ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:
доктор биологических наук,
профессор
Петричук Светлана Валентиновна
доктор медицинских наук,
профессор
Фисенко Андрей Петрович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 24
1.1. Современные взгляд на этиопатогенез и клинические проявления при иммунозависимых заболеваниях у детей 24
1.1.1. Особенности этиопатогенеза, клинических проявлений воспалительных заболеваний кишечника у детей 24
1.1.2. Особенности этиопатогенеза, клинических проявлений псориаза у детей .. 27
1.1.3. Особенности этиопатогенеза, клинических проявлений рассеянного склероза у детей 29
1.2. Малые популяции лимфоцитов и миелоидные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе иммунозависимых заболеваний 30
1.2.1. Малые популяции лимфоцитов и миелоидные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе воспалительных заболеваний кишечника 30
1.2.2. Малые популяции лимфоцитов и миелоидные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе псориаза 37
1.3. Современный взгляд на исследование митохондриальной дисфункции при иммунозависимых заболеваниях 46
1.4. Роль эктонуклеотидаз CD39/CD73 в патогенезе иммунозависимых заболеваний 52
1.5. Роль цитокинов в иммунопатогенезе иммунозависимых заболеваний 56
1.5.1. Роль цитокинов в иммунопатогенезе воспалительных заболеванияй кишечника 59
1.5.2. Роль цитокинов в иммунопатогенезе псориаза 62
1.5.3. Роль цитокинов в иммунопатогенезе рассеянного склероза 64
1.6. Изучение ядерного фактора транскрипции кВ при иммунозависимых заболеваниях у детей..... 66
1.7.1. Современная диагностика воспалительных заболеваний кишечника у детей 68
1.7.2. Современная диагностика псориаза у детей 70
1.7.3. Современная диагностика рассеянного склероза у детей 71
1.8. Особенности лечения детей с иммунозависимыми заболеваниями 74
1.8.1. Особенности лечения детей с воспалительными заболеваниями кишечника 74
1.8.2. Особенности лечения детей с псориазом 78
1.8.3. Особенности лечения детей с рассеянным склерозом 82

1.9. Мониторинг концентрации биологических препаратов и антител к ним в сыворотке крови у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями 85
1.9.1. Мониторинг концентрации блокаторов TNF и антител к ним в сыворотке крови у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника 85
1.9.2. Мониторинг концентрации адалимумаба и антител к ним в сыворотке крови у пациентов с псориазом 87
1.9.3. Мониторинг концентрации INFβ-1a и антител к ним в сыворотке крови у пациентов с рассеянным склерозом 88
1.10. Заключение к главе 88
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 90
2.1. Клинико-анамнестические сведения о пациентах 90
2.2. Лабораторные методы 97
2.2.1. Фенотипирование популяций клеток 97
2.2.2. Определение АТФ-азной активности регуляторных Т-клеток 100
2.2.3. Изучение активности митохондриальных ферментов (СДГ и ГФДГ) в лимфоцитах 102
2.2.4. Количественное определение цитокинов методом мультиплексного анализа 103
2.2.5. Количественное определение белков окислительного фосфорилирования методом мультиплексного анализа 104
2.2.6. Исследование белков гликолиза методом мультиплексного анализа 105
2.2.7. Измерение концентрации блокаторов TNF и антител к ним 106
2.2.8. Исследование активности NF-κB в популяциях лимфоцитов 108
2.3. Статистический анализ и методы представления данных 110
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 113
3.1. Показатели клеточного иммунитета в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями 113
3.1.1. Показатели популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника 113
3.1.2. Показатели основных и малых популяций Т-хелперных лимфоцитов в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с вульгарным псориазом 144
3.1.3. Показатели основных и малых популяций Т-хелперных лимфоцитов в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с рассеянным склерозом 153
3.1.4. Оценка содержания миелоидных клеток-супрессоров у детей с иммунозависимыми заболеваниями 169

3.1.5. Оценка популяций Т-клеток памяти при иммунозависимых заболеваниях184

3.2. Метаболическая активность популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями 204

3.2.1. Метаболическая активность популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности блокаторов TNF у детей с воспалительными заболеваниями кишечника 205

3.2.2. Метаболическая активность популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности ADA у детей с вульгарным псориазом 235

3.2.3. Метаболическая активность популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности INFβ-1a у детей с рассеянным склерозом..... 249

3.2.4. Оценка содержания белков окислительного фосфорилирования и гликолиза в лизатах лимфоцитов у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями и в группе сравнения 265

3.2.5. Оценка содержания малых популяций Т-хелперов, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями 272

3.2.5.1. Содержание малых популяций CD4+ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73 и АТФ-азная активность CD39 в Treg у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника 273

3.2.5.2. Содержание малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у пациентов с вульгарным псориазом 287

3.2.5.3. Содержание малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у пациентов с рассеянным склерозом 296

3.3. Концентрация циркулирующих цитокинов и цитокиновых комплексов у детей с иммунозависимыми заболеваниями 308

3.3.1. Уровень цитокинов и цитокиновых комплексов у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями в состоянии ремиссии и обострения 308

3.3.2. Уровень цитокинов и цитокиновых комплексов у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями при разной эффективности ГИБП 324

3.3.3. Взаимосвязь циркулирующих цитокинов и метаболизма популяций лимфоцитов у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями 343

3.4. Содержание клеток с транслокацией фактора транскрипции NF-κB у детей с иммунозависимыми заболеваниями 345

3.5. Оценка остаточного уровня инфликсимаба и адалимумаба и антител к блокаторам TNF у пациентов с болезнью Крона, язвенным колитом и псориазом 368

3.6. Выживаемость биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями 383
3.6.1. Выживаемость блокаторов TNF у детей с ВЗК 384
3.6.2. Выживаемость адалимумаба у детей с вульгарным псориазом 394
3.6.3. Выживаемость интерферона β-1α у детей с рассеянным склерозом 398
3.7. Проверка прогностической ценности иммунологических маркеров при лечении биологическими препаратами у детей с ИЗЗ 402
3.7.1. Алгоритм иммунологического обследования пациентов с ВЗК, ПС и РС . 410
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 413
4.1. Показатели клеточного иммунитета у пациентов с ИЗЗ в зависимости от клинического состояния и ответа при лечении ГИБП 417
4.2. Метаболизм лимфоцитов у детей с иммунозависимыми заболеваниями в зависимости от клинического состояния и эффективности лечения ГИБП 426
4.3. Уровень цитокинов и цитокиновых комплексов у детей с ИЗЗ в зависимости от стадии заболевания и эффективности лечения ГИБП 436
4.4. Информативность оценки ядерного фактора транскрипции κB в популяциях лимфоцитов у детей с ИЗЗ в зависимости от формы патологии, тяжести состояния и эффективности ГИБП 444
4.5. Информативность определения концентрации блокаторов TNF в сыворотке крови у пациентов с ВЗК и ПС 450
4.6. Влияние клинико-анамнестических факторов и иммунологических показателей на выживаемость биологической терапии у пациентов с ИЗЗ 456
4.7. Алгоритм иммунологического обследования для прогноза эффективности ГИБП у пациентов с ИЗЗ 460
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 467
ВЫВОДЫ 469
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 476
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 478
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 483

ВВЕДЕНИЕ

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 [Conrad 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 β-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 (α4β1, α4β7) 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 обусловливают 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 β-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 сигналам 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 β-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 κB (NF-κB) 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-κB вносит существенный вклад в патогенез ВЗК, ПС, РС и др. [McDaniel D. et al., 2016; Zhang Q. et al., 2017; Abdallah H.B. et al., 2021; Sharfe N. et al., 2023,]. Мониторирование активности транскрипционного фактора κB может использоваться для оценки интенсивности воспалительного процесса при ИЗЗ [Aksentijevich I. et al., 2017; Irrera 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, NK-клеток и минорных популяций $CD4^+$ 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 $CD4^+$ и $CD8^+$ 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 κB 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 $CD4^+$ 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-α, 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 М1 макрофагами (IL-1,IL-6,TNF-α), Т-хелперами 1 типа (IFN-γ,IL-12p70,TNF-β,IL-2), Th17-лимфоцитами (IL-1β,IL-6,IL-17A, IL17-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 М1 и Th1, что подтверждает значимость Th1-клеток, М1 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-1β, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN-γ, TNF-α, CCL20/MIP3α) в крови, что подтверждает функциональную связь между внутриклеточным метаболизмом иммунных клеток и интенсивностью цитокинового ответа.

Впервые показано, что активность ядерного фактора транскрипции κВ (NF-κВ) зависит от популяции клеток (в В-лимфоцитах значимо выше, чем в Т- и NK-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 $CD8^+$ Т-клетках, NK-клетках, цитотоксических Th17-лимфоцитах), от формы патологии (при

воспалительных заболеваниях кишечника выше, чем при псориазе и рассеянном склерозе). Увеличение содержания клеток с транслокацией NF-κB в популяции NK-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 κB до начала терапии и значимым снижением доли клеток с транслокацией NF-κB 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-κB в NK-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 имунозависимыми 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 применен 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 вышеперечисленного 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 α-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 κB 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 иммунодефециты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний», п. 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологогических 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 программам 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 «ORPHA-DA. 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные взгляд на этиопатогенез и клинические проявления при иммунозависимых заболеваниях у детей

1.1.1. Особенности этиопатогенеза, клинических проявлений воспалительных заболеваний кишечника у детей

Более 200 миллионов человек во всем мире больны аутоиммунными и аутовоспалительными заболеваниями [603].

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это хроническое заболевание, в основе которого лежит иммуноопосредованное воспаление, приводящее к повреждению отделов желудно-кишечного тракта (ЖКТ). Патологический процесс носит рецидивирующий характер, часто переходящий в системный характер с развитием разнообразных внекишечных осложнений [30, 89]. Среди ВЗК по международной классификации выделяют болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК). Существует понятие о недифференцированном колите (НДК), который характеризуется клиническими и эндоскопическими признаками хронического колита без специфических черт ЯК или БК [555]. В ряде исследований у детей показано, что до 80% пациентов с НДК реклассифицируются в БК или ЯК [402, 429]. Болезнь Крона и язвенный колит отличаются распространенностью процесса и глубиной поражения. Так, при БК воспалительный процесс может поражать всю толщу кишечной стенки в любом отделе ЖКТ, с типичной локализацией в илеоцекальной области, с частыми локальными и системными осложнениями. ЯК может поражать только слизистую оболочку толстой и прямой кишки. Для ВЗК характерны следующие клинически проявления: геморрагическая диарея, боль в животе, тенезмы, императивные позывы к эвакуации, анорексия и потеря веса [529]. Раннее начало ВЗК, как правило, имеет более тяжелое течение и сопровождается нарушением роста и

развития ребенка. [33]. В больших когортных исследованиях пациентов с ВЗК установлено, что у 15% детей заболевание начинается в возрасте до 6 лет, а у 1% – до 1 года [329]. По последним опубликованным данным распространенность БК на 100 тыс. населения с 2014 по 2019 увеличилась с 6,02 до 18,88, а для ЯК – 11,62 до 36,08. В 2020 г. произошло снижение случаев распространенности для БК и ЯК до 16,59 и 32,91 соответственно, что связывают с эпидемией новой коронавирусной инфекции и значительным ростом смертности населения РФ в 2020 г. [23]. Пик заболеваемости ВЗК приходится на 2-3-е десятилетие жизни, при этом 20-25% случаев диагностируют в детском возрасте [12, 30]. Клиническую активность ВЗК оценивают с помощью индексов (Pediatric Crohn Disease Activity Index (PCDAI) при БК; Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) при ЯК), включающие оценку клинических симптомов (боль в животе, ректальное кровотечение, консистенцию стула, наличие ночной дефекации , количество дефекаций за сутки), физикальное обследование, рост, лабораторные тесты (маркеры воспаления) [519].

Существует устоявшееся мнение, что в возникновении ВЗК играет роль совокупность факторов: генетических, иммунологических, экологических, микробиологических факторов и взаимодействие между ними [233]. В 2001 году впервые был описан ген, связанный с возникновением болезни Крона – *NOD2*. Описано 2 основные мутации, ассоциированные с БК: R702W и G908R [236]. Этот ген кодирует белок, выступающий в качестве рецептора для распознавания компонентов бактериальной стенки патогенных бактерий (PRR – pattern recognize receptor). PRR стимулирует аутофагию в эпителиальных клетках и моноцитах кишечника. Далее было показано, что еще ряд мутаций в генах приводят к возникновению ВЗК, например, ген *ATG16L1*, также ответственный за аутофагию [246]. Показано, что мутации рецептора IL-10 (IL-10RA и IL-10RB) могут привести к колиту [102, 465]. В настоящий момент обнаружено около 240 генных локусов, ответственных за предрасположенность и возникновение ВЗК. Для 30 локусов продемонстрирована прямая ассоциация с ЯК и БК [281]. С помощью молекулярно-генетического секвенирования выявлены около 70 генов, дефекты в которых обуславливают развитие моногенных ВЗК (ВЗК-подобные заболевания),

ассоциированных с первичными иммунодефицитными состояниями (ПИДС) [87]. При этом данные состояния фенотипически сходны с «классическим» ВЗК и затрудняют диагностировать ПИДС [552]. С настороженностью необходимо относится к случаям раннего дебюта ВЗК (до 2 лет) и помнить о возможной маскировке ПИДС.

Важной задачей в исследованиях ВЗК является понимание механизма каким образом генетическая предрасположенность, нарушения в иммунной системе и кишечной микробиоте под действием неблагоприятных факторов окружающей среды приводят к хроническому воспалению кишечника. Остаются невыясненными вопросы: является ли воспаление кишечника основным фактором, влияющим на состав микробиоты и возможно ли определить влияние генетических факторов на микробиом кишечника у людей с диагнозом ВЗК. До сих пор нет понимания являются ли нарушения микробиоты причиной или следствием воспаления [110]. Многие генетические мутации, ассоциированные с ВЗК, связаны с взаимодействием иммунной системы и микробиоты. Микробиом способен активировать экспрессию генов, связанных с ВЗК [466]. Предполагается, что гены восприимчивости к ВЗК, участвующие в распознавании и элиминации патогенов, такие как *NOD2*, *ATG16L1*(связанный с аутофагией), *CARD9* (член семейства доменов рекрутирования каспаз 9) и *CLEC7A* (домен лектина С-типа), влияют на дисбактериоз [203, 356, 499, 626]. В основе иммунопатогенеза ВЗК лежит запуск провоспалительных сигнальных путей, который происходит вследствие нарушения распознавания бактериальных паттернов дендритными клетками. При этом отмечается дисбаланс между популяциями Th1, Th17, Th9, Th22-клеток и регуляторными клетками (Treg, MDSCs, Breg) с последующей гиперпродукцией цитокинов, в частности, IL-13, IL-23, TNF [12].

1.1.2. Особенности этиопатогенеза, клинических проявлений псориаза у детей

Псориаз, как и любое иммунозависимое заболевание, характеризуется хроническим течением. Заболевание возникает у генетически предрасположенного индивидуума под действием множества триггерных факторов, сопровождающееся гиперпролиферацией кератиноцитов с нарушением их дифференцировки, а также дисбалансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (ЦК) [162, 430]. В разных странах распространенность псориазом у детей и подростков оценивается в пределах от 0,5 до 2% [16]. В России распространенность псориаза у детей 15-17 лет самая высокая – 326,0 на 100 тыс. населения [88]. У детей в 70% случаев встречается вульгарный псориаз, характеризующийся мономорфными эритематозными бляшками с тонкими пластинчатыми чешуйками серебристого цвета. Поражение волосистой части головы у детей с псориазом встречается довольно часто (около 80%) [2]. Псориатическое изменение ногтей (ониходистрофия) встречается приблительно в 39% случаев [412]. 30% случаев у детей приходится на каплевидный псориаз (розовато-оранжевые мелкие папулы разной формы, менее 1 см), с локализацией на коже груди, живота и спины [14] . Инверсный псориаз (ИП) у детей наблюдается чаще, чем у взрослых и поражает складки кожи с локализацией в ягодичных, паховых складках, под молочными железами, в области пупка, за ушами, в сгибах локтей, в подколенных ямках. Часто псориатические бляшки при ИП осложняются вторичной инфекцией, в частности стрептококковой [85]. Для оценки тяжести псориаза пытались использовать разные шкалы и индексы, но наиболее полно отражающее состояние кожи пациента с псориазом является шкала PASI – индекс площади и тяжести псориатических поражений [55]. PASI складывается из суммы процентного поражения кожи головы, туловища, рук и ног [36, 55]. Согласно современным преставлениям, развитию псориаза способствуют нарушения реакций врожденного и адаптивного иммунитета у индивидуума с генетической предрасположенностью под действием ряда триггеров и факторов риска, играющих важную роль в поддержании воспалительного процесса в коже [579]. Наследственная предрасположенность -

один из ведущих факторов, оказывающих влияние на патогенез, механизмы развития и течения псориаза. Исследования, проведенные в семьях, страдающих псориазом, выявили в хромосомах локусы восприимчивости к псориазу. Наиболее значимой является область *PSORS1*, ответственная за 35-50% случаев наследственного псориаза [216]. Также в этой области найден ген – *HLA-Cw6* (у 7,2-10,5% пациентов) и показана его роль в презентации антигена и регуляции функции цитотоксических Т-клеток при псориазе [358]. К факторам риска развития псориаза, помимо генетических, относят инфекции, вызванные β-гемолитическими стрептококками (групп A, C, G – М-белки могут имитировать детерминанты кератина с последующей активацией псориатических Т-клеток), стресс, курение, способствующее у подростков развитию тяжелых форм псориаза, а также нарушение микробиоты кишечника и кожи [14, 160].Прием ряда препаратов, таких как литий, бета-адреноблокаторы, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, интерфероны, нестероидные противоревматические препараты и противомалярийные препараты, могут вызвать начало псориаза или ухудшение его [579]. Показана связь между ожирением и развитием псориаза у детей [59]. Установлена ключевая роль иммунной системы в патогенезе псориаза. Повреждение кератиноцитов приводит к образованию аутоантигенов, например, LL-37, который стимулирует плазмацитоидные дендритные клетки (DC) к выработке каскада провоспалительных цитокинов [260]. Активированные DC затем продуцируют TNF-α, IL-12 и IL-23, активирующие дифференцировку и пролиферацию наивных Т-лимфоцитов в эффекторные популяции лимфоцитов Th1, Th17 и Th22, которые, в свою очередь, приводят к выработке ЦК и возникновению их неконтролируемой продукции с усилением воспаления [207].

1.1.3. Особенности этиопатогенеза, клинических проявлений рассеянного склероза у детей

Рассеянный склероз – это хроническое, демиелинизирующее заболевание, приводящее к множественному очаговому и диффузному поражению центральной нервной системы (ЦНС) с последующей инвалидизацией. Примерно 2,8 миллиона человек в мире больны РС [590]. По МКБ 10 клинические формы РС выделяют по типу течения заболевания: ремиттирующий; первично-прогрессирующий; вторично-прогрессирующий; первично-прогрессирующий РС с обострениями. Основными формами течения считается рецидивирующе-ремиттирующий (РР) и первично-прогрессирующий РС [37, 96]. Распространенность РС в России колеблется от 36-79 случаев на 100 тысяч населения в разных регионах. Дети составляют 4-5% от всех пациентов [6] . Средний возраст дебюта составляет 14,2±1,3 года [6]. При РС у детей может наблюдаться широкий спектр клинических проявлений, в том числе сенсорные, стволово-мозжечковые и моторные симптомы, неврит зрительного нерва [96]. РС у детей имеет особенности и отличается от заболевания у взрослых. Дети в 98% случаев имеют РР форму течения РС. У детей, в сравнении со взрослыми, рецидивы заболевания более частые, а инвалидизация наступает на 10 лет раньше [37, 96]. Этиопатогенез РС не до конца изучен, в настоящий момент считается, что заболевание возникает у генетически детерменированного индивидуума под действием различных неблагоприятных факторов [223]. Открыто более 200 генов, имеющих корреляцию с РС. Однако, доказана значимость только для нескольких ассоциированных локусов, таких как *HLA-A*02:01* и *HLA-DRB1*15:01*, генов, кодирующих α-цепи рецепторов IL-2 и IL-7 [471]. Предполагается, что РС вызывается активацией периферических аутореактивных Т-клеток (ауто-Т-клетки), которые мигрируют в ЦНС и инициируют патологический процесс [223]. Большинство ауто-Т-клеток удаляется в тимусе (центральная толерантность), однако небольшое количество попадает на периферию. В норме Treg контролируют периферические механизмы толерантности, ингибируя активность ауто-Т-клеток и антиген-презентирующих

клеток через межклеточное взаимодействие и секрецию противовоспалительных цитокинов [459]. При нарушении периферической толерантности, к которому причастны, помимо генетических, ряд факторов (вирус Эпштейн-Барр, особенности микробиоты кишечника), которые посредством молекулярной мимикрии могут приводить к повреждению ЦНС [444]. Ауто-Т-клетки (CD8+Т-клетки, Th1 и Th17-клетки) и В-лимфоциты опосредованно через ЦК активируют реакции клеточного и гуморального иммунитета в ЦНС. Происходит активация резидентных иммунных клеток ЦНС (микроглия, астроциты, макрофаги), которые в свою очередь, вырабатывают ЦК, усиливающие функции эффекторных клеток [251].

1.2. Малые популяции лимфоцитов и миелоидные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе иммунозависимых заболеваний

1.2.1. Малые популяции лимфоцитов и миелоидные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе воспалительных заболеваний кишечника

Желудочно-кишечный тракт постоянно подвергается воздействию различных антигенов. В норме постоянство гомеостаза кишечника осуществляется за счет подавления избыточного иммунного ответа на чужеродные антигены (непатогенные комменсальные бактерии, пищевые антигены). При попадании патогенных бактерий происходит развитие воспалительной реакции [92]. Ключевым дефектом, приводящим к ВЗК является иммунная дисфункция с преобладанием провоспалительных реакций в слизистой оболочке кишечника, направленных против бактерий у генетически предрасположенных индивидуумов [608] на фоне снижения микробного разнообразия [489] и при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды [220, 360] (Рисунок 1.1).

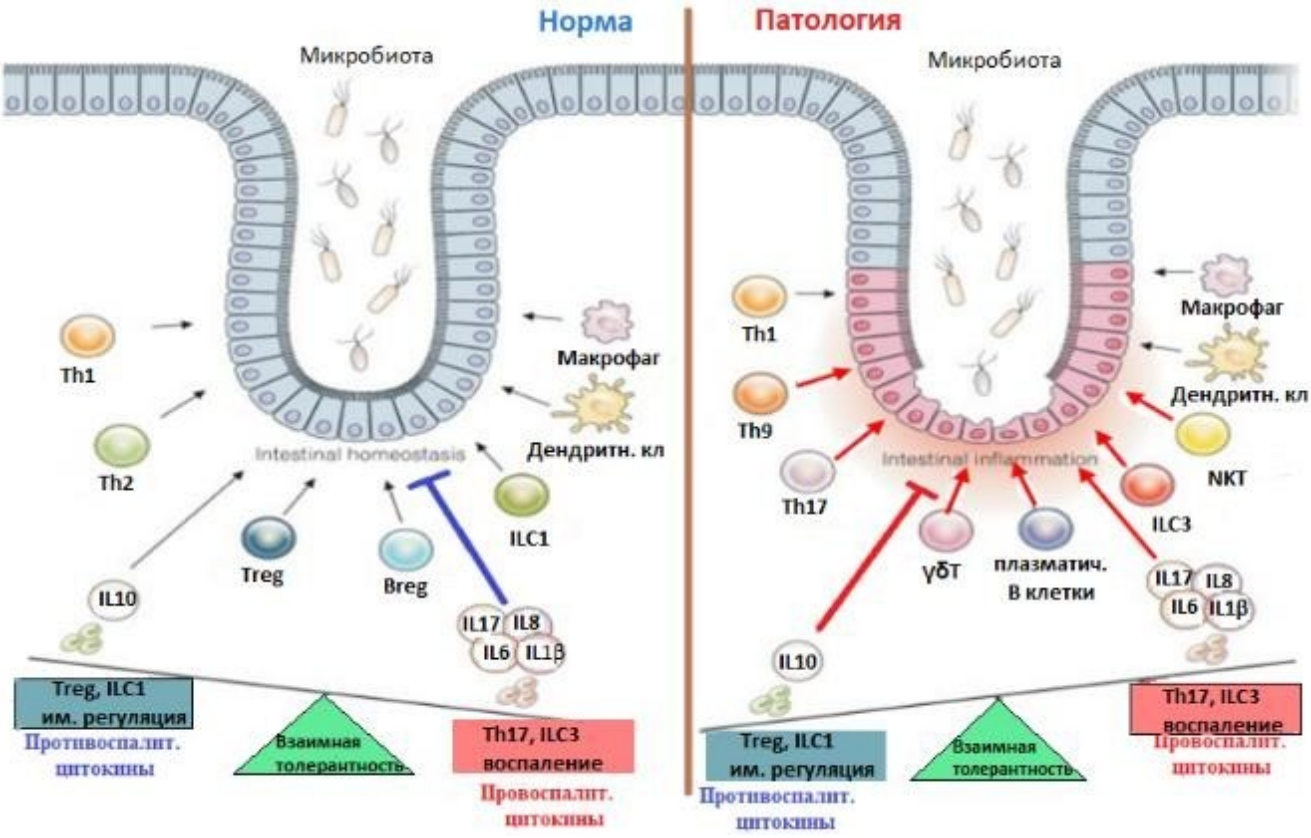


Рисунок 1.1 – Патогенез ВЗК. Основные участники. Адаптировано из статьи Lee SH et al. [360]

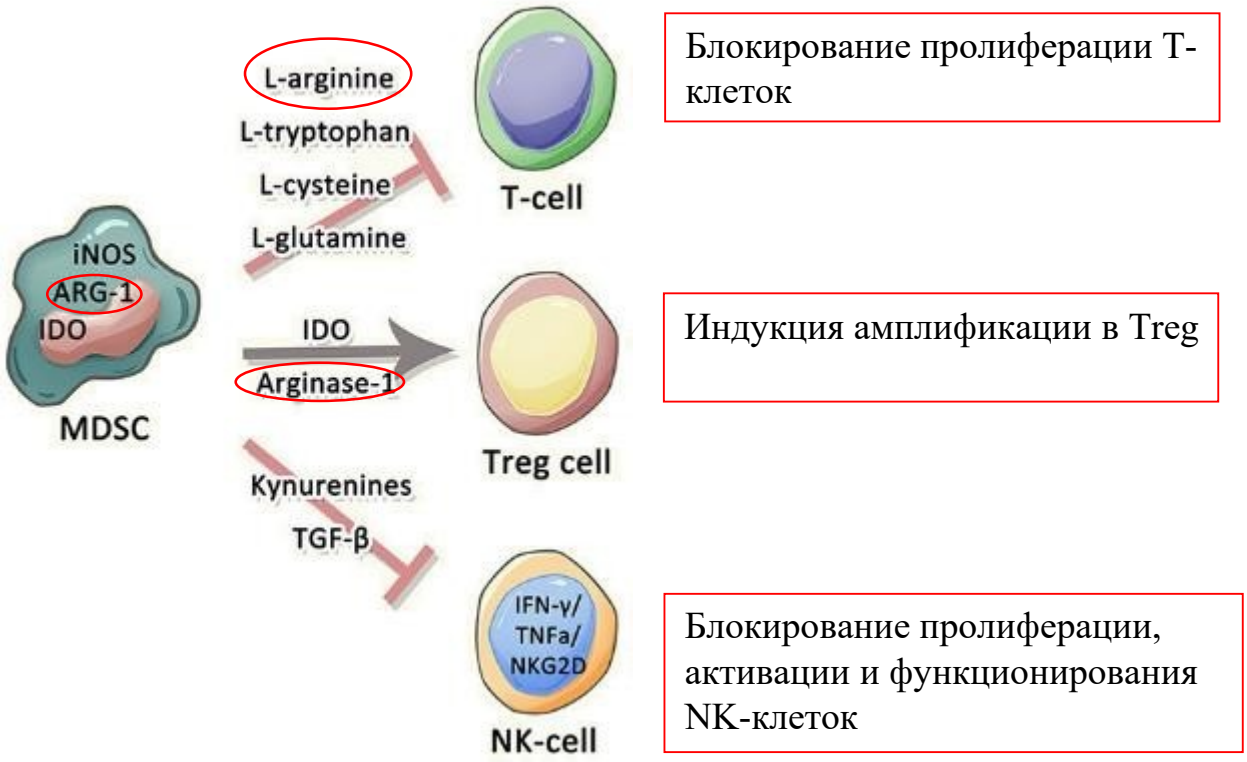
Ведутся дискуссии, что первично – нарушение целостности и проницаемости желудочно-кишечного барьера, состоящего из слоя слизи и кишечного эпителия, или это последствия воспалительной реакции при ВЗК [419]. В биоптатах кишечника пациентов с ВЗК найдены изменения в экспрессии антимикробных пептидов и экспрессии соединительных белков (Е-кадгерин, β-катенин), подтверждающие роль нарушения барьера в патогенезе ВЗК [333].

В иммунопатогенезе ВЗК принимают участие как врожденная иммунная система, так и адаптивная. Макрофаги (МФ), ДК, нейтрофилы, NKT-клетки и ILC-клетки (клетки врожденного иммунитета) являются первой линии защиты слизистой оболочки. При нарушении барьерной функции эпителия нейтрофилы усиливают воспаление кишечника, высвобождая большое количество медиаторов [220].

В норме МФ и ДК кишечника гипореактивны. Резидентные макрофаги в собственной пластинке не экспрессируют CD14, не функционируют как

профессиональные АПК, не инициируют воспалительную реакцию [117, 281]. МФ и ДК через Toll-подобные рецепторы (TLR) и NOD-подобные рецепторы (NLR) связываются с патоген-ассоциированными молекулярными структурами (PAMP) на патогенах и активируют различные сигнальные пути с последующей выработкой провоспалительных цитокинов, хемокинов и антимикробных пептидов [498]. Макрофаги, выделенные из слизистой оболочки пациентов с ВЗК, экспрессируют CD14 и при антигенной стимуляции продуцируют высокие уровни IL-12 и IL-23 [383]. Показана двойственная роль NK-клеток в патогенезе ВЗК. С одной стороны, NK-клетки уничтожают патогенны, контролируют и убивают опухолевые клетки, обеспечивая гомеостаз кишечника. С другой стороны, продемонстрированно, что увеличение NK-клеток с повышенной активацией способствует развитию ВЗК [609]. NKT-клетки, другой тип клеток врожденного иммунитета, распознают патогенные фосфолипиды или гликолипиды, представленные АПК, продуцируют цитокины, приводя к активации клеток врожденной и адаптивной иммунной системы [144]. У пациентов с ВЗК NK и NKT-клетки экспрессируют повышенные уровни активационных маркеров - CD25, CD28 и CD69 [300, 350]. Активно изучаются клетки врожденного иммунитета – ILC (ILC 1, 2 и 3 типа). Показана роль разных типов ILC-клеток в инициации реакции на попадание патогенов и повреждение эпителия [426, 435]. Так, при БК найдены значимые количества ILC 1 типа. В то время, как у пациентов с ЯК повышенные уровни экспрессии NKp44^{-}ILC3 [247, 511]. Миелоидные супрессорные клетки (миелоидные клетки-супрессоры, клетки-супрессоры миелоидного происхождения – MDSCs) – это популяция незрелых миелодных клеток, образующаяся под действием стимуляции TLR, DAMPs, PAMPs и играющая немаловажную роль при аутоиммунных заболеваниях (АИЗ) [31, 421]. MDSCs начинают свое развитие от гемопоэтических стволовых клеток, обладают слабой фагоцитарной активностью и оказывают супрессирующее воздействие на Т-эффекторы [606]. Среди MDSCs различают 2 основные популяции: моноцитарную и гранулоцитарную [255, 421]. Супрессорную функцию миелоидные супрессорные клетки реализуют за счет прямого контакта с клетками,

истощения аминокислот в микроокружении Т-клеток (снижения концентрации L-аргинина), которые необходимы им для метаболизма при осуществлении эффекторных функций. В результате увеличения секреции ряда медиаторов (аргиназа, индуцибельная синтаза оксида азота, индоламиндиоксигеназа) ингибируется синтез ζ-цепи TCR, активируется апоптоз Т-лимфоцитов и стимулируется увеличение количества Treg (Рисунок 2) [496, 606].



Примечание: MDSC – миелоидные клетки – супрессоры, ARG-1 – аргиназа-1, iNOS - индуцибельная синтаза оксида азота, IDO – индоламиндиоксигеназа

Рисунок 1.2 – Механизмы воздействия MDSCs на эффекторные клетки адаптивного иммунного ответа (истощение запаса аминокислот необходимых для метаболизма Т-клеток). Адаптировано из статьи Xu D et al. [606]

Имеются противоречивые данные о роли популяций MDSCs. Так, например, было показано, что увеличение MDSCs способствовало прогрессированию заболевания у пациентов с раком поджелудочной железы [268]. У пациентов с ЯК продемонстрировано, что увеличение количества MDSCs способствовало активации эффекторных Т-клеток и возникновению рака в толстом кишечнике толстой кишки [591, 594]. В то же время, в эксперименте на мышах показано, что

перенос MDSCs приводил к снижению воспаления и восстановлению слизистой оболочки толстой кишки за счет привлечения Treg и подавления секреции IL-17A и TNF-α, а элиминация MDSCs вызывала ухудшение колита [627]. Известно, что популяции MDSCs могут выполнять разнонаправленные функции. В эксперименте на мышах продемонстрировано, что популяция M-MDSCs оказывала подавляющее действие на пролиферацию Т-клеток [284, 604]. При этом, в другом экспериментальном исследовании описано, что популяция G-MDSCs усиливала пролиферацию Т-клеток [339]. Интересно отметить возможное участие MDSCs в дифференцировке Th17-клеток под действием Arg-1 и IL-1, что было продемонистрировано в эксперименте на мышах при СКВ и при аутоиммунном миокардите [602, 605]. Высокий уровень Arg-1 способствовал усилению продукции IL-17A, но при этом снижался уровень IL-17F в толстой кишке мышей и уменьшению активности колита, [391]. Таким образом, MDSCs могут обладать как провоспалительными, так и противоспалительными функциями в зависимости от микроокружения и стадий ИЗЗ, и необходимо дальнейшее изучение роли этой популяции клеток [635].

Дисрегуляция врожденной иммунной системы вызывает функциональные нарушения адаптивной иммунной системы, что характерно для хронических воспалительных процессов при ВЗК [281]. В отличие от клеток врожденного иммунитета, клетки адаптивного иммунитета высокоспецифичны, образуют клетки-памяти. Ключевыми игроками адаптивного иммунного ответа являются Т-клетки, которые активируются клетками врожденного иммунитета и антигенами лимфоидной ткани кишечника (GALT), дифференцируясь в различные подмножества (эффекторные, регуляторные Т-клетки и Т-клетки памяти) (Рисунок 1.3) [299, 385].

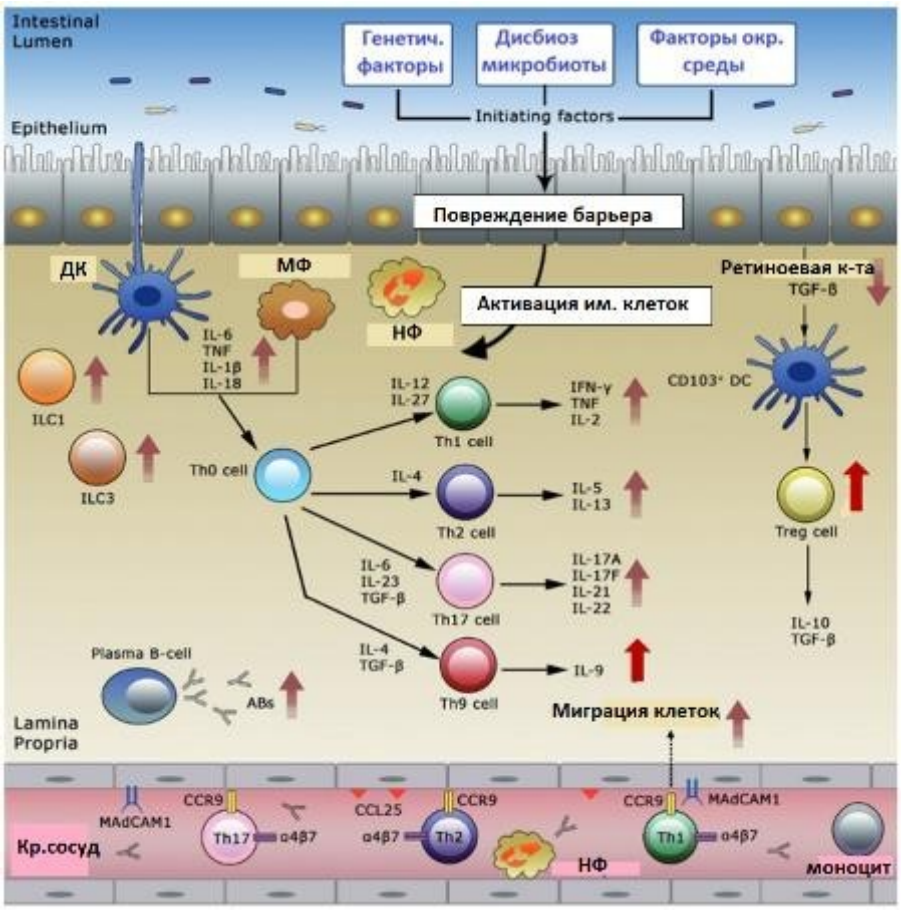


Рисунок 1.3 – Иммунопатогенез ВЗК. Адаптировано из статьи Qingdong Guan et al. [299]

При БК реакции адаптивного иммунитета в большей степени обусловлены клетками Th1/Th17, тогда как при ЯК – Th2-клетками [271]. Образование подмножества Th1-клеток индуцируются под действием IL-12 с секрецией IFN-γ, TNF-α и IL-2, приводящей к привлечению в очаг повреждения макрофагов, NK-клеток и CD8 Т-клеток [180, 478]. У пациентов с ВЗК в слизистой оболочке кишечника и собственной пластинке содержится гораздо больше Th17, IL-17 и IL-23 по сравнению со здоровыми людьми [335]. Действие IL-13 на наивные Т-клетки приводит к образованию Th2-клеток, которые начинают продуцировать IL-4, IL-5 и IL-13 [642]. При этом, цитокины Th2-профиля ингибируют образование Th1-клеток [478]. Наивные CD4 Т-клетки в присутствии TGF-β дифференцируются в iTreg (индуцибельные). Клетки iTreg и регуляторные Т-клетки (nTreg) регулируют гомеостаз [484]. Treg выполняют регуляторную функцию, продуцируя IL-10 и TGF-β и экспрессируя, ингибирующие молекулы, в частности CTLA-4

[600]. Treg в слизистой кишечника подавляют реакции, обусловленные Th17-клетками через RORγt [448]. Treg обладают пластичностью и в присутствии IL-6 трансформируются в Th17-клетки [475]. Продемонстрирована роль Th17-клеток в развитии воспаления при ВЗК. Выявлены гены предрасположенности к ВЗК, связанные с Th17 – *JAK2, STAT3, IL-23R, IL-12B* и *CCR6* [237]. Th17-клетки индуцируются под действием IL-6 и TGF-β и при экспрессии STAT3, а их пролиферации способствует IL-23 [188, 257].Th17-клетки продуцируют различные цитокины, в том числе, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-8, привлекая нейтрофилы и эффекторные лимфоциты в очаг воспаления [257]. У пациентов с ВЗК наблюдаются повышенные уровни IL-17A и IFN-γ [256, 589]. В последние годы активно изучается подмножество Th9-клеток, названных так из-за продукции ими IL-9. Th9 индуцируются под действием IL-4 и TGF-β в присутствии нескольких транскрипционных факторов [597]. Показано увеличение количества Th9-клеток в слизистой оболочке кишечника у пациентов с ЯК [588]. IL-9 блокирует пролиферацию эпителиальных клеток кишечника, подавляя экспрессию нескольких белков плотного соединения, тем самым нарушая барьерную функцию кишечника [261].

Популяция Th9 лимфоцитов ответственна за развитие хронического воспаления кишечника и отражает активность заболевания. У пациентов с ЯК с тяжелым течением наблюдаются гораздо большие уровни IL-9 по сравнению с пациентами с легким течением заболевания [437]. Т-клетки памяти, характеризующиеся повышенной экспрессией CD69 и CD103 в слизистой оболочке кишечника, играют немаловажную роль в поддержании хронического воспаления [390]. Количество клеток памяти увеличено как при ЯК, так и при БК [183]. В-клетки кишечника выполняют супрессорную функцию, изменяя эффекторные реакции за счет выработки IL-10 [125].

1.2.2. Малые популяции лимфоцитов и миелоидные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе псориаза

Основой иммунопатогенеза псориаза является иммунологическая дисрегуляция у генетически детерменированного индивидуума, которая приводит к неконтролируемой выработке каскада провоспалительных цитокинов активированными клетками иммунной системы [192]. При псориазе доказано активное участие клеток врожденного и адаптивного иммунитета [4]. Дендритные клетки (DC), Th17-клетки и кератиноциты (КЦ) составляют патогенную триаду при псориазе [528]. При ПС различают фазу инициации и фазу поддержания заболевания [579]. Тригерные факторы (стресс, травма, курение, лекарства), вызывая повреждение кератиноцитов, приводят к увеличению ими продукции различных антимикробных белков (S100, β-дефензины и LL-37 - кателицидин), которые связываются с фрагментами собственной ДНК или РНК, образуя DAMP (Рисунок 1.4). Далее такие DAMP активируют плазмоцитоидные DC (pDC), миелоидные дендритные клетки (mDC) и клетки Лангерганса через Toll-like рецепторы (TLR7, TLR8, TLR9) с последующим синтезом ряда цитокинов IFN-α, IFN-β, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-18, приводя к нарушению пролиферации и дифференцировки клеток эпидермиса [53, 495] (Рисунок 1.4).

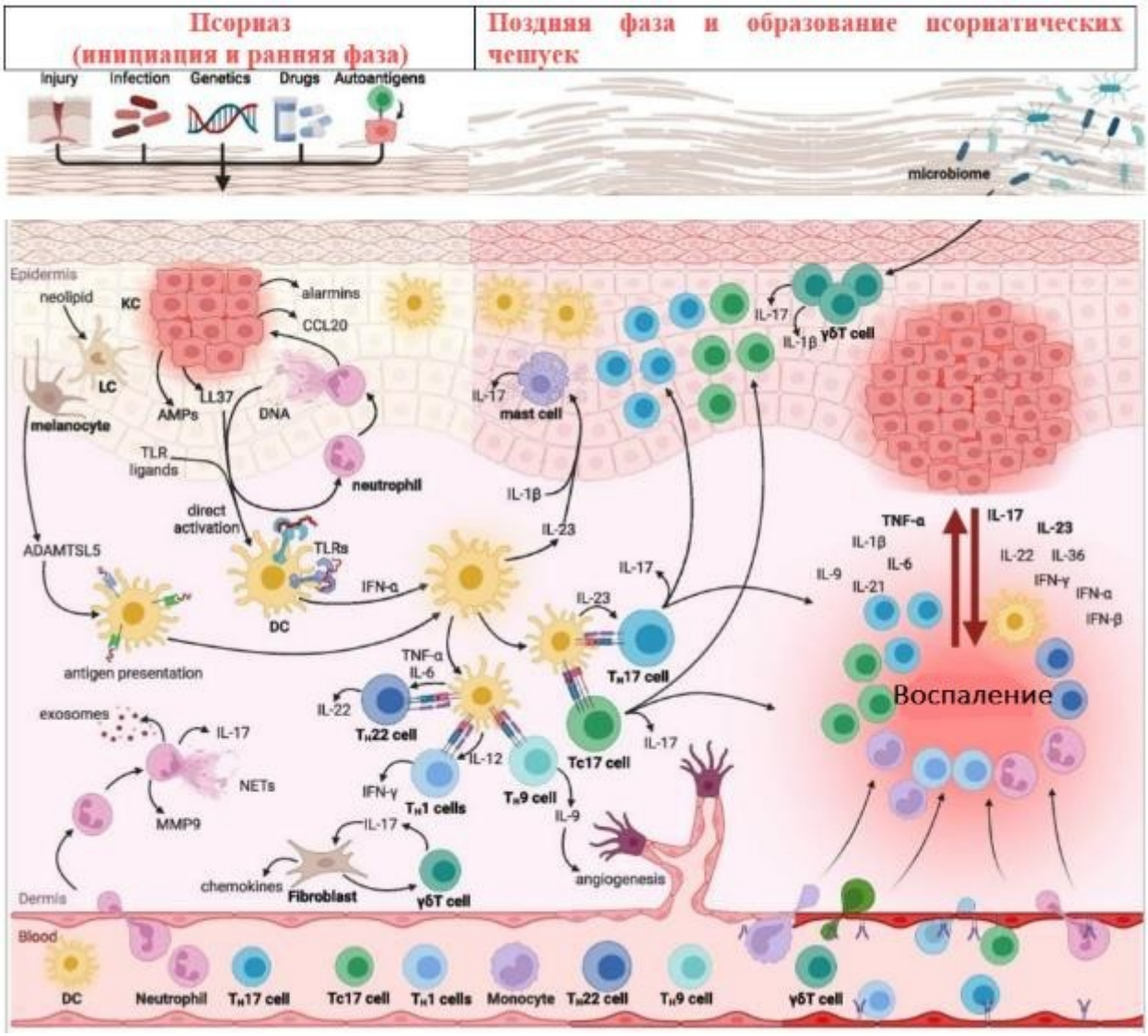


Рисунок 1.4 – Модель иммунопатогенеза псориаза. Адаптировано из статьи Sieminska I et al. [528]

Ключевым цитокином фазы инициации считается IFN-α, который активирует резидентные mDC к созреванию и миграции в периферические лимфатические узлы [260]. Кроме того, IFN-α, высвобождаемый pDC, индуцирует дифференцировку моноцитов в воспалительные DC (iDC), а также поляризацию $CD4^+$ Т-клетки в Th1 и Th17 [320]. Показано увеличение количества pDC у людей с псориазом по сравнению со здоровыми [396]. Дендритные клетки под действием активационных сигналов увеличивают выработку оксида азота, что приводит к вазодилатации дермальных кровеносных сосудов в пораженной коже пациентов с псориазом и облегчению миграции клеток в очаг поражения [200].

В фазе инициации псориаза нейтрофилы проникают в кожу и высвобождают нейтрофильные внеклеточные ловушки, экзосомы, металлопротеиназу 9, внеклеточные везикулы и IL-17A, усиливая экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов в кератиноцитах, привлекая еще больше нейтрофилов и лимфоцитов в очаг воспаления [369, 377, 518]. Помимо этого, кератиноциты, макрофаги, NKT-клетки секретируют IFN-γ, TNF-α, IL-1-β и IL-6, активируя mDC к продукции ряда цитокинов TNF-α, IL-12 и IL-23, вызывая дифференцировку и пролиферацию наивных Т-лимфоцитов в зрелые лимфоциты Th1, Т-цитотоксические 1 типа (Tc1), Th17, Th22 и Т-цитотоксические, продуцирующие IL-22 (Tc22) [194]. Далее субпопуляции лимфоцитов попадают в кровоток и активно мигрируют в кожу [207]. Т-лимфоциты в очагах поражения кожи в ответ на презентацию антигенов клетками Лангерганса синтезируют целый ряд цитокинов, таких как IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-23. IL-17A продуцируется несколькими типами клеток: Th17-лимфоцитами, γδ Т-клетками, NK, тучными клетками и ILC. Показано, что активация γδ Т-клеток происходит при нарушении микробиома кожи [187]. Воздействие ЦК приводит к нарушению пролиферации и дифференцировки клеток эпидермиса [4].

Помимо IL-17A Th17 секретируют IL-17F, TNF-α, IL-21, IL-22 и IL-26 и играют решающую роль в фазе поддержания воспаления при псориазе [194]. TNF-α и IL-6 способствуют дифференцировке Th22 лимфоцитов, которые продуцируют IL-22, IL-13 и IL-26 [322]. Цитокины IL-22 и IL-17A/F способствуют пролиферации и нарушению дифференцировки кератиноцитов, с одной стороны. С другой стороны, активация кератиноцитов приводит к секреции антимикробных пептидов, ряда цитокинов и хемокинов, способствуя дальнейшей активации Т-лимфоцитов и привлечению других клеток в очаг повреждения, что приводит к хронизации воспаления в фазе поддержания заболевания [486]. Количество циркулирующих клеток Th22 увеличивается при псориазе и коррелирует с тяжестью патологического процесса [387].

В поздней фазе воспаления псориатические поражения характеризуются глубокой инфильтрацией иммунных клеток, повышенной концентрацией

различных цитокинов и хемокинов, и гиперпролиферацией КЦ. Повышенный ангиогенез и эндотелиальные клетки, активированные псориатическими цитокинами, облегчают инфильтрацию иммунных клеток в воспаленную кожу [199]. Клетки Th9 продуцируют TNF-α и гранзим B и индуцируют экспрессию множества провоспалительных цитокинов, включая IFN-γ, IL-9, IL-13 и IL-17 [503]. Показано увеличение популяции Th9 у пациентов с псориазом. [503]. Th9 способствуют стимуляции ангиогенеза и потенцированию воспаления, опосредованного Th17-клетками, благодаря секреции IL-9 [528].

Врожденные клетки иммунитета - ILC3 вносят свой вклад в патогенез псориаза, также продуцируя IL-17 и IL-22 [159].

При аутоиммунных заболеваниях, в том числе и при псориазе, показано нарушение супрессорной функции у ключевых иммунорегулирующих популяций клеток, в том числе у миелоидных клеток-супрессоров [25, 124, 425, 443]. В отличие от здоровых людей, у больных псориазом Treg не могут обеспечивать адекватного контроля над эффекторными Т-лимфоцитами. [569]. MDSCs при увеличении в циркуляции у пациентов с псориазом не снижали тяжесть воспалительного процесса [18, 175, 209, 421]. При этом, как показано, MDSCs, выделенные у таких пациентов, теряют способность ингибировать эффекторные клетки [449]. В экспериментальной модели фармакологическое снижение пула MDSCs приводило к подавлению воспаления и уменьшению акантоза, а также сопровождалось увеличением количества классических регуляторных Т-клеток [185].

Немаловажную роль в рецидивировании псориаза играют клетки-памяти. Нерециркулирующие резидентные клетки памяти ($CD69^{+}CD103^{-/+}$) имеют повышенную экспрессию молекул адгезии и продуцируют различные провоспалительные цитокины, в том числе IFN-γ, IL-17A и IL-22 [345, 362]. Показано, что плотность инфильтрирующих клеток $CD8^{+}$ резидентных клеток памяти коррелирует с толщиной эпидермиса при псориазе [347]. Таким образом, псориаз инициируется и поддерживается взаимным участием врожденных и адаптивных клеток иммунной системы, выработкой различных

провоспалитиельных цитокинов, приводя к нарушению дифференцировки и гиперпролиферации КЦ с образованием псориатических чешуек.

1.2.3. Малые популяции лимфоцитов и миелоидные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе рассеянного склероза

В иммунопатогенезе РС до сих пор остаются неясные моменты. Где начинается патологический процесс, какие антигены его провоцируют? По одной из гипотез, процесс начинается на периферии, а по другой - в ЦНС [399]. В качестве неблагоприятных факторов рассматривается, в частности, вирус Эпштейн-Барр (EBV), который, как предполагается, через механизм молекулярной мимикрии, приводит к активации аутореактивных клонов клеток [289]. Гены, ассоциированные с рассеянным склерозом, в основном регулируют врожденный или адаптивный иммунитет [293]. Так, DRB*1501/DQ6 кодирует белок, который благодаря структурным особенностям может связывать только определенный тип представляемого пептида для активации молекул TCR на зрелых Т-клетках, тем самым, регулируя активацию CD4 клеток [292]. Микробиота играет важную иммунорегуляторную роль. Показана роль дисбиоза кишечника в иммунопатогенеза ряда аутоиммунных заболеваний ЦНС, включая оптикомиелит и рассеянный склероз [212]. Так, например, предполагается, что *C. Perfringens* может выступать в качестве молекулярного мимикрирующего агента, с одной стороны. С другой стороны, *C. Perfringens* может влиять на баланс между Th17-лимфоцитами и регуляторными Т-клетками [212]. Также предполагается, что отсутствие в раннем детском возрасте воздействия инфекционных агентов и симбиотических микроорганизмов повышает восприимчивость к аллергическим и аутоиммунным заболеваниям, приводя к нарушениям формирования иммунной толерантности [115]. Большинство аутореактивных Т-клеток удаляются в процессе центральной толерантности в тимусе, но небольшая часть аутореактивных Т-клеток высвобождается на периферию (Рисунок 1.5).

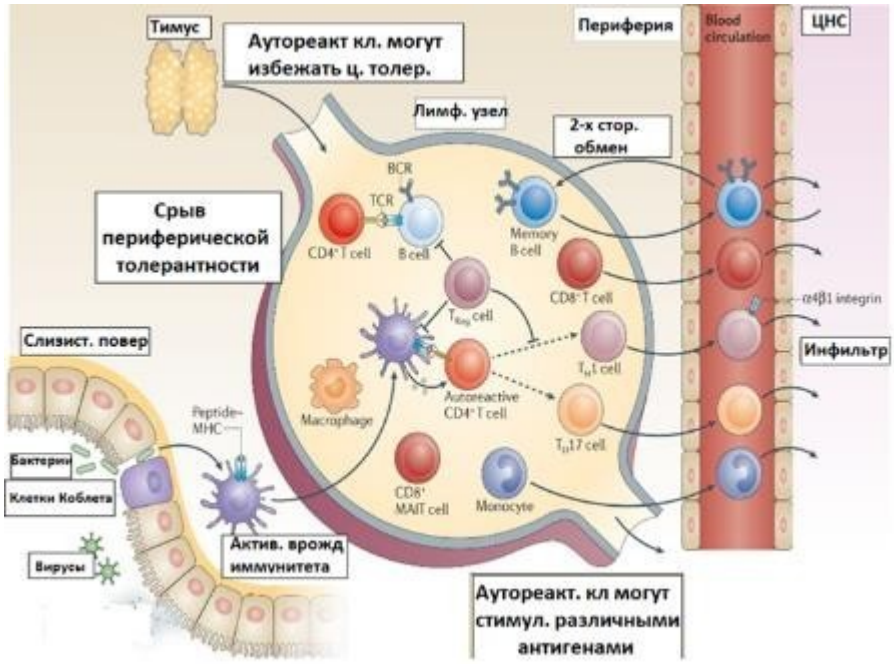
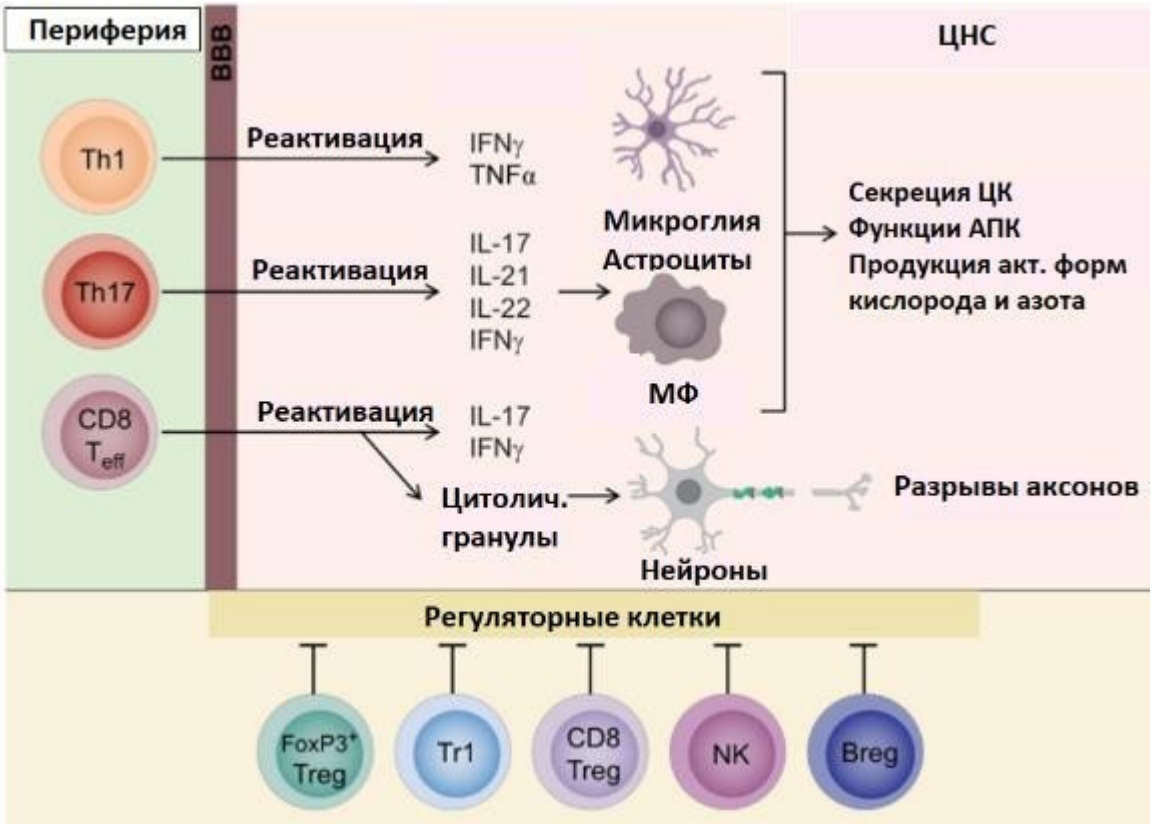


Рисунок 1.5 – Иммунопатогенез рассеянного склероза. Адаптировано из статьи Dendrou CA et al. [223]

Периферические механизмы толерантности эффективно контролируют эти клетки у здоровых людей. При нарушениях в функционировании Treg или повышенной устойчивости эффекторных клеток к механизмам регулирования, аутореактивные Т- и В-клетки активируются и мигрируют в ЦНС для взаимодействия с аутоантигенами. На своем пути в ЦНС аутореактивные клоны встречают гематоэнцефалический барьер, который они преодолевают с помощью экспрессии интегриновых молекул (α4β1) и взаимодействия с адгезивными молекулами эндотелиальных клеток (VCAM-1) ГЭБ (Рисунок 1.5). Далее происходит активация матриксных металлопротеиназ с последующим разрушением барьера [213, 278].

В ЦНС аутореактивные эффекторные Т-клетки реактивируются антигенпрезентирующими клетками с выработкой цитокинов для еще большего привлечения лимфоцитов и макрофагов. В центре очагов поражения РС находятся $CD4^+$ Т-клетки, по краям, в основном, обнаруживаются $CD8^+$ Т-клетки [290]. Функционирование Т-клеток в очагах повреждения приводит к потере миелина, разрушению олигодендроцитов, повреждению аксонов и в итоге - к неврологической дисфункции. Среди аутореактивных $CD4^+$ Т-клеток различается

несколько популяций. В обострении заболевания отмечается превалирование Th1/Th17-лимфоцитов над Th2 [389, 543]. У взрослых пациентов с РС продемонстрировано повышение концентрации цитокинов, продуцируемых Th1 (IL-1β, IL-2 и TNFα) и Th17-лимфоцитами (IL-17A, IL-21 и IL-22) [129]. Th17-клетки, помимо индукции выработки провоспалительных цитокинов, стимулируют выработку активных форм кислорода в эндотелиальных клетках, приводя к разрушению гематоэнцефалического барьера [302]. $CD8^+$ Т-клетки оказывают повреждающее действие на аксоны нейронов путем прямых контактов с участием гранзимов А (GzmA) и В (GzmB) [122, 415]. У пациентов с РС выявлено увеличение содержания популяции $CD8^+$ Т-клеток, экспрессирующих CD161 (Tc17) с секрецией IL-17 [104]. В-клетки играют важную роль в иммунопатогенезе РС [276]. Помимо выработки аутоантител, В-клетки в ЦНС выполняют антигенпредставляющую роль, а также секретирует различные цитокины [428]. Аутореактивные В-клетки, преодолевая гематоэнцефалический барьер, могут становиться резидентными клетками, формируя эктопические лимфоидные фолликулы в мозговых оболочках ЦНС, дифференцируясь в плазмобласты и плазматические клетки [395, 513]. Параллельно с повреждением в ЦНС активируются процессы, направленные на ограничение воспаления и восстановление с частичной ремиелинизацией, что сопровождается клинической ремиссией [406]. Известно, что эффекторные Т-клетки в ЦНС, помимо профессиональных Treg, могут регулироваться и другими клетками: Т-регуляторными клетками типа 1 (Tr1), $CD8^+$Treg, NK-клетками и В-регуляторными клетками (Рисунок 1.6).



Примечание: МФ – макрофаг, ЦК – цитокины, АПК – антигенпрзентирующая клетка, ЦНС – центральная нервная система, BBB (blood-brain barrier) – гематоэнцефалический барьер

Рисунок 1.6 – Роль различных популяций лимфоцитов в развитии иммунной реакции при РС. Адаптировано по Baecher-Allan C et al. [115]

Treg – классические регуляторные клетки, продуцирующие IL-10 и экспрессирующие транскрипционный фактор (Forkhead box protein 3 - FoxP3), [384]. В эксперименте при совместном культивировании Treg пациентов с РС с эффекторными Т-клетками показано снижение супрессивной способности Treg, что свидетельствует об их дисфункции [580]. У взрослых пациентов с РС показано, что Treg имеют сниженную супрессорную активность в отношении ингибирования пролиферации эффекторных Т-клеток [115]. Также в экспериментах на мышах показано, что IL-6 ингибирует супрессорное действие Treg, увеличивая секрецию GzmB, тем самым способствуя устойчивости Т эффекторных клеток [131]. Tr1 ингибируют пролиферацию клеток посредством секреции IL-10 [277]. Для Tr1 также, как и для Treg, показано снижение секреции IL-10 у пациентов с РС относительно здоровых людей [111]. Популяция клеток CD8, экспрессирующая CD122 (цепь IL-2Rβ), ингибирует иммунный ответ и снижает активность

заболевания. [386]. Интересно отметить, что Th17-клетки у пациентов с РС могут играть также регулирующую роль. У пациентов в ремиссии заболевания Th17-клетки способны секретировать высокие уровни IL-10 [258, 434].

NK-клетки, благодаря продукции провоспалительных (IFNγ, TNFα) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов, могут выполнять двоякую роль в ЦНС [504]. При этом, отмечено, что NK-клетки $CD56^{bright}$ нелеченных пациентов с РС имеют сниженную способность ингибировать пролиферацию аутологичных активированных Т-клеток. Это может быть связано, во-первых, с дисфункцией NK-клеток $CD56^{bright}$, а во-вторых, с меньшей чувствительностью CD4 клеток к регуляции NK-клеток [354]. Было высказано предположение, что эта резистентность со стороны Т-клеток связана с повышенной экспрессией Т-клетками HLA-E лиганда, ингибирующего NK-клетки, или со снижением экспрессии CD155 на Т-клетках [279].

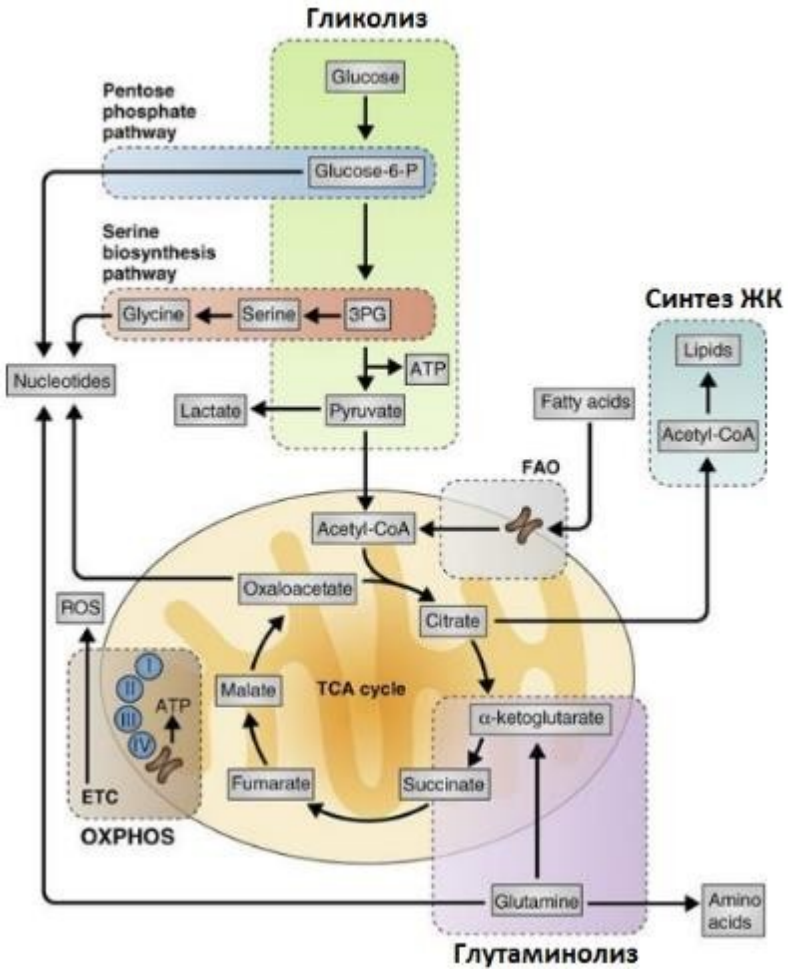
Популяция В-клеток при РС гетерогенна и различается по продуцированию провоспалительных (IL-6, TNF-α, LT-α и GM-CSF) и противовоспалительных (IL-10 и TGF-β) цитокинов. В-клетки, подавляющие иммунные ответы, называются регуляторными В-клетками (Breg). Однако, не выявлено специфических поверхностных маркеров или факторов транскрипции Breg. Идентификация их возможна только по продукции IL-10 [408]. Breg, вырабатывая IL-10, TGFβ ингибируют праймирование дендритных клеток и активируют уничтожение Т-клеток прямой цитотоксичностью чрез GzmB, а также индуцируют образование Tr1 и Treg [312] Однако известно, что Breg пациентов с РС секретируют больше GM-CSF и меньше IL-10, чем у здоровых людей [363].

Также, как и у пациентов с ВЗК и ПС, MDSCs играют различную роль при РС. Исследования показывают разнонаправленную динамику MDSC в зависимости от формы течения рассеянного склероза. При рецидивирующе-ремиттирующем РС их количество увеличивается в фазе обострения [304]. При экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите, миелоидные клетки-супрессоры, напротив, демонстрировали защитную функцию, способствуя гибели эффекторных Т-клеток [414]. Работы по оценке малых популяций лимфоцитов и миелоидных клеток-

супрессоров проведены, в основном, у взрослых пациентов с ИЗЗ и в эксперименте у животных.

1.3. Современный взгляд на исследование митохондриальной дисфункции при иммунозависимых заболеваниях

Иммунометаболизм – это область иммунологии, занимающаяся изучением метаболического профиля иммунных клеток на разных этапах их дифференцировки и пролиферации. Известно, что в норме клетки в качестве источника энергии для основных метаболических потребностей используют АТФ, получаемый посредством окислительного фосфорилирования (OXPHOS) из липидов или глюкозы (Рисунок 1.7) [285].

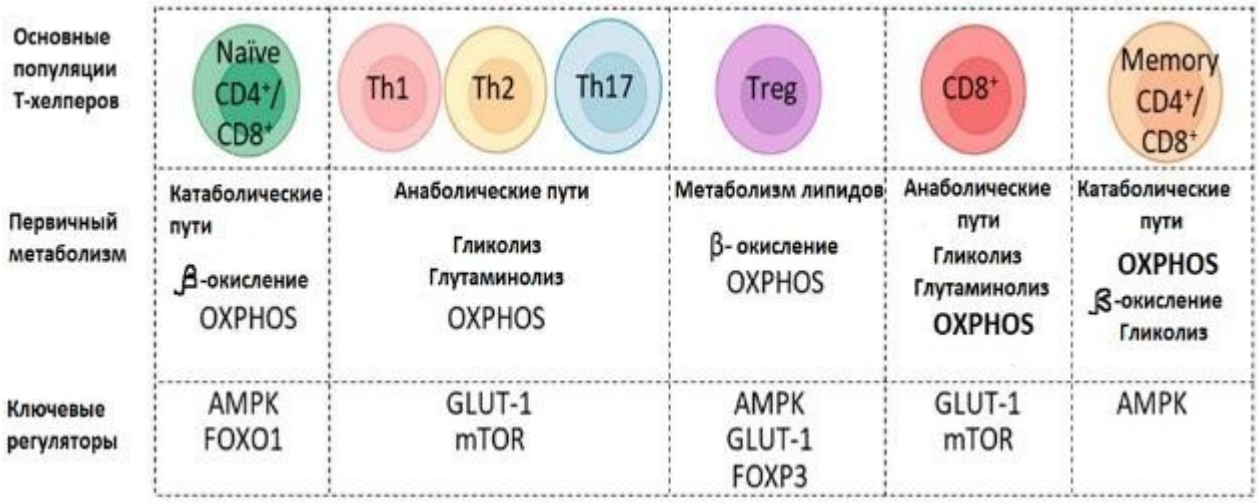


Примечание: ATP (Adenosine triphosphate)- аденозинтрифосфат, glucose-6-P (glucose-6-phosphate) глюкозо 6 фосфат, - 3PG (3-Phosphoglyceric acid)- 3-фосфоглицериновая кислот, ЖК – жирные кислоты, FAO (Fatty acid oxidation) – окисление жирных кислот, OXPHOS (oxidative phosphorylation) – окислительное фосфорилирование, ETC (electron transport chain) – цепь переноса электронов, ROS (reactive oxygen species) – активные формы кислорода, TCA (citric acid cycle) –цикл трикарбоновых кислот, AcetylCoA (acetyl coenzyme A) – ацетил коэнзим А.

Рисунок 1.7 – Основные пути метаболизма в популяциях Т-лимфоцитов. Адаптировано из статьи Buck MD et al. [156]

После антигенной стимуляции в клетках происходит метаболический сдвиг от катаболического к анаболическому состоянию [485, 570]. Для активации процессов дифференцировки клеток, а также миграции необходимо ускорение метаболизма глюкозы [527]. При взаимодействии молекул клеточной адгезии LFA-1 лимфоцитов с ICAM-1 эндотелия сосудов метаболизм Т-клеток перепрограммируется, приводя к усилению поглощения глюкозы и образованию лактата [332, 403, 577, 578]. При этом, увеличивается экспрессия транспортеров глюкозы (GLUT-1), которая, в конечном итоге, приводит к усилению гликолиза. В клетках активируются процессы пролиферации, сопровождающиеся

переключением с OXPHOS на аэробный гликолиз [259]. Гликолиз представляет цепь реакций превращения глюкозы до пирувата или лактата под действием цитозольных ферментов с образованием энергии (Рисунок 1.7). Для аэробного гликолиза необходимо достаточное количество кислорода, при этом глюкоза превращается в лактат [457]. Аэробный гликолиз по сравнению с OXPHOS менее эффективен по количеству образующейся АТФ на 1 молекулу глюкозы, но при этом образуются промежуточные продукты, необходимые для роста и пролиферации клеток. В ходе гликолиза образуется глюкозо-6-фосфат и 3-фосфоглицерат, участвующие в биосинтезе пентозофосфата и серина [460]. Помимо этого, глюкоза, превращаясь в пируват, может поступать в митохондрии с образованием ацетил-КоА, а конденсируясь с оксалоацетатом превращаться в цитрат, который окисляется в цикле трикарбоновых кислот (TCA). Распадающиеся субстраты в TCA обеспечивают не только восстанавливающие эквиваленты OXPHOS, но и предшественники для биосинтеза. Цитрат может экспортироваться в цитозоль и под действием АТФ-цитратлиазы образует ацетил-КоА (ACL), использующийся для синтеза липидов [221]. Оксалоацетат может быть использован для получения аспартата, являющегося предшественником для синтеза нуклеотидов [222]. При этом дифференцировка в определенные популяции клеток зависит от клеточного окружения, а также субстратов для метаболизма [326]. После антигенной стимуляции различные факторы транскрипции и сигнальных путей контролируют изменения в метаболических программах Т-клеток. Интенсивность метаболических процессов в лимфоцитах контролируется цитокинами. В частности, IL-2, который, с одной стороны, может активировать анаболический метаболизм и поддерживать эффекторные функции Th1-клеток через STAT5 и путь PI3K/Akt/mTOR. А с другой стороны, IL-2 посредством активации сигнальных путей, участвует в созревании Treg в тимусе, а также необходим для поддержания Treg при выходе на периферию [487]. Разные популяции Т-клеток характеризуются разным метаболическим профилем (Рисунок 1.8).



Примечание: OXPHOS (oxidative phosphorylation) – окислительное фосфорилирование, AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) – аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа, FOXO1 (Forkhead box protein O1) - белок вилкообразной формы O1, GLUT-1(glucose transporter 1) – транспортер глюкозы 1, mTOR (mammalian target of rapamycin) - мишень рапамицина у млекопитающих, FOXP3 (forkhead box P3)

Рисунок 1.8 – Метаболический профиль и клеточные регуляторы различных популяций Т-лимфоцитов. Адаптировано из статьи Antony IR et al. [106]

Процессы дифференцировки и пролиферации клеток эффекторов влекут за собой повышенную потребность в биосинтезе, что изменяет метаболические пути, использующие, в основном, глюкозу. Метаболический профиль Т-клеток коррелирует с их функцией. Для активированных эффекторных популяций (Рисунок 1.8) характерна экспрессия молекул, обеспечивающих метаболизм глюкозы и глутамина (GLUT-1, ASCT2, mTOR и др.) со смещением в сторону аэробного гликолиза. Напротив, регуляторные Т-клетки (Treg) для поддержания своей функции преимущественно используют окислительный метаболизм (Рисунок 1.8). Помимо этого, Treg, по сравнению с эффекторными клетками, экспрессируют меньшие уровни GLUT-1, но большие AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK) [557]. Т-клетки памяти имеют высокий уровень OXPHOS [7, 106, 259]. Нарушение метаболического баланса в Т-клеточном компартменте ведёт к двойному патогенному эффекту. С одной стороны, к гиперактивации аутоагрессивных клеток и клеток памяти [474]. С другой стороны, к функциональной недостаточности регуляторных Т-клеток. Все вместе это

вызывает активацию аутоиммунных процессов с разрушением собственных тканей [106].

В эксперименте показана возможность снижения воспаления при ревматоидном артрите ингибированием гликолиза в Т-лимфоцитах с помощью 2-дезоксиглюкозы [90]. Продемонстрировано повышение гликолиза в Т-клетках у пациентов с ВЗК и системной красной волчанкой (СКВ) (Рисунок 1.9) [135, 587].

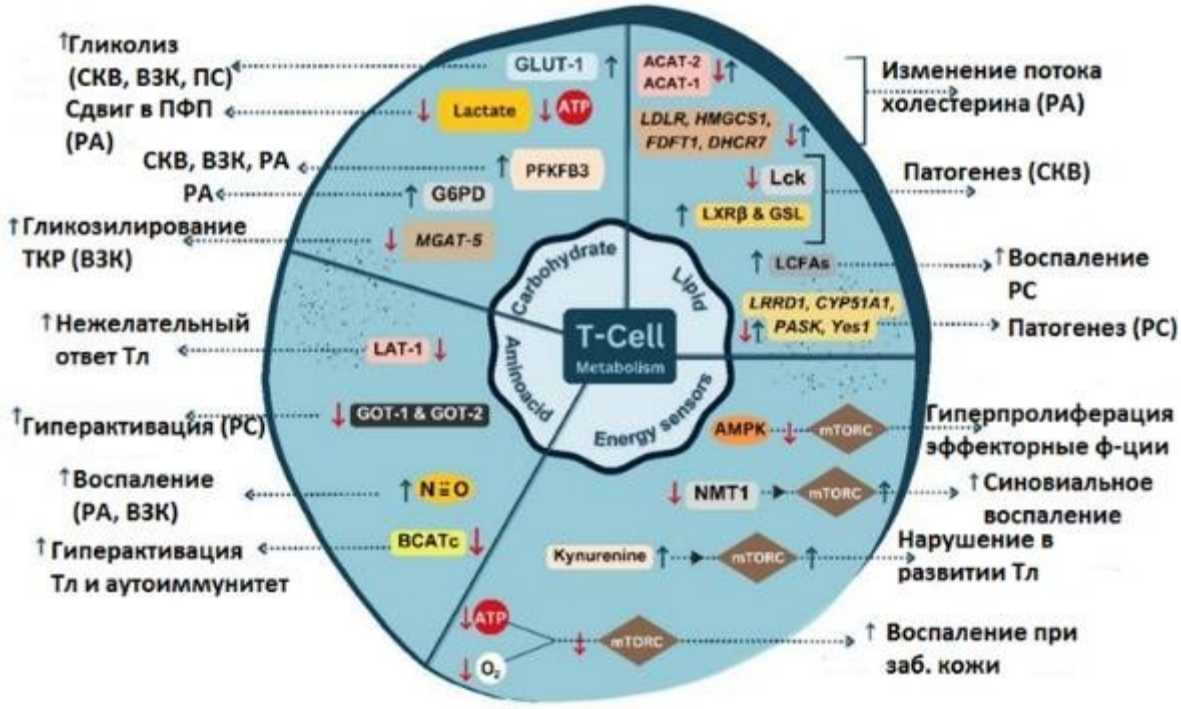


Рисунок 1.9 – Роль нарушений регуляции метаболизма Т-клеток при аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваниях. Адаптировано из статьи Antony IR et al. [106]

Показано также, что неконтролируемая пролиферация Т-клеток у пациентов с псориазом связана с повышенным уровнем экспрессии GLUT-1 [454]. Изучены белки и факторы, которые играют роль в патогенезе при разных АИЗ. Так, у пациентов с ВЗК выявлена повышенная экспрессия HIF-1α, которая активирует процессы гликолиза в клетках слизистой оболочки кишечника и приводит к повреждению тканей [607].

Показана пластичность популяций Th17/Treg. Дифференцировка клеток Th17 и Treg взаимно связана и, помимо цитокинов, контролируется метаболическими процессами [202, 628]. В популяциях Т-эффекторов, связанных с аутоиммунитетом, продемонстрированы нарушения на разных уровнях регуляции

углеводного обмена, в зависимости от их энергетических потребностей. Показана высокая экспрессия генов, связанных с метаболизмом глюкозы, а также повышение уровней экспрессии пирувата, лактата и продуктов пентозофосфатного пути в Th17-клетках [262]. Также выявлено, что для дифференцировки Th17 необходима высокая активность пируваткиназы M2 (фермент, ограничивающий скорость гликолиза) [338]. В эксперименте на мышах ингибирование гликолиза в Т-клетках посредством циклин-зависимой киназы 7 приводило к нарушению дифференцировки Th17/Th1 и уменьшало тяжесть IL-23-опосредованного псориаза [371].

Помимо нарушений в углеводном обмене при АИЗ нарушается липидный обмен. При РС иммунная система повреждает миелиновую оболочку нейронов, при этом выделяется поток липидов и происходит сдвиг биосинтеза холестерина на производство провоспалительных длинноцепочечных жирных кислот, способствующих выработке IFN-γ и IL-17, которые усугубляют течение острого энцефалита. Короткоцепочечные жирные кислоты, напротив, оказывают защитное действие за счет индукции экспрессии FOXP3 и подавляют дифференцировку Th17 [346]. Показано, что гиперпролиферация Т-клеток при псориазе также зависит от синтеза холестерина и жирных кислот *de novo*. Нарушение окисления жирных кислот в Т-клетках приводит к нарушению их функции. Установлено, что пролиферация Т-клеток памяти требует усиления поглощения жирных кислот, поэтому при нарушениях окисления жирных кислот компенсаторно происходит усиление функционирования митохондрий [294, 584].

Помимо метаболизма глюкозы и липидов, активированные Т-клетки также зависят от метаболизма аминокислот. Определенные незаменимые аминокислоты имеют решающее значение для функционирования Т-клеток и служат метаболическим топливом для митохондриального окисления и производства АТФ. Дефектный метаболизм аминокислот в Т-клетках, вызывающий гиперактивацию Т-клеток, наблюдался у пациентов с рассеянным склерозом [119]. Для выполнения своих функций Т-эффекторы используют различные энергетические датчики, например, AMPK, реагирующий на изменение уровней

энергии и активирующий сигнальные пути при ее снижении. При этом, для выработки АТФ активизируются катаболические процессы в Т-клетках через AMPK, путь которого пересекается с липидным и углеводным метаболизмом [527]. Показано, что AMPK может инактивировать mTORC1, приводя к замедлению клеточного роста. [317]. Таким образом, метаболический профиль разных популяций Т-клеток варьирует у пациентов с разными АИЗ и зависит от микроокружения и содержания метаболитов. Терапевтические подходы к лечению аутоиммунных заболеваний продолжают развиваться, в том числе, направленные на изменение метаболизма клеток. Понимание процессов, приводящих к метаболической дисфункции, может помочь в разработке новых подходов для контроля и лечения пациентов с АИЗ.

1.4. Роль эктонуклеотидаз CD39/CD73 в патогенезе иммунозависимых заболеваний

В последнее десятилетие много внимания иммунологов уделяется изучению пуринергической системы, которую открыл Джеффри Бернстокком еще в 1972 г. [163]. Подробно изучена ее роль в различных физиологических реакциях (боль, воспаление, агрегация тромбоцитов), передаче сигналов в нейронах, а также в поддержании баланса между реакциями воспаления и иммуносупрессии [162, 163, 164, 165]. Пуринергическая система включает в себя ряд составляющих [163, 165, 167]:

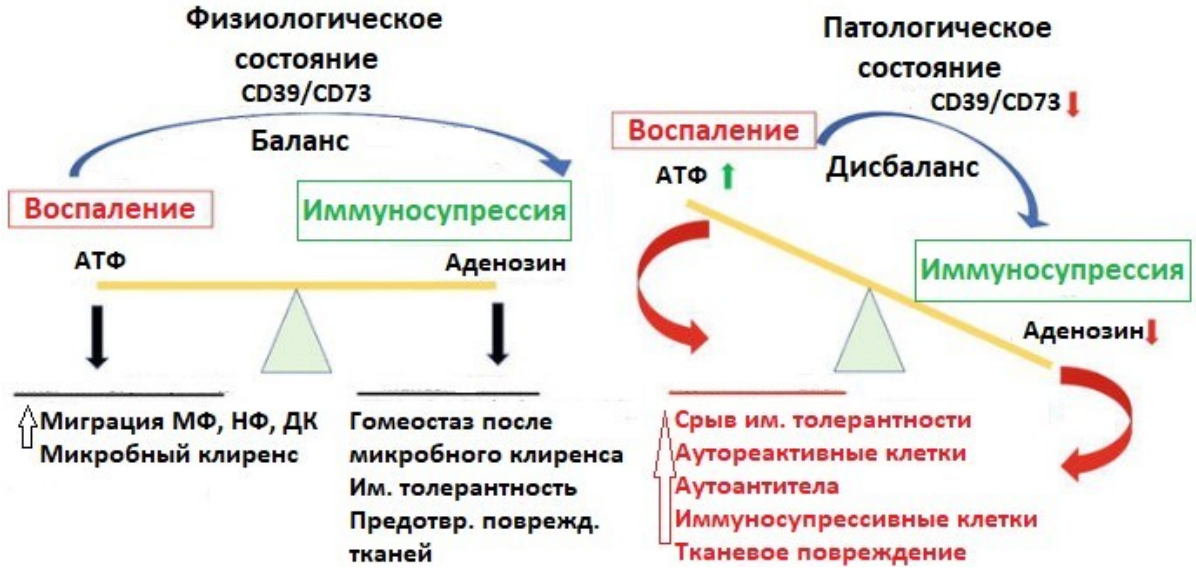
1) производные пурина или пиримидина – внеклеточные мессенджеры;

2) мембранный переносчик для нуклеотидов/ нуклеозидов;

3) поверхностные ферменты, гидролизующие АТФ до аденозиндифосфата (АДФ), до аденозинмонофосфата (АМФ) и аденозина;

4) пуринергические рецепторы для внеклеточных производных пурина/пиримидина (Р1 - связывает только аденозин, Р2 может связывать АТФ, АДФ, и др.) [166].

Показано влияние и роль пуринергической системы в секреции цитокинов / хемокинов, образовании активных форм кислорода, дифференцировке Т-клеток эффекторов [105]. Воспалительная реакция связана с увеличением продукции провоспалительных медиаторов и выбросом во внеклеточное пространство АТФ из поврежденных клеток [585] (Рисунок 1.10).



Примечание: МФ – макрофаги, НФ – нейтрофилы, ДК – дендритные клетки

Рисунок 1.10 – Участие CD39/CD73 в регуляции внеклеточного АТФ и аденозина в норме и патологии. Адаптировано из статьи по Rai R et al. [477]

АТФ является сигналом опасности – DAMP (damage associated molecular patterns) и стимулирует пуринергические рецепторы, предотвращая повреждение тканей, с одной стороны. Но, с другой стороны, может приводить к гибели клеток. Нарушение баланса между воспалением и регуляторной средой является причиной гипервоспалительных состояний и различных патологий [539, 540, 541]. Ферменты пуринергической системы делятся на 4 основных семейства, одно из них – семейство эктонуклеозидтрифосфатфосфогидролаз. Самым хорошо охарактеризованным представителем этого семейства является NTPDase1 (CD39), которая гидролизует АТФ до АДФ. CD39 экспрессируется на разных клетках, в том числе на Treg, NK-клетках, моноцитах, дендритных клетках [477]. CD73 (экто-5'-нуклеотидаза (NT5E/CD73) – представитель другого семейства, расщепляет АМФ до аденозина [477]. АТФ может действовать как иммуностимулятор и иммуносупрессор в зависимости от концентрации, аденозин же действует только

как иммуносупрессор. АТФ и аденозин воздействуют на иммунные клетки через рецепторы P2 и P1. Показано, что пуринергическая система участвует в регуляции всех звеньев иммунной системы [228]. Дисбаланс между количеством внеклеточной АТФ и аденозина может приводить к активации воспаления [240]. При адекватной работе иммунной системы внеклеточная АТФ под действием CD39 превращается в аденозинмонофосфат, а далее гидролизируется с помощью эктонуклеотидазы CD73 до аденозина [227]. Дефосфорилирование АТФ, катализируемое CD39, предотвращает активацию P2X7R и снижает секрецию IL-1β и IL-18 [243]. В тоже время, активация Т-клеток через P2X7R ингибирует Treg [501].

Пуриновые рецепторы находятся практически во всех клетках организма и воздействие на них нуклеотидов влияет на начало, продолжительность и разрешение воспалительной реакции. Так, функция и активность В-клеток во многом зависят от соотношения аденозина и АТФ в микроокружении. Аденозин оказывает угнетающее действие на В-клетки, тогда как повышенное высвобождение АТФ приводит к их активации [473]. Экспрессия эктонуклеотидаз изучена на разных типах клеток, включая иммунные [622].

Показана клиническая значимость эктонуклеотидаз при разных патологиях. Выявлены однонуклеотидные полиморфизмы, приводящие к низким уровням экспрессии CD39 и повышающие восприимчивость к болезни Крона [249]. Как показано, у взрослых с ВЗК, лечение блокаторами TNF приводило к увеличению экспрессии CD39 на Treg [263]. Повышенная экспрессия эктонуклеотидаз ассоциирована с ремиссией ВЗК [263].

Важная роль в поддержании гомеостаза кишечника продемонстрирована для фермента CD73 [205, 381, 538]. Отсутствие CD73 у нокаут-мышей приводило к выраженному воспалению толстой кишки [169]. Необходимо отметить, что CD73 катализирует превращение AMP до аденозина не только экспрессируясь на поверхности клеток, но и находясь в растворимой форме [506]. Показано, что активность растворимой формы CD73 коррелирует с тяжестью патологического процесса у пациентов с острым панкреатитом [398].

Показано, что экспрессия эктонуклеотидаз в Treg различается при разных типах псориаза (вулгарном, пустулезном, зритродермическом), что, вероятно, связано с особенностями иммунопатогенеза каждой формы. Так, наименьшая экспрессия CD39 в регуляторных Т-клетках выявлена у пациентов с пустулезным псориазом, а наименьшая экспрессия CD73 у пациентов с вульгарным псориазом [287]. Изучение экспрессии эктонуклеотидаз в биопсийных образцах здоровых людей и пациентов с пустулезным, эритродермическим и вульгарным псориазом продемонстрировало более низкую экспрессию CD39 и CD73 в Treg у пациентов в разной степени в зависимости от формы заболевания. Наименьшее снижение экспрессии CD39 и CD73 в Treg относительно здоровых людей наблюдалось у пациентов с вульгарным псориазом [633]. Для большинства TregFoxp3 $^{+}$ (до 90%) характерна экспрессия на поверхности CD39 [622]. Treg, экспрессирующие CD39, подавляют возможность Th17 к продукции IL-17 [244]. Интересно отметить, что при РС подавление пролиферации и продукции IFNγ клетками отмечалось как с помощью $CD4^{+}CD25^{high}CD39^{+}$, так и $CD4^{+}CD25^{high}CD39^{-}$ [244]. Однако, только $CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}CD39^{+}$ ингибировали продукцию IL17, а $CD4^{+}CD25^{high}CD39^{-}$ Treg, наоборот, его секретировали [244].

Популяция Th17-клеток также представляет неоднородную популяцию по экспрессии CD39. Помимо классической провоспалительной популяции, существует популяция супрессорных Th17-клеток (supTh17) с экспрессией эктонуклеотидазы CD39 и продукцией IL-10. В экспериментальной работе показано, что такие клетки менее патогенны, чем клетки без экспрессии [242]. По данным Longhi с соавторами, значимо сниженная концентрация супрессорных Th17-клеток у больных болезнью Крона способствует развитию обострений [378].

У пациентов с псориатическим артритом показано, что под действием метотрексата увеличивалась экспрессия CD73 в эффекторных Th1.17 (функции Th17-клеток и Th1) и Th1-лимфоцитах, что способствовало увеличению АМФ-азной активности эктонуклеотидазы и приводило к снижению воспаления [142]. Также, предполагается, что одним из механизмов противоспалительного действия метотрексата у пациентов с псориазом является инактивация mTOR, приводящая к

повышению экспрессии эктонуклеотидазы CD73 в Treg и восстановлению их регулирующей функции [612].

В экспериментальной модели РС на мышах показана взаимосвязь между повышением экспрессии NTPDase1 (CD39) и модуляции инфильтрованных провоспалительных макрофагов к противовоспалительному фенотипу [315].

У пациентов с аутоиммунным гепатитом дефицит CD39 в Treg ассоциирован с утратой регулирующей функции. В результате такие Treg переставали подавлять выработку IL-17 другими клетками, а при стимуляции сами продуцировали провоспалительные цитокины (IL-17 и IFN-γ) [274].

Пуринергические рецепторы в ЦНС контролируют выживаемость нейронов, активацию астроцитов и микроглии, а также иммунных клеток. Генетические варианты рецепторов P2X4 и P2X7 связаны с восприимчивостью к РС. [497]. В лимфоцитах, полученных от пациентов с РС, наблюдалась более высокая экспрессия аденозиновых рецепторов A2A в сравнении со здоровыми людьми. Авторы предполагаю, что увеличение количества A2A является компенсаторным механизмом, ограничивающим воспаление. Воздействие агониста на эти рецепторы опосредовало ингибирование провоспалительных цитокинов, что может являться новой перспективной мишенью для лечения пациентов с РС [582].

Исследование экспрессии эктонуклеотидаз в клетках является перпективным направлением в оценке состояния пациента и эффекта от применяемых препаратов при различных ИЗЗ, включая ВЗК, ПС и РС.

1.5. Роль цитокинов в иммунопатогенезе иммунозависимых заболеваний

Цитокины – это низкомолекулярные пептиды с молекулярной массой от 5-50 кДа, являющиеся медиаторами межклеточного взаимодействия, необходимые для физиологических функций организма и участвующие в поддержании гомеостаза [24]. ЦК циркулируют в крови в пикомолярных (10^{-12} М) количествах. Однако, некоторые из них могут достигать фемтомолярных концентраций, например,

интерлейкин 6 (IL-6) у пациентов при сепсисе [632]. Насчитывается более 200 ЦК. В 1957 году исследователями Isaacs A и Lindenmann J. был открыт первый цитокин – интерферон [309] Термин «цитокин» (от греческого *κύτταρο* /клетка и *κίνηση* /движение) появился только в 1974 благодаря Stanley Cohen, который показал, что ЦК могут вырабатываться не только лимфоидными клетками, но и не лимфоидными [204]. Одним из последних открытых интерлейкинов стал IL-41, который обнаружен в высоких концентрациях при псориатическом артрите в синовиальной жидкости [152].

Кетлинский С.А. и Симбирцев А.С. обобщили свойства ЦК. Цитокины характеризуются как локальным (аутокринным и паракринным), так и дистантным действием. Важной особенностью цитокиновой сети является плейотропность, проявляющаяся в синергизме, антагонизме и других взаимодействиях, регулируя активацию, подавление или поддержание функций клеток-мишеней. [24]. Существует несколько классификаций ЦК. Выделяется структурно-функциональная классификация, которая распределяет цитокины по семействам (факторы роста гемопоэтических клеток, семейство фактора некроза опухоли, семейство IL-10, семейство IL-17, хемокины и др.) и описывает их функци [24, 79].

ЦК являются медиаторами, контролирующими и регулирующими иммунные и воспалительные реакции через сложные сети взаимодействий. Количественное определение цитокинов имеет важное значение в клинической медицине, так как их уровни дают представление о патологических процессах и могут использоваться для диагностики и лечения [79]. В зависимости от их роли ЦК также классифицируются на провоспалительные, инициирующие воспаление и стимулирующие иммунокомпетентные клетки (IL-1β, TNF-α и др.) – противовоспалительные (IL-10, TGF-β), которые ингибируют воспалительные реакции и активацию иммунных клеток [372].

Известно, что нарушения в регулировании продукции цитокинов вносят вклад в развитие ИЗЗ [432].

Антигенная стимуляция наивных $CD4^+$ Т-клеток индуцирует их дифференцировку в субпопуляции под действием определённых цитокинов: IL-2

для дифференцировки в Th1-популяцию; IL-4 для Th2; IL-4 и TGF-β для Th9; IL-4, TGF-β, IL-23 для Th17; IL-6, TNF, IL-23, IL-1β для Th22; IL-6, IL-21, IL-12 для Tfh; IL-2 и TGF-β для Treg. В свою очередь субпопуляции лимфоцитов начинают вырабатывать комплекс ЦК. Так, например, для Th1 характерна продукция IFN-ɤ, TNF, IL-2, а для Treg продукция IL-10 и TGF-β. Представлена схема дифференцировки субпопуляций Th и показаны ЦК, которые продуцируются этими популяциями (Рисунок 1.11) [318].

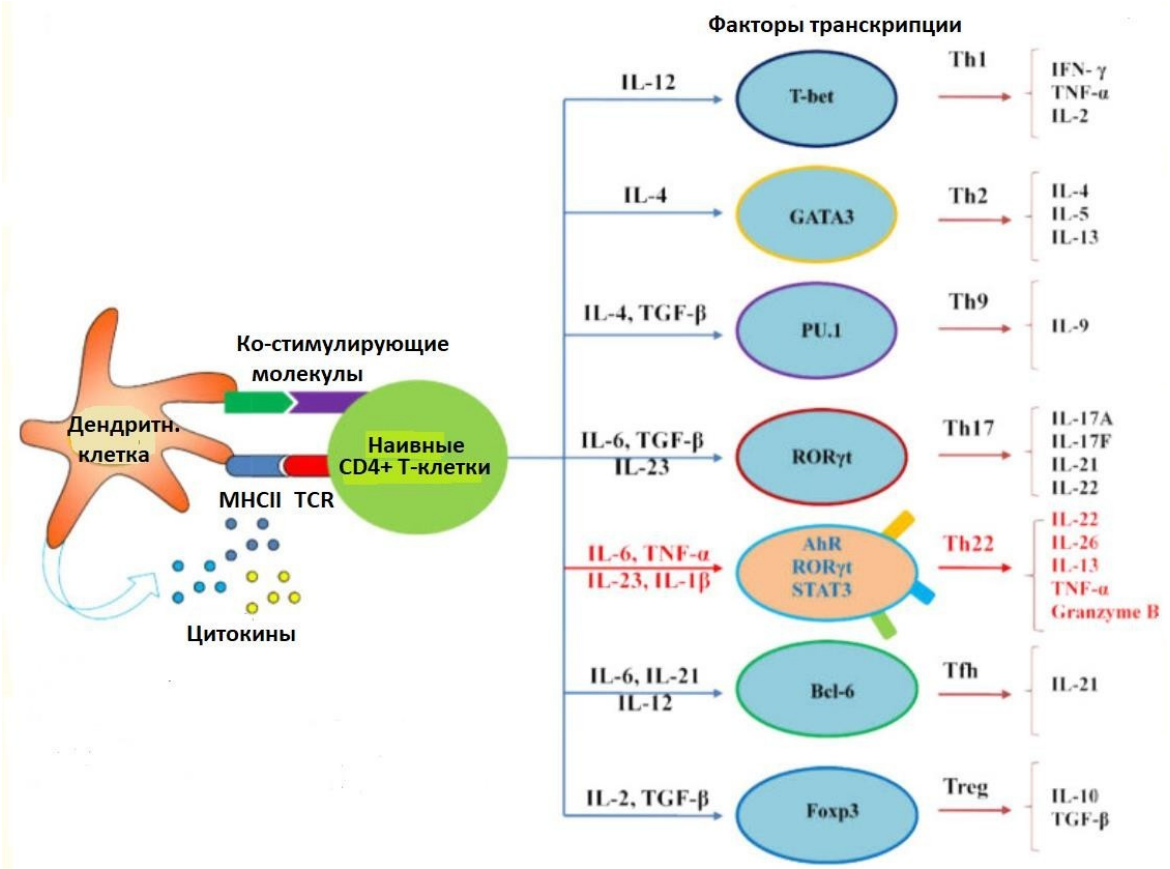


Рисунок 1.11 - Схема дифференцировки субпопуляций Th-лимфоцитов под действием цитокинов (адаптировано из статьи Jiang Q et al. [318]

Для разных иммунозависимых заболеваний характерно превалирование тех или иных субпопуляций Th лимфоцитов с продукцией специфических для них ЦК профилей.

1.5.1. Роль цитокинов в иммунопатогенезе воспалительных заболеванияй кишечника

Установлено, что ЦК являются ключевыми медиаторами клеточных взаимодействий в кишечнике как в физиологических состояниях, так и при патологии. За последние три десятилетия в исследованиях тканей кишечника человека в моделях *in vivo* на мышах установлен механизм иммунной регуляции и восстановления тканей при взаимодействии организма хозяина и микроба. Показано, что нарушение процессов поддержания гомеостаза кишечника и дисбаланс может приводить к возникновению ВЗК [250]. На основе последних полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) и исследований точного картирования определены гены-кандидаты цитокинового пути ответственные с высокой степенью достоверности за риск развития ВЗК (TNF, IL-12, IL-23, Th17, IFN-ɤ, IL-10) [218].

Слой эпителиальных клеток в кишечнике (IEC) представляет собой барьер, отделяющий микробиоту от слизистой оболочки. Его целостность зависит от баланса между дифференцировкой и обновлением IEC, проницаемости и продукции антимикробных пептидов [445] Эти процессы контролируются ЦК, продуцируемыми клетками кишечника (естественные Т-киллеры, γδТ-клетки, $CD8^+$ инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой, врожденные лимфоидные клетки (ILC) [464]. IL-22, вырабатываемый клетками Т-хелперами 17 (Th17), ILC3 и γδТ-клетками, действует на IEC, способствуя антимикробной защите и целостности кишечного барьера [637]. IL-6 продуцируемый в ILC также способствует барьерной функции и секреции слизи [344].

Помимо укрепления и целостности барьера, цитокины опосредуют иммунорегуляторные свойства, контролирующие взаимодействие иммунной системы и микробиоты. Главным среди цитокинов, регулирующим эти взаимодействия, является IL-10, который играет важную роль в гомеостазе кишечника. Мутации в IL-10, IL-10RA и IL-10RB генах приводят к тяжелому ВЗК

с ранним началом [267]. Основу барьера IEC составляет густая сеть мононуклеарных фагоцитов (МНК), которые фагоцитирует бактерии и продуцируют противовоспалительные цитокины, способствуя кишечной толерантности [217]. IL-2 и TGF-β также являются ключевыми компонентами гомеостаза кишечника, благодаря их роли в формировании Treg лимфоцитов и контролю за развитием воспаления в кишечнике [416].

В кишечнике находится большое количество активированных В-лимфоцитов и плазматических клеток, которые локализуются в пейеровых бляшках (ПП) тонкого кишечника и в одиночных кишечных лимфоидных тканях толстого кишечника. [158]. Секреторный иммуноглобулин А (sIgA) способствует защите эпителия, покрывая патогенные бактерии [394] Переключение синтеза класса иммуноглобулинов М и G на IgA имеет важное значение для гомеостаза кишечника и контролируется Т-лимфоцитами под действием TGFβ1 и IL-21, а также дендритными клетками (ДК), продуцируя факторы, стимулирующие В-клетки, фактор активации В-клеток (BAFF), лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), а также цитокины IL-10, IL-6 и TGF-β1 [250]. Таким образом, гомеостаз кишечника поддерживается за счет сложных цитокиновых взаимодействий между эпителиальными и иммунными клетками.

Нарушение барьерной функции эпителия и микробный дисбактериоз являются ключевыми событиями в инициации ВЗК. При нарушении целостности кишечного барьера происходит продукция провоспалительных ЦК и, в частности, семейства IL-1. Генетические дефекты в гене, ответственном за выработку членов семейства IL-1, могут приводить к спонтанному колиту, что подчеркивает их роль в инициировании ВЗК [565]. В экспериментальных работах на мышах показано, что генетический дефицит или блокада передачи сигналов IL1-β и IL-18 приводит к развитию менее тяжелого колита. Цитокины семейства IL-1 - IL-1β и IL-18 продуцируются МНК и IEC и связаны с провоспалительными эффекторными функциями при воспалении кишечника. Удаление компонента воспаления каспазы-1 предотвращает высвобождение IL-1β и IL-18 и снижает тяжесть колита у мышей [380]. IL-33, являющийся членом семейства IL-1, также связан с

воспалением кишечника. Однако показано, что помимо провоспалительного действия IL-33 обладает и противовоспалительным эффектом, действуя на Treg и способствуя их накоплению, ограничивая передачу сигналов, опосредованную IL-23 [502].

TNF – центральный провоспалительный ЦК, который влияет на целостность эпителия и индуцирует апоптоз в IEC [470]. Исследование клеток, полученных от пациентов с ВЗК показало, что мембраносвязанный TNF передает сигнал в клетку через рецептор (TNFR2) и предотвращает апоптоз $CD4^{+}$Т-клеток, что способствует выживанию провоспалительных Т-клеток при колите [112] IL-6 является плейотропным ЦК и его действие зависит от фазы воспаления и клетки-мишени на которую он воздействует. С одной стороны, во время инициации воспаления IL-6 индуцирует приток полиморфно-ядерных лейкоцитов и макрофагов, необходимых для восстановления повреждения тканей [301]. С другой стороны, IL-6 способствует выживанию Th1, Th2 или Th17 и секреции ими цитокинов, поддерживающих воспаление [301].

Показано, что БК и ЯК различаются по ЦК, участвующих в инициации, прогрессировании и разрешения заболевания. Считается, что БК ассоциирована с Th1 и Th17 лимфоцитами и с повышенной продукцией IL-12, IL-23, IFN-γ и IL-17. Патологические изменения при ЯК в большей степени обусловлены Th2 и Th9 популяциями с продукцией IL-13, IL-5 и IL-9 [280].

Ряд ЦК при ВЗК могут выполнять двоякую роль. IL-27 относится к семейству IL12 и продуцируется преимущественно ДК, МФ и моноцитами после стимуляции [413; 619]. IL-27 регулирует как врожденные, так и адаптивные иммунные реакции. IL-27 способствует дифференцировке Th1 и ингибирует дифференцировку Th2 лимфоцитов и Treg [413, 619]. Однако, при определенных условиях IL-27 может, наоборот, ингибировать Th1 и способствовать дифференцировке Treg [413, 619]. IL-35 также член семейства IL12 может индуцировать дифференцировку наивных Т-клеток человека и мыши в регуляторные Т-клетки (клетки iTr35), которые не экспрессируют Foxp3, IL-10 и TGF, но подавляют ответы Т-клеток посредством IL-35 [581]. Показано, что уровень IL-35 в сыворотке обратно коррелирует с

активностью ЯК [365]. IL-33 член семейства IL-1 конститутивно экспрессируется в эпителиальных клетках кишечника [310]. Для IL-33 также показана двоякая роль. При определенных условиях IL-33 может либо инициировать воспаление [219], либо его ингибировать [640]. Показано, что секреция IL-1 $_{\beta}$, IL-6, TNF зависит от стадии заболевания и продуцируются в больших концентрациях в тканях кишечника у пациентов с ЯК по сравнению с БК [436]. Таким образом, ЦК играют ключевую роль в патогенезе ВЗК и могут быть информативны для оценки эффективности проводимой терапии.

1.5.2. Роль цитокинов в иммунопатогенезе псориаза

Во время раннего начала псориаза комплексы нуклеиновых кислот (AMP-цепи кателицидина LL-37) стимулируют в верхних слоях кожи плазмацитоидные дендритные клетки к продукции IFN-γ, TNF-α, IL-12 и IL-23 [441]. Под действием этих ЦК происходит активация миелоидных дендритных клеток (мДК) к выработке ЦК. В свою очередь, мДК стимулируют дифференцировку Т-клеток – Th1, Th22 и Th17 клеток. Клетки Th1, ранее считались центральными клетками патогенеза псориаза [182]. IFN-γ способствует привлечению воспалительных клеток в очаг поражения, а также активирует высвобождение цитокинов (IL-23, IL-1) и хемокинов (CXCL10, CXCL11) [521].

Показана положительная корреляция между уровнями IFN-γ в сыворотке и показателями PASI, что может быть использовано в качестве биомаркера для определения тяжести псориаза и оценки терапии [348]. IFN-α и IFN-β также повышаются при псориазе [411]. Показана их роль на ранних стадиях псориаза [593].

Th22 продуцируют IL-22, который отвечает за индукцию хемокинов, рекрутирующих Т-клетки к кератиноцитам, приводя к эпидермальной гиперплазии, акантозу и паракератозу.

После открытия Th17 была показана их роль в патогенезе псориаза. Клетки Th17 мигрируют в дерму и после воздействия IL-1, IL-23, IL-12 и TNF-α,

высвобождают IL-17 [507, 639]. Интересно отметить, что Th17-клетки становятся воспалительными аутоиммунно-ассоциированными клетками после воздействия IL-23 [256]. IL-23 необходим для дифференцировке и активации Th17-клеток [98, 109]. Цитокины семейства IL-17 могут вызывать как сходные эффекты, так и противоположные эффекты на клетки-мишени в зависимости от микроокружения [149]. Установлена роль IL-17 в иммунопатогенезе псориаза. Представители семейства IL-17 (IL-17A, IL-17C, IL-17E и IL-17F) воздействуют на кератиноциты, эндотелиальные клетки, эффекторные клетки как по отдельности, так и в комбинации, усиливая пролиферацию кератиноцитов и секрецию повреждающих факторов [24, 433].

При обострении псориаза продемонстированы высокие уровни циркулирующих ЦК (IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17A, IL-18 и IL-23), которые положительно коррелировали с индексами PASI [592]. Воздействие IL-17 на кератиноциты приводит к секреции TNF-α и экспрессии хемокиновых лигандов CCL20. IL-17 в кооперации с TNF-α, привлекая нейтрофилы может образовывать микроабсцессы Мунро [193]. В настоящее время стало ясно, что существуют клетки, продуцирующие IL-17A (гомологи), без воздействия IL-23. Помимо этого показано, что ингибирование IL-17A менее эффективно, чем ингибированием гомологов IL-17: IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25), IL-17F. [148]. Концентрация IL-17F в коже при псориазе больше, чем IL-17A [337]. Ранее считалось, что Th17-клетки основные продуценты IL-17, недавние исследования показывают, что нейтрофилы и тучные клетки также способны секретировать IL-17 после активации IL-23 в коже при псориазе [369]. Этим можно объяснить эффективность анти-IL-23 при псориазе[364, 149]. Дополнительными источниками IL-17 при псориазе могут быть врожденные лимфоидные клетки, NK-клетки и γδT-клетки [98].

Обнаружено, что IL-36 играет ключевую роль при прогрессировании псориаза [232]. Стимуляция рецепторов IL-36 на кератиноцитах приводит к секреции IL-17 и IL-21, которые через продукцию хекинов привлекают нейтрофилы в псориатические бляшки [269].

При псориазе продемонстрирована неоднозначная роль определенных цитокинов. В одних работах показано повышение уровня IL-4 (секретируется Th2-клетками) у пациентов с псориазом [138, 610]. А в других работах, наоборот, уровень этого цитокина снижался у пациентов с псориазом [575]. В недавно проведенном метаанализе было показано, что повышение циркулирующих IL-2, IL-17, IL-18 and IFN-γ у взрослых коррелировало с тяжестью псориаза [376].

Продемонстрирована зависимость клинического ответа на лечение этанерцептом и уровнем TNF-α иIL-17 у пациентов с псориазом [560]. Также, увеличение IL-5, IL-10, IL-12, IL-22 и GM-CSF при псориазе коррелировало с эффектом лечения различными биологическими препаратами, в том числе анти-TNF и анти IL-12/23 [535].

1.5.3. Роль цитокинов в иммунопатогенезе рассеянного склероза

Цитокины в ЦНС необходимы для поддержания физиологического гомеостаза и модуляции функции нейронов [101, 382]. Взаимодействия между ЦНС и иммунной системой опосредованы через секрецию цитокинов [214]. Нарушение баланса между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами играет роль в патогенезе при рассеянном склерозе [559]. Th1-клетки во время обострения РС начинают превалировать над Th2, при этом секретируют высокие уровни IFN-γ и IL-12 [543]. IFN-γ может играть регулирующую роль, уменьшая тяжесть патологического процесса при рассеянном склерозе. Введение у мышей с энцефаломиелитом анти-IFN-γ вызывало обострение заболевания [254, 361]. Также показана его двоякая роль в отношении к олигодендроцитам. IFN-γ оказывает защитное влияние на олигодендроциты, которые производят миелин, но повреждающее на ремиелинизирующиеся олигодендроциты [370]. Критически важная роль Th17 при РС обусловлена действием IL-17A, IL-21 и IL-22 [389]. У взрослых с РС выявлены повышенные уровни ЦК, продуцируемые как, Th1-клетками (IL-1β, IL-2 и TNFα), так и Th17-лимфоцитами. Причем, уровни ЦК в ликворе пациентов были значимо выше, чем в сыворотке крови [129]. У взрослых

пациентов с РС было продемонстрировано увеличение концентрации цитокинов IL-1α, IL-4, IL-18, CCL7, CCL27, IFNγ, LIF (leukocyte inhibitory factor), M-CSF, SCF (stem cell factor) и TNFα и их корреляция с активностью заболевания [407]. В одном из исследований было продемонстрировано увеличение концентраций IL-10, IL-21, IL-23, IL-27 у детей с РС по сравнению со здоровыми детьми независимо от активности заболевания [171].

Пациенты с полиморфизмом единичного нуклеотида локуса рецептора TNF-α (*TNFRSF1A*) имеют сниженный риск обострения РС [530]. У пациентов с таким полиморфизмом стимулированные мононуклеарные клетки продуцировали более высокие концентрации TNF-α [451]. Возможно, это указывает на протективную роль TNF-α в патогенезе РС. TNF-α может выполнять контроль над персистирующей ВЭБ-инфекцией (вирус Эпштейн-Барр), реактивация которой обычно сопровождает обострение РС у детей [15]. Блокаторы TNF у пациентов с РС могут ухудшать процесс демиелинизации и усиливать повреждение аксонов [327]. Это объясняется тем, что блокаторы TNF-α, неспецифически блокируют рецепторы TNF – TNFR1 и TNFR2. При этом, известно, что TNF-α, действуя через TNFR2, оказывает нейропротекторное действие, которое подавляется ингибиторами TNF-α, повышающими восприимчивость к демиелинизации [615].

Показана роль IL-11 в стимуляции Th17-клеток в дебюте РС [630, 631]. Есть сообщения о накоплении Th22 и их провоспалительном действии за счет IL-22 и IL-13 при РС [190, 318, 599]. Известно, что в зависимости от микроокружения Th22 могут дифференцироваться в Th1- или Th2-клетки. Кроме того, IL-22 может играть синергистическую роль с IL-17, повреждая целостность ГЭБ [190]. IL-9 продуцируется популяцией Th9 и при РС выполняет регулирующую роль, конкурируя с IL-17. [492]. Показано, что у пациентов с РС при применении INFβ-1a концентрации IL-1β, IL-12/IL-23p40 и IL-18 в сыворотке было значимо ниже, чем у пациентов без лечения INFβ-1a. Предполагается, что INFβ-1a действует на нескольких уровнях, влияя на дифференцировку Т-клеток, миграцию ДК и продукцию про- и противовоспалительных ЦК [215]. Показано, что INF-β способен снижать пролиферацию Th17-клеток и увеличивать секрецию IL-10 Т-клетками,

стимулированными *in vitro* [624]. IL-10 осуществляет свое противоспалительное действие через путь JAK-STAT, блокируя активность NF-κB [343]. В исследовании с участием 106 пациентов с ремитирующе-рецидивирующем РС получена корреляция между прогрессированием заболевания и снижением IL-10 в ликворе [264]. Полиморфизм гена IL-4 возможно связан с повышенной восприимчивостью к РС [108]. Также показано повышение уровня IL-4 в сыворотке крови у пациентов с РС [550, 568].

Таким образом, исследование цитокинового профиля при ИЗЗ, включая ВЗК, ПС и РС, может быть информативно для оценки состояния пациентов и эффективности биологической терапии.

1.6. Изучение ядерного фактора транскрипции κB при иммунозависимых заболеваниях у детей

Ядерный фактор транскрипции κB (NF-κB) регулирует экспрессию множества генов [488]. Активация NF-κB может рассматриваться как универсальная реакция на стресс, под действием разнородных стимулов (провоспалительные цитокины, антиген-специфическая стимуляция лимфоцитов). [120]. NF-κB представляет собой комплексы белковых субъединиц (p52, p65, p50, c-Rel, RelB), связанных с ингибирующими белками IκB. В состоянии покоя комплекс NF-κB в цитоплазме находится в неактивном состоянии. Воздействие киназы IKK на IκB приводит к его протеасомной деградации и отделению NF-κB с перемещением его в ядро, запуская экспрессию генов [620]. Стимуляция NF-κB происходит двумя путями: каноническим и неканоническим.

Канонический сигнальный путь NK-κB может индуцироваться различными стимулами, включающими провоспалительные цитокины, лиганды Toll-подобных рецепторов, антигены разной природы. Активация канонического пути занимает всего несколько минут и опосредует широкий спектр биологических функций [546].

Неканонический сигнальный путь NF-κB гораздо более длительный по времени процесс, активируется строго определенными стимулами – фактором активации В-клеток, лимфотоксином β, CD40 лигандом, рецептором-активатором NF-κB и контролирует специфические реакции [638].

NF-κB является центральным регулятором воспаления, функционируя в клетках врожденного и адаптивного иммунитета. Показана его роль в управлении дифференцировкой Т-клеток и воздействием на их функции [375, 620]. В макрофагах NF-κB активирует индукцию провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, способны активировать NF-κB как в клетках врожденного иммунитета, так и в фибробластах. Таким образом, формируется самоподдерживающаяся петля положительной обратной связи, приводящая к инфильтрации очага воспаления иммунными клетками и его хронизации [375].

Описано, что NF-κB опосредованно, в том числе через дефекты активации адаптивной иммунной системы может приводить к иммунодефицитным состояниям, аутоиммунным заболеваниям, лимфоидным новообразованиям [91, 375, 410]. В экспериментальных исследованиях и клиническими случаями проиллюстрированы биологические эффекты в результате различных мутаций в компонентах системы NF-κB [520, 625].

Интересно отметить, что кишечные комменсалы могут ослаблять воспаление, опосредованное NF-κB [620]. При нарушениях микробиоты кишечника возникает хроническое неконтролируемое хроническое воспаление [620].

В экспериментальных работах было подтверждено, что нарушение регуляции сигнальных путей NF-κB играет роль при патогенезе псориаза [469, 548].

Аберрантная активации NF-κB также играет критически важную роль в патогенезе РС [126, 282, 424]. NF-κB усиливает локальное воспаление в ЦНС за счет активации выработки провоспалительных медиаторов и подавления активности Treg. У пациентов с РС найдены гены, регулирующие путь NF-κB (*NFKBIZ* и *RELA*) и ассоциированные с риском развития заболевания [126, 282, 424]. Выявлены варианты генов, которые ответственны за усиление экспрессии NF-

κB. В частности, для варианта *rs228614-G* после стимуляции TNF-α продемонстрирована повышенная деградацию IκBα и ядерная транслокацию субъединицы NF-κB p65 [296].

Накоплен опыт применения препаратов, модулирующих активность NF-κB. Так, действие нестероидных противовоспалительных препаратов, блокаторов TNF направлено на снижение уровня NF-κB [120].

Исследования показывают, что активность фактора NF-κB может служить биомаркерем для прогнозирования эффективности адалимумаба у пациентов с псориазом. Учёные обнаружили корреляцию уровня фосфорилирования субъединицы p65 в дендритных клетках 2 типа (после стимуляции in vitro) до начала терапии с клиническим ответом, который наблюдается на 12 неделе лечения [103].

Современные исследования подчёркивают взаимосвязь клеточных метаболитов и активности NF-κB. Ферменты и метаболиты через индукцию посттрансляционных модификаций NF-κB могут регилировать его активацию. А NF-κB влияет на метаболические пути. Например, фермент АТФ-цитрат-лиаза активирует компоненты NF-κB, что вызывает транскрипцию провоспалительных генов, запуская реакции воспаления [305].

Дальнейшее изучение NF-κB может открыть новые возможности для совершенствования диагностики и персонализированного подхода при лечении ИЗЗ, включая ВЗК, ПС и РС.

1.7. Современная диагностика иммунозависимых заболеваний у детей

1.7.1. Современная диагностика воспалительных заболеваний кишечника у детей

Согласно клиническим рекомендациям не разработано строгих диагностических критериев для постановки диагноза БК и ЯК [26, 29]. При постановке диагноза следует помнить о дифференциальной диагностике между БК

и ЯК, а также с рядом других заболеваний со схожими симптомами. Так, например, наличие гемоколита может указывать на кишечные заболевания (дизентерию, амебиаз, иерсиниоз, сальмонеллез, туберкулез кишечника, дивертикулез кишечника и др.) [127]. Следует обращать внимание и проявлять настороженность при наличии низкорослости, семейных случаях ВЗК, анемии, повышенных маркерах воспаления в крови. Диагностика включает клинико-анамнестические данные, общеклинические анализы (общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови, анализ кала на скрытую кровь), инструментальные методы исследования (эндоскопические, исследование биоптатов), а также исследование ряда специфических маркеров, необходимых для дифференциальной диагностики. Клинический анализ крови позволяет диагностировать анемию (железодефицитную, анемию хронического заболевания), лейкоцитоз (хроническое воспаление, на фоне стероидной терапии), тромбоцитоз [450, 564]. Повышение С-реактивного белка является неспецифическим маркером активности воспалительного процесса. Возможно наличие повышения уровня АЛТ, АСТ, ГГТ, общего билирубина при поражении печени, что затрудняет постановку диагноза [450]. Пациентам с ВЗК рекомендовано проведение исследования фекального кальпротектина (ФК). ФК является чувствительным маркером активности воспаления в кишечнике, а кроме того, необходим для дифференциальной диагностики колита от диареи невоспалительной природы [224, 564]. Показано, что в дебюте заболевания маркеры воспаления выше при БК, чем при ЯК [393].

Для дифференциальной диагностики БК и ЯК проводят исследование антител к *Saccharomyces cerevisiae* – ASCA. Как показано в работах зарубежных авторов, наличие антител к ASCA может свидетельствовать в пользу БК (у 50-70% больных), но встречаются и у пациентов с ЯК в 5-15% [224]. По данным отечественных авторов, антитела к *Saccharomyces cerevisiae* у детей могут присутствовать в 36% случаев [13]. В тоже время, антинейтрофильные цитоплазматические антитела (pANCA) встречаются у 50-80% больных ЯК и только у 5-10% при БК [241].

При оценке информативности неинвазивных методов исследования для постановки диагноза и оценки активности воспалительного процесса при ВЗК было показано, что ультразвуковое исследование (УЗИ) и магнитно-резонансная энтерография (МРЭ) являются чувствительными и специфичными в отношении активности заболевания, наряду с высокой чувствительностью ФК. Контрастная ультрасонография тонкой кишки и ФК имели самую высокую чувствительность и специфичность в прогнозе оперативного рецидива БК [523]. Необходимо отметить, что наиболее точная диагностика, а также дифференциальная диагностика между БК и ЯК и другими заболеваниями желудочно-кишечного тракта возможна благодаря эндоскопическому и патологоанатомическому исследованию [224]. Рекомендовано всем детям с подозрением на БК проводить колоноскопию с илеоскопией, эзофагогастродуоденоскопию, ступенчатую биопсию всех исследованных участков слизистой оболочки [400]. С целью уточнения диагноза следует применять МР-энтерографию или КТ-энтерографию [400]. При ЯК рекомендовано использование колоноскопии с илеоскопией с применением эндоскопического индекса активности язвенного колита (UCEIS) для интерпретации результатов [564].

1.7.2. Современная диагностика псориаза у детей

Диагноз псориаза у детей ставится после проведения клинико-анамнестического и физикального обследования. Особое внимание уделяется семейному анамнезу и выявлению триггерных факторов возникновения псориаза (инфекции, травмы, лекарственных препараты). Диагностически значимыми симптомами считаются изоморфная реакция кожи (феномен Кёбнера), появление точечного кровотечения после удаления чешуек кожи (знак Ауспитца), выявление на коже пигментации после разрешения высыпаний [2].Для оценки состояния пациентов рекомендуется проведение общелабораторных исследований: клинического анализа крови, биохимического (АЛТ, АСТ, билирубин общий, ГГТ, ЛПВП, ЛПНП, общий белок, СРБ, триглицериды, холестерин общий).

Генетическое тестирование, направленное на выявление мутаций, ассоциированных с псориазом, может быть использовано для уточнения диагноза. [52, 311, 480]. При псориазе отмечается высокая коморбидность, особенно с кардиометаболическими заболеваниями, поэтому необходимо оценивать состояние внутренних систем и органов [480]. При подозрении на стрептококковую инфекцию проводят микроскопическое исследование мазка со слизистой глотки, перианальной области [480].

Для подтверждения диагноза у детей с атипичными проявлениями может потребоваться проведение биопсии [154]. Наиболее распространенными индексами для оценки степени тяжести и активности псориаза PASI (Psoriasis Area and Severity Index) и BSA (Body Surface Area). Также, при оценке эффективности терапии используют индекс PASI 75, который указывает на снижение баллов PASI на 75% или более от исходного уровня [55]. Однако, у новорожденных и детей младшего возраста возникают сложности в применении PASI и тогда используется BSA. Однако, индекс BSA не учитывает выраженность эритемы, инфильтрации, шелушения и зуда [417]. Степень тяжести кожи с помощью индексов (PASI в баллах/BSA в %) оценивается следующим образом: <10/<5% легкая; от 10 до 20 /<10% – средняя; >20/>10% – тяжелая [27].

1.7.3. Современная диагностика рассеянного склероза у детей

Диагноз РС устанавливается на основании клинических и данных МРТ с применением критериев McDonald в редакции 2017 года при типичной картине РС [554].

Критерии McDonald включают диссеминацию в пространстве и времени (Таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Критерии McDonald для постановки диагноза РС у детей (адаптировано по) [28]

Диссеминация в пространстве	Диссеминация во времени
Клинически	
●Наличие признаков ≥2 клинических очагов поражения	●Обострение с вовлечением нового участка ЦНС (не менее 24 часов) ●Интервал между атаками не менее 1 месяца
МРТ-данные	
●≥1 Т2-гиперинтенсивных очагов в ≥2 областях ЦНС (перивентрикулярно, кортикально/юкстакортикально, инфратенториально, в спинном мозге)	**1**. ●Одновременное выявление очагов (накапливающих и ненакапливающих контраст на МРТ, в любое время от начала заболевания) ●Очаги могут давать симптомы и не давать. При наличии других критериев – РС подтверждается без повторной МРТ **2.** ●Появление новых Т2-гиперинтенсивных или накапливающих контраст очагов на повторной МРТ ● Интервал между 1 и 2 МРТ любой

При физикальном обследовании для оценки тяжести неврологического дефицита у пациентов с РС используют расширенную шкалу инвалидизации с баллами от 1 до 10. Степень EDSS: 1 – микросимптомы; от 1-4 – не требуется посторонняя помощь в обслуживании; с 7 – в кресле-каталке; 10 – смерть от РС [349].

Лабораторная диагностика РС включает достаточные исследования и дополнительные [28].

К достаточным относятся:

1) ОАК (общий анализ крови);

2) исследования в сыворотки крови: биохимическое, С-реактивный белок, фибриноген, общий кальций; уровень тиреотропного гормона, свободный тироксин, антитела к тиреопероксидазе, уровень тиреоглобулина;

3) клинический анализ мочи с микроскопией осадка;

4) определение антигенов и антител к различным вирусам: IgM, IgG к вирусу иммунодефицита человека ВИЧ-1 и ВИЧ-2, HbsAg, антитела к HBsAg, антитела HBcAg, антител к вирусу гепатита С, антитела к Treponema pallidum в нетрепонемных тестах;

5) аутоантитела к антигенам ядра клетки и ДНК [556].

Дополнительные исследования (для дифференциальной диагностики):

1) при подозрении на церебральную аутосомно-доминантную артериопатию с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией рекомендуется назначение молекулярно-генетического исследования мутации в гене NOTCH3 [596];

2) определение витамина В12 - при подозрении на его дефицит [514];

3) определение наличия JC-вируса в ликворе с помощью ПЦР – при подозрении на прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию [286];

4) определение антител к аквапорину-4 в культуре трансфицированных клеток, экспрессирующих аквапорин-4 – при подозрении на оптиконейромиелит (специфичность от 97 до 98%) [491];

5) определение антител к антигенам ядра клетки, ДНК, антител к экстрагируемым ядерным антигенам – при подозрении на системные заболевания соединительной ткани, имеющие симптомы, затрагивающие ЦНС (системная красная волчанка, синдром Шегрена) [532];

6) исследование синтеза олигоклональных IgG – подтверждает диссеминацию во времени согласно критериям МакДональда. Однако есть ограничения: в ликворе должны отсутствовать атипичные показатели, например, плеоцитоз (>50 клеток/мм^3, белок >100 мг/дл, эозинофилы, атипичные клетки). При этом, олигоклональные IgG в ликворе не являются специфичным маркером для РС, и могут присутствовать при различных воспалительных и инфекционных заболеваниях [537]. Тем не менее, при РС олигоклональные IgG могут выявляться у детей в 50-90 % случаев [150]. Наибольшая информативность теста показана в группе детей от 12-17 лет [139];

7) в дополнение к олигоклональным IgG проводят исследование концентрации свободных легких цепей иммуноглобулинов каппа (k-СЛЦ). При отрицательном анализе на олигоклональные антитела выявление k-СЛЦ подтверждает воспалительный процесс у пациентов с РС [225, 397], а также k-СЛЦ является прогностическим маркером риска прогрессирования РС [51, 481];

При постановке диагноза РС необходима дифференцированная диагностика с другими демиелинизирующими заболеваниями ЦНС. Так, выявление антител к олигодендроцитарному гликопротеину (MOG), аквапорину-4 снимает диагноз РС [272].

1.8. Особенности лечения детей с иммунозависимыми заболеваниями

1.8.1. Особенности лечения детей с воспалительными заболеваниями кишечника

Выбор терапии как для БК, так и для ЯК определяется тяжестью воспалительного процесса. Лечение ВЗК включает комплекс лечебных мероприятий: подбор лекарственных средств, выбор тактики ведения пациента (консервативное, хирургическое вмешательство), профилактику осложнений и внекишечных проявлений [5]. Кроме того, при БК должны учитываться факторы неблагоприятного течения такие как: тотальное поражение тонкой кишки, тяжелое течение после индукционной терапии, глубокое язвенное поражение толстой кишки, снижение темпов роста, тяжелый остеопороз и другие [574] Целью терапии ВЗК является достижение быстрой клинической и эндоскопической ремиссии, улучшение качества жизни, а также обеспечение физического развития согласно возрасту [490, 567]. Целью терапии является не только ослабление симптомов, но также и достижение удовлетворительного качества жизни. Для пациентов с БК энтеральное питании (ЭП - специализированные питательные смеси) (6-8 недель) является первой линией терапии для индукции ремиссии, за исключением случаев тяжелого панколита, оральной или перианальной формы БК [574]. У пациентов с

ЯК также возможно ЭП при невозможности приема обычной пищи [134]. При невозможности применения ЭП у пациентов с БК, а также при повторном обострении со среднетяжелым и тяжелым течением для индукции ремиссии назначаются кортикостероиды системного действия (КС) [26]. При ЯК КС также применяются при среднетяжелой атаке с системными проявлениями, при неэффективности терапии препаратами аминосалициловой кислоты (5-АСК) [562]. Для поддержания ремиссии у детей с БК в комплексе с КС или у детей из группы риска по неблагоприятному исходу применяются аналоги пурина (азатиоприн, меркаптопурин) [450]. У детей с ЯК с непереносимостью 5-АСК или аналогов, с частыми обострениями (2-3 раза в год), с гормонозависимой формой на фоне 5-АСК также рекомендуется назначение аналогов пурина [563, 564]. При неэффективности или непереносимости аналогов пурина возможно назначение метотрексата как у пациентов с БК, так и ЯК [450, 563, 564].

Накоплен большой опыт применения блокаторов TNF в лечении ВЗК. Для лечения ВЗК с конца 1990-х годов применяется инфликсимаб – моноклональное антитело подкласса IgG1, состоящие приблизительно на 75% из человеческих и на 25% из мышиных последовательностей. Адалимумаб (ADA) был одобрен к применению только в 2002 г. [367]. ADA представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело IgG1. IFX и ADA специфически связываются с TNF, нейтрализуя эффект цитокина, блокируя его взаимодействие с рецепторами TNF на клеточной поверхности p55 и p75 [558]. Одним из механизмов действия IFX и ADA, как это было показано в исследовании in vitro, является комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимая клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) в трансмембранных TNF-экспрессирующих Т-клетках [178].

Блокаторы TNF в Российской когорте детей с ВЗК с разными формами и в разных возрастных группах применяются уже почти 20 лет [367]. Опыт использования анти-TNF препаратов в Российских и международных клинических исследованиях был отражен в клинических рекомендациях. Назначение блокаторов TNF показано при лечении ВЗК у детей с тяжелым течением и средней

степени тяжести с 6 лет (в отдельных случаях до 6 лет). Также при неэффективности, побочных реакциях от традиционной терапии. Кроме того, при свищевой форме БК [26, 29, 328, 574]. У взрослых пациентов с БК показана эффективность инфликсимаба при лечении различных внекишечных проявлений [20, 442].

Согласно рекомендациям при лечении детей с ВЗК примененяются стандартные схемы во время индукционного курса: внутривенная инфузия IFX (5 мг/кг) на 0, 2, 6 неделе; подкожное введение ADA на 0 неделе (≥40 кг массы тела – 160 мг; <40 массы тела – 80 мг), на 2 неделе (≥40 кг массы тела – 80 мг ; <40 массы тела – 40 мг). Далее следует поддерживающий курс терапии: IFX инфузия 1 раз в 8 недель (5 мг/кг); подкожное введение ADA 1 раз в 2 недели (40 мг) [26, 29, 563].

Показана значимость измерения концентрации биологических препаратов в крови пациентов при лечении ВЗК. При неэффективности анти-TNF терапии у пациентов с болезнью Крона применяется стратегия оптимизации лечения, включающая: увеличение дозы (например, инфликсимаб до 10 мг/кг); сокращение интервалов между введениями (для инфликсимаба – до 4 недель, для адалимумаба – до еженедельного режима). В данной ситуации обязательным является мониторинг концентрации препарата в сыворотке крови, целевой диапазон которой составляет 3-8 мкг/мл [542].

Для пациентов с язвенным колитом, у которых после индукционного курса анти-TNF терапии отмечается недостаточный ответ, также рекомендован мониторинг уровней препарата и антител к нему. Оптимальными сроками оценки для инфликсимаба является 14-я неделя, для адалимумаба период 8-10 недели [563]. Рекомендованый уровень препаратов для поддержания ремиссии у пациентов с ЯК: IFX – 5 мкг/мл, ADA – 7,5 мкг/мл [29].

Показана эффективность проведения комбинированной терапии с применением анти-TNF и азатиоприна, но имеется высокий риск развития побочных реакций (лимфомы) [494].

Результаты исследований биологических препаратов при ВЗК демонстрируют их высокую эффективность в разных возрастных категориях.

Однако отмечается развитие резистентности, и совокупная частота отсутствия ответа на терапию (включая первичную и вторичную неэффективность) может достигать 50% после года лечения [379, 472]. В случае неэффективности анти-TNF терапии у детей с БК рекомендовано назначение устекинумаба (блокатор активности IL-12/13) или ведолизумаба (гуманизированное моноклональные IgG1 к β4a7-интегрину и молекулам клеточной адгезии слизистой оболочки кишечника адрессину-1 (MAdCAM-1), препятствующего миграции Т-хелперов в стенку кишечника [392, 536, 574]. В клиническом исследовании показана эффективность применения устекинумаба на 52 неделе у 39-40% детей с БК. Для достижения ремиссии вводят 6 мг/кг устекинумаб (1 раз в 8 недель) [574]. Ведолизумаб используется и у пациентов с ЯК при неэффективности IFX и ADA или непереносимости [132, 288, 351]. Во время индукции (0, 2, 6 неделя) препарат вводится в дозе 5 мг/кг (далее 6-10 мг/кг), в последующем каждые 8 недель [563]. При недостаточном эффекте возможно введение 1 раз в 4 недели, детям с массой <30 кг требуются более высокие дозы. В исследовании показано, что достижение ремиссии при лечении ведолизумабом выше у детей БК без предшествующей анти-TNF терапии [536]. Имеется положительный опыт применения препаратов янус-киназ у детей от 2 до 17 лет с ВЗК. Показано, что применение упадацитиниба (селективный ингибитор янус-киназы 1) снижало активность заболевания (по клинико-лабораторным показателям) у детей с ВЗК при неэффективности предшествующей биологической терапии [63]. Также, для оптимизации терапии рекомендовано селективное применение тофацитиниба детям с ЯК при отсутствии эффекта от инфликсимаба, адалимумаба, голимумаба (ингибитор TNF), ведолизумаба [29].

ВЗК – это хроническое, рецидивирующее заболевание для которого медикаментозный контроль необходим в течении многих лет. Поэтому лечащих врачей волнует вопрос эффективности препаратов, их смены в результате неэффективности, сравнение эффекта от разных препаратов и их выживаемость.

Выживаемость терапии – это отрезок времени от начала терапии до ее отмены/смены по каким-либо причинам и отражает ряд характеристик препарата в

том числе его эффективность (первичная или вторичная неэффективностью, побочными явлениями и др.) [19, 50]. Недавнее масштабное исследование в Великобритании у 13222 тысяч взрослых пациентов с ВЗК показало, что выживаемость терапии выше для IFX по сравнению с ADA через 1, 3, 5 и 10 лет терапии [321].

Появились исследования, которые изучают отмену блокаторов TNF при ВЗК. Показано, что частота рецидивов после отмены анти-TNF препаратов у пациентов с клинической и эндоскопической ремиссией составляет около 40% в течение 1 года и 50% через 2 года [512]. В дальнейшем пациентам с обострением заболевания требуется возобновление терапии теми же биопрепаратами. При этом показана безопасность и эффективность многократного применения биопрепаратов [512].

1.8.2. Особенности лечения детей с псориазом

Терапия псориаза у детей зависит от возраста, типа псориаза, тяжести, локализации поражения и распространенности, наличия сопутствующей патологии [334]. Для определения тактики лечения пациента требуется участие дерматологов, педиатров и ревматологов. Для пациентов с псориазом применяется последовательное назначение различных типов лечения: местное (наружное), фототерапия, системная, в том числе биологическая [146]. Перед назначением определенного типа лечения и мониторинга безопасности терапии необходимо клиническое и лабораторное обследование пациента с оценкой активности заболевания [145].

В качестве наружной терапии используются топические кортикостероиды (первая линия) для лечения псориаза любых форми [27]. Используются средства для увлажнения и восстановления барьерной функции –эмоленты; для коррекции кератинизации кератолитики – аналог витамина D3 (кальципотриол); противовоспалительные препараты в виде мазей (5-10% нафталанская нефть) [3, 56]. Фототерапия используется при тяжелых формах псориаза, а также торпидном течении заболевания у детей с 7 лет. УФВ-311 предпочтительна в очагах поражения

с незначительной инфильтрацией [27, 82, 230]. В качестве альтернативной терапии в отсутствии удовлетворительных результатов от местной терапии у детей старше 12 лет с хроническим бляшечным или каплевидным псориазом возможно назначение псоралена плюс ультрафиолет А (PUVA) [334, 417].

Назначение системной терапии требуется при умеренном и тяжелом течении заболевания. Метотрексат – наиболее распространенный системный препаратом, использующийся при псориазе у детей. Возможно назначение циклоспорина и системных ретиноидов в отсутствии эффекта от других средств [146, 334, 417].

Согласно клиническим рекомендациям по лечению псориаза показанием к назначению ГИБП является отсутствие эффекта от других препаратов и методов, а также в случаях непереносимости или противопоказаниях [27]. Кроме того, объективными критериями для назначения являются: BSA≥10 %, PASI≥10, детский дерматологический индекс качества жизни (DLQI) ≥10 [230].

В России для лечения детей с псориазом разрешены блокаторы TNF (адалимумаб, этанерцепт – в качестве первой линии), ингибиторы интерлейкинов (устекинумаб, секукинумаб, иксекизумаб). Показана роль блокаторов TNF в модуляции активности эффекторных (Th1-, Th17-лимфоцитов) и Т-регуляторных клеток [253]. Адалимумаб разрешен к применению у детей с 4-х лет при хроническом бляшечном псориазе (тяжелой степени) [27, 56, 330]. В международном многоцентровом рандомизированном двойном слепом исследовании 3 фазы продемонстрирована наибольшая эффективность адалимумаба у детей с псориазом в сравнении с метотрексатом [467].

Этанерцепт (ETA) – это рекомбинантный химерный димер, выступающий в роли конкурентного ингибитора фактора некроза опухоли. Его механизм действия основан на блокировании связывания TNF с клеточным рецептором [352]. ETA разрешен для лечения детей (с 6 лет) с тяжелым псориазом [27]. Показана его эффективность в нескольких клинических исследованиях [226, 453].

Устекинумаб (UST) – гуманизированное моноклональное антитело (IgG1κ) к общей p40-субъединице IL-12/IL-23, блокирующее их взаимодействие с рецептором IL-12Rβ1 [56, 229]. Применяется при среднетяжелом/тяжелом псориазе

с 6 лет, а у детей старше 12 лет – как терапия третьей линии [27]. В клинических исследованиях 3 фазы CADMUS и CADMUS Jr была установлена эффективность и безопасность использования UST у пациентов с умеренным и тяжелым бляшечным псориазом в возрастных группах от 6 до 12 лет и старше 12 лет [353, 463]. Также, разрешены и успешно применяются препараты, нацеленные против IL-17A - секукинумаб (с 6 лет) и иксекизумаб (с 12 лет) для лечения среднетяжелого и тяжелого бляшечного псориаза [27].

Секукинумаб – это полностью человеческое IgG1 МАТ, а иксекизумаб гуманизированное IgG4 МАТ. И тот и другой препарат селективно связываются с IL-17A и ингибируют его взаимодействие с рецептором [229]. К сожалению, еще не так много когортных исследований проведено по оценке эффективности и безопасности данных препаратов у детей. В рандомизированном двойном слепом исследовании 3 фазы была продемонстрирована высокая эффективность секукинумаба в течении 52-х недель наблюдения с благоприятным профилем безопасности у детей с тяжелым хроническим бляшечным псориазом [137].

В двойном слепом, рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании 3 фазы IXORA-PEDS по оценке применения иксекизумаба при псориазе у детей показана эффективность и безопасность сопоставимая с исследованиями, проведенными у взрослых [453]. Недавно проведенный метаанализ с использованием модели случайных эффектов у детей с псориазом показал эффективность в порядке убывания для следующих препаратов: высокой дозы устекинумаба, низкой дозы устекинумаба, низкой дозы секукинумаба, иксекизумаба, высокой дозы секукинумаба, этанерцепта [170]. Результаты международных и российских клинических исследований свидетельствуют о высокой эффективности ГИБП для лечения псориаза у детей и ассоциированы с достижением устойчивой клинической ремиссии [86, 128, 184].

Несмотря на успехи в использовании ГИБП, у 20 % пациентов возникает резистентность к применяемому препарату и возникает вопрос о смене терапии [462]. Поэтому, имеется необходимость поиска предикторных маркеров эффективности терапии и оценки выживаемости биологической терапии. В одном

из ретроспективных исследований были проанализированы результаты выживаемости у 70 детей на этанерцепте, 68 на адалимумабе и 46 детей, получавших устекинумаб [462]. Наиболее длительное эффективное применение продемонстрировано у бионаивных пациентов (не получавших ранее биологических препаратов) при лечении устекинумабом [462].

Наиболее распространенными причинами отмены ГИБП авторы называют первичную (8,9%) и вторичную потерю резистентности (19,2%). Прекращение приема ГИБП пациентами из-за потери эффекта было более частым для этанерцепта (34,9%), чем для адалимумаба (9,1%) и не было отмечено для устекинумаба (0%). Также, Zitouni J с соавторами после проведенного исследования по оценке эффективности и безопасности адалимумаба, этанерцепта и устекинумаба сообщили, что наиболее распространенными случаями прекращения ГИБП в когорте франко-итальянских детей (82 ребенка, 106 курсов ГИБП) являлись неэффективность (потеря эффективности в 19,8% случаев и первичная неэффективность в 8,5% случаев), а также прекращения лечения в результате ремиссии (13,2%) [643]. Сравнительное исследование в группах российских детей показало, что лечение устекинумабом позволяет достичь более длительного терапевтического успеха, чем терапия этанерцептом или адалимумабом [19]. Причем, в группе бионаивных пациентов показатель выживаемости для устекинумаба и этанерцепта был выше в сравнении с пациентами, получавшими ранее лечение другими ГИБП. В тоже время показатель выживаемости для ADA достоверно не отличался в группе бионаивных и пациентов с предшествующей терапией ГИБП [19].

Несмотря на успехи, достигнутые в лечении псориаза у детей, не существует объективных критериев, основанных на информативных биомаркерах, для оценки эффективности ГИБП.

1.8.3. Особенности лечения детей с рассеянным склерозом

Согласно клиническим рекомендациям Минздрава России лечение РС включает в себя терапию обострений РС, назначение препаратов, изменяющих течение заболевания, коррекцию симптомов заболевания [28]. При обострении заболевания рекомендовано назначение глюкокортикоидов (ГК) в высоких дозах [420, 439]. Показано снижение индекса инвалидизации EDSS через 4 - 5 недель назначения ГК [401]. В случае неэффективности ГК терапии для купирования обострения возможно назначение плазмафереза [210]. Также, при наличии противопоказаний к ГК детям с РС при обострении применяют внутривенное введение иммуноглобулина человека в течение 5 дней [107, 306, 438].

У детей с РС в 40 % случаев активность процесса может быть высокой, приводящая к ранним когнитивным нарушениям [303]. Поэтому, важно, как можно раньше назначить препараты, изменяющие течение РС (ПИТРС) [34]. В России разрешенными к применению у детей является только 2 препарата ПИТРС: интерферон-β - ПИТРС 1-ой линии (с 12 лет), финголимод - ПИТРС 2-ой линии (с 10 лет) [1]. Детям с ремитирующим РС рекомендовано раннее назначение ПИТРС первой линии интерферон бета-1а (INFβ-1a) 30 мкг (внутримышечно 1 раз в неделю) или 44 мкг (подкожно 3 раза в неделю) для предотвращения обострений, активности заболевания по МРТ (головного/спинного мозга), а также инвалидизации [553]. Оценку эффективности терапии проводят 1 раз в 6 месяцев [458]. Предполагается, что INFβ-1a снижает активацию и способность эффекторных клеток проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), ингибируя матриксные металлопротеиназы [314]. Кроме того, INFβ-1a индуцирует продукцию противовоспалительного IL-10, ингибирующего эффекторные Т-клетки [623].

Помимо интерферона в качестве ПИТРС 1-ой линии в 2012 году международной группой по изучению РС у детей (IPMSSG) рекомендовано детям ≥12 лет применение глатирамера ацетата, индуцирующего активацию глатирамера ацетат-специфических супрессорных Т-клеток [99, 121].

Финголимод для применения у детей был одобрен в 2018 г. FDA и EMA детям с 10 лет с быстропрогрессирующим РС (EDSS ≤ 6,5 баллов) в качестве ПИТРС второй линии (0,5 мг перорально один раз в день) [99, 172, 195]. Финголимод блокирует выход лимфоцитов из лимфоузлов за счет связывания с рецепторами сфингозин-1-фосфата на Т-лимфоцитах, при этом происходит уменьшение лимфоцитарной инфильтрации ЦНС, в том числе Th17-лимфоцитами [195]. Необходимо отметить, что финголимод вызывает ряд серьезных побочных реакций: лейкопению, судороги, а также риск развития прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии (ПМЛ) при реактивации латентного JCV-вируса (вирус Джона Каннингема) [38].

Продолжается клиническое исследование алемтузумаба (LemKids, NCT03368664, окончание исследования – 2025г) по оценки эффективности и безопасности в группе детей от 10 до 18 лет в качестве терапии 2-ой линии ПИТРС. Показанием для его назначения является отсутствие эффекта от применения 2-х предыдущих ПИТРС 1-ой линии. Алемтузумаб представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное IgG1 антитело (МАТ) против CD52. При связывании алемтузумаба с CD52 на Т- и В-клетках происходит активация антителозависимой клеточной цитотоксичности и комплемент-зависимый лизис, приводя к истощению лимфоцитарной популяции. Показана эффективность его использования у взрослых [291].

В клинических рекомендациях от 2025 г. появились несколько высокоэффективных препаратов для назначения детям с РС в возрасте от 10 до 18 лет в качестве ПИТРС 2-ой линии: натализумаб, окрелизумаб, офатумумаб (анти-CD20 МАТ) [28]. В ряде клинических исследований у детей с РС была показана эффективность использования натализумаба, гуманизированного МАТ против α4β1-интегрина. Показано снижение EDSS с 1,5 до 1 балла через 2 года лечения (21 пациент). При этом, у всех пациентов через год лечения не было выявлено активных очагов по МРТ [452]. В другом исследовании у 20 пациентов, не получавших ранее ПИТРС, исследовалось применение натализумаба в качестве 1-ой линии терапии [404]. После 42 инфузий только у 2 пациентов из 20 наблюдались

активные очаги по МРТ. Одним из крайне тяжелых осложнений применения натализумаба считается развитие ПМЛ за счет реактивации латентного JCV. Отмечалось, что через 2 года наблюдений у 50% пациентов были найдены положительные антитела к JCV. Поэтому перед началом лечения важно провести анализ на наличие антител к JCV. По опубликованным данным 21% здоровых детей имеют положительные антитела к JCV [324]. Риск реактивации латентного JCV зависит от длительности терапии натализумабом. Данные о риске ПМЛ у детей отсутствуют. Отмечено, что риск ПМЛ зависит от продолжительности применения натализумаба, поэтому длительность непрерывного лечения натализумабом у детей рекомендовано ограничить 2 годами [9]. Долгосрочная безопасность использования натализумаба неизвестна и необходимы дальнейшие исследования его применения на большей выборке пациентов.

Другим высоэффективным препаратом, который может быть использован в качестве ПИТРС 2-ой линии, является окрелизумаб, представляющим собой МАТ против CD20 (300 мг препарата – однократно, 300 мг препарата через 2 недели, далее по 600 мг внутривенно каждые 6 месяцев). Перед началом терапии необходимо провести исследование на туберкулез и гепатит В. При связывании препарата с CD20 на поверхности В-клеток происходит активация различных механизмов цитолиза (антителозависимая клеточная цитотоксичность, комплементзависимая цитотоксичность, антителозависимый фагоцитоз). Считается, что быстрый эффект терапии у пациентов с РС объясняется истощением В-клеток памяти, продуцирующих провоспалительные цитокины [583]. Несколько клинических исследований по оценки эффективности и безопасности у детей и подростков продолжаются (NCT04075266, планируется завершение в 2027г.; NCT05123703; NEOS, NCT04926818). Одно из них проводится у детей с ремиттирующим РС в сравнении с финголимодом (Operetta 2, NCT05123703, планируется окончание в 2025 г.), другое в сравнении с модулятором S1P-рецепторов второго поколения (NEOS, NCT04926818).

Сообщалось об использовании аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в небольшой группе у детей с РС (21 человек)

[161]. У 16 пациентов было отмечено улучшение по шкале EDSS. У 2 человек через год после трансплантации было зафиксировано обострение РС.

Были попытки рассматривать цитокины в качестве таргетных мишеней при лечении РС [509]. Однако, каких-либо успешных исследований в данном направлении так и не было представлено.

Несмотря на другие механизмы действия биологических препаратов при РС по сравнению с ВЗК и ПС, но учитывая ключевую роль клеток иммунной системы в патогенезе РС, определение иммунологических показателей (содержание эффекторных и регуляторных клеток, содержание цитокинов и др.) может быть информативно для оценки тяжести и эффективности терапии у пациентов с РС.

1.9. Мониторинг концентрации биологических препаратов и антител к ним в сыворотке крови у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями

1.9.1. Мониторинг концентрации блокаторов TNF и антител к ним в сыворотке крови у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника

Использование терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) блокаторов TNF у пациентов с ВЗК описано в ряде работ [541, 542, 543]. Продемонстрировано положительное влияние ТЛМ на результаты лечения во взрослой когорте больных ВЗК [177, 319, 566]. Показана корреляция концентрации анти-TNF препаратов после индукции с эффектом к году лечения [133, 505]. Целесообразно проведение мониторинга антител к IFX после индукционного курса на 14 неделе препарата, а антител к ADA в период с 8-ой по 10-ую неделю терапии [563].

У части пациентов с ВЗК в процессе лечения анти-TNF препаратами обнаруживаются антитела к ним (антилекарственные антител – АЛА) [516]. В исследовании, проведенном у детей с ВЗК, получена обратная корреляция АЛА с концентрациями IFX [573].

Оценка реактивного ТЛМ (при обострении заболевания) показала, что приблизительно у 50 % определялся субтерапевтический уровень остаточного препарата без наличия АЛА [526]. Это, как полагают, объясняется быстрым клиренсом препарата при высокой воспалительной нагрузке или неоптимальной дозировкой. В такой ситуации рекомендовано введение большего количества препарата (увеличение дозы или частоты введения) [526]. В 20 % случаев у пациентов был обнаружен субтерапевтический уровень препарата при наличии «нейтрализующих» АЛА. При низких титрах АЛА возможно назначение иммуномодулирующих препаратов и введения большего количества того же биологического агента. В случае получения высоких титров АЛА необходимо переключение на другой биологический препарат в пределах одного класса или другого класса в зависимости от первоначальной реакции пациента на препарат [526]. В 25 % случаев у пациентов уровень ГИБП был терапевтическим в отсутствии АЛА, что может быть объяснено другим патогенетическим (не анти-TNF) механизмом. В данной ситуации, как считают, целесообразно переключение на биологический препарат другого класса [559].

Согласно мнению различных Европейских экспертов, пациентам с ВЗК необходимо проводить ТЛМ блокаторов TNF препаратов и антител к ним после окончания индукционного курса хотя бы один раз [248, 455]. Минимальная рекомендованная концентрация IFX отражена в консенсусах Европейских организаций ECCO и ESPGHAN. Уровень IFX в 5 мкг/мл коррелирует с наилучшей эффективностью к году лечения [531, 563, 574]. Продемонстрировано, что у детей с клинической и эндоскопической ремиссией в период поддерживающей терапии определяются достоверно более высокие уровни инфликсимаба, чем у детей в обострении ВЗК [440, 573]. У детей с БК концентрация ADA в период поддерживающей терапии должна быть не меньше 7,5 мкг/мл [574]. Изменение тактики лечения блокаторами TNF целесообразно проводить после измерения концентрации препарата в сыворотке крови перед плановым введением препарата [576].

1.9.2. Мониторинг концентрации адалимумаба и антител к ним в сыворотке крови у пациентов с псориазом

Остаточный уровень ADA оценивался у пациентов с псориазом, но диапазоны достаточного терапевтического уровня отличаются у разных исследователей. Первые работы по оценке минимального уровня ADA для достижения PASI 75 были проведены в работах Lecluse LL [357], Takahashi H [551] и составили 9,7 мг/л и 7,84 мкг/мл соответственно. Menting SP и соавторы показали достаточность уровня ADA в диапазоне от 3,51 до 7,00 мг/л для достижения ремиссии у пациентов с ПС [418]. Высокие уровни (выше 7 мкг/л) препарата у пациентов не приводили к улучшению ответа на лечение [418]. Wilkinson с соавторами, используя проактивный мониторинг, показали, что пациенты с уровнем ADA не менее 7 мкг/мл на ранней стадии терапии, имели 78% вероятность достижения PASI 75 через 6 месяцев [598]. При этом, 50% пациентов, не ответивших на лечение, имели субтерапевтические уровни, а около 40% пациентов, достигших 90% улучшения исходного PASI, показали высокие терапевтические уровни [598].

Ведутся споры о необходимости рутинного определения нейтрализующих антител у пациентов с псориазом [325]. Недавнее исследование по оценке АЛА против различных биологических препаратов у пациентов с псориазом (42 тыс. человек) показало, что наименьший процент АЛА у пациентов образуется против секукинумаба – 0,49%. АЛА к этанерцепту составляли 2,2%, устекинумабу – 4,08% и адалимумабу – 31,8%. При этом отмечалось, что более 70% АЛА к ADA были нейтрализующими, тогда как более 70 % АЛА к секукинумабу - транзиторными. Терапия метотрексатом снижала уровни АЛА. Также было показано, что снижение дозы (для IFX) и прерывистая терапия для блокаторов IL-23 приводила к возникновению АЛА.

1.9.3. Мониторинг концентрации INFβ-1a и антител к ним в сыворотке крови у пациентов с рассеянным склерозом

Методов оценки остаточного уровня INFβ-1a у пациентов с РС не существует. Однако, оцениваются уровни нейтрализующих антител. Нейтрализующие антитела могут выявляться у пациентов с РС уже через 3-6 месяцев после начала введения INFβ-1a [8, 571]. Уровень нейтрализующих антител может быть оценен с помощью чувствительной клеточной линии к INFβ-1a (иммуноблотинг, иммуноферментный анализ) и по данным отечественных авторов составляет около 60 % [48, 57]. Однако, данные методы трудоемки и не стандартизированы. В тоже время, известно, что появление АЛА зависит от дозы, частоты, способа введения и используемого препарата [114]. В работе Dunn N с соавторами показано, что высокий титр АЛА к INFβ-1a связан с более высокой активностью заболевания. Поэтому, необходимо использование высокоэффективного лечения на более ранних стадиях у пациентов с активным заболеванием [235].

Таким образом, мониторинг остаточного уровня биологической терапии и определение антител к используемым у пациентов ГИБП может быть клиническим инструментом в прогнозе эффективности и коррекции терапии.

1.10. Заключение к главе

Иммунопатогенез воспалительных заболеваний кишечника, псориаза и рассеянного склероза характеризуется сложным специфичным комплексов взаимодействий между иммунными клетками и их микроокружением. Тем не менее, патогенез рассмотренных патологий имеет общие закономерности, в том числе, обусловленные общими генами полиморфизма и, вероятно, универсальными путями ответа на триггерные факторы инициации аутоиммунитета. При ВЗК, ПС и РС развивается нарушение соотношения между эффекторными и регуляторными клетками, приводящего к активации сигнальных

путей NF-κB и гиперпродукции каскада провоспалительных цитокинов. ГИБП успешно применяются при ВЗК, ПС и РС. Однако, существует риск возникновения резистентности к терапии. Современные представления об иммунопатогенезе иммунозависимых заболеваний (ВЗК, ПС и РС), позволяют предположить, что в качестве потенциальных предиктивных биомаркеров ответа на биологическую терапию можно рассматривать следующие параметры: количественные показатели популяций иммунных клеток (Th17, регуляторные Т-клетки (Treg), миелоидные супрессорные клетки; качественные клеточные показатели (активность ключевых метаболических ферментов, активность и функциональность сигнальных молекул); гуморальные и фармакокинетические показатели (концентрация цитокинов при обострении/ремиссии в динамике, терапевтический лекарственный мониторинг блокаторов TNF и антител к ним).

Поиск информативных предикторных маркеров и способов, позволяющих оценивать и прогнозировать ответ на лечение биологическими препаратами при различных иммунозависимых заболеваниях (ВЗК, ПС и РС), представляет собой одну из наиболее значимых проблем современной медицины как с научной, так и с практической точки зрения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клинико-анамнестические сведения о пациентах

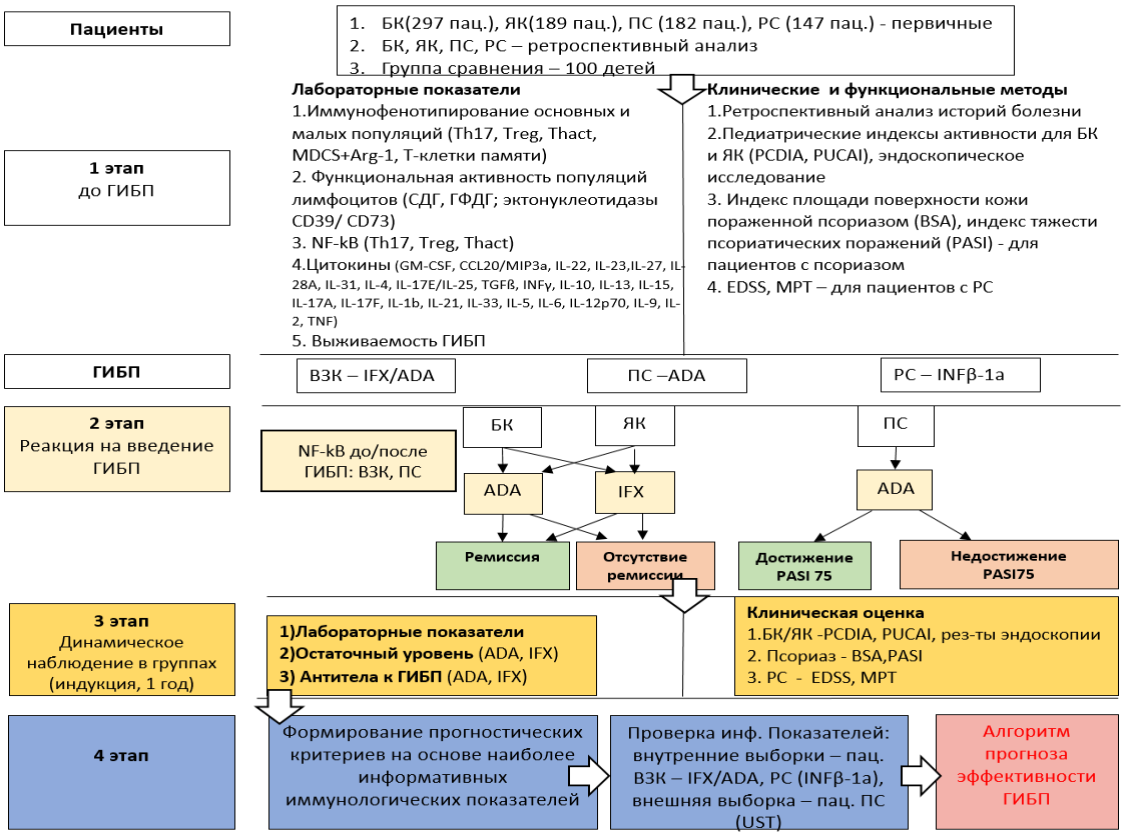
Исследование проведено на базе ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России (директор – заслуженный врач Российской Федерации, д.м.н., профессор А.П. Фисенко) в подразделениях: гастроэнтерологическом отделении Центра воспалительных заболеваний кишечника у детей (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), лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии (и.о. заведующего лабораторией – к.м.н., О.В. Курбатова), клинико-диагностической лаборатории (заведующая лабораторией – к.м.н., С.С. Акулова) лабораторного отдела (заведующая отделом – д.м.н., Е.Л. Семикина).

Оценка АТФ-азной активности эктонуклеотидаз проводилась на мультипланшетном считывателе Clariostar (BMG, Германия) в лаборатории нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ (заведующая лабораторией – к.м.н., Бакаева З.В.). МРТ головного и спинного мозга выполняли в лаборатории лучевой и инструментальной диагностики (заведующий лабораторией – к.м.н., А.В. Аникин). Эндоскопические исследования пациентам проводили в лаборатории эндоскопических, морфологических и патологоанатомических исследований (заведующий отделением – д.м.н. М.М. Лохматов) ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России. Эндоскопические исследования проводились с помощью аппаратов Olympus (Olympus Corporation, Япония), Fujifilm (Fuji Photo Optical Co, Япония), Pentax (Pentax Corporation, Япония).

Исследование являлось частью научно-исследовательских работ (номер регистрационной карты в ЕГИСУ НИОКР АААА-А19-119013090093-2; номер

регистрационной карты в ЕГИСУ НИОКР АААА-А22-122040800220-9) и получило одобрение Локального этического комитета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (протокол № 9 от 10 июля 2020 г).

Общая численность обследованной когорты детей составила 915 человек (Рисунок 2.1).



Примечание: БК – болезнь Крона, ЯК – язвенный колит, ПС – вульгарный псориаз, РС – рассеянный склероз, MDSCs – миелоидные клетки – супрессоры, ADA – адалимумаб, IFX – инфликсимаб, INFβ-1a – интерферон бета-1a, UST- устекинумаб

Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

Из них: 486 пациентов с ВЗК (с БК – 297, с ЯК – 189); 182 ребёнка с вульгарным псориазом; 147 детей с рассеянным склерозом; 100 детей – группа сравнения. Пациенты с ИЗЗ находились на биологической терапии: пациенты с ВЗК – блокаторы TNF (IFX/ADA), пациенты с ПС – ADA, пациенты с РС - INFβ-1a. Часть пациентов получали комбинированную терапию с дополнительными иммуносупрессорами: азатиоприн – 80 % пациентов с ВЗК при лечении IFX и 46 % пациентов с ВЗК при терапии ADA; метотрексат – 45% пациентов с ПС.

В исследование не были включены дети: возраст старше 18 лет; другие острые/хронические заболевания или иммунозависимые заболевания (помимо ВЗК, ПС, РС); наличие метаболических заболеваний. В группу сравнения включали детей: возраст младше 18 лет; без отклонений показателей в клинических и биохимических тестах; отсутствие в анамнезе ряда заболеваний (онкологических, аутоиммунных, психических); без каких-либо повреждений/ушибов; отсутствие острых/хронических процессов.

Распределение пациентов по формам патологии и группам представлены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Клинико-анамнестические данные обследованных пациентов

Пациенты / Характеристика	БК	ЯК	Псориаз	РС
	297	189	182	147
Число наблюдений	594	349	325	359
Обострение (кол-во пац.)	159	111	92	51
Ремиссия (кол-во пац.)	138	78	90	96
Терапия (кол-во пац.)	IFX - 139 ADA - 158	IFX - 88 ADA - 101	ADA	INFβ-1a
Эффективность* (кол-во пац.)	IFX - 58 ADA - 45	IFX - 46 ADA - 24	ADA - 52	54
НЭ* (кол-во пац.)	IFX - 30 ADA - 36	IFX - 36 ADA - 19	ADA - 58	40
Возраст, год	IFX 14,1 (11,1-15,8) ADA 15,5 (13,1-16,9)	IFX 12,1 (7,1-15,5) ADA 13,7 (8,8-15,9)	12,5 (8,5-15,3)	15,9 (14,7-17,3)
Длительность заболевания, год	IFX 3,1(2,0-4,8) ADA 4,0 (2,3-6,4)	IFX 3,5 (1,9-6,5) ADA 3,9 (2,5-6,0)	4,0 (2,0-7,0)	1,7 (0,96-3,4)
Длительность терапии, недели	IFX 44,0 (7,0-93,0) ADA 53,0 (26,0-111,5)	IFX 36,0 (14,0-80,0) ADA 37,5 (19,0-95,0)	22,0 (4,1-63,0)	53,9 (17,1-128,3)

Примечание: * – в группы пациентов с эффективностью и НЭ вошли только дети, у которых показатели определялись в динамике лечения (до, индукционный курс, 52 недели, 1-3 года)

Возраст пациентов составлял: БК от 3,5 до 18 лет, для ЯК от 3,4 до 18 лет, для ПС от 8,5 до 15,3 лет, для РС от 14,7 до 18 лет. Распределение пациентов по возрасту представлены на Рисунке 2.2.

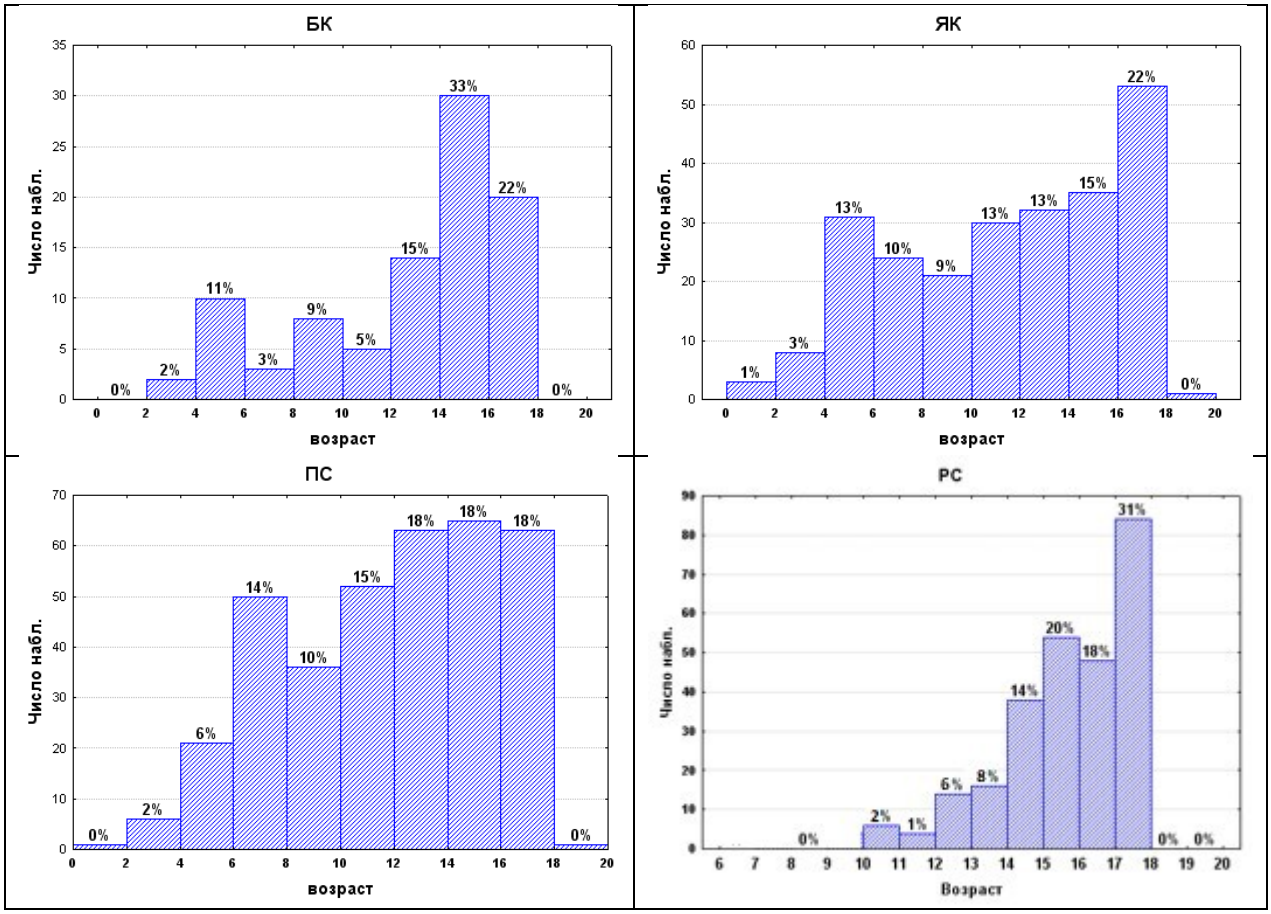


Рисунок 2.2 – Гистограммы распределения пациентов с ИЗЗ по возрасту

Количество пациентов с БК младше 6 лет составляло – 13%, от 6-12 лет – 17%, старше 12 лет – 70% (Рисунок 2.2). Количество пациентов с ЯК младше 6 лет составляло – 17%, от 6-12 лет – 32%, старше 12 лет – 51% (Рисунок 2.2). Количество пациентов с ПС младше 6 лет составляло – 8%, от 6-12 лет – 39%, старше 12 лет – 53% (Рисунок 2.2). Количество пациентов с РС младше 6 лет составляло – 0%, от 6-12 лет – 3%, старше 12 лет – 97% (Рисунок 2.2).

Длительность заболевания по исследованным патологиям в группах составила: для БК на IFX от 0,1 до 14,8 лет; для ЯК на IFX от 0,3 до 16,8 лет; для БК на ADA от 0,2 до 17,7 лет; для ЯК на ADA от 0,3 до 16,7 лет; для ПС на ADA от 0,4 до 13 лет; для РС на INFβ-1a лет от 0,21 до 8,2 лет.

Активность заболевания у пациентов с ВЗК и ПС оценивалась с помощью специальных клинических индексов, а также с использованием эндоскопических индексов при БК и ЯК (Таблица 2.2) [55, 231, 561].

Таблица 2.2 – Индексы активности, используемые в исследовании у пациентов с ВЗК и ПС

Патология	Активность заболевания
БК	
Клинические индексы	PCDAI (баллы): ≤ 10 – ремиссия 11 – 30– низкая >30 баллов – умеренная или высокая
Эндоскопические индексы	SES-CD (баллы): 0 – заживление слизистой ≤ 2– ремиссия 3-6 – средняя 7-15 –умеренная >15 – тяжёлая
ЯК	
Клинические индексы	PUCAI (баллы): ≤ 10 – ремиссия 1-34 балла – низкая 35-64 балла – умеренная > 65 баллов – высокая
Эндоскопические индексы	USEIC(баллы): 0-1 – ремиссия 2-4 – легкая 5-6 – умеренная 7-8 – тяжёлая
ПС	BSA < 3% , PASI <10 баллов – легкая, BSA < 10% , PASI 10-19 баллов средняя BSA > 10% , PASI >20 баллов –тяжелая
Примечание: PCDAI (Pediatric Crohn's Disease Activity Index); PUCAI (Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index); USEIC (Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity); SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn’s Disease)	

Распределение по индексам активности у пациентов с ВЗК: PCDAI – 20,0 (15,0-25,0), PUCAI – 25,0 (15,0 – 35,0). Распределение по индексам активности у пациентов с псориазом: PASI – 13,9 (8,8-19,7); BSA – 19,0 (11,0-28,0).

Пациенты, вошедшие в исследование, получали терапию согласно существующим стандартам лечения (Таблица 2.3). Длительность терапии ГИБП по исследованным патологиям составила: для БК на IFX от 0 до 434 недель; для ЯК на

IFX от 0 до 316 недель; для БК на ADA 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.

Таблица 2.3 – Схемы лечения пациентов, включённых в исследование

ВЗК (IFX)	ВЗК (ADA)	ПС (ADA)	РС (INFβ-1a)
Индукционный курс			Титрация
5 мг/кг (0, 2, 6 неделя)	Масса тела ≥40 кг: 0 нед. – 160 мг 2 нед. – 80 мг Масса тела <40 кг: 0 нед. – 80 мг 2 нед. – 40 мг	Масса тела ≥30 кг: 0 нед. – 40 мг 1 нед. – 40 мг Масса тела 15-30 кг: 0 нед. – 20 мг 2 нед. – 20 мг	1 нед. – 11 мкг 3 раза 2 нед. – 22 мкг 3 раза 3 нед. – 33 мкг 3 раза 4 нед. – 44 мкг 3 раза
Поддерживающий курс			
5 мг/кг (1 раз в 8 недель)	Масса тела ≥40 кг: 80 мг – 1 раз в 2 нед. Масса тела <40 кг: 40 мг – 1 раз в 2 нед.	Масса тела ≥30 кг: 40 мг – 1 раз в 2 нед. Масса тела 15-30 кг: 40 мг – 1 раз в 2 нед.	44 мкг – 3 раза в нед.

Пациенты были распределены на группы по эффективности терапии (эффективность/ неэффективность). Оценка эффекта использованного препарата проводилась на 52 неделе лечения, учитывая ряд показателей и параметров (Таблица 2.4). У пациентов с РС индекс инвалидизации EDSS (Expanded Disability Status Scale) изменялся от 1 до 4,5 баллов.

Таблица 2.4 – Показатели, используемые для формирования групп пациентов с эффективностью ГИБП

Патология	Эффективность терапии
ВЗК	PCDAI/PUCAI<10 баллов ОАК, СРБ, ФК – без отклонений SES-CD≤ 2 балла USEIC- 0-1 балла
ПС	Достижения PASI 75 к году
РС	Отсутствие нарастания EDSS Отсутствие активных очагов по МРТ Отсутствие клинической симптоматики
Примечание: PASI 75 – снижение PASI ≥ 75% от исходных значений до начала терапии; ОАК – общий анализ крови; СРБ – С реактивный белок; ФК – фекальный кальпротектин	

К группе с эффективностью терапии были отнесены пациенты: с ВЗК – при PCDAI/PUCAI <10 баллов, отсутствии воспалительной активности по лабораторным показателям и эндоскопическому исследованию (SES-CD ≤ 2 балла – при БК, USEIC– 0-1 балла – при ЯК); с ПС– при достижении PASI 75 к 52 неделе;

у пациентов с РС – при отсутствии клинической симптоматики, отсутствии нарастания баллов по шкале EDSS, отсутствии активных очагов по МРТ головного и спинного мозга.

Клинические, лабораторные и функциональные показатели у пациентов определялись в динамике: до назначения терапии, после индукционного курса, на 52 неделе терапии и далее согласно плану лечения.

Образцы крови пациентов для исследований получали натощак с помощью вакуумных систем в пробирки (с антикоагулянтом K_2ЭДТА, с активатором свертывания). Исследование уровня цитокинов, исследование концентраций IFX/ADA и антител к ним проводили в сыворотках крови (хранили до анализа при -80 °С). Перед анализом образцы однократно размораживали при комнатной температуре (20-25 °С). Исследования, проведенные в результате данной работы представлены в Таблице 2.5.

Таблица 2.5 – Количество проведенных лабораторных тестов

Название теста	Количество исследований					
	БК	ЯК	ПС	РС	ГС	Всего исследований
ИФ	9752	6693	4186	3887	2898	27416
ИЦХ	2184	1736	1176	1200	832	7128
NF-kB	800	750	830	720	500	3600
MDCSs	630	540	882	423	558	3033
CD39/CD73	468	342	972	612	900	2799
Т-клетки памяти	162		133	116	-	411
ЦК (25 аналитов)	2000	1325	2225	1625	-	7175
Белки гликолиза и окислительного фосфорилирования	390		468	-	416	1274
Остаточный уровень ГИБП (ИФА)	40	40	-	-	-	80
Остаточный уровень ГИБП (экспресс)	350	220	39	-	-	609
АЛА к IFX	93		39	-	-	132
АЛА к ADA	86		39	-	-	125

Примечание: ГС – группа сравнения, ИФ - иммунофенотипирование, ИЦХ – иммуноцитохимическое исследование, АЛА – антилекарственные антитела; в тестах ИФ, ИЦХ, NF-kB, MDCSs, CD39/CD73 при подсчёте количества исследований умножали на количество оцениваемых популяций клеток

2.2. Лабораторные методы

2.2.1. Фенотипирование популяций клеток

Для фенотипирования клеточных популяций периферической крови использовали метод проточной цитометрии. Принцип метода заключается в измерении светорассеяния отдельных клеток суспензии в ламинарном потоке под разными углами, а также флуоресценции в различных диапазонах спектра. В пробирки с суспензией мононуклеарных клеток или каплей цельной крови вносят моноклональные антитела (МАТ), коньюгированные с флуоресцентной меткой. Окрашенные клетки подаются в ячейку, освещаются по очереди лучом лазера. Детекторы улавливают сигнал от клетки под разными углами и в разных каналах флуоресценции, получая информацию:

- прямое светорассеяния (FSL – 1°-10°) – размер клетки
- боковое светорассеяние (SSL – 90°) – гранулярность клетки:
- интенсивность флюоресценции (FL1 – FL10) – специфические маркеры клетки.

Технология использованного для иммунофенотипирования лимфоцитов проточного цитометра (Novocyte, США) позволяет оценивать не только относительное количество той или иной популяции, но и абсолютное количество собранной популяции.

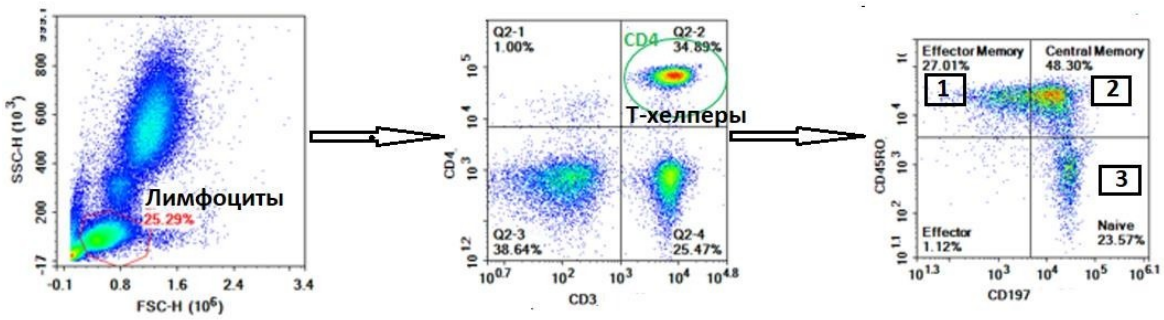
Иммунофенотипирование проводили согласно стандартизованной технологии в цельной крови или в суспензии выделенных на градиенте плотности мононуклерных клетках (МНК) [83, 84]. Образцы предварительно окрашивали (100 мкл цельной крови/суспензии МНК + 20 мкл МАТ), эритроциты из цельной крови лизировали в автоматическом режиме (TQ-PREP™, США). Окрашивание маркеров клеточных популяций осуществляли с помощью МАТ (Beckman Coulter, США) (Таблица 2.6). Дополнительно для пермеабилизации клеток при внутриклеточном окрашивании использовали специальные реагенты (BDCytofix/Cytoperm, США).

Таблица 2.6 – Набор антител для окрашивания клеточных популяций

№	Клеточная популяция (сокращённое название): фенотип (флюоресцентные метки)
1.	Т-лимфоциты (CD3): CD3 (PerCP/PC5), CD45 (PC7)
2.	Т-хелперы (CD4): CD4 (FITC), CD3 (PerCP/PC5), CD45 (PC7)
3.	Т-цитотоксические (CD8): CD8 (PE), CD3 (PerCP/PC5), CD45 (PC7)
4.	В-лимфоциты (CD19): $CD3^-$ (FITC), CD19 (PE), CD45 (PerCP/PC5)
5.	NK-клетки (NK): $CD3^-$ (FITC), CD(16+56) (PE), CD45 (PerCP/PC5)
6.	NKT-лимфоциты (NKT): CD3 (FITC), CD(16+56) (PE), CD45 (PerCP/PC5)
	Субпопуляции CD4, включая минорные
1.	Активированные Т-хелперы (Thact): CD4 (FITC), $CD127^{high}$ (PE), CD45 (PerCP/PC5), CD25 (PC7)
2.	Т-регуляторные лимфоциты (Treg): CD4 (FITC), $CD127^{low}$ (PE), CD45 (PerCP/PC5), CD25 (PC7)
3.	Th17-лимфоциты (Th17): CD4 (FITC), CD161 (PE), CD3 (PerCP/PC5), CD45 (PC7)
4.	TNAIVE: CD4 (FITC), $CD45R0^-$ (PE), CD3 (PerCP/PC5), CD197 (APC-Cy7)
5.	TCM: CD4 (FITC), CD45R0 (PE), CD3 (PerCP/PC5), CD197 (APC-Cy7)
6.	TEM: CD4 (FITC), CD45R0 (PE), CD3 (PerCP/PC5), CD197- (APC-Cy7)
7.	TEMRA: CD4 (FITC), $CD45R0^-$ (PE), CD3 (PerCP/PC5), $CD197^-$ (APC-Cy7)
	Субпопуляции Treg
1.	CD39Treg: CD4 (FITC), $CD127^{low}$ (PE), CD45 (PerCP/PC5), CD25 (PC7), CD39 (APC-Cy7)
2.	CD73Treg: CD4 (FITC), $CD127^{low}$ (PE), CD45 (PerCP/PC5), CD25 (PC7), CD73 (APC-Cy7)
	Субпопуляции Th17
1.	CD39Th17: CD4 (FITC), CD161 (PE), CD3 (PerCP/PC5), CD45 (PC7), CD39 (APC-Cy7)
2.	CD73Th17: CD4 (FITC), CD161 (PE), CD3 (PerCP/PC5), CD45 (PC7), CD73 (APC-Cy7)
	Субпопуляции CD8, включая минорные
1.	TcytNAIVE: CD8 (FITC), CD45R0- (PE), CD3 (PerCP/PC5), CD197 (APC-Cy7)
2.	TcytCM: CD8 (FITC), CD45R0 (PE), CD3 (PerCP/PC5), CD197 (APC-Cy7)
3.	TcytEM: CD8 (FITC), CD45R0 (PE), CD3 (PerCP/PC5), $CD197^-$ (APC-Cy7)
4.	TcytEMRA: CD8 (FITC), $CD45R0^-$ (PE), CD3 (PerCP/PC5), $CD197^-$ (APC-Cy7)
	Субпопуляции MDCS
12.	Моноцитарные (M-MDCS): $HLA\text{-}DR^-$ (FITC), Lin^- (PE), CD14 (PerCP/PC5), PECy7 CD33 (PC7), CD11b (APC-Cy7)
2.	Гранулоцитарные (G-MDCS): $HLA\text{-}DR^-$ (FITC), Lin^- (PE), PECy7 CD33 (PC7), CD11b (APC-Cy7), CD15 (APC-Cy7)
3.	Незрелые (M^-G^-MDCS): $HLA\text{-}DR^-$ (FITC), Lin^- (PE), $CD14^-$ (PerCP/PC5), PECy7 CD33 (PC7), CD11b (APC-Cy7), $CD15^-$ (APC-Cy7)
4.	MDCS-Arginasa: Lin^- (FITC), Arg-1 (PE)
Примечание: Lin^- – отсутствие маркеров CD3/CD19/CD56; $^-$ – отсутствие экспрессии маркера; NAIVE – наивные; CM – центральные клетки памяти; EM – эффекторные клетки памяти; EMRA – терминально-дифференцированные клетки памяти	

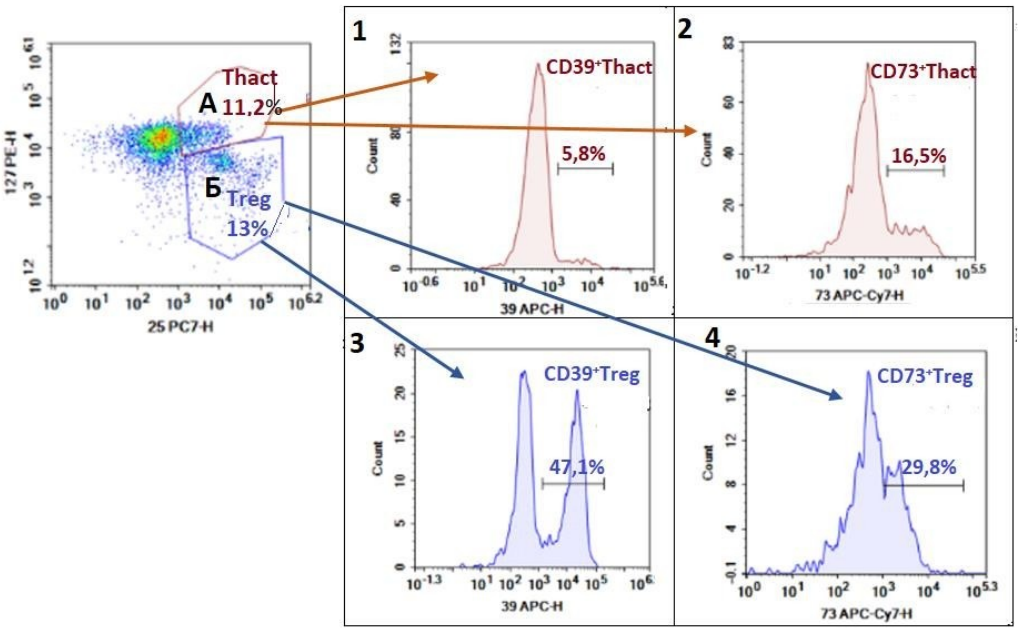
Для анализа популяций лимфоцитов использовали метод пошагового гейтирования согласно рекомендациям, существующим на настоящий момент [83, 84]. Оценка относительного и абсолютного содержания популяций клеток проводилась по уровню экспрессии поверхностных маркеров, специфичных для определённых популяций (Таблица 2.6).

Представлен пример оценки содержания популяций клеток памяти (Рисунок 2.3) и популяций лимфоцитов, экспрессирующих эктонуклеотидазы (Рисунок 2.4).



Примечание: 1 – клетки эффекторной памяти, 2 – клетки центральной памяти, 3 – наивные клетки

Рисунок 2.3 – Выделение популяций Т-клеток памяти



Примечание: А – популяция Thact; Б – популяция Treg; 1 – популяция Thact, экспрессирующая CD39; 2 – гистограмма популяции Thact, сэкспрессией CD73; 3 – гистограмма популяции Treg с экспрессией CD39; 4 – гистограмма популяции Treg с экспрессией CD73

Рисунок 2.4 – Оценка относительного содержания популяций Т-клеток экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73

Функциональные характеристики клеточных субпопуляций исследовали с помощью внутриклеточного окрашивания, проводимого в 2 этапа: 1 этап – получение суспензии мононуклеарных клеток в градиенте плотности, 2 этап – повышение проницаемости мембран клеток – пермеабилизация клеток (набор реагентов «Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit» – Becton Dickinson, США) и внесение МАТ для внутриклеточного окрашивания. Таким способом,

например, оценивали функциональную активность миелоидных клеток-супрессоров (по экспрессии Аргиназы-1) (Таблица 2.6, Рисунок 2.5). Так как, один из механизмов супрессивного действия этих клеток – это снижение концентрации аминокислот в микроокружении эффекторных клеток, необходимых им для их метаболизма. Аргиназа-1, секретируемая MDSC, снижает концентрацию L-аргинина в микроокружении Т-лимфоцитов, что приводит к потере цепи CD3ζ и вызывает ингибирование пролиферации Т-клеток.

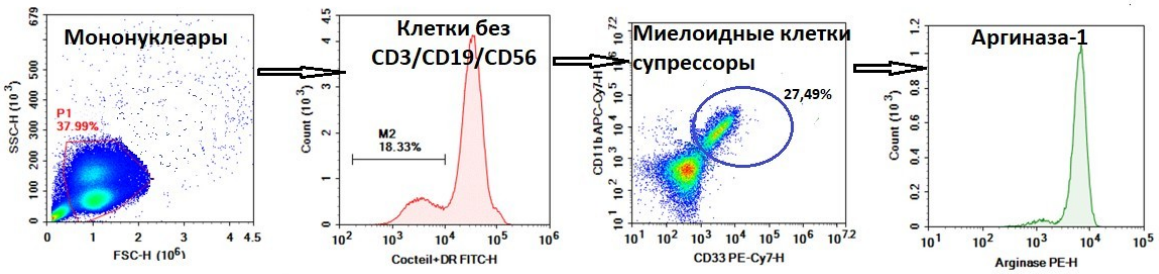


Рисунок 2.5 – Оценка функциональной активности миелоидных клеток-супрессоров по Arg-1

2.2.2. Определение АТФ-азной активности регуляторных Т-клеток

Измерение гидролазной активности эктонуклеотидазы проводили в суспензии Treg, экспрессирующих эктонуклеотидазу CD39 (CD39Treg), в тесте на основе люциферин-люциферазного метода [274]. Принцип метода заключается в оценке люминесценции в опытных образцах, содержащих суспензию клеток CD39Treg, при добавлении в них АТФ. Интенсивность люминесценции прямо пропорциональна концентрации АТФ и обратно пропорциональна АТФ-азной активности эктонуклеотидазы CD39. Анализ проводили по схеме (Рисунок 2.6).

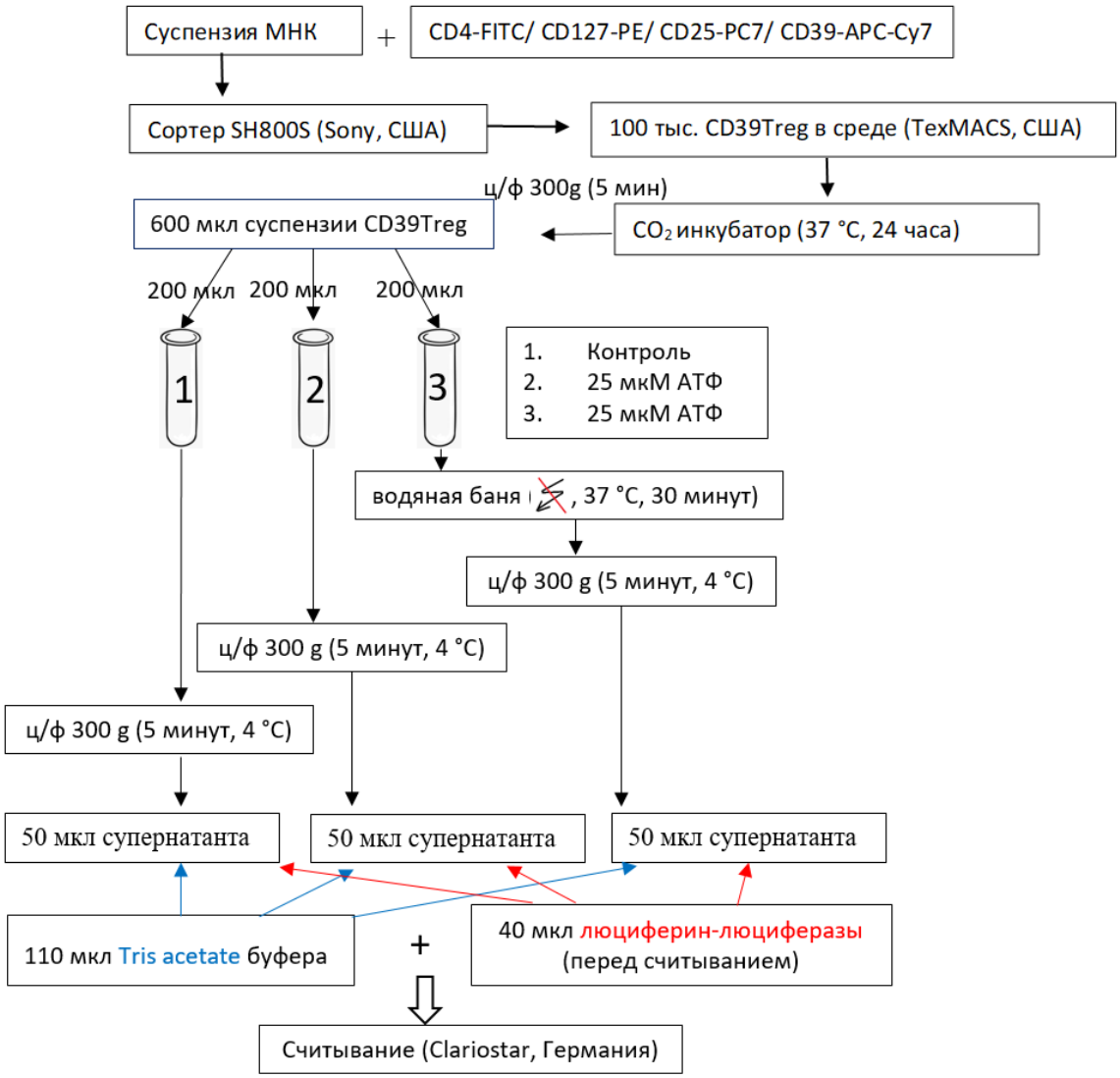


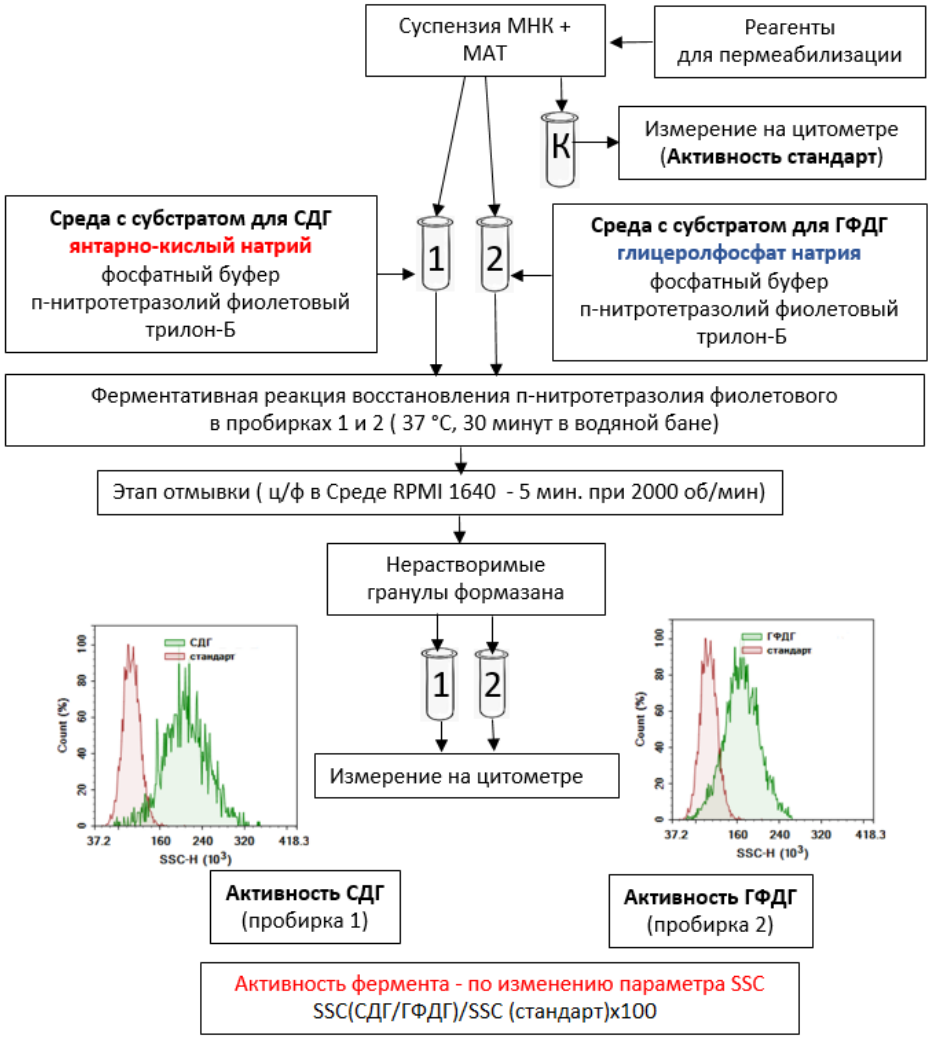
Рисунок 2.6 – Схема измерения АТФ-азной активности CD39Treg

Активность фермента определяли по регистрации снижения интенсивности люминесцентной реакции после добавления люциферин-люциферазы (rLuciferase/Luciferin Reagent – Promega, США), вызванной гидролизом АТФ под действием эктонуклеотидазы CD39 на поверхности Treg. Концентрацию АТФ определяли по значениям интенсивности люминесценции согласно калибровочной кривой (прямая зависимость концентрации АТФ от интенсивности флюоресценции). Снижение люминесценции в опытном образце свидетельствовало о гидролазной активности эктонуклеотидазы CD39 [71].

2.2.3. Изучение активности митохондриальных ферментов (СДГ и ГФДГ) в лимфоцитах

Активность дегидрогеназ (СДГ – сукцинатдегидрогеназы, ГФДГ – глицерол-3-фосфатдегидрогеназы) в популяциях лимфоцитов периферической крови у пациентов определяли запатентованным способом, который позволяет оценивать цитохимическую реакцию в клетках на проточном цитометре [78].

Степень активности ферментов СДГ и ГФДГ позволяет косвенно судить об интенсивности процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза. Схематическое представление оценки активности ферментов иммуноцитохимическим методом представлено на схеме (Рисунок 2.7).



Примечание: Активность ферментов оценивали на проточном цитометре (Novocyte, США); реагенты для пермеабилизации (Becton Dickinson, США)

Рисунок 2.7 – Схема оценки активности внутриклеточных ферментов (СДГ/ГФДГ) иммуноцитохимическим методом

2.2.4. Количественное определение цитокинов методом мультиплексного анализа

Определение концентрации цитокинов в образцах сыворотки пациентов с ВЗК, псориазом и РС проводили методом мультиплексного анализа. Анализ образцов проводили на анализаторе Bio-plex-200 (BIO-RAD, США), представляющий собой проточный флуориметр.

Принцип метода основан на использовании микросфер (6,5мкн) с вкраплениями магнетита. Микросферы окрашены двумя или тремя флуоресцентными репортерами в различных соотношениях. Таким образом, каждая микросфера имеют свой уникальный «спектральный адрес». Репортеры специфически взаимодействуют с исследуемыми аналитами. Микросферы подаются в камеру анализатора в ламинарном потоке, где происходит их облучение лазерами (Рисунок 2.10).

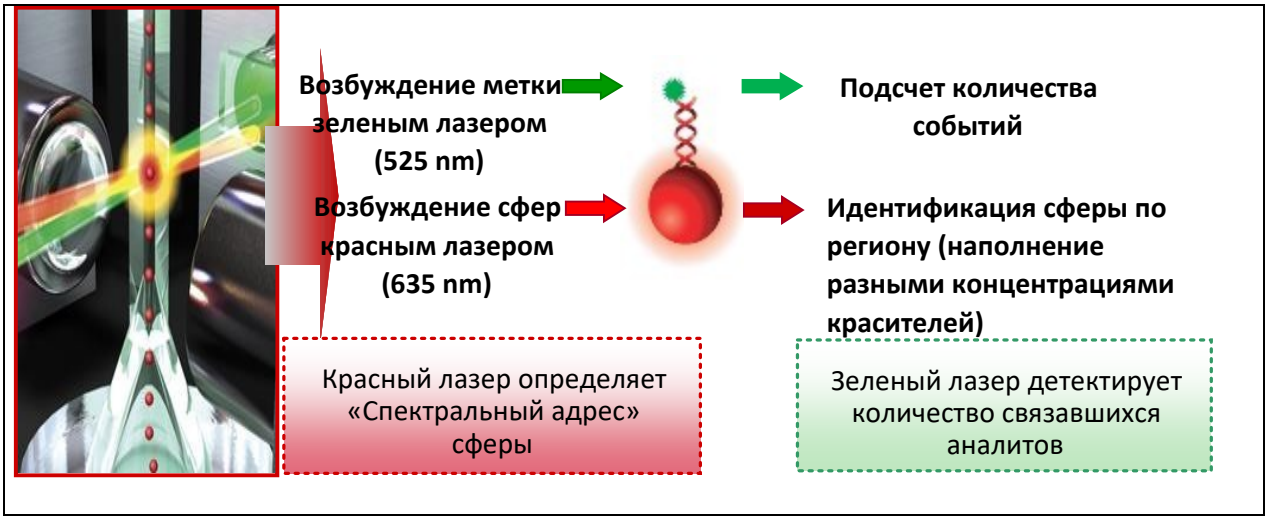


Рисунок 2.10 – Принцип мультиплексного анализа

Проточный флуориметр считывает «спектральный адрес» от каждой микросферы. Интенсивность сигнала репортерного флуорофора зависит от количества, связавшегося аналита. Полученные данные суммируются в виде профиля аналитов в зависимости от спектрального адреса конкретной микросферы

и репортера. Анализ проводится в 96-луночном планшете. В каждой лунке возможно измерение до 100 аналитов одновременно.

Преимущества использования мультиплексного анализа (альтернатива иммуноферментного анализа)

- одновременное определение до 100 аналитов в одной лунке;
- минимальное количество образца (< 50 µl);
- высокая чувствительность (< 1 pg/ml);
- широкий диапазон измеряемых концентраций (1-10,000 pg/ml);
- воспроизводимые результаты;
- открытая система.

Мультиплексный анализ цитокинов выполняли с использованием набора MILLIPLEX MAP Human Th17 Magnetic Bead Panel согласно инструкции производителя (Millipore, США). Были определены концентрации следующих цитокинов: 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, MIP-3α, TNF-α и TNF-β. Анализ полученных данных проводился по калибровочным кривым, строящимся с использованием программного обеспечения к анализатору.

2.2.5. Количественное определение белков окислительного фосфорилирования методом мультиплексного анализа

95% энергии клеток аккумулировано в форме АТФ и производится благодаря процессу окислительного фосфорилирования (OXPHOS) в митохондриях. С помощью коммерческого набора MILLIPLEX (OXPHOS) (EMD Millipore, США), была проведена количественная оценка основных комплексов OXPHOS (НАДФ-убихинон оксидоредуктаза, сукцинат убихинон оксидоредуктаза, убихинон цитохром С оксидоредуктаза, цитохром С оксидаза, АТФ-синтаза), а также

компонента АТФ-синтазы (никотинамид нуклеотид трансгидрогеназа) в образцах пациентов. Принцип мультиплексного анализа был описан в 2.2.4.

Из образцов цельной крови пациентов готовили суспензию МНК (как это было описано в разделе 2.2.4.). Лизаты клеток получали, следуя инструкции производителя к данному набору. К суспензии, содержащей 1 млн клеток, добавляли 100 мкл холодного (ледяной) буфера для лизиса клеток и митохондрий (Cell / Mitochondria Lysis Buffer) с ингибиторами фосфатаз и протеаз (10 мкл на 10^6 клеток). Микропробирку с клеточной суспензией осторожно перемешивали на шейкере 15-30 минут при 4°C. Далее клеточный лизат центрифугировали при 14000 g в течение 20 минут при 4°C. Надосадочную жидкость переносили в охлажденные микроцентрифужные пробирки и хранили до анализа при температуре ≤ -70°C. В аликвотах образцов измеряли концентрацию белка по Брэдфорду [143]. Сбор и анализ образцов производили на анализаторе Bio-plex-200 (BIO-RAD, США).

2.2.6. Исследование белков гликолиза методом мультиплексного анализа

Гликолиз, как и OXPHOS, является источником энергии клетки. В процессе гликолиза происходит преобразование глюкозы в пируват, который в цитоплазме превращается с помощью лактатдегидрогеназы в молочную кислоту (обычно в анаэробных условиях) или может транспортироваться в митохондрии и преобразуется в Ацетил-КоА. В конечном итоге Ацетил-КоА в цикле трикарбоновых кислот метаболизируется с образованием АТФ. Наивные лимфоциты живут в основном за счет OXPHOS, но при активации иммунных клеток происходит перестройка их метаболических путей и переход к аэробному гликолизу, так называемый феномен Варбурга, характерный и впервые показанный в опухолевых клетках человека [7, 595].

Ферменты гликолиза (глюкозо-6-фосфат изомераза, M2 пируват-киназа, енолаза-1, L-лактат дегидрогеназа (A цепь и B цепь), транскетолаза), а также

фактор транскрипции – гипоксия-индуцируемый фактор 1-а, исследовали в образцах пациентов методом мультиплексного анализа с помощью коммерческой панели MILLIPLEX «Human Glycolysis Pethway Magnetic Bead Panel» (Millipore, США). В качесте образцов использовали лизаты иммунных клеток (раздел 2.2.5). Считывание результатов анализа проводили на анализаторе Bio-plex-200 (BIO-RAD, США).

2.2.7. Измерение концентрации блокаторов TNF и антител к ним

Метод твердофазного иммуноферментного анализа

У пациентов с БК и ЯК определяли остаточный уровень IFX и ADA и антитела к ним в сыворотках крови на разных сроках терапии с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) (классический сэндвич иммуноанализ).

Использованные в анализе сыворотки были получены от пациентов непосредственно перед инфузией или введением IFX/ADA на разных этапах лечения (после индукционного курса, в период поддерживающей терапии). Образцы сывороток хранили при -70°С и непосредственно перед постановкой анализа были однократно разморожены.

Концентрацию IFX и ADA в образцах сыворотки определяли с помощью наборов Shikari Q-INFLIXI (Matriks Biotek, Турция) и Shikari Q-ADA (Matriks Biotek, Турция) соответственно. Уровень антител к IFX и ADA в сыворотках крови измеряли с помощью наборов Shikari Q-ATI (Matriks Biotek, Турция) и Shikari S-ATA (Matriks Biotek, Турция) соответственно. Постановка тестов осуществлялась согласно инструкции производителя. Считывание результатов осуществляли на мультискане Tecan Infinite (Австрия). Результаты анализа были получены автоматическим образом с учетом калибровочных кривых, построенных с использованием прилагаемых стандартов.

Недостатки теста:

1) набор рассчитан на одномоментную постановку большого количества образцов;

2) время постановки (приблизительно 3 часа)

Экспресс-тест

С помощью количественного латерального иммуноанализа (BUHLMANN, Германия) проведено исследование концентрации IFX («Quantum Blue Infliximab») и ADA («Quantum Blue Adalimumab») в сыворотках крови пациентов с ВЗК и ПС. Минимальная определяемая концентрация блокаторов TNF с помощью данных тестов составляет 0,4 мкг/мл для IFX и 1,3 мкг/мл для ADA.

Преимущество экспресс-теста перед твердофазным иммуноферментным анализом:

1) время постановки (30 минут после получения образца сыворотки пациента);
2) возможность постановки исследования для одного пациента.

Принцип метода основан на сэндвич иммуноанализе и аналогичен для IFX и ADA. Предварительно разведенный образец сыворотки вносится на стрип-кассету (Рисунок 2.13).

Рисунок 2.13 – Стрип-кассета для экспресс-тестов определения концентрации IFX/ADA (адаптировано из инструкции к тесту)

Рекомбинантный TNF конъюгирован с коллоидным золотом. При проведении теста коллоидное золото высвобождается при попадании образца в реакционную ячейку. IFX/ADA (препарат) из образца связывается с конъюгатом. Моноклональные антитела, иммобилизированые на тест-мембране, захватывают комплекс конъюгат с препаратом, вызывая окрашивание тестовой линии (Т).

Оставшийся свободный комплекс препарат/конъюгат будет связываться с контрольной полоской (С). Интенсивность сигнала полосок Т и С измеряется количественно с помощью QUANTUM BLUE ридера (Рисунок 2.14).

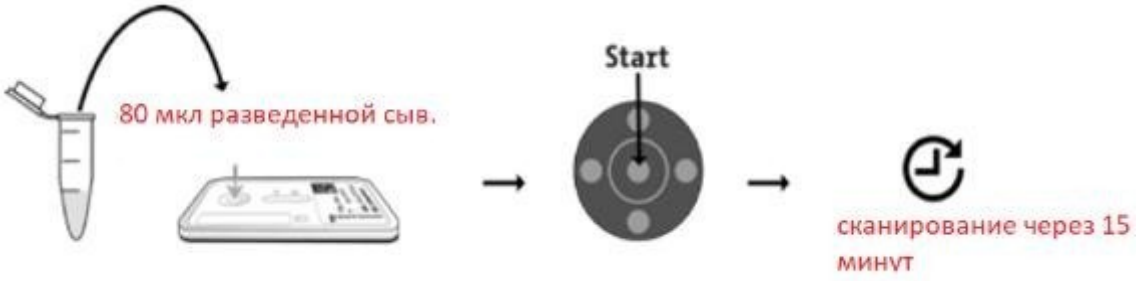


Рисунок 2.14 - Постановка экспресс-теста для определения концентрации IFX/ADA (адаптировано из инструкции к тесту)

Рекомендуемый производителем уровень для поддержания ремиссии у пациентов с ВЗК составляет для ADA от 5 до 12 мкг/мл, для IFX от 3 до 7 мкг/мл.

2.2.8. Исследование активности NF-κB в популяциях лимфоцитов

Количество лимфоцитов с переносом ядерного факора транскрипции κB из цитоплазмы в ядро определяли с помощью технологии AMNIS на проточном цитометрии с визуализацией (AMNIS, США).

Пробоподготовка перед исследованием NF-κB в лимфоцитах проводилась в соответствии с инструкцией (набор реагентов «Amnis NF-κB Translocation Kit» – Millipore, США). На первом этапе выделяли МНК в градиенте плотности и окрашивали их поверхностными МАТ (Beckman Coulter, США) для соответствующих популяций (Таблица 2.7).

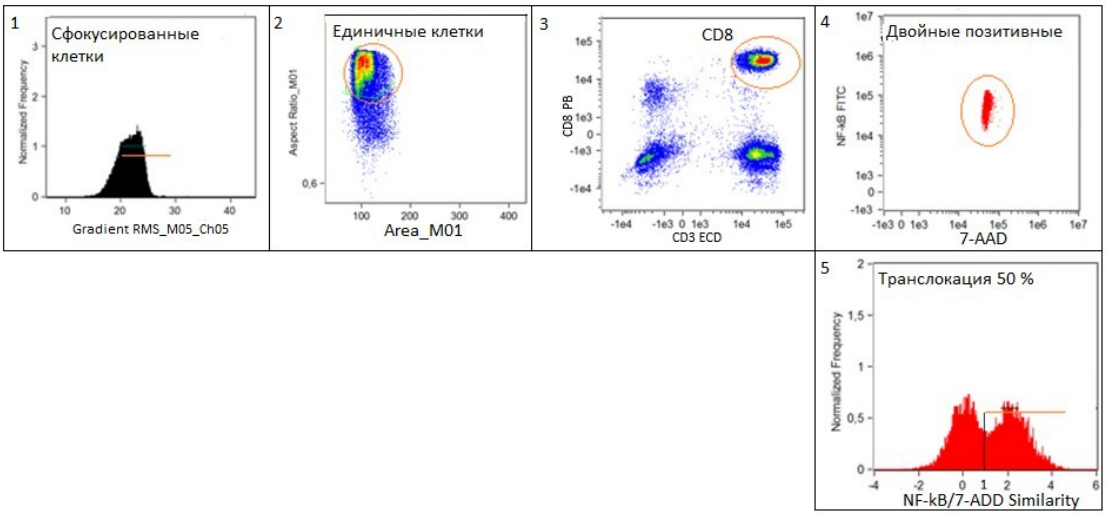
Таблица 2.7 – Моноклональные антитела и каналы флюоресценции при оценке содержания лимфоцитов с транслокацией NF-κB методом цитометрии с визуализацией

Популяции лимфоцитов	Флуоресцентные метки и канал флюуоресценции					
	канал 2	канал 3	канал 4	канал 5	канал 6	канал 7
CD19; CD3	NF-κB AF 488	CD19-PE	CD3-ECD	7-AAD	-	-
CD4; CD3	NF-κB AF 488	CD4-PE	CD3-ECD	7-AAD	-	-
CD8; CD3	NF-κB AF 488	CD8-PE	CD3-ECD	7-AAD	-	-
NK; NKT	NF-κB AF 488	CD16/56-PE	CD3-ECD	7-AAD	-	-
Treg; Thact	NF-κB AF 488	CD127-PE	CD4-ECD	7-AAD	CD25 PC7	-
Th17	NF-κB AF 488	CD 161	CD3-ECD	7-AAD	-	CD4-PB
Примечание: 1 канал – светлопольный, не используется для работы с флюоресцентными метками						

Далее проводили пермеабилизацию клеток («Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit» – Becton Dickinson, США) с последующим внутриклеточным окрашиванием ядра с помощью 7-AAD красителя и окрашивания субъединицы p50 фактора транскрипции κB – Anti-Hu NFκB Alexa Fluor 488. Образцы собирали при определённых условиях: программное обеспечение «INSPIRE» (Amnis, Luminex Corporation, США), низкая скорость потока клеток, увеличение изображения – x 40.

Анализировали выборки клеток не менее 10000 событий. Обработку изображений и статистический анализ выполняли в программе «IDEAS» (Amnis, Luminex Corporation, США). Автоматическую компенсацию спектрального перекрытия флуорохромов проводили с использованием встроенного алгоритма на основе одноцветных контролей. Для определения уровня транслокации ядерного

фактора NF-κB в лимфоцитах применяли следующую стратегию: выделяли клетки в фокусе на основе параметра «Gradient RMS»; отбирали одиночные клетки по параметру «Aspect Ratio RMS»; выделяли популяции лимфоцитов на основе характеристик флуоресценции; отбирали клетки, экспрессирующие NF-κB (FITC-позитивные) и 7-AAD-позитивные (Рисунок 2.15). Уровень транслокации NF-κB из цитоплазмы в ядро определяли с помощью коэффициента Similarity (подобие), который вычислялся в программе «IDEAS» для каждой клетки и отражал степень колокализации NF-κB и 7-AAD. Транслокация NF-κB из цитоплазмы в ядро определялась при значениях коэффициента Similarity больше 1 (Рисунок 2.15).



Примечание: 1 – сфокусированные клетки; 2 – единичные клетки; 3 – выделение популяции CD8-лимфоцитов; 4 – двойные позитивные клетки NF-κB/7-AAD; 5 –клетки с транслокацией NF-κB

Рисунок 2.15 – Стратегия гейтирования при определении уровня транскрипционного фактора κB в популяциях лимфоцитов

2.3. 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 отклонения от референсных значений, соответствующих возрасту, и рассчитаны согласно формуле 1:

$$\mathbf{Xn} = \frac{(\mathbf{Xmin} - \mathbf{X})}{\mathbf{0{,}01} \times (\mathbf{Xmax} - \mathbf{Xmin})} \quad (1),$$

где Xn – значение показателя, нормированное на возрастной референсный интервал; X – измеренное индивидуальное значение показателя; Xmax и Xmin – верхняя и нижняя граница возрастной нормы референсного интервала для соответствующего возраста. Данная формула позволяет представить индивидуальный результат в виде процентного отклонения в рамках возрастной нормы, где весь диапазон (Xmax − Xmin) принимается 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 χ^2 для сравнения распределений. Статистически значимыми принимали различия при $p < 0{,}05$. Исследование взаимосвязей показателей выполнено методом множественной пошаговой регрессии. ROC-анализ («SPSS 16.0», США) применён для оценки диагностической значимости показателей, определения пороговых значений (cut-off) и расчёта площади под кривой (AUC), коэффициентов специфичности (Sp) и чувствительности (Se).

Для графического представления состояний обострение-ремиссия по уровню цитокиновых комплексов была проведена z-стандартизация (z-оценка), представляющая собой меру относительного разброса, наблюдаемого или измеренного значения и, показывающая, сколько стандартных отклонений составляет его разброс относительного среднего значения. Z рассчитывали по формуле 2:

$$\mathbf{Z} = \frac{(\mathbf{xi} - \boldsymbol{\mu})}{\boldsymbol{\sigma}} \quad (2),$$

где xi — исходный элемент выборки; μ — среднее арифметическое;
σ — стандартное отклонение.

Выживаемость терапии строили методом суммарной кривой Каплан-Мейера, достоверность различий между кривыми оценивали критерием Гехана-Вилкоксона (Statistica 10.0, США).

Для оценки вероятности хорошего прогноза (SeP) с помощью иммунологических показателей у пациентов с ИЗЗ определяли частоту верно предсказанных истинно положительных результатов (TP) из их общего числа (TP и ложноотрицательные – FN) по формуле 3[49]:

$$\mathbf{SeP} = \frac{\mathbf{TP}}{\mathbf{TP+FN}} \quad (3),$$

а также частоту верно предсказанных истинно отрицательных результатов (SeN) по формуле 4, где TN - верно предсказанные истинно отрицательные результаты, FP - ложноположительные:

$$\mathbf{SeN} = \frac{\mathbf{TN}}{\mathbf{TN+FP}} \quad (4)$$

Высокую вероятность прогноза эффекта терапии считали при частоте правильных прогнозов не менее 70 %.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Показатели клеточного иммунитета в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями

3.1.1. Показатели популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника

В иммунопатогенезе ВЗК немаловажную роль играет дисбаланс между эффекторными и регуляторными клетками. При ВЗК показано участие различных эффекторных клеток, в том числе Th1-, Th17-, Th2-лимфоцитов, содержание которых у взрослых пациентов с ВЗК в слизистой оболочке кишечника и собственной пластинке содержится гораздо больше, чем у здоровых людей.

Оценка показателей субпопуляций Т-хелперов у детей с БК и ЯК была проведена в группах пациентов, получавших терапию блокаторами TNF (БК IFX, БК ADA, ЯК IFX, ЯК ADA) (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Количество и возраст пациентов с ВЗК в группах в зависимости от эффекта блокаторов TNF при исследовании содержания популяций лимфоцитов

Группы	НЭ		Эфф.		Всего пациентов
	Кол-во	Возраст, лет Me (Q_{25}-Q_{75})	Кол-во	Возраст, лет Me (Q_{25} – Q_{75})	
БК IFX	58	14,5 (10,5-15,9)	30	13,3 (11,2-15,4)	88
БК ADA	45	15,5 (13,2-16,8)	36	15,5 (12,7-16,9)	91
ЯК IFX	46	11,2 (6,4-15,4)	36	14,5 (11,8-16,2)	82
ЯК ADA	24	13,5 (8,8-16,0)	19	13,9 (11,0-14,7)	43

Возраст пациентов в группах составил: БК IFX – от 2,2 до 18 лет; БК ADA – от 2,9 до 18 лет; ЯК IFX – от 1,7 до 18 лет; ЯК ADA – от 3,6 до 17,9 лет. Для каждой группы пациентов оценивали показатели популяций лимфоцитов до терапии ГИБП, к концу индукционного курса, к году терапии (52 недели) и далее согласно плану лечения (1-3 года). В зависимости от активности воспалительного процесса (PCDAI/PUCAI) и результатов эндоскопического исследования пациенты были

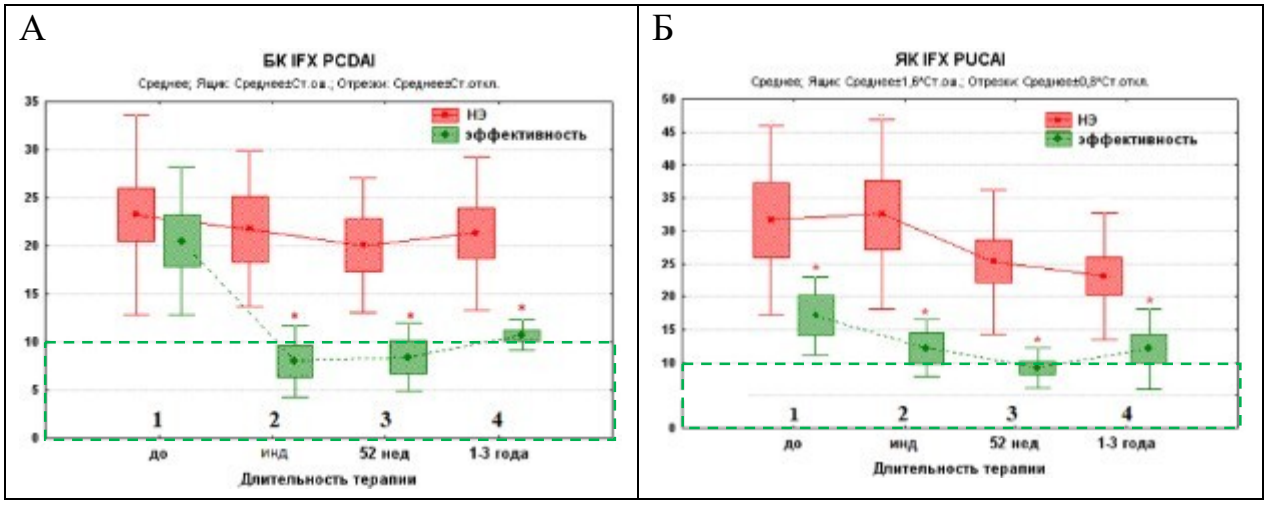
разделены на группы по эффективности ГИБП к году терапии - с недостаточно эффективным ответом (НЭ) – группа 1 и эффективным – группа 2.

Сравнительный анализ динамики клинических индексов активности у пациентов с БК и ЯК при лечении IFX показал достоверные отличия между группами с НЭ (группа 1) и с эффективным ответом (группа 2) на терапию во все периоды наблюдения, кроме периода до введения IFX у пациентов с БК (достоверных отличий не выявлено) (Таблица 3.2, Рисунок 3.1).

Таблица 3.2 – Динамика индексов активности у пациентов с ВЗК при терапии IFX (Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$))

Период	БК (PCDAI)		ЯК (PUCAI)	
	Группа 1	Группа 2	Группа 1	Группа 2
До	20,0 (15,0-25,0)	15 (15-22,5)	25,0 (15,0-35,0)	15,0* (12,0-20,0)
инд	20,0 (15,0-25,0)	10* (5-10)	30,0 (15,0-45,0)	10,0* (10,0-10,0)
52 нед	15,0 (15,0-22,5)	10** (10-10)	20,0 (15,0-30,0)	10,0** (5,0-10,0)
1-3 года	15,0 (15-30)	10* (10-10)	20,0 (15,0-30,0)	10,0* (10,0-12,0)
Примечание: До – до начала терапии; инд – после индукционного курса; * - достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,05; **– достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,001				

У пациентов БК 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 PCDAI между периодом до начала терапии и остальными периодами лечения (Рисунок 3.1А).



НЭ (недостаточная эффективность): p_{12}=0,81, p_{13}=0,46, p_{14}=0,61, p_{23}=0,41, p_{24}=0,66, p_{34}=0,77 Эффективность: p_{12}<0,001, p_{13}<0,001, p_{14}<0,001, p_{23}=0,077, p_{24}=0,080, p_{34}=0,21	НЭ (недостаточная эффективность): p_{12}=0,903, p_{13}=0,156, p_{14}=0,032, p_{23}=0,124, p_{24}=0,025, p_{34}=0,331 Эффективность: p_{12}=0,006, p_{13}<0,001, p_{14}=0,002, p_{23}=0,201, p_{24}=0,913, p_{34}=0,227

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

Рисунок 3.1 - Динамика клинических индексов активности PCDAI /PUCAI у пациентов с БК (А) и у пациентов с ЯК (Б) при терапии IFX

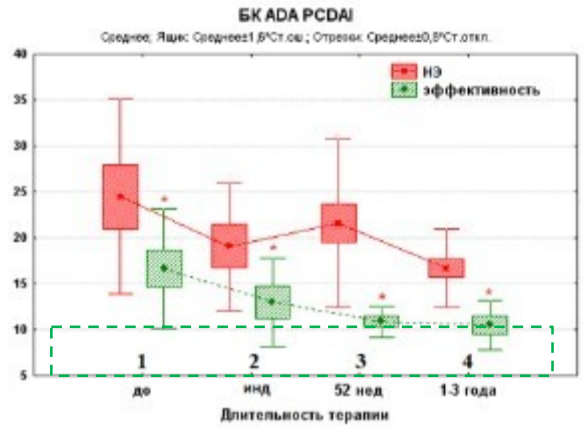
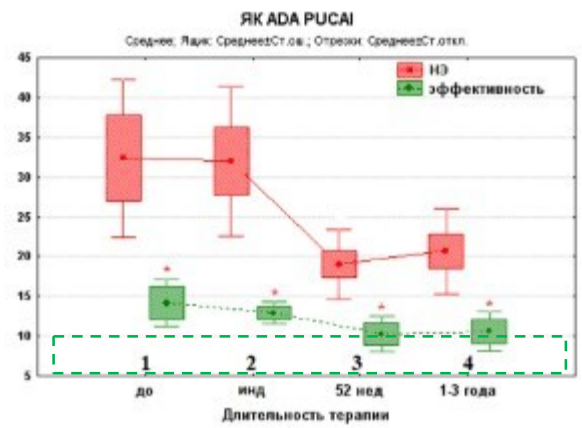
Группы 1 и 2 у пациентов с ЯК отличались по индексу PUCAI до начала лечения: более высокие значение PUCAI выявлены в группе с НЭ (Рисунок 3.1Б). В этой группе наблюдалось снижение индекса PUCAI между периодами до назначения ГИБП и периодом 1-3 года, но при этом индекс активности оставался достоверно выше, чем в группе 2. У пациентов с ЯК с эффективностью IFX выявлено достоверное снижение PUCAI между периодами наблюдения, как и у пациентов с БК для PCDAI.

Анализ изменения клинических индексов активности у пациентов с БК и ЯК при лечении ADA также, как и у пациентов при терапии IFX, показал достоверно более высокие значения индексов в группе с НЭ по сравнения с группой пациентов с эффективностью ГИБП. При этом, снижение индексов активности у пациентов БК ADA и ЯК ADA выявлено как в группе с эффективностью ГИБП, так и с НЭ (Таблица 3.3, Рисунок 3.2).

Таблица 3.3 - Динамика индексов активности у пациентов с ВЗК при терапии ADA (Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$))

	БК		ЯК	
Период ГИБП	Группа 1	Группа 2	Группа 1	Группа 2
До	15,0 (15,0-35,0)	13,5* (10,0-20,0)	35,0 (15,0-40,0)	13,5* (10,0-16,5)
Инд	15,0 (12,5-22,5)	11,0* (10,0-13,5)	35,0 (15,0 40,0)	15,0* (10,0-15,0)
52 нед	15,0 (15,0-25,0)	10,0* (10,0-11,0)	15,0 (15,0-20,0)	10,0* (7,5-13,5)
1-3 года	15,0 (15,0-15,0)	10,0* (10,0-12,5)	15,0 (15,0-35,0)	10,0* (7,5-15,0)
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,001				

У пациентов группы БК ADA с эффективностью терапии отмечалось быстрое снижение PCDAI (Рисунок 3.2А). В группе БК ADA с НЭ лечения также наблюдалось снижение индекса активности, но значения PCDAI достоверно были выше, чем в группе с эффективным лечением во все периоды наблюдения (Рисунок 3.2А).

А	Б
	
НЭ (недостаточная эффективность): p_{12}=0,021, p_{13} = 0,303, p_{14}=0,003, p_{23}=0,108, p_{24}=0,904, p_{34}=0,007 Эффективность: p_{12} =0,026, p_{13}< 0,001, p_{14}< 0,001, p_{23}=0,072, p_{24}=0,092, p_{34}=0,775	НЭ (недостаточная эффективность): p_{12}=0,872, p_{13} = 0,023 p_{14}=0,004, p_{23}< 0,001, p_{24}< 0,001, p_{34}=782 Эффективность: p_{12} =0,765, p_{13}=0,066, p_{14}=0,099, p_{23}=0,037, p_{24}=0,102, p_{34}=0,838

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

Рисунок 3.2 – Динамика клинических индексов активности PCDAI /PUCAI у пациентов с БК (А) и у пациентов с ЯК (Б) при терапии ADA

У пациентов группы ЯК ADA с НЭ достоверное снижение PUCAI наблюдалось только к 52 неделе лечения и составляло в среднем 15 баллов (Рисунок 3.2Б).

Отклонение показателей популяций лимфоцитов (Т-, В-, NK-лимфоциты) у пациентов группы БК IFX на разных этапах терапии представлено в таблице 3.4. У пациентов с разной эффективностью IFX все исследованные популяции отклонялись от референсных показателей в разные периоды введения препарата. При этом, относительное содержание популяций CD3, CD4, соотношение CD4/CD8 были выше референсного диапазона практически во все периоды введения IFX, а содержание CD19 и NK-клеток, наоборот, ниже возрастного интервала. Причем, в популяциях, где наблюдались достоверные отличия (CD3, CD4, CD4/CD8) - показатели относительного или абсолютного содержания лимфоцитов в группе с эффективностью IFX (группа 2) были выше, чем в группе пациентов с НЭ (группа 1) на протяжении всего периода лечения (Таблица 3.4, Рисунок 3.3).

Таблица 3.4 – Динамика содержания основных популяций лимфоцитов (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с БК при терапии IFX

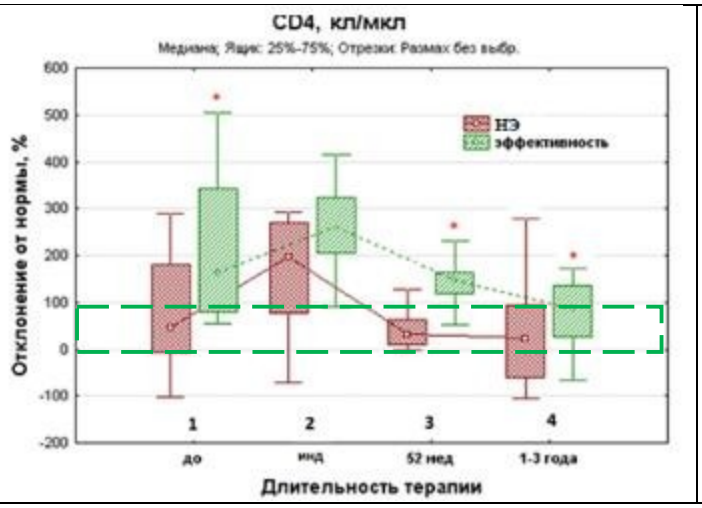
Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*До*	*105,9 (68,2-158,7)* *35,5 (-61,9 - 162,4)*	*154,9 (135,4 -206,4)** *129,8 (46,5 - 229,0)*
	Инд	*147,9 (128,4 - 168,2)* *30,7 (5,5 - 171,2)*	*175,2 (162,0 - 199,6)** *57,2 (25,1 - 101,2)*
	52 нед	*163,9 (130,9 - 207,2)* *36,3 (10,1 - 102,3)*	*140,6 (106,7 - 224,0)* *114,1 (70,2 - 144,8)**
	1-3 года	*129,6 (72,6 - 166,1)* *-42,7 (-102,0 - 57,5)*	*144,9 (106,9 - 169,8)* *86,4 (7,5 - 148,3)**
CD4	*До*	*146,8 (85,0 - 210,0)* *45,5 (-7,3 - 179,4)*	*237,7 (189,4 - 337,9)*** *163,3 (79,5 - 342,3**)*
	Инд	*197,0 (77,5 - 271,2)* *63,9 (27,4 - 95,0)*	*260,9 (205,0 - 323,8)** *108,1 (42,0 - 164,3)*
	52 нед	*130,7 (103,6 - 197,9)* *31,8 (11,1 - 63,5)*	*241,6 (195,0 - 298,1)** *148,0 (118,5 - 165,2)***
	1-3 года	*188,8 (134,6 - 242,9)* *22,8 (-59,8 - 93,0)*	*170,6 (126,0 - 211,7)* *86,7 (28,0 - 134,8)**

Продолжение Таблицы 3.4

Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD8	*До*	*18,4 (-55,0 - 84,8)* *0,0 (-88,7 - 85,1)*	*13,7 (-26,4 - 60,4)* *42,8 (16, 7 - 57,9)*
	Инд	*14,8 (-55,0 - 118,9)* *-5,2 (-48,7 - 90,3)*	*0,0 (-23,3 - 55,3)* *-8,3 (-19,4 - 43,7)*
	52 нед	*56,3 (38,1 - 127,5)** *21,6 (-0,9 - 144,1)*	*-10,0 (-56,4 - 23,0)** *27,1 (-13,6 - 70,7)*
	1-3 года	*-18,0 (-45,1 - 11,3)* *-66,9 (-87,3 - 8,7)**	*16,7 (-30,5 - 64,3)* *9,9 (-32,0 - 89,7)**
CD4/CD8	*До*	*123,3 (36,3 - 456,7*	*256, 7 (138,4 - 316,7)*
	Инд	*202,18 (26,8 - 465,2)*	*231,2 (130,0 - 420,0)*
	52 нед	*70,0 (22,4 - 93,8)*	*293,3 (160,0 - 404,3)***
	1-3 года	*203,3 (150,0 - 390,0)*	*173,3 (103,3 - 369,4)*
CD19	*До*	*9,0 (-45,8 - 65,0)* *-34,5 (-78,7 - 124,9)*	*-4,9 (-27,2 – 32,7)* *-20,5 (-54,5 – 76,0)*
	Инд	*-28,6 (-61,3 - 12,0)* *-56,8 (-82,0 - -0,8)*	*-28,1 (-33,7 - 5,6)* *-49,0 (-71,4 - -12,2)*
	52 нед	*-59,6 (-186,1 - -21,2)* *-69,5 (-86,7 - -61,2)*	*0,0 (-38,2 - 24,3)** *-27,0 (-45,9 - 64,0)**
	1-3 года	*-17,0 (-54,0 - 44,7)* *-80,4 (-100,6 - -12,5)*	*13,9 (-18,0 - 34,3)* *5,0 (-41,0 - 29,9)***
NK	*До*	*-26,3 (-48,4 - -8,9)* *-2,1 (-17,3 - 17,1)*	*-39,3 (-62,4 - -15,2)* *-5,1 (-22,4 – 37,9)*
	Инд	*-27,8 (-43,3 - -2,4)* *-6,5 (-22,2 - 8,9)*	*-52,5 (-62,1 - -40,0)** *-21,5 (-51,7 - -13,8)**
	52 нед	*-49,2 (-58,1 - -27,0)* *-24,0 (-37,7 - -15,4)*	*-38,9 (-56,2 - -21,1)* *-18,7 (-34,3 - 8,6)*
	1-3 года	*-8,1 (-42,7 - -2,9)* *-3,0 (-22,9 -18,9)*	*-46,1 (-61,9 - -16,9)** *-15,7 (-23,6 - 15,6)*

Примечание*:* % от ЛФ – процент от лимфоцитов; * –достоверность различий между группами 1 и 2 с $p < 0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p < 0,001$

Анализ динамики абсолютного содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов у пациентов группы БК IFX относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ - в пределах диапазона (за исключением периода после индукции); в группе с эффективностью терапии – выше диапазона, кроме периода 1-3 года (в пределах возрастного диапазона значений) (Рисунок 3.3).

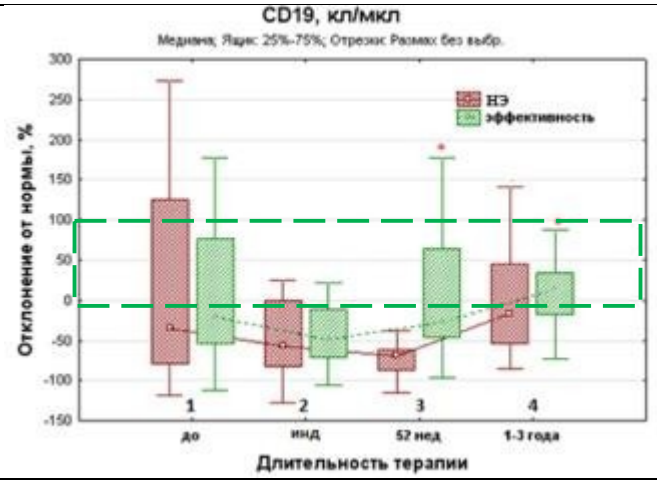
БК IFX		
	НЭ p_{12}=0,002 p_{13}=0,871 p_{14}=0,192 p_{23}<0,001 p_{24}<0,001 p_{34}=0,243	Эффект. p_{12}=0,076 p_{13}=0,717 p_{14}< 0,001 p_{23}=0,003 p_{24} <0,001 p_{34}=0,002

Примечание: * – достоверность различий с p<0,05 между группами с разной эффективностью IFX в разные периоды наблюдения; зеленой штрих-линией указан референсный диапазон

Рисунок 3.3 – Динамика содержания CD4 клеток (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с БК при терапии IFX

У пациентов БК IFX в группе с НЭ наблюдалось увеличение содержания CD4 лимфоцитов к концу индукционного курса и достоверное снижение к году и к периоду 1-3 года (Рисунок 3.3). У пациентов с эффективностью IFX наблюдалось значимое повышение содержания CD4 Т-лимфоцитов к 52 неделе и к периоду 1-3 года относительно группы с НЭ (Рисунок 3.3).

Анализ динамики отклонения абсолютных показателей CD19 лимфоцитов показал более низкие значения у пациентов БК IFX в обеих группах относительно референсного диапазона, за исключением периода 1-3 года у пациентов с эффективностью терапии в пределах референсного диапазона (Таблица 3.4, Рисунок 3.4).

БК IFX		
	НЭ p_{12}=0,285 p_{13}=0,034 p_{14}=0,713 p_{23}=0,465 p_{24}=0,204 p_{34}=0,004	Эффект. p_{12}=0,336 p_{13}=0,956 p_{14}=0,179 p_{23}=0,287 p_{24}=0,005 p_{34}=0,323

Примечание: * – достоверность отличий с $p<0,05$ между группами с разной эффективностью IFX в разные периоды наблюдения; зеленой штрих-линией указан референсный диапазон

Рисунок 3.4 – Динамика абсолютного содержания CD19 клеток (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с БК при терапии IFX

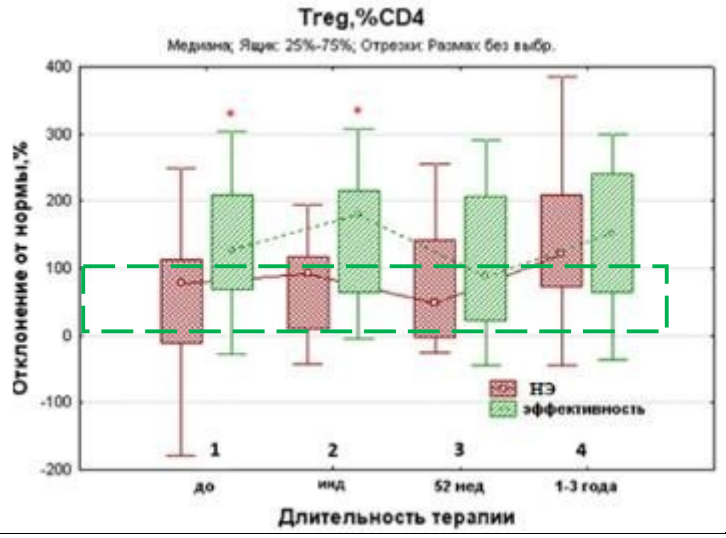
У пациентов БК IFX в группе с НЭ получено снижение содержания CD19 лимфоцитов после индукционного курса (Рисунок 3.4). У пациентов с эффективностью терапии IFX показано значимое увеличение показателей CD19 лимфоцитов между периодами после индукционного курса и периодом 1-3 года терапии (Рисунок 3.4). При этом, достоверных различий между группами пациентов в период до и после индукции выявлено не было, а к году терапии и к периоду 1-3 года в группе пациентов с НЭ значения показателей CD19 лимфоцитов были достоверно ниже, чем в группе с эффективностью терапии (Таблица 3.4, Рисунок 3.4).

Анализ малых популяций лимфоцитов также, как и для основных популяций, показал существенные отклонения показателей от возрастных референсных диапазонов. При этом, для популяций Treg, Th17, Thact характерно увеличение показателей как для относительного, так и для абсолютного количества в обеих группах (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Динамика содержания малых популяций лимфоцитов (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с БК при терапии IFX

Популяция клеток % от CD4 абс от CD4, кл/*мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Treg	*До*	*77,3 (-12,0 - 113,6)* *68,9(20,7 - 222,9)*	*27,3 (45,5 - 209,1)** *268,9 (137,9 - 433,3)***
	Инд	*92,5 (9,1 - 116,0)* *131,8 (55,2 - 200,5)*	*160,5 (64,0 - 214,6)*** *289,6 (36,2 - 408,1)*
	52 нед	*61,4 (13,5 - 155,7)* *49,0 (-17,5 - 128,4)*	*88,0 (21,9 - 206,8)* *205,3 (130,4 - 329,3)***
	1-3 года	*122,0 (72,7 - 209,1)* *21,9 (-3,4 - 136,4)*	*152,3 (65,0 - 240,9)* *130,6 (86,2 - 243,7)***
Thact	*До*	*160,9 (79,7 - 239,7)* *151,2 (44,3 - 406,3)*	*80,9 (-25,0 - 157,8)*** *193,4 (49,2 - 304,9)*
	Инд	*174,9 (95,3 - 248,4)* *211,5 (122,9 - 356,9)*	*84,0 (53,1 - 142,2)*** *136,2 (90,9 - 255,3)*
	52 нед	*176,9 (98,8 - 307,7)* *89,5 (70,8 - 253,1)*	*31,3 (-21,3 - 112,2)*** *125,8 (64,8 - 311,7)*
	1-3 года	*101,6 (64,7 - 228,1)* *93,4 (-4,9 - 213,9)*	*71,9 (27,0 - 140,6)** *132,7 (55,7 - 213,7)*
Th17	*До*	*64,7 (-1,5 - 133,8)* *75,4 (-29,8 - 216,7)*	*2,9 (-54,4 - 60,3)*** *123,4 (73,7 - 211,6)*
	Инд	*108,1 (23,9 - 211,9)* *195,0 (76,4 - 279,4)*	*32,4 (8,8 - 97,1)** *145,1 (-2,1 - 176,5)*
	52 нед	*122,1 (60,0 - 185,3)* *200,0 (141,5 - 350,0)*	*0,0 (-23,5 - 51,5)*** *87,2 (42,6 - 200,0)**
	1-3 года	*116,5 (7,7 - 279,4)* *55,7 (-65,9 - 168,6)*	*27,2 (-22,1 - 101,5)** *118,6 (-82,9 - 223,4)*
Примечание: *– достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,05; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,001			

Анализ динамики отклонений относительного содержания регуляторных Т клеток (Treg) лимфоцитов у пациентов БК IFX относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ – показатели в пределах диапазона, за исключением периода 1-3 года (выше верхней границы диапазона); в группе с эффективностью терапии – показатели выше верхней границы диапазона, кроме периода 52 недели (в пределах диапазона) (Рисунок 3.5).

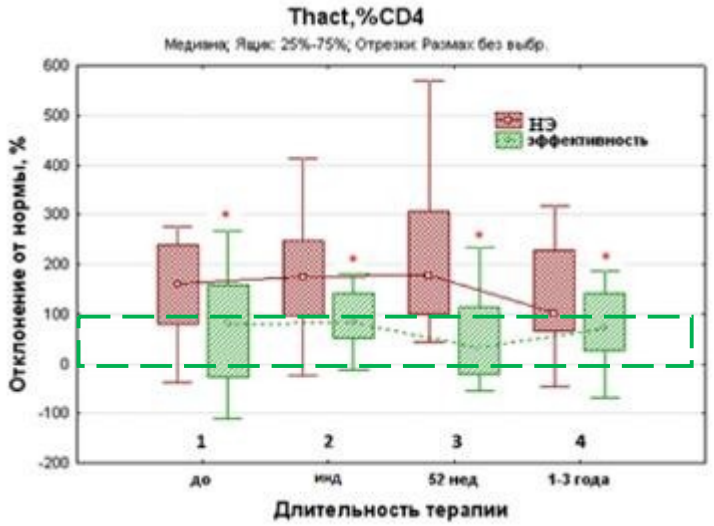
БК IFX		
	НЭ p_{12}=0,467 p_{13}=0,728 p_{14}=0,005 p_{23}=0,889 p_{24}=0,041 p_{34}=0,067	Эффект. p_{12}=0,602 p_{13}=0,216 p_{14}=0,533 p_{23}=0,205 p_{24}=0,937 p_{34}=0,141

Примечание: * – достоверность различий с p<0,05 между группами с разной эффективностью IFX в разные периоды наблюдения; зеленой штрих-линией указан референсный диапазон

Рисунок 3.5 – Динамика относительного содержания Treg клеток (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с БК при терапии IFX

В группе БК IFX с НЭ наблюдалось достоверное увеличение относительного содержания Treg между периодами до / после индукции ГИБП и периодом 1-3 года терапии (Рисунок 3.5). В группе БК IFX с эффективностью терапии достоверных изменений по относительному содержанию Treg не наблюдалось в течении всего периода наблюдения (Рисунок 3.5). При этом, достоверно более высокие показатели наблюдались в группе с эффективностью терапии относительно группы с НЭ до назначения ГИБП и в период после индукции (Таблица 3.5, Рисунок 3.5).

Анализ динамики отклонений показателей относительного содержания активированных Т-хелперов (Thact) у пациентов БК IFX в период лечения показал: в группе с НЭ значения показателя были выше верхней границы диапазона; в группе с эффективностью терапии – в пределах диапазона (Рисунок 3.6).

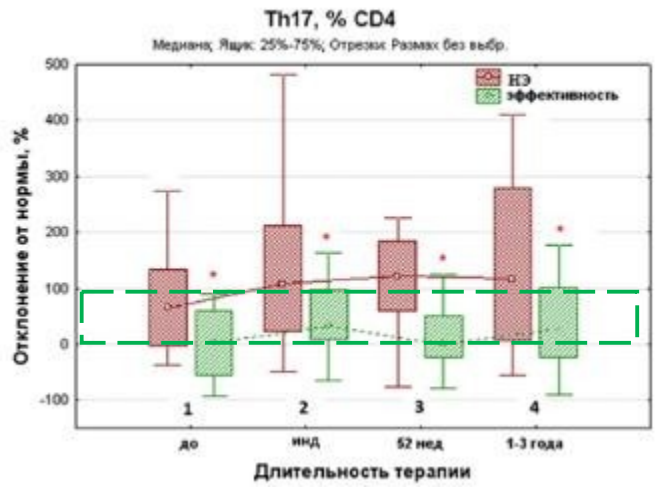
БК IFX		
	НЭ p_{12}=0,596 p_{13}=0,241 p_{14}=0,432 p_{23}=0,639 p_{24}=0,239 p_{34}=0,168	Эффект. p_{12}=0,589 p_{13}=0,656 p_{14}=0,769 p_{23}=0,189 p_{24}=0,633 p_{34}=0,349

Примечание: * – достоверность различий с p<0,05 между группами с разной эффективностью IFX в разные периоды наблюдения; зеленой штрих-линией указан референсный диапазон

Рисунок 3.6 – Динамика относительного содержания Thact клеток (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с БК при разной эффективности терапии IFX

У пациентов БК IFX в обеих группах по эффективности ГИБП достоверных изменений между периодами лечения по относительному содержанию Thact выявлено не было (Рисунок 3.6). При этом, показатели относительного содержания Thact в группе с НЭ были значимо выше, чем в группе с эффективным лечением на протяжении всего периода лечения (Таблица 3.5, Рисунок 3.6).

Анализ динамики отклонений показателей относительного содержания Th17-лимфоцитов у пациентов группы БК IFX относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ значения показателя были выше верхней границы диапазона, кроме периода до введения ГИБП; в группе с эффективностью терапии – в пределах диапазона (Рисунок 3.7).

БК IFX		
	НЭ p_{12}=0,321 p_{13}=0,141 p_{14}=0,339 p_{23}=0,992 p_{24}=0,781 p_{34}=0,992	Эффект. p_{12}=0,058 p_{13}=0,999 p_{14}=0,060 p_{23}=0,069 p_{24}=0,815 p_{34}=0,069

Примечание: * – достоверность различий с p<0,05 между группами с разной эффективностью IFX в разные периоды наблюдения; зеленой штрих-линией указан референсный диапазон

Рисунок 3.7 – Динамика относительного содержания Th17-лимфоцитов (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с БК при терапии IFX

У пациентов БК IFX как в группе 1, так и в группе 2 не было выявлено значимых изменений значений Th17-лимфоцитов между периодами наблюдения (Рисунок 3.7). При этом, показатели относительного содержания Th17-лимфоцитов в группе с НЭ были значимо выше, чем в группе с эффективным лечением на протяжении всего периода лечения (Таблица 3.5, Рисунок 3.7).

Среди анализируемых пациентов, находящихся на лечении ADA, были выделены пациенты, у которых до назначения ADA была терапия IFX с потерей эффективности (IFX/ADA). При сравнительном анализе группы пациентов IFX/ADA (IFX – 1-ый препарат/ADA – 2-ой препарат) с наивными пациентами (без предшествующей ГИБП терапии) была выявлена достоверная разница по относительному содержанию популяций $CD4^+$ Т-клеток, Treg, Thact и Th17-лимфоцитов (Таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Содержание популяций лимфоцитов в группах пациентов с ВЗК со сменой терапии с IFX на терапию ADA и наивных пациентов (до введения ADA)

Популяция клеток	IFX/ADA n=36	ADA n=37	Достоверность отличий, p
CD4, % от ЛФ	263,2 (152,7 - 338,6)	135 (60,8 - 247,3)	0,005
CD4, кл/мкл	97,1 39,5 - 180)	21,8 (-8,6 - 83,8)	0,006
Treg от CD4, кл/мкл	177,1 (113,7 - 305,8)	72,4 (10,4 - 144,8)	<0,001
Thact, % от ЛФ	80,8 (33,4 - 136,9)	169,8 (102,5 - 269,7)	0,011
Thact, % от CD4	57,8 (-15,6 - 121,4)	182,8 (96,9 - 264,7)	<0,001
Th17, % от CD4	50 (1,5 - 68)	114,7 (39,7 - 150)	0,002
Примечание: % от ЛФ – процент от всех лимфоцитов			

Необходимо отметить, что у пациентов группы IFX/ADA абсолютное содержание Treg было существенно выше референсного диапазона и группы наивных пациентов до ADA. При этом, содержание Thact и Th17-лимфоцитов, наоборот, в группе IFX/ADA было в пределах возрастного интервала и достоверно ниже, чем у наивных пациентов до ADA. В связи с полученными данными, при анализе динамики содержания популяций лимфоцитов у пациентов группы БК ADA из анализа были исключены пациенты с предшествующей терапией IFX.

Анализ пациентов группы БК ADA, как и в группе БК IFX, показал различия в содержании основных популяций лимфоцитов между группами с разной эффективностью ГИБП и в разные периоды введения препарата (Таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Динамика содержания основных популяций лимфоцитов (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с БК при терапии ADA

Популяция клеток, % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*До*	*119,8 (62,7 - 201,3)* *-43,3 (-96,3 - 85,7)*	*33,8 (-86,8 -90,7)*** *-64,9 (-137,6 - 96,1)*
	Инд	*57,1 (39,0 - 192,0)* *21,2 (-45,7 - 104,5)*	*152,2 (62,3 - 213,9)* *-7,2 (-57,0 - 74,7)*
	52 нед	114,6 (52,2 - 160,6) 84,2 (-2,5 - 183,0)	96,3 (63,5 - 137,2) 129,9 (56,4 - 217,7)
	1-3 года	62,0 (32,7 - 140,9) 110,3 (29,7 - 158,0)	73,8 (15,1 - 112,2) 86,8 (16,3 - 232,5)
CD4	*До*	*178,9 (90,0 - 286,3)* *7,3 (-37,3 - 98,7)*	*118,9 (-11,1 - 272,9)* *-6,2 (-71,5 - 132,6)*
	Инд	*96,3 (-1,0 - 171,0)* *21,1 (-31,0 - 113,0)*	*161,8 (53,4 - 281,0)** *31,3 (-26,9 - 84,6)*
	52 нед	135,6 (77,5 - 215,6) 108,1 (33,5 - 172,9)	157,1 (45,4 - 234,5) 147,1 (71,3 - 217,4)
	1-3 года	131,9 (66,3 - 207,9) 121,6 (53,4 - 206,8)	149,8 (60,9 - 247,4) 136,5 (41,8 - 250,8)
CD8	*До*	*-33,9 (-113,8 - 68,8)* *-86,3 (-130,5 - 24,0)*	*-54,2 (-74,4 - -11,3)* *-79,0 (-134,5 - 27,0)*
	Инд	*4,5 (-29,6 - 133,1)* *-0,9 (-72,5 - 65,0)*	*-1,9 (-14,6 - 54,2)* *-13,9 (-102,0 - 27,4)*
	52 нед	25,3 (-38,8 - 78,1) 24,3 (-15,7 - 139,3)	11,8 (-54,0 - 58,8) 44,6 (-28,3 - 127,13)
	1-3 года	-23,9 (-83,8 - 36,4) 22,8 (-55,6 - 98,7)	-70,4 (-96,5 - -34,1) -8,9 (-77,6 - 59,6)
CD4/CD8	*До*	*320,0 (46,7 - 624,0)*	*207,9 (61,3 - 434,5)*
	Инд	*203,3 (46,7 - 250,0)*	*223,7 (60,9 - 359,9)*
	52 нед	127,5 (41,9 - 322,6)	129,4 (30,1 - 374,1)
	1-3 года	216,3 (105,0 - 383,3)	286,4 (158,2 - 535,3)
CD19	*До*	*-3,0 (-40,3 - 24,0)* *-63,4 (-109,0 - 38,0)*	*153,7 (87,3 - 211,5)*** *43,1 (-37,6 - 242,4)**
	Инд	*-9,1 (-34,7 - 103,8)* *-13,9 (-78,2 - 49,6)*	*-19,4 (-48,9 - 37,9)* *-37,5 (-111,0 - 112,2)*
	52 нед	10,3 (-40,8 - 57,0) -8,8 (-45,1 - 83,0)	31,2 (-17,0 - 57,3) 67,6 (-8,4 - 124,7)
	1-3 года	32,3 (6,3 - 79,9) 34,5 (-5,4 - 149,5)	32,5 (20,3 - 74,5) 51,9 (-17,5 - 202,0)

Продолжение Таблицы 3.7

Популяция клеток, % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период ГИБП	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
NK	*До*	*-44,8 (-53,8 - 6,7)* *-9,2 (-20,8 - 2,9)*	*-44,8 (-53,8 - 6,7)* *-9,2 (-20,8 - 2,9)*
	Инд	*-24,9 (-40,6 - 8,5)* *6,8 (-11,9 - 23,7)*	*-29,6 (-584,8 - -21,2)* *-8,9 (-20,8 - -2,1)**
	52 нед	-12,5 (-26,4 - 29,4) 15,7 (2,4 - 39,0)	-27,6 (-33,5 - 6,2) 11,9 (0,8 - 45,0)
	1-3 года	*-13,3 (-37,6 - 15,5)* *22,1 (-5,5 - 33,6)*	-12,8 (-44,1 - 10,8) 13,6 (-8,4 - 48,5)
Примечание: % от ЛФ – процент от лимфоцитов; * – достоверность различий между группами 1 и 2 с p<0,05; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с p<0,001			

Анализ динамики содержания малых популяций $CD4^+$ Т-клеток у пациентов группы БК ADA, также как в группе БК IFX, показал увеличение % содержания Treg относительно возрастного референсного диапазона во все периоды наблюдения и достоверно более высокое абсолютное содержание Treg у пациентов с эффективностью терапии (группа 2) к году лечения (Таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Динамика содержания малых популяций $CD4^+$ Т- лимфоцитов (% отклонений от возрастных референсных значений) у пациентов с БК при терапии ADA

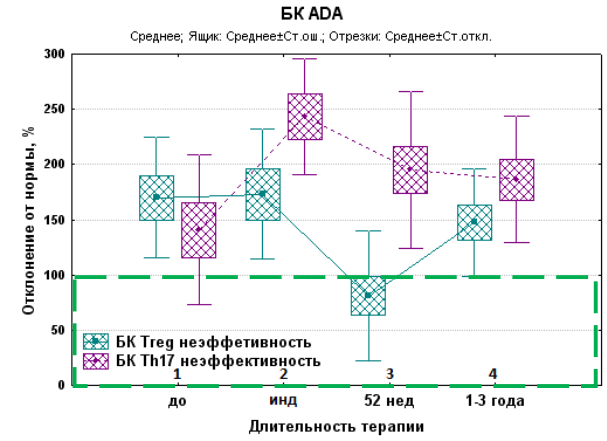
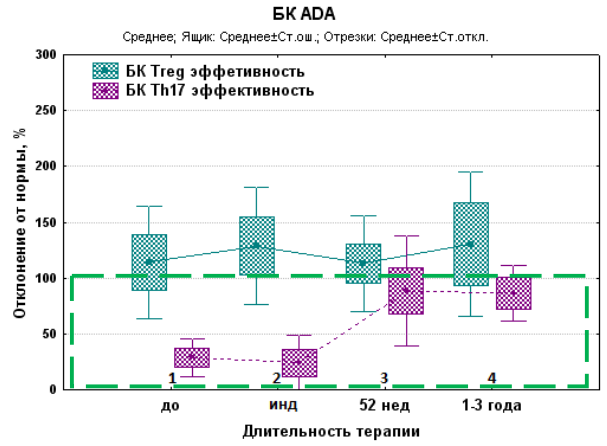
Популяция клеток % от CD4 абс от CD4, к*л/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$) n=20	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$) n=34
Treg	*До*	*159,1 (80,0 - 250,0)* *95,4(37,5 - 320,8)*	*165,9 (50,9 - 177,3)* *56,1 (-39,1 - 109,0)*
	Инд	*200,0 (131,8 - 250,0)* *57,2 (13,8 - 235,5)*	*112,8 (68,2 - 211,9)* *70,9 (-20,4 – 203,7)*
	52 нед	81,8 (-8,2 - 186,4) 105,1 (39,8 - 225)	107,0 (51,5 - 170,5) 233,6 (123,4 - 475,4)*
	1-3 года	125,6 (90,9 - 204) 219,7 (113,3 - 341,4)	133,0 (36,8 - 193,1) 209,0 (53,4 - 432,9)

Продолжение Таблицы 3.8

Популяция клеток % от CD4 абс от CD4, к*л/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$) n=20	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$) n=34
Thact	*До*	*188 (112,5 - 287,5)* *90,3 (22,6 - 332,8)*	*150,0 (133,6 - 207,8)* *76,8 (0,5 - 236,2)*
	Инд	*232,8 (196,9 - 405)* *150,7 (56,1 - 424,9)*	*10,2 (-42,4 - 145,8)*** *68,9 (-66,9 - 237,7)**
	52 нед	145,3 (84,4 - 226,6) 224,8 (117 - 304,8)	150,8 (89,4 - 234,8) 290,2 (89,5 - 468,9)
	1-3 года	242,7 (166,7 - 343,8) 369,9 (190,2 - 587,1)	154 (106,3 - 214,2)* 261,0 (169,1 - 411,6)
Th17	*До*	*119 (86,8 - 138,2)* *8,5 (-42,6 - 235,4)*	*35,7 (-1,8 - 59,6)*** *-99,1 (-172,4 - 157,3)**
	Инд	*242,7 (202,9 - 316)* *194,8 (27,7 - 454)*	*39,7 (3,7 - 46,4)*** *-14,4 (-88,9 - 74,7)***
	52 нед	172,1 (110,3 - 272,1) 323,4 (180,8 - 569,9)	78,6 (12,9 - 143,1)** 225,7 (49,6 - 333)*
	1-3 года	168,9 (111,8 - 241,2) 335,8 (225,5 - 496,5)	91,1 (55,9 - 115,7)* 195,4 (71,6 - 479,8)
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,05; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,001			

Показатели относительного содержания Thact лимфоцитов у пациентов БК ADA в группе 1 были достоверно выше, чем в группе 2 после индукционного курса и в период 1-3 года терапии (Таблица 3.8). Относительное и абсолютное содержание Th17-клеток в группе 1 было достоверно выше, чем у пациентов группы 2 во все периоды лечения ADA, кроме периода 1-3 года (Таблица 3.8).

У пациентов БК ADA относительное содержание Treg и Th17-лимфоцитов в группе с НЭ было выше значений референсного диапазона во все периоды лечения за исключением периода в 52 нед. для содержания Treg (в пределах возрастного диапазона) (Рисунок 3.8А).

А. Группа 1 (НЭ)	Б. Группа 2 (эффективность лечения)
	
Treg Недостаточная эффективность: p_{12}=0,585, p_{13} = 0,002 p_{14}=0,31, p_{23}=0,002, p_{24}=0,056, p_{34}=0,014 Th17 Недостаточная эффективность: p_{12} < 0,001, p_{13}=0,016, p_{14}=0,016, p_{23}=0,029, p_{24}=0,016, p_{34}=0,945	Treg Эффективность: p_{12}=0,780, p_{13}=0,557, p_{14}=0,664, p_{23}=0,486, p_{24}=0,945, p_{34}=0,779 Th17 Эффективность: p_{12}=0,780, p_{13}=0,019, p_{14}=0,003, p_{23}=0,023, p_{24}=0,001, p_{34}=0,779

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

Рисунок 3.8 – Динамика показателей Treg и Th17 у пациентов с БК в группе с недостаточной эффективностью ADA (А) и в группе с эффективностью ADA (Б)

При этом, содержание Treg лимфоцитов в группе с НЭ значимо снижалось после индукционного курса к году терапии и далее достоверно повышалось к периоду 1-3 года лечения. В то же время, содержание Th17-лимфоцитов в этой же группе после индукционного курса значимо увеличивалось, снижалось к году терапии ADA и к периоду 1-3 года, но оставалось достоверно выше по сравнению с периодом до начала ГИБП (Рисунок 3.8А).

У пациентов БК ADA в группе с эффективностью терапии содержание Treg было выше верхней границы референсного диапазона и не изменялось между периодами наблюдения, а содержание Th17-лимфоцитов повышалось после индукционного курса к году терапии, но оставалось в пределах возрастного референсного диапазона (Рисунок 3.8Б).

Интересно отметить, что у пациентов группы ЯК IFX при анализе динамики содержания популяций лимфоцитов в группе с эффективностью терапии (группа 2) выявлено увеличение популяций CD3 и CD4 Т-лимфоцитов во все периоды

наблюдения относительно диапазона референсных значений и пациентов группы 1 (Таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Динамика содержания основных популяций лимфоцитов (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с ЯК при терапии IFX

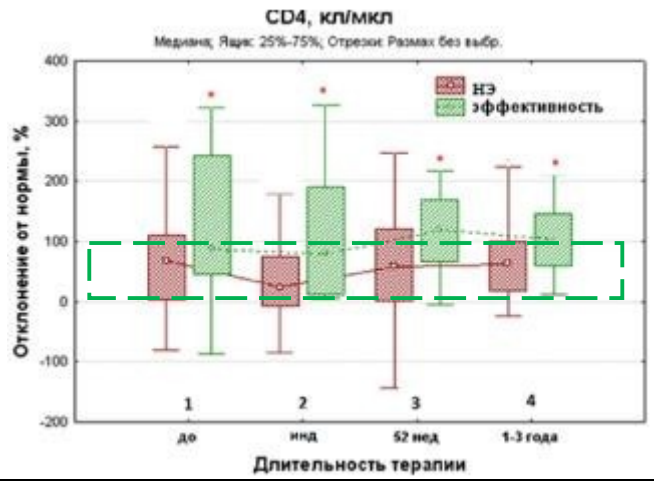
Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*До*	*67,6 (12,4 - 112,0)* *67,7(-1,8 - 95,5)*	*137,9 (99,5 - 175,3)*** *109,0 (55,2 - 208,6)**
	Инд	*100,9 (73,8 - 139,2)* *23,6 (-12,7 - 75,3)*	*135,0 (64,1 - 188,1)* *98,2 (25,0 - 132,6)**
	52 нед	*139,4 (71,3 - 185,5)* *35,9 (-6,2 - 116,8)*	*154,6 (100,7 - 178,6)* *72,8 (38,3 - 145,9)*
	1-3 года	135,6 (55,7 - 210,4) 70,5 (19,5 - 126,3)	192,6 (154,3 - 225,9)* 75,2 (39,2 - 140,2)
CD4	*До*	*79,5 (-2,3 - 116,9)* *68,5 (3,3 - 110,9)*	*168,8 (74,0 - 207,3)** *87,5 (46,5 - 242,9)*
	Инд	*96,4 (42,9 - 158,8)* *23,9 (-7,0 - 74,9)*	*142,3 (81,3 - 193,8)* *79,4 (12,4 - 189,9)*
	52 нед	*135,3 (62,9 - 243,9)* *58,6 (2,3 - 120,9)*	*206,5 (193,3 - 271,2)*** *119,9 (66,0 - 169,7)**
	1-3 года	117,4 (60,8 - 191,9) 63,3 (18,1 - 100,5)	216,6 (113,5 - 282,0)* 103,5 (60,3 - 146,0)*
CD8	*До*	*24,1 (-10,9 - 74,4)* *16,4(-11,0 - 80,6)*	*37,5 (-20,0 - 153,3)* *107,3 (-20,7 - 162,7)*
	Инд	*41,7 (-1,3 - 68,8)* *3,1 (-14,5 - 48,3)*	*50,4 (1,3 - 58,2)* *46,6 (-7,8 - 96,6)*
	52 нед	*35,6 (-20,6 - 105,4)* *1,8 (-41,7 - 73,5)*	*12,7 (-27,5 - 69,6)* *8,3 (-20,7 - 67,9)*
	1-3 года	26,0 (-23,8 - 88,3) 33,7 (-10,3 - 108,2)	34,0 (-49,4 - 93,8) 31,4 (-44,1 - 108,0)
CD4/CD8	*До*	*66,0 (34,5 - 186,7)*	*196,1 (-30,0 - 253,3)*
	Инд	*65,0 (35,1 - 207,7)*	*66,9 (56,7 - 230,0)*
	52 нед	*150,1 (3,3 - 316,7)*	*213,2 (80,3 - 378,4)*
	1-3 года	116,7 (36,7 - 313,3)	156,7 (76,7 - 326,7)

Продолжение Таблицы 3.9

Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD19	*До*	*11,7 (-42,0 - 122,5)* *-8,0 (-56,4 - 164,5)*	*42,4 (-4,0 - 83,1)* *42,1 (-33,0 - 111,8)*
	Инд	*-29,4 (-53,9 - 20,1)* *-34,0 (-71,5 - -4,4)*	*24,2 (-12,7 - 67,0)** *21,8 (-32,5 - 115,7)**
	52 нед	*-16,1 (-45,0 - 37,7)* *-46,9 (-70,7 - 1,9)*	*-6,7 (-25,7 - 19,1)* *-11,1 (-40,6 - 8,5)*
	1-3 года	-22,0 (-48,6 - 50,6) -26,4 (-66,0 - 46,7)	-40,5 (-55,9 - -6,9) -60,1 (-79,5 - -14,7)*
NK	*До*	*-31,1 (-45,3 - -3,8)* *-4,5 (-19,7 - 3,8)*	*-55,1 (-67,8 - -39,8)** *-22,9 (-43,4 - -9,6)**
	Инд	*-18,5 (-40,0 - 12,9)* *-9,9 (-23,9 - 14,8)*	*-45,9 (-68,8 - -29,2)** *-26,3 (-50,8 - -21,9)**
	52 нед	*-35,3 (-59,3 - -6,8)* *-10,9 (-32,7 - 12,5)*	*-41,4 (-51,9 - -15,6)* *-4,7 (-23,8 - 6,1)*
	1-3 года	-33,1 (-52,5 - -18,5) -9,6 (-46,1 - 14,7)	-40,5 (-60,8 - -18,0) -5,1 (-21,7 - 8,9)
Примечание: % от ЛФ – процент от лимфоцитов; * – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,05; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,001; диапазон нормы указан штриховкой			

Содержание CD19 лимфоцитов и NK-клеток во все периоды наблюдения и в обеих группах в большинстве случаев было ниже показателей возрастной нормы (Таблица 3.9).

Анализ динамики отклонений абсолютного содержания $CD4^+$ Т-клеток у пациентов ЯК IFX в обеих группах на протяжении всего периода терапии не показал значимых отличий относительно референсного диапазона (Рисунок 3.9).

IFX		
	НЭ p_{12}=0,137 p_{13}=0,572 p_{14}=0,919 p_{23}=0,297 p_{24}=0,069 p_{34}=0,561	Эффект . p_{12}=0,914 p_{13}=0,720 p_{14}=0,853 p_{23}=0,557 p_{24}=0,725 p_{34}=0,595

Примечание: * – достоверность отличий с p<0,05 между группами с разной эффективностью IFX в разные периоды наблюдения; зеленой штрих-линией указан референсный диапазон

Рисунок 3.9 – Динамика абсолютного содержания CD4 клеток у пациентов с ЯК при терапии IFX

У пациентов ЯК IFX в группе 1 и в группе 2 не выявлено достоверных отличий между периодами лечения. Однако, в группе 2 наблюдались достоверно более высокие значения абсолютного содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов относительно группы 1 (Рисунок 3.9).

Анализ малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов в группе пациентов ЯК IFX показал разную динамику показателей в группе с НЭ (группа 1) и группе с эффективностью терапии (группа 2) (Таблица 3.10).

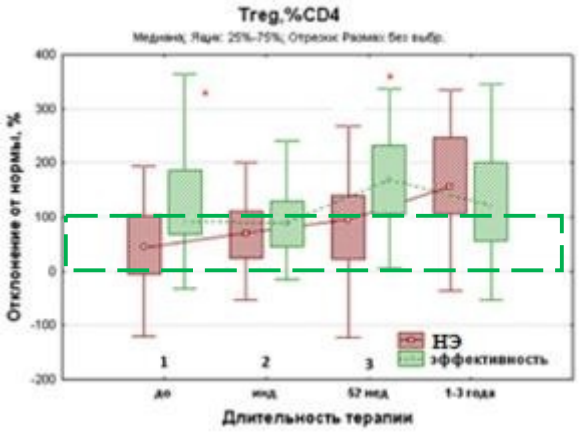
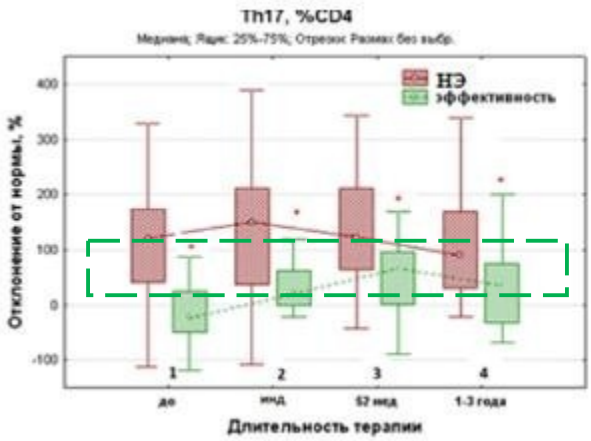
Таблица 3.10 – Динамика содержания малых популяций лимфоцитов (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с ЯК при терапии IFX

Популяция клеток % от CD4 абс от CD4, кл/*мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Treg	*До*	*43,9 (-4,6 - 102,2)* *59,2 (-27,1 - 251,9)*	*90,9 (68,0 - 186,4)** *186,6 (44,8 - 389,9)*
	Инд	*70,7(24,1 - 109,8)* *28,6 (-30,2 - 196)*	*88,0 (84,8 - 104,5)* *165,0 (37,9 - 426,3)**
	52 нед	*95,0 (23,2 - 140,9)* *109,4 (-0,1 - 166,7)*	*169,0 (105,9 - 231,8)*** *194,8 (95,0 - 334,5)**
	1-3 года	156,0 (105,9 - 248,0) 227,4 (100,0 - 286,3)	120,5 (55,9 - 200,0) 189,7 (92,9 - 272,4)

Продолжение Таблицы 3.10

Популяция клеток % от CD4 абс от CD4, кл/*мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Thact	*До*	*168,9 (114,7 - 223,6)* *217,3 (64,7 - 340,9)*	*79,7 (28,6 - 198,6)** *201,6 (49,2 - 291,7)*
	Инд	*163,4 (93,8 - 359,4)* *143,1 (26,0 - 247,0)*	*87,5 (43,3 - 335,7)* *269,1 (69,1 - 609,3)**
	52 нед	*192,3 (115,6 - 273,4)* *229,9 (103,3 - 315,6)*	*158,0 (59,4 - 230,9)* *212,4 (95,1 - 445,4)*
	1-3 года	172,3 (128,6 - 252,4) 222,9 (93,6 - 317,0)	134,4 (44,8 - 201,7)* 230,2 (38,7 - 356,7)
Th17	*До*	*120,0 (40,0 - 173,5)* *163,2 (-1,0 - 286,0)*	*-23,2 (-50,0 - 25,0)*** *37,4 (-53,2 - 93,6)**
	Инд	*150,0 (37,1 - 211,8)* *122,7 (33,3 - 351,2)*	*20,7 (-1,5 - 63,0)** *148,4 (55,2 - 201,9)*
	52 нед	*122,8 (63,2 - 211,8)* *174,1 (65,9 - 255,3)*	*65,4 (1,5 - 95,6)*** *146,1 (12,8 - 299,2)*
	1-3 года	90,2 (31,4 - 168,5) 164,7 (37,7 - 282,9)	35,3 (-31,5 - 75)* 125,5 (12,8 - 285,6)
Примечание: * – достоверность различий между группами с $p<0,05$; **– достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$			

Анализ динамики отклонений показателей относительного содержания Treg у пациентов группы ЯК IFX относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ –показатели изменялись в пределах диапазона, кроме периода 1-3 года (выше диапазона); в группе с эффективностью терапии – показатели были выше диапазона, начиная с года терапии и в период 1-3 года (Рисунок 3.10А).

А	Б
	
Недостаточная эффективность: p_{12}=0,166, p_{13}=0,043, p_{14} <0,001, p_{23}=0,488, p_{24} <0,001, p_{34}<0,001 Эффективность: p_{12}=0,472, p_{13}=0,158, p_{14}=0,728, p_{23} <0,001, p_{24}=0,074, p_{34}=0,084	Недостаточная эффективность: p_{12}=0,331, p_{13}=0,473, p_{14}=0,691, p_{23}=0,687, p_{24}=0,153, p_{34}=0,098 Эффективность: p_{12}=0,056, p_{13}=0,004, p_{14}=0,042, p_{23}=0,201, p_{24}=0,875, p_{34}=0,326

Примечание: * – достоверность отличий с p<0,05 между группами с разной эффективностью в разные периоды наблюдения; зеленой штрих-линией указан референсный диапазон

Рисунок 3.10 – Динамика показателей относительного содержания Treg (А) и Th17-лимфоцитов (Б) у пациентов с ЯК при терапии IFX

У пациентов ЯК IFX также, как и у пациентов БК IFX в группе 1 выявлено увеличение показателей относительного содержания Treg в процессе лечения. У пациентов ЯК IFX с НЭ относительное содержание Treg достоверно увеличивалось между периодами до начала и к году терапии и далее с периодом 1-3 года (Рисунок 3.10А). У пациентов ЯК IFX в группе 2 выявлено значимое увеличение относительного содержания Treg к году терапии после индукционного курса (Рисунок 3.10А).

При этом, показатели относительного содержания Treg в группе с НЭ были значимо ниже, чем в группе с эффективным лечением до начала лечения IFX и к году терапии (Таблица 3.10, Рисунок 3.10А).

Анализ динамики отклонений показателей относительного содержания Th17-лимфоцитов у пациентов ЯК IFX по сравнению с референсным интервалом в период лечения показал: в группе с НЭ показатели были выше верхней границы диапазона, кроме периода 1-3 года; в группе с эффективностью терапии – выше

верхней границы диапазона, начиная с года терапии и в период 1-3 года (Рисунок 3.10Б).

У пациентов ЯК IFX относительное содержание Th17-лимфоцитов между периодами наблюдения в группе с НЭ достоверно не изменялось, а в группе 2 достоверно увеличивалось к году терапии и периоду 1-3 года лечения, но сохранялось в пределах диапазона референсных значений (Рисунок 3.10Б). При этом, относительное содержание Th17-лимфоцитов в группе 1 было значимо выше, чем в группе 2 на всех этапах лечения после индукционного курса (Таблица 3.10, Рисунок 3.10Б).

Анализ динамики показателей основных популяций лимфоцитов в группе ЯК ADA выявил достоверные изменения между группами пациентами с разной эффективностью терапии в популяциях CD3, CD4, CD8 Т-лимфоцитов и NK-клетках. В группе с эффективностью терапии наблюдалось увеличение популяции CD4 Т-лимфоцитов относительно возрастного диапазона во все периоды наблюдения, и показатели в этой группе были значимо выше показателей группы с НЭ после индукционного курса. Интересно отметить, что у пациентов с эффективным лечением ADA выявлено снижение содержания CD8 Т-лимфоцитов до введения препарата и после индукционного курса. Причем, показатели CD8 Т-лимфоцитов были ниже уровня возрастных референсных значений, что привело к существенному увеличению иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) во все периоды наблюдения. Достоверные отличия для популяции CD19 клеток между группами пациентов ЯК ADA наблюдались только до введения препарата: в группе с НЭ наблюдалось снижение показателя ниже уровня возрастных референсных значений. В группе ЯК ADA также, как и у пациентов при лечении IFX, выявлено снижение показателей NK-клеток ниже возрастного диапазона в группе с недостаточной эффективностью (группа 1) и группе с эффективностью адалимумаба (группа 2) (Таблица 3.11).

Таблица 3.11 – Динамика содержания основных популяций лимфоцитов (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с ЯК при терапии ADA

Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*До*	*180,8 (153,6 - 196)* *58,9 (7,7 - 116,1)*	*119,4 (63,6 - 175,2)** *93,4 (-57,4 - 246,1)*
	Инд	*111,8 (75,6 - 142,7)* *40,5 (29,1 - 147,7)*	*175,2 (28,0 - 211,4)* *26,82 (-18,70 - 246,1)*
	52 нед	*81,7 (-6,4 - 188,2)* *193,5 (10,6 - 349,4)*	*172,8 (72,7 - 207,1)** *90,5 (34,3 - 169,01)*
	1-3 года	*131,1 (29,9 - 222,6)* *138,8 (89,7 - 227,4)*	*238,2 (86,4 - 243,5)* *158,7 (137,9 - 212,8)*
CD4	*До*	*254,0 (247,3 - 305)* *92,9 (83,8 - 127,6)*	*283,4 (189,8 - 286,4)* *176,9 (35,1 - 180)*
	Инд	*56,9 (34,4 - 68,1)* *25,9 (5,1 - 123)*	*275,52 (132,5 - 286,4)*** *83,8 (35,1 - 299,5)*
	52 нед	*107,5 (-12,8 - 240,4)* *122,5 (11,9 - 276,3)*	*256,8 (163,4 - 321,9*)* *122,0 (49,2 - 186,3)*
	1-3 года	*171,2 (40,3 - 299,7)* *191,1(104,9 - 219,6)*	*241,1 (156,3 - 289,8)* *217,7 (135,7 - 295,5)*
CD8	*До*	*186,1 (90,2 – 256,1)* *108,5 (12,4 - 158,9)*	*-20,0 (-42,6 - 6,5)*** *-0,5 (-97,5 - 92,5)**
	Инд	*81,6 (36,3 - 151,3)* *55,7 (11,3 - 164,3)*	*-41,3 (-49,4 - 23,2)*** *-36,3 (-74,8 - 107,2)**
	52 нед	*35,0 (-56,0 - 116,3)* *125,9 (-25,3 - 315,7)*	*-5,9 (-33,6 - 20,03)* *22,1 (-51,7 - 111,7)*
	1-3 года	*-31,8 (-111,1 - 11,6)* *20,8 (-31,2 - 41,2)*	*-6,3 (-35,2 - 71,2)* *56,7 (25,4 - 114)*
CD4/CD8	*До*	*11,2 (-20,5 - 336,7)*	*279,2 (271,5 - 320,1)*
	Инд	*10,9 (-3,8 - 72,7)*	*279,2 (254,6 - 336,7)***
	52 нед	*85,0 (-13,3 - 330,0)*	*229,7 (75,3 - 438,9)*
	1-3 года	*377,8 (68,9 - 652,7)*	*326,7 (166,5 - 407,8)*
CD19	*До*	*-10,0 (-26,7 - 22,9)* *-24,8 (-72,1 - 26,7)*	*51,8 (8,3 - 95,4)*** *101,9 (-70,6 - 274,5)*
	Инд	*9,2 (-90,0 - 52)* *-22,7 (-62,0 - 60,5)*	*8,3 (-22,8 - 95,4)* *-27,0 (-68,7 - 274,5)*
	52 нед	*53,0 (-16 - 73,6)* *84,5 (-9,5 - 210,5)*	*20,4 (-10,6 - 50,9)* *48,2 (-49,9 - 166,3)*
	1-3 года	*6,9 (-57,4 - 106,2)* *20,7 (-78,7 - 286,5)*	*-46,0 (-77,7 - 13,9)* *-43,0 (-101,5 - 53,2)*

Продолжение Таблицы 3.11

Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
NK	*До*	*-55,9 (-60,1 - -49,1)* *-17,3 (-26,2 - -14,8)*	*-59,2 (-61,5 - -58,5)* *-19,9 (-24,6 - -17,9)*
	Инд	*-43,1 (-51,5 - -37,5)* *-26,8 (-33,2 - -7,7)*	*-59,2 (-65,4 - -34,2)** *-24,6 (-58,0 - 20,1)*
	52 нед	*-31,4 (-55,1 - 16,9)* *-4,1 (-24,8 - 41,4)*	*-67,0 (-71,9 - -44,6)*** *-36,9 (-62,8 - 0,9)**
	1-3 года	*-30,3 (-51,3 - -13,0)* *9,5 (-15,2 - 45,8)*	*-53,2 (-61,2 - -40,8)** *-18,8 (-27,3 - 16,1)**
Примечание: % от ЛФ – процент от лимфоцитов; *– достоверность различий между группами 1 и 2 p <0,05; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,001			

Анализ отклонений показателей малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов в группе пациентов ЯК ADA показал достоверные изменения содержания Treg, Th17-лимфоцитов, Thact между группами пациентов с разной эффективностью лечения. Причем, содержание Th17-лимфоцитов и Thact было достоверно выше в группе с НЭ до терапии и после индукционного курса терапии (Таблица 3.12, Рисунок 3.11).

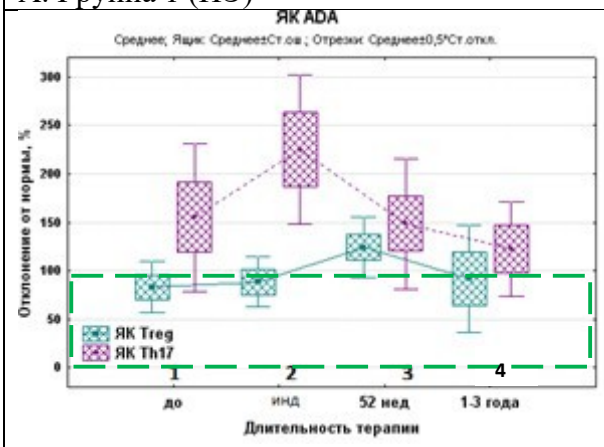
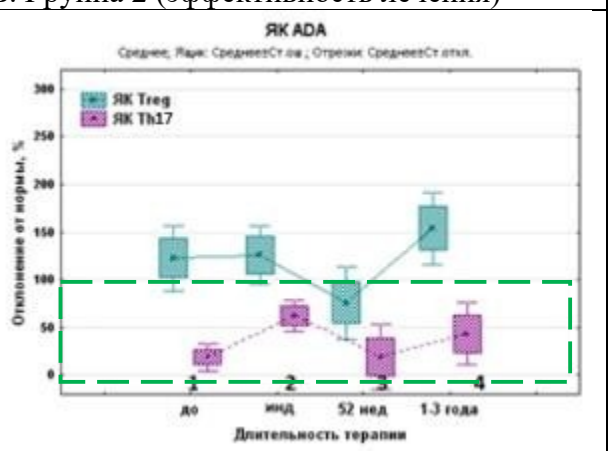
Таблица 3.12 – Динамика содержания малых популяций лимфоцитов (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с ЯК при терапии ADA

Популяция клеток % от CD4 абс от CD4, к*л/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Treg	*До*	*75,5 (72,7 - 79,0)* *142,2 (89,1 - 158,9)*	*197,8 (132,0 - 218,5)*** *256,0 (40,5 - 519,5)*
	Инд	*86,4 (30,4 - 109,1)* *34,5 (-11,3 - 127)*	*112,4 (81,8 - 213,6)** *211,4 (108,3 - 545,8)*
	52 нед	*138,3 (68,2 - 163,6)* *220,7 (13,8 - 495,4)*	*49,6 (9,1 - 140)** *122,6 (47,3 - 342,9)*
	1-3 года	*47,3 (27,3 - 136,4)* *253,5 (218,3 - 306,9)*	*154,2 (96,4 - 227,3)** *317,2 (232,9 - 453,8)*

Продолжение Таблицы 3.12

Популяция клеток % от CD4 абс от CD4, к*л/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Thact	*До*	*292,7 (196,9 - 355)* *443,5 (249,8 - 488)*	*15,5 (-19,9 - 60)*** *62,5 (29,3 - 102,5)***
	Инд	*196,5 (38,2 - 264,7)* *174,6 (30,6 - 494,4)*	*76,6 (-21,9 - 311,9)*** *125,3 (28,6 - 493,6)**
	52 нед	*217,2 (109,4 - 295,7)* *346,4 (124,6 - 591,8)*	*60,7 (26,2 - 98,4)* *166,6 (38,7 - 244,3)*
	1-3 года	*184,4 (139,1 - 312,5)* *381,6 (189,5 - 606,9)*	*188,1 (147,5 - 228,1)* *380,0 (192,1 - 645,9)*
Th17	*До*	*91,5 (50,0 - 128,3)* *192,8 (63,1 - 287,3)*	*22,5 (7,0 - 27,0)*** *163,6 (-68,9 - 396,2)*
	Инд	*275,7 (135,3 - 380)* *484,3 (246,8 - 725,5)*	*36,3 (22,1 - 64,3)*** *188,2 (-68,9 - 382,4)***
	52 нед	*122,1 (50,0 - 321,7)* *437,0 (113,2 - 587,2)*	*22,9 (-35,9 - 50,4)** *176,6 (-81,6 - 293,5)**
	1-3 года	*117,7 (32,4 - 200)* *338,9 (227,2 - 589,2)*	*30,8 (-2,9 - 106,5)** *182,9 (81,7 - 376,7)*
Примечание: * – различий между группами 1 и 2 с p <0,05; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,001			

Анализ динамики относительного содержания Treg у пациентов ЯК ADA относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ – в пределах диапазона, кроме года терапии (выше диапазона), (Рисунок 3.11А); в группе с эффективностью терапии – выше диапазона, кроме года терапии (в пределах диапазона) (Рисунок 3.11Б). При этом, относительное содержание Treg у пациентов ЯК ADA в группе с НЭ не изменялось в разные периоды лечения, а в группе с эффективностью терапии достоверно снижалось к году терапии и повышалось к периоду 1-3 года (Рисунок 3.11Б).

А. Группа 1 (НЭ)	Б. Группа 2 (эффективность лечения)
	
Treg Недостаточная эффективность: p_{12}=0,695, p_{13} = 0,106 p_{14}=0,945, p_{23}=0,059, p_{24}=0,669, p_{34}=0,078 Th17 Недостаточная эффективность: p_{12} = 0,422, p_{13}=0,882, p_{14}=0,422, p_{23}=0,078, p_{24}=0,051 p_{34}=0,569	Treg Эффективность: p_{12}=0,654, p_{13}=0,118, p_{14}=0,562, p_{23}=0,036, p_{24}=0,223, p_{34}=0,009 Th17 Эффективность: p_{12}=0,002, p_{13}=0,705, p_{14}=0,5, p_{23}=0,203, p_{24}=0,251, p_{34}=0,487

Примечание: p – достоверность отличий между разными периодами наблюдений; зеленой штрих-линией указан референсный диапазон

Рисунок 3.11 – Динамика показателей Treg и Th17 у пациентов с ЯК в группах недостаточной эффективностью адалимумаба (А) и с эффективностью адалимумаба (Б)

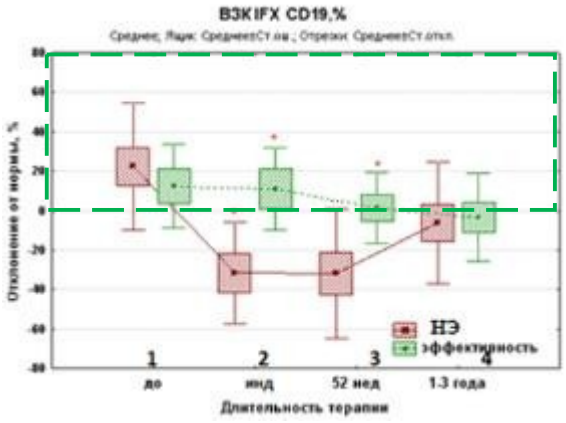
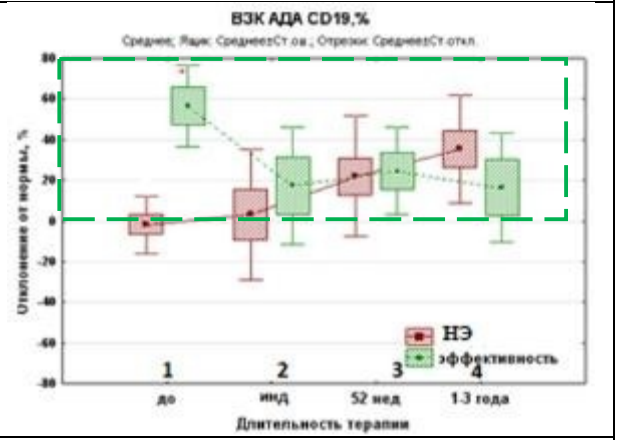
Анализ динамики относительного содержания Th17-лимфоцитов у пациентов ЯК ADA относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ показали были выше диапазона (Рисунок 3.11А); в группе с эффективностью терапии – в пределах диапазона (Рисунок 3.11Б). При этом, относительное содержание Th17-лимфоцитов у пациентов ЯК ADA в группе с НЭ не изменялось между периодами лечения (Рисунок 3.11А), а в группе с эффективностью терапии - достоверно повышалось после индукции (Рисунок 3.11Б).

Анализ динамики относительного содержания Th17-лимфоцитов у пациентов ЯК ADA относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ – выше диапазона (Рисунок 3.11А); в группе с эффективностью терапии – в пределах диапазона (Рисунок 3.11Б). При этом, относительное содержание Th17-лимфоцитов у пациентов ЯК ADA в группе с НЭ не изменялось в разные периоды лечения (Рисунок 3.11А), а в группе с

эффективностью терапии достоверно повышалось после индукции (Рисунок 3.11Б).

На следующем этапе работы было проведено сравнение относительного содержания CD19 клеток у пациентов с ВЗК на разной анти-TNF терапии (инфликсимаб, адалимумаб).

Анализ динамики относительного содержания CD19 лимфоцитов у пациентов ВЗК IFX относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ показатели были ниже диапазона, кроме периода до начала IFX (в пределах диапазона) (Рисунок 3.12А); в группе с эффективностью терапии – в пределах диапазона, кроме периода 1-3 года (чуть ниже нижней границы) (Рисунок 3.12А).

А	Б
	
Недостаточная эффективность: p_{12}=0,001, p_{13} = 0,002 p_{14}=0,053, p_{23}=0,874, p_{24}=0,129, p_{34}=0,145 Эффективность: p_{12}=0,761, p_{13}=0,277, p_{14}=0,071, p_{23}=0,519, p_{24}=0,166, p_{34}=0,327	Недостаточная эффективность: p_{12} = 0,569, p_{13}=0,059, p_{14}=0,002, p_{23}=0,432, p_{24}=0,097 p_{34}=0,211 Эффективность: p_{12}=0,004, p_{13}=0,048, p_{14}=0,036, p_{23}=0,423, p_{24}=0,96, p_{34}=0,553

Примечание: p - достоверность отличий между разными периодами наблюдений; красным показана достоверность различий между группами с p <0,001

Рисунок 3.12 – Динамика относительного содержания CD19 клеток у пациентов с ВЗК при терапии IFX (А) и при терапии ADA (Б)

У пациентов с НЭ наблюдалось снижение относительного содержания CD19 лимфоцитов после индукционного курса и к году терапии относительно периода до начала лечения IFX. В тоже время, у пациентов с эффективностью IFX относительное содержание CD19 клеток значимо не изменялось в течении всего периода наблюдения (Рисунок 3.12А). При этом, относительное содержание CD19 лимфоцитов было достоверно ниже в группе пациентов с НЭ относительно группы

с эффективностью IFX после индукционного курса и к году терапии (Таблица 3.9, Рисунок 3.12А).

Однако, в группе с НЭ терапии ADA было показано значимое увеличение относительного содержания CD19 лимфоцитов к периоду 1-3 года относительно периода до начала лечения (Рисунок 3.12Б). В группе пациентов с эффективностью ADA, напротив, наблюдалось значимое снижение относительного содержания CD19 лимфоцитов к концу индукционного курса, к году терапии и к периоду 1-3 года относительно периода до начала терапии (Таблица 3.11, Рисунок 3.12Б). При этом, достоверные отличия между группами пациентов наблюдались только в период до начала ADA.

Для пациентов с ВЗК при лечении IFX и ADA по соотношению Th17/Treg был проведен ROC-анализ в разделительной модели «эффективность – неэффективность» терапии. Исходя из того, что достоверных различий по соотношению Th17/Treg между пациентами с БК и ЯК не было выявлено во время поддерживающего курса блокаторами TNF, анализ проводился у пациентов с ВЗК без деления на группы БК и ЯК (Таблица 3.13).

Таблица 3.13 – Соотношение содержания Th17/Treg у пациентов с ВЗК в период поддерживающей терапии блокаторами TNF

Группы (эффект терапии)	БК $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$ $n_{НЭ}=66/\ n_{Эф}=103$	ЯК $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$ $n_{НЭ}=55/\ n_{Эф}=70$	Достоверность отличий, p
Неэффективность	2,46 (2,07 - 3,84)	2,56 (2,0 - 3,26)	0,819
Эффективность	1,21 (1,05 - 1,83)	1,3 (1,02 - 1,99)	0,912
Примечание: p – достоверность отличий между пациентами с БК и ЯК; $n_{НЭ}$ – количество пациентов в группе с неэффективностью; $n_{Эф}$ – количество пациентов в группе с эффективностью			

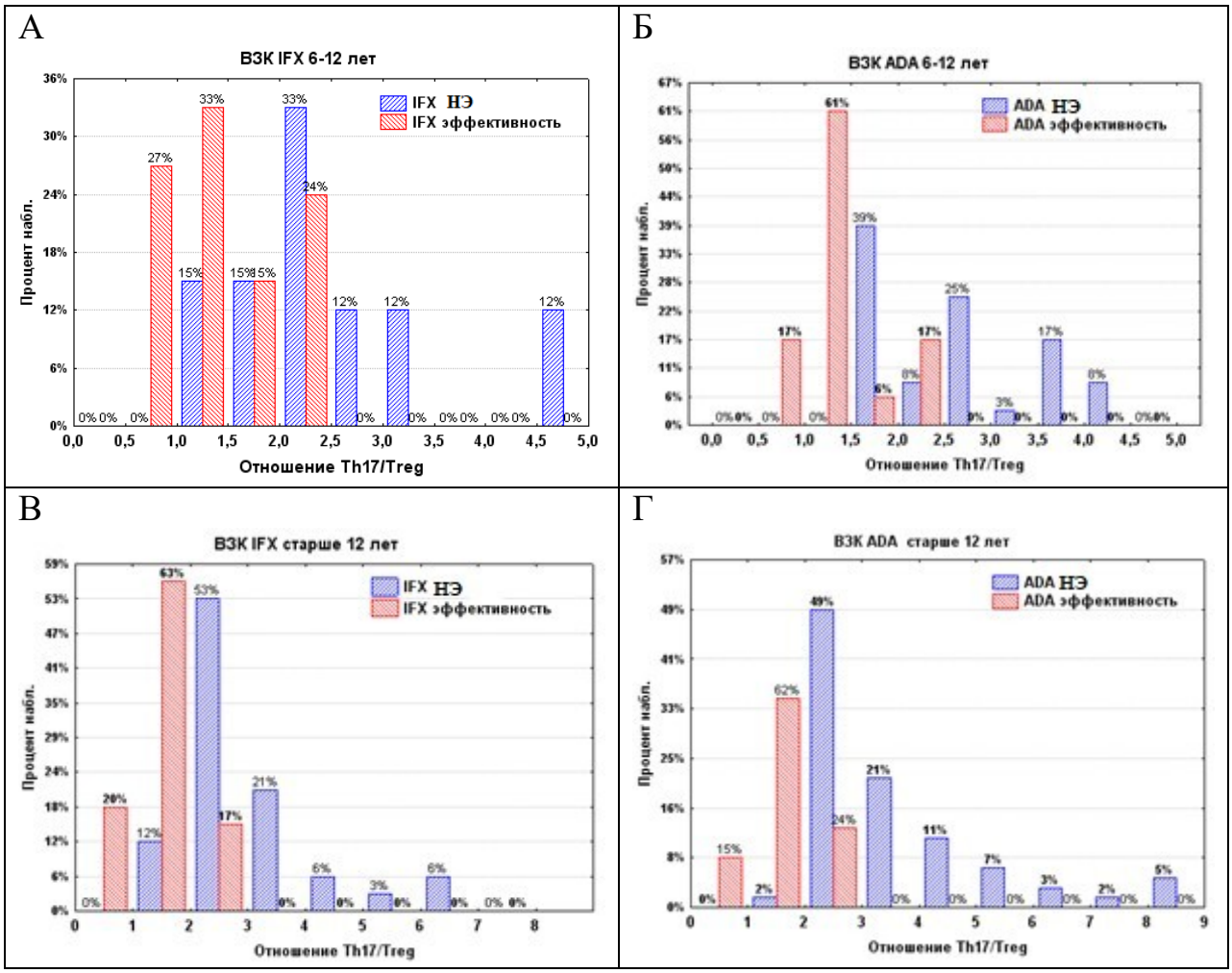
Проведенный ROC-анализа показал очень хорошее и отличное качество для разделительной модели «эффективность – неэффективность» терапии (IFX и ADA) у пациентов с ВЗК (Таблица 3.14).

Таблица 3.14 - Показатели ROC-анализа для модели «эффективность – неэффективность» по соотношению Th17/Treg у пациентов с ВЗК при терапии блокаторами TNF (IFX, ADA)

Возраст/препарат	AUC (95% доверит. инт.)	Cut-off	Se, %	Sp, %
6-12 лет / IFX	0,848 (0,745 - 0,950)	1,92	72,7	71,4
>12 лет/ IFX	0,960 (0,920 - 1,0)	2,04	85,3	83,3
6-12 лет / ADA	0,889 (0,804 - 0,974)	1,8	80	77,8
>12 лет/ ADA	0,895 (0,817 - 0,973)	2,32	81,4	81,8
Примечание: AUC – площадь под кривой, Se- чувствительность, Sp – специфичность				

Для возрастных групп 6-12 лет и старше 12 лет определены пороговые значения (cut-off) для соотношения Th17/Treg, при превышении которых можно прогнозировать потерю эффективности у пациентов с ВЗК на блокаторах TNF (Таблица 3.14).

Анализ гистограмм распределения Th17/Treg у пациентов с ВЗК между группами с эффективностью и НЭ терапии блокаторами TNF в разных возрастных группах показал, что соотношение Th17/Treg ниже порогового значения в большем проценте случаев наблюдалось в обеих возрастных группах (от 6-12 лет, старше 12 лет) с эффективностью терапии как для IFX, так и для ADA: с эффективностью IFX в группе 6-12 лет – в 65% случаев, в группе старше 12 лет – в 83% случаев; с эффективностью ADA - в обеих возрастных группах в 78% случаев (Рисунок 3.13).



Примечание: группа пациентов от 6-12 лет при терапии IFX (А), группа пациентов от 6-12 лет при терапии ADA (Б), группа пациентов старше 12 лет при терапии IFX (В), группа пациентов старше 12 лет при терапии ADA (Г)

Рисунок 3.13 – Гистограммы распределения отношения Th17/Treg у пациентов с ВЗК в разных возрастных группах и при разной эффективности терапии блокаторами TNF

Таким образом, анализ содержания основных и малых популяций лимфоцитов у детей с ВЗК выявил следующее:

1) у пациентов с ВЗК к году терапии блокаторами TNFαнезависимо от эффективности ГИБП выявлено значимое увеличение относительного содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов и снижение относительного содержания NK-клеток в циркуляции по сравнению с возрастными референсными значениями;

2) независимо от применяемого блокатора TNF, выявлены достоверные отличия между группами с разной эффективностью терапии: при эффективности терапии у детей с ВЗК наблюдается существенное повышение содержания CD4 Т-лимфоцитов и снижение NK-клеток после индукционного курса;

3) содержание Th17-лимфоцитов независимо от блокатора TNFα и периода наблюдения в группе с эффективностью терапии соответствовало возрастному диапазону, а в группе с недостаточной эффективностью - достоверно выше референсного диапазона, что приводило к увеличению соотношения Th17/Treg. Показатели в группе с недостаточной эффективностью были значимо выше, чем в группе с эффективностью терапии.

4) содержание Treg у пациентов со сменой терапии IFX на терапию ADA до введения ADA было выше, чем в группе наивных пациентов;

5) можно прогнозировать потерю эффективности у пациентов с ВЗК от 6 до 12 лет при лечении блокаторами TNF-α при соотношении Th17/Treg больше: 1,92 - при лечении IFX, 1,8 - при лечении ADA;

6) можно прогнозировать потерю эффективности у пациентов с ВЗК старше 12 лет при лечении блокаторами TNFα при соотношении Th17/Treg больше: 2,04 - при лечении IFX, 2,32 - при лечении ADA.

3.1.2. Показатели основных и малых популяций Т-хелперных лимфоцитов в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с вульгарным псориазом

У пациентов с ПС воздействие триггерных факторов приводит к активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Под действием провоспалительных цитокинов происходит дифференцировка наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов в клетки эффекторы, в том числе, в Th1 и Th17-лимфоциты. Активированные эффекторные клетки, в свою очередь, продуцируют комплекс цитокинов, воздействие которых приводит к нарушению пролиферации и дифференцировки клеток эпидермиса.

Пациенты с вульгарным псориазом были поделены на группы в зависимости от достижения PASI 75 к году терапии (недостаточная эффективность терапии – НЭ) – дети, не достигшие PASI 75 (n=52); группа 2 (эффективность терапии -

эффект PASI 75) – достигшие PASI 75 и более (n=58). Достоверной разницы по возрасту между группами не наблюдалось (p=0,755): группа 1 – 12,1 (8,0-15,9) лет; группа 2 – 12,5 (8,8-15,3) лет.

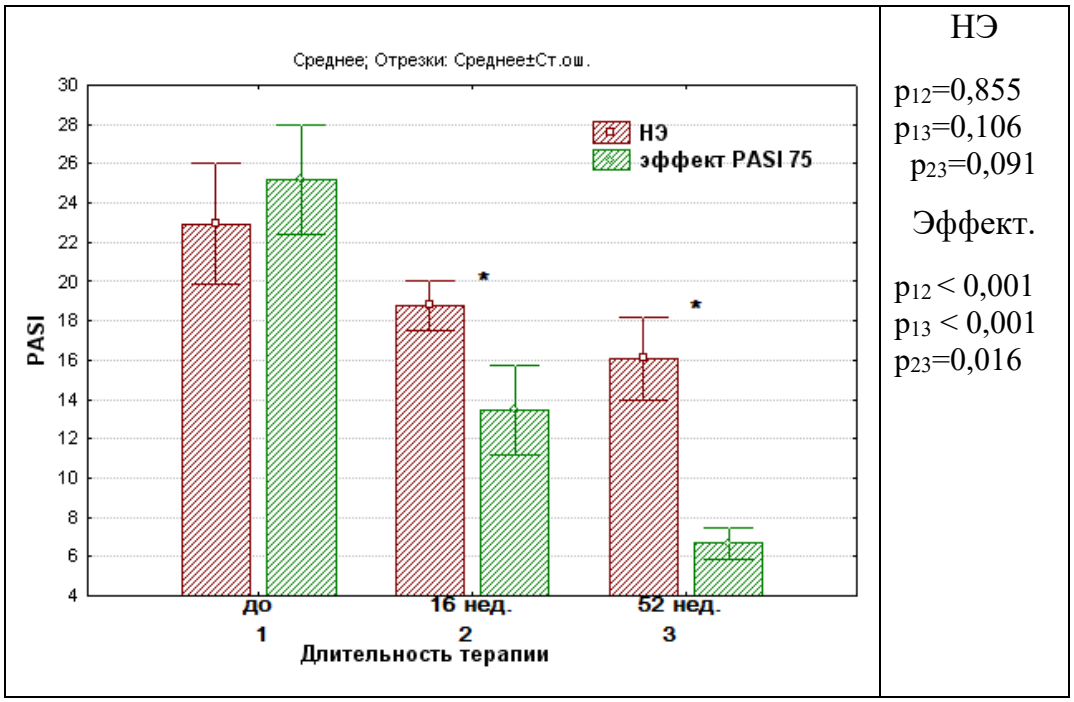
Проведена оценка индекса PASI у пациентов с ПС в группах с разной эффективностью ADA в процессе лечения (Таблица 3.15).

Таблица 3.15 – Динамика индекса PASI у пациентов с ПС при терапии ADA

Период	Группа 1	Группа 2
До	18,0 (10,5 - 20,1)	20,0 (14,1 - 31,0)
16 нед	16,1 (15,1-21,0)	11,2 (7,1 - 15,0)*
52 нед	10,8 (4,8-22,1)	6,0 (1,4 - 9,8)*
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,001		

У пациентов с ПС в группах с разной эффективностью ADA достоверные различия наблюдались, начиная с периода после индукции, и к году терапии ГИБП с более высокими значениями индекса у пациентов с НЭ (Таблица 3.15).

Сравнительный 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 (Рисунок 3.14).



Примечание: * - достоверность отличий между группами НЭ и эффект PASI 75 с p<0,001 между группами с разной эффективностью ADA в разные периоды наблюдения

Рисунок 3.14 - Динамика индекса PASI у детей с ПС на ADA

Анализ содержания основных популяций лимфоцитов у пациентов с ПС в группе с НЭ показал достоверно более низкие значения популяции CD3 лимфоцитов после индукционного курса и значимо более высокие показатели к году терапии ADA по сравнению с группой с эффективностью терапии (Таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Динамика содержания основных популяций лимфоцитов (% отклонений от возрастных референсных показателей) у пациентов с ПС при терапии ADA

Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$) n=52	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$) n=58
CD3	*До*	*96,4 (86,4-129,1)* *69,5 (27,2-160,4)*	*76,7 (47,4-128,3)* *102,1 (-4,2-170,0)*
	16 нед	*56,4 (-40,0-95,0)* *28,3 (6,7-84,0)*	*93,8 (60,1-113,8)** *89,5 (10,3-246,7)**
	52 нед	*120,0 (77,2-140,4)* *48,3 (18,9-58,7)*	*88,8 (22,6-103,2)** *133,2 (49,5-222,4)***

Продолжение Таблицы 3.16

Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$ n=52	Группа 2 $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$ n=58
CD4	*До*	*66,6 (28,3-188,1)* *78,0 (23,5-150,9)*	*116,1 (55,6-165,7)* *91,2 (34,7 -180,9)*
	16 нед	*71,3 (-11,4-143,8)* *57,1 (30,8-100,3)*	*111,0 (89,0-155,0)* *87,5 (32,5-162,0)*
	52 нед	*112,4 (46,6-192,2)* *34,1 (18,9-53,3)*	*144,1 (68,9-175,1)* *145,8 (97,8-216,7)***
CD8	*До*	*33,1 (-34,1-98,9)* *23,7 (-19,9-101,6)*	*35,1 (-41,1-77,1)* *65,4 (-19,8-126,8)*
	16 нед	*5,6 (-31,4-42,6)* *15,7 (-30,0-41,1)*	*26,1 (-46,4-54,9)* *52,8 (-13,8-136,0)*
	52 нед	*15,5 (10,2-106,9)* *26,3 (-23,1-55,8)*	*-7,3 (-83,1-25,2)** *86,9 (-26,4-120,2)**
CD19	*До*	*29,0 (9,6-47,8)* *19,9 (-15,8-91,5)*	*39,1 (12,2-66,5)* *71,6 (-10,8-121,1)*
	16 нед	*31,0 (-44,0-71,0)* *40,4 (-21,7-49,5)*	*31,1 (-4,6-57,2)* *44,9 (-35,0-146,3)*
	52 нед	*25,4 (-41,7-39,0)* *-12,7 (-45,5-46,5)*	*38,54 (18,7-95,5)** *101,0 (4,7-186,6)***
NK	*До*	*-25,6 (-45,3- -7,3)* *-6,7 (-15,6-15,9)*	*-18,2 (-30,6- -0,5)* *4,9 (-3,6-23,3)*
	16 нед	*38,5 (-24,2-84,4)* *51,4 (-6,5-64,9)*	*-20,8 (-36,6-23,0)** *10,2 (-6,7-51,6)*
	52 нед	*-5,3 (-35,5-4,5)* *-3,8 (-7,9-20,5)*	*-22,4 (-35,7- -4,4)* *6,8 (-9,9-30,1)*

Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p < 0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p < 0,001$

К году лечения содержание NK-клеток было снижено у пациентов с ПС в обеих группах, независимо от эффективности терапии. В группе PASI 75 наблюдалось увеличение содержания CD4 Т-клеток до начала терапии и в течении года терапии. Содержание В-лимфоцитов между группами пациентов 1 и 2 до начала терапии и к 16 неделе терапии достоверно не отличалось, а к году терапии абсолютное и относительное содержание В-клеток было достоверно выше в группе с достижением PASI 75.

Сравнительный анализ относительного содержания малых популяций Т-хелперов у пациентов с ПС показал достоверные отличия между группами НЭ и эффективностью терапии ADA в разные периоды лечения (Таблица 3.17)

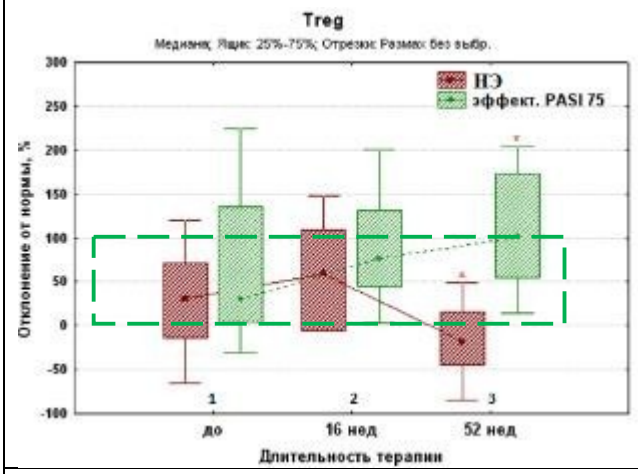
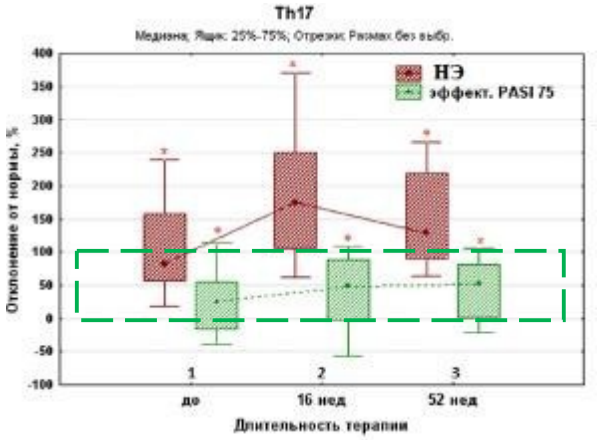
Таблица 3.17 – Динамика содержание малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов (% отклонения от возрастного референсного интервала) у пациентов с ПС при терапии ADA

Популяция клеток % от CD4 абс от CD4, кл/*мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Treg	*До*	*31,7 (-12,1-82,1)* *50,4 (4,3-173,6)*	*70,7 (4,6-136,1)* *154,2 (33,4-267,9)**
	16 нед	*72,7 (-4,5-109,1)* *65,5 (3,4-150,7)*	*60,0 (41,7-122,7)* *134,5 (66,7-201,1)**
	52 нед	*-27,3 (-79,5-16,0)* *-16,9 (-33,1-22,9)*	*90,3 (-24,3-158,0)*** *214,1 (136,1-350,0)***
Thact	*До*	*225,1 (183,2-264,2)* *290,0 (212,9-381,5)*	*164,2 (114,2-235,8)*** *186,5 (117,7-344,1)**
	16 нед	*170,3 (145,3-196,9)* *140,4 (118,0-264,9)*	*190,5 (101,4-254,8)* *268,1 (179,1-359,8)**
	52 нед	*128,9 (124,9-224,6)* *149,0 (67,9-238,6)*	*156,0 (79,6-169,1)* *325,5 (125,5-430,4)**
Th17	*До*	*73,4 (51,4-135,8)* *145,2 (39,7-294,0)*	*25,1 (-5,8-54,3)*** *51,9 (-17,5-104,0)**
	16 нед	*158,8 (109,1-180,9)* *146,8 (51,2-370,2)*	*33,8 (-5,7-83,9)*** *77,8 (8,5-241,4)*
	52 нед	*106,1 (70,6-180,9)* *73,7 (9,4-327,8)*	*45,5 (-1,4-88,0)*** *200,8 (57,6-304,1)*
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,05; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,001			

У пациентов с ПС в обеих группах относительное и абсолютное содержание Thact лимфоцитов было выше референсного диапазона (отклонение более 100%) (Таблица 3.17). При этом, в группах пациентов в течении лечения наблюдались фазные изменения содержания Thact. В группе с НЭ наблюдались достоверно более высокие значения абсолютного и относительного содержания Thact в сравнении с группой с эффективностью терапии до начала терапии, значимо более низкие значения абсолютного содержания Thact после окончания индукционного курса и к году терапии (Таблица 3.17).

Анализ динамики относительного содержания Treg лимфоцитов у пациентов с ПС относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ показатели находились в пределах диапазона, кроме 52 недель (ниже

диапазона) (Рисунок 3.15А); в группе с эффективностью терапии – в пределах диапазона (Рисунок 3.15А).

А	Б
	
Недостаточная эффективность: p_{12}=0,001, p_{13} = 0,002 p_{14}=0,053, p_{23}=0,874, Эффективность (PASI 75): p_{12}=0,761, p_{13}=0,277, p_{14}=0,071, p_{23}=0,519	Недостаточная эффективность: p_{12}=0,001, p_{13} = 0,002 p_{14}=0,053, p_{23}=0,874, Эффективность (PASI 75): p_{12}=0,761, p_{13}=0,277, p_{14}=0,071, p_{23}=0,519

Примечание: p – достоверность отличий между разными периодами наблюдений; *– достоверность различий между группами

Рисунок 3.15 – Динамика относительного содержания Treg (А), Th17-лимфоцитов (Б) у пациентов с псориазом при терапии ADA для групп с разной эффективностью лечения

В группе пациентов с ПС с НЭ терапии ADA показано достоверное увеличение относительного содержания Treg к концу индукционного курса и значимое снижение к году терапии относительно периода до начала лечения (Рисунок 3.15А). В группе пациентов с ПС с эффективностью ADA достоверных изменений содержания Treg клеток в процессе лечения не выявлено (Рисунок 3.15А). При этом, в группе пациентов с НЭ терапии относительно группы пациентов с эффективностью лечения наблюдались значимо более низкие показатели Treg к году лечения (Таблица 3.17, Рисунок 3.15А).

Анализ динамики относительного содержания Th17-лимфоцитов у пациентов с ПС относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ показатели были выше диапазона, кроме периода до начала терапии (в пределах диапазона) (Рисунок 3.15Б); в группе с эффективностью терапии – в пределах диапазона (Рисунок 3.15Б).

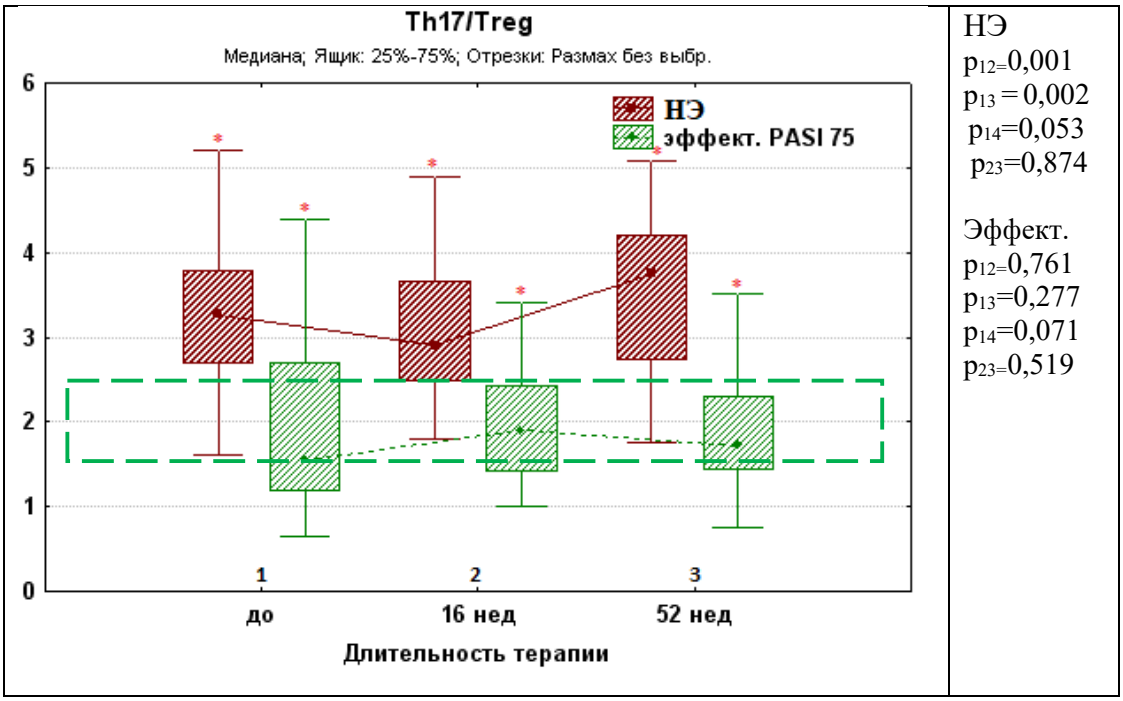
В группе пациентов с ПС с НЭ терапии ADA показано достоверное увеличение относительного содержания Th17-лимфоцитов к концу индукционного курса и к году терапии относительно периода до начала лечения (Рисунок 3.15А). В группе пациентов с ПС с эффективностью ADA достоверных изменений содержания Th17 лимфоцитов в процессе лечения не выявлено (Рисунок 3.15Б). При этом, в группе пациентов с НЭ терапии ADA относительно группы пациентов с эффективностью лечения наблюдались значимо более высокие показатели Th17-лимфоцитов во все периоды наблюдения (Таблица 3.17, Рисунок 3.15Б).

Анализ соотношения Th17/Treg лимфоцитов у пациентов с ПС выявил достоверные отличия между группами с разной эффективностью лечения ADA. Группа пациентов с эффективностью терапии по соотношению Th17/Treg не отличалась от группы сравнения и имела более низкие показатели относительно группы с НЭ терапии ADA (Таблица 3.18).

Таблица 3.18 – Индекс Th17/Treg у детей с псориазом при разной длительности терапии ADA

Период ADA	Группа 1	Группа 2	p	Группа сравнения
До	2,9 (2,5-3,5)*	1,7 (1,1-2,4)	***	2,0 (1,7-2,5)
16 нед	2,8 (2,5-3,5)*	1,6 (1,3-2,6)	****	
52 нед	3,8 (2,5-4,4)**	1,6 (1,3-2,4)	****	
Примечание*:* * – достоверность отличий между группами и группой сравнения с p<0,05; ** – достоверность отличий между группами и группой сравнения с p<0,001; *** – достоверность отличий между группами пациентов с p<0,05; **** – достоверность отличий между группами пациентов с p<0,001				

Значения индекса Th17/Treg в группе с НЭ лечения ADA были выше диапазона референсных значений во все периоды наблюдения (Таблица 3.18, Рисунок 3.16).



Примечание: p – достоверность отличий между разными периодами наблюдений; * – достоверность различий между группами; зеленой штрих-линией показан диапазон референсных значений – 1,7-2,5

Рисунок 3.16 – Динамика Th17/Treg у пациентов с ПС на ADA

С помощью ROC- анализа получено очень хорошее и отличное качество для разделительной модели «эффективность – неэффективность» терапии ADA у пациентов с ПС в период поддерживающего курса в возрастной группе 6-12 лет и в группе старше 12 лет соответственно. Определены пороговые значения (cut-off) для соотношения Th17/Treg, выше которых у пациентов с ПС можно прогнозировать потерю эффекта от терапии ADA (Таблица 3.19, Рисунок 3.17).

Таблица 3.19 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по соотношению Th17/Treg у пациентов с ПС, получавших терапию адалимумабом

Возрастная группа	AUC (95% доверит. инт)	Cut-off	Se, %	Sp, %
6-12 лет	0,836 (0,764 - 0,908)	2,42	77,6	73,3
>12 лет	0,929 (0,885 - 0,973)	2,48	85,7	85,0
Примечание: AUC – площадь под кривой, Se- чувствительность, Sp – специфичность				

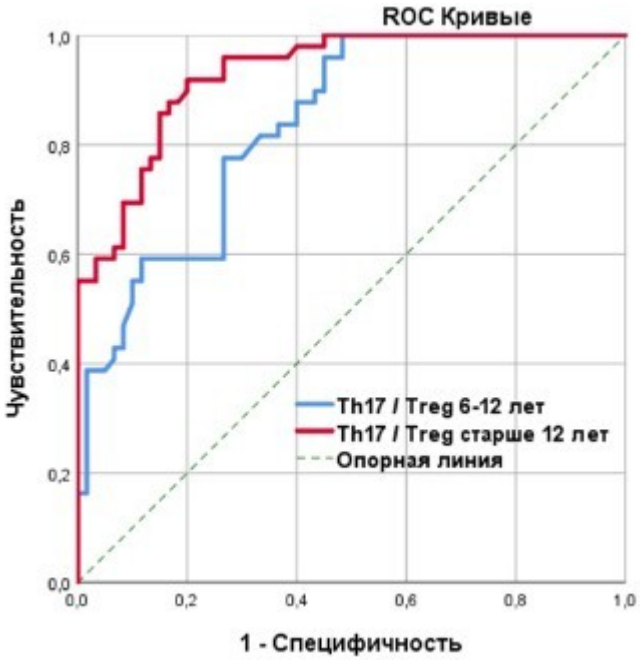


Рисунок 3.17 – ROC-кривые для разделительной модели «эффективность – неэффективность» у пациентов с ПС в разных возрастных группах

Анализ гистограмм распределения соотношения Th17/Treg у пациентов с ПС между группами с эффективностью и неэффективностью терапии ADA в разных возрастных группах показал, что соотношение Th17/Treg ниже порогового значения в большем проценте случаев наблюдалось также, как и при ВЗК, в обеих возрастных группах (от 6-12 лет, старше 12 лет) в группах с эффективностью терапии ADA: в группе 6-12 лет – в 74% случаев, в группе старше 12 лет – в 83% случаев (Рисунок 3.18).

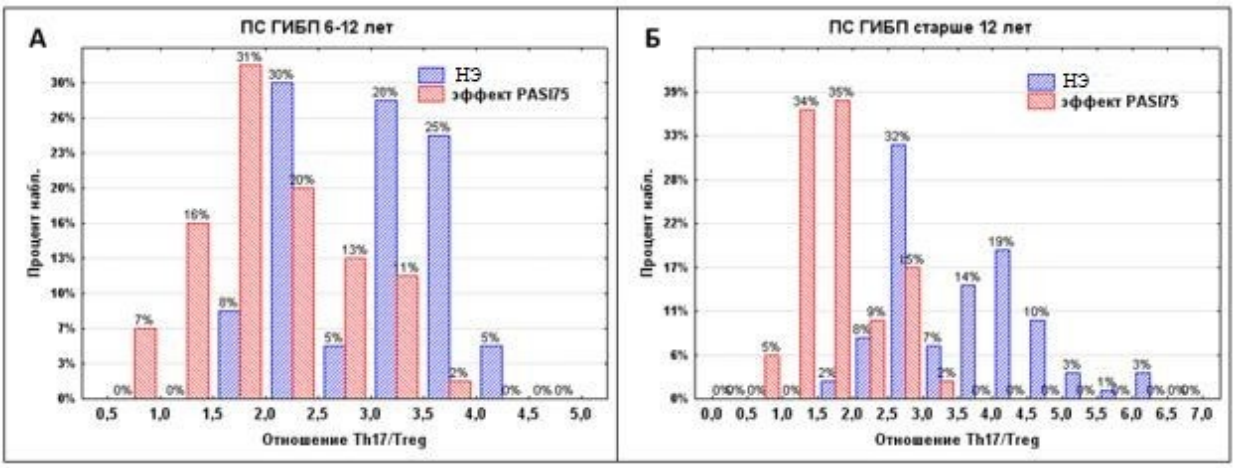


Рисунок 3.18 – Гистограммы распределения соотношения Th17/Treg у пациентов с ПС при лечении блокатором TNF-α в группе пациентов от 6 до 12 лет (А) и в группе пациентов старше 12 лет (Б)

Таким образом:

1) у детей с псориазом также, как и у детей с ВЗК, в группе пациентов с эффективностью терапии наблюдалось существенное повышение содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов и снижение NK-клеток на протяжении года лечения ГИБП;

2) содержание Treg в группе с неэффективностью терапии снижалось к году терапии ГИБП, а содержание Th17-лимфоцитов оставалось достоверно высоким и приводило к существенному повышению отношения Th17/Treg;

3) получены пороговые значения соотношения Th17/Treg для возрастных групп: 6-12 лет - 2,42; старше 12 лет - 2,48.

3.1.3. Показатели основных и малых популяций Т-хелперных лимфоцитов в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с рассеянным склерозом

У пациентов с РС нарушения в функционировании Treg приводит к неконтролируемой активации эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, миграции их в ЦНС, разрушению олигодендроцитов и повреждению аксонов. Среди активированных $CD4^+$ Т-клеток, участвующих в повреждении ЦНС, немаловажную роль играют Th17-клетки, которые помимо продукции провоспалительных цитокинов стимулируют выработку активных форм кислорода в эндотелиальных клетках, приводя к разрушению гематоэнцефалического барьера. $CD8^+$ Т-клетки оказывают своё повреждающее действие на аксоны нейронов за счёт прямых контактов с участием гранзимов А и В.

Пациентов с РС, получавших терапию INFβ-1a, обследовали в периоды до введения препарата, через 6 месяцев терапии, через 1 год и далее согласно плану лечения (1-3 года). В зависимости от наличия или отсутствия активных очагов демиелинизации на МРТ к году терапии дети были поделены на 2 группы: группа 1 – с наличием активных очагов, n=54 (недостаточная эффективность терапии - НЭ), группа 2 – без активных очагов, n=40 (эффективность терапии). Группу

сравнения составили 46 условно – здоровых детей. Группы пациентов не отличались между собой по возрасту и не отличались от группы сравнения (15,9 [12,9-17,1] лет): группа 1 – 16,0 [14,3-16,7] лет против группы 2 – 16,0 [14,6-17,1] лет, p=0,210; различия группы 1 и группы 2 с группой сравнения – p_1=0,801 и p_2=0,087 соответственно.

Распределение пациентов в зависимости от индекса инвалидизации EDSS в группах с эффективностью и неэффективностью INFβ-1a представлено на диаграммах (Рисунок 3.19).

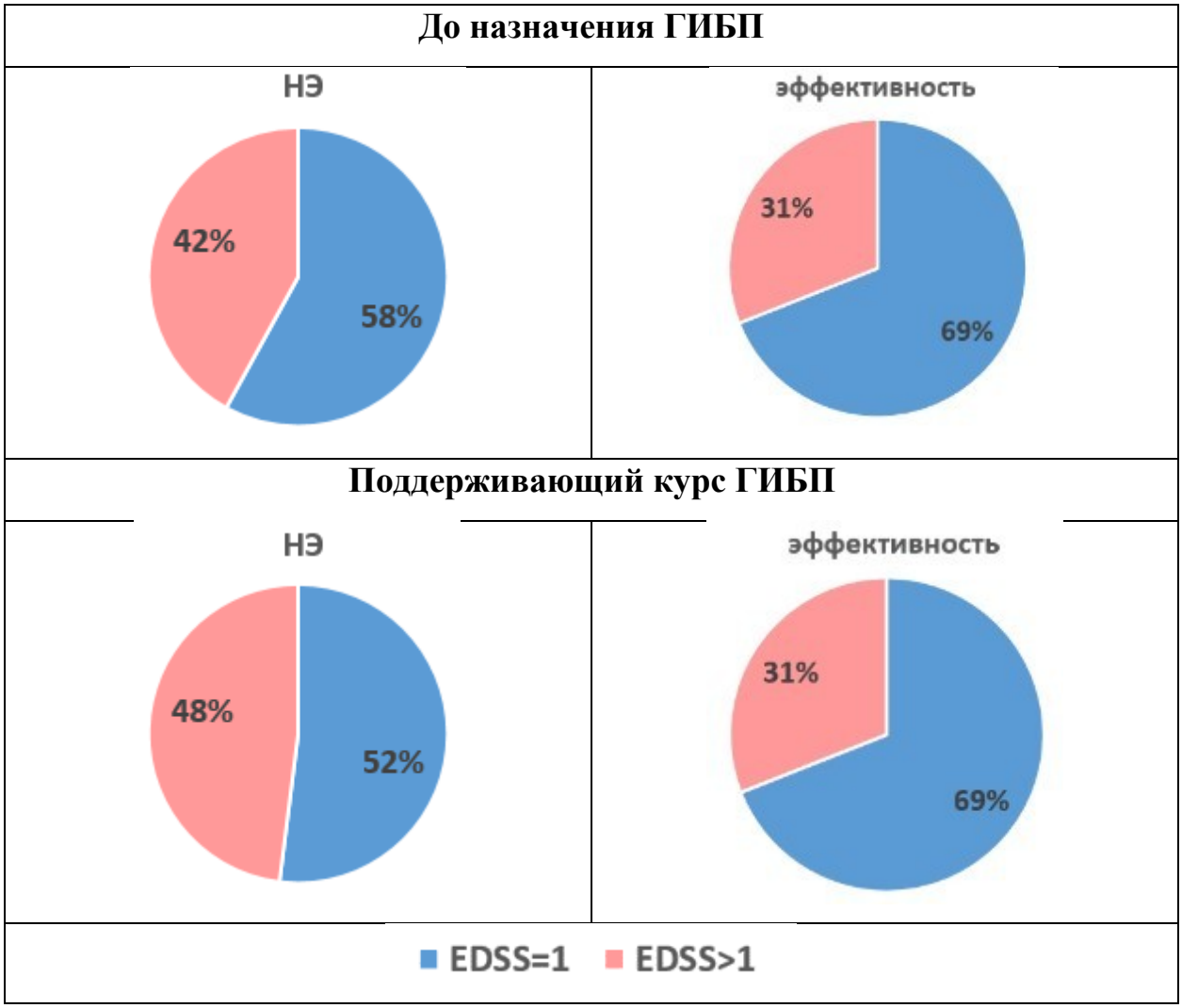


Рисунок 3.19 – Диаграмма распределения пациентов с РС по EDSS до назначения INFβ-1a и в период поддерживающего курса

Выявлено, что до назначения терапии и в период поддерживающего курса INFβ-1a EDSS>1 в меньшем проценте случаев наблюдался в группе с эффективностью терапии (Рисунок 3.19). Распределение пациентов по наличию

активных очагов демиелинизации на МРТ в период поддерживающего курса представлено на диаграммах (Рисунок 3.20).

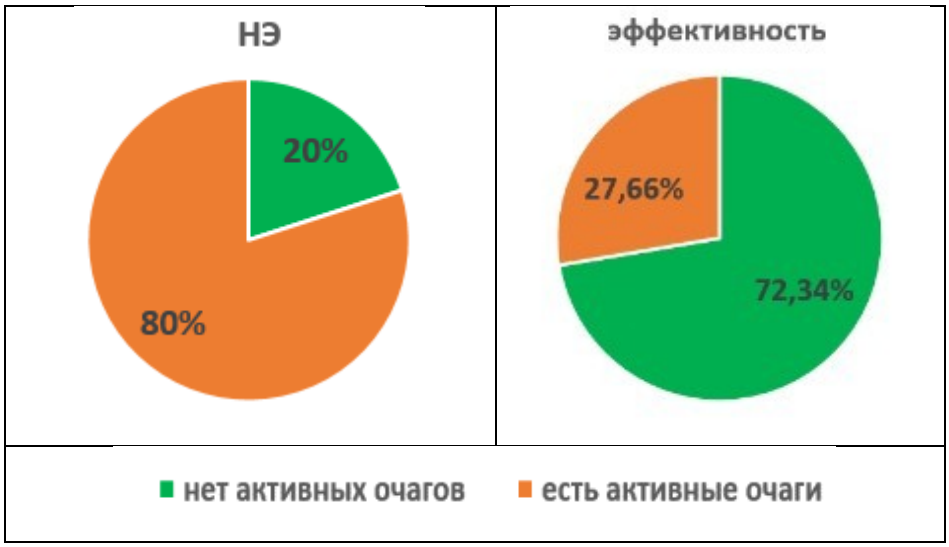


Рисунок 3.20 – Диаграмма распределения пациентов с РС по наличию активных очагов демиелинизации по МРТ в группах с разной эффективностью INFβ-1a в период поддерживающего курса

Из представленных диаграмм видно, что в группе с эффективностью INFβ-1a процент пациентов с активными очагами был значительно ниже (27,66 %), чем в группе с неэффективностью терапии (80%).

Анализ популяций лимфоцитов у пациентов с РС до назначения INFβ-1a выявил значимо более высокие значения содержания CD3 и CD4 Т-лимфоцитов в обеих группах пациентов относительно группы сравнения (Таблица 3.18).

Таблица 3.20 – Содержание основных популяций лимфоцитов у пациентов с РС до назначения INFβ-1a и в группе сравнения

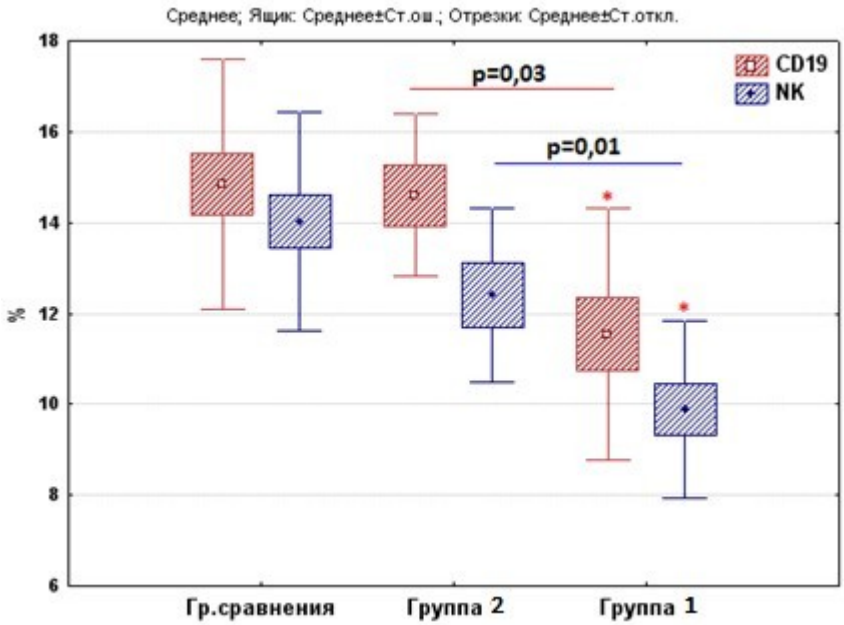
Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	p $_{1_2}$	Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	78,5 (74,8 - 81,6)** 1413 (1087 – 1603)	75,1 (72,3 - 77,1)* 1398 (1083 – 1595)*	***	72,1 (67,9-75,2) 1595 (1278-1829)
CD4	41,7 (37,3 - 48,9)* 762 (579 – 1064)	45,4 (43,5 - 50,8)** 796 (654 – 945)		38,4 (35,2-44,6) 857 (717-960)
CD8	27,9 (25,6 - 32,4) 489 (399 – 575)*	24 (23,2 - 25,4)* 477 (357 – 515)*	****	26,3 (24,1-31,9) 618 (415-778)
CD19	11,2 (8,6 - 16,2)** 197 (137 – 294)	14,3 (12,8 – 15) 264 (210 – 292)	***	13,5 (12,1-17,5) 304 (252-370)

Продолжение Таблицы 3.20

Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	p $_{1_2}$	Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
NK 	9,5 (8,9 - 11,2)** 180 (136 – 216)**	11,6 (10 - 13,7) 217 (157 – 285)*	***	14,9 (10,9 -17,2) 264 (177-393)
CD4/CD8	1,4 (1,1 - 2,2)	1,9 (1,8 - 2,2)**		1,5 (1,2 – 1,8)
TNK 	3,7 (2,1 - 7,1)* 78,8 (32,9 - 195,5)	2,9 (1,3 - 4,9) 39,6 (19,3 - 91,7)		2,2 (1,3 – 3,6) 48,6 (26,9 – 79,2)
Treg от CD4 	7,5 (6,2 - 8,5) 66,6 (40,2 - 83,2)	8,5 (6,8 - 12,1)* 70,6 (59,5 - 79,2)		7,9 (7,3-9,4) 67,3 (54-89)
Thact от CD4 	18,1 (13,1 - 22,3)** 152 (99,5 - 184,1)**	20,6 (12,5 - 27,5) 151,5 (92,4 – 207)		14,1 (9,9-16,5) 117,1 (83-139)
Th17от CD4 	21,3 (17,5 - 28,5)** 178 (141 - 212,5)*	20,9 (16,9 - 21,6)* 158 (130 - 203)		17,1 (14-19,4) 150,2 (118-172)

Примечание: % от ЛФ – процент от лимфоцитов; * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения p <0,05; ** - достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения p <0,001; ***– достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с p<0,05; **** достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с p <0,001

У пациентов с активными очагами на МРТ (группа 1) содержание CD19-лимфоцитов и NK-клеток было значимо ниже относительно группы сравнения (Таблица 3.20, Рисунок 3.21).



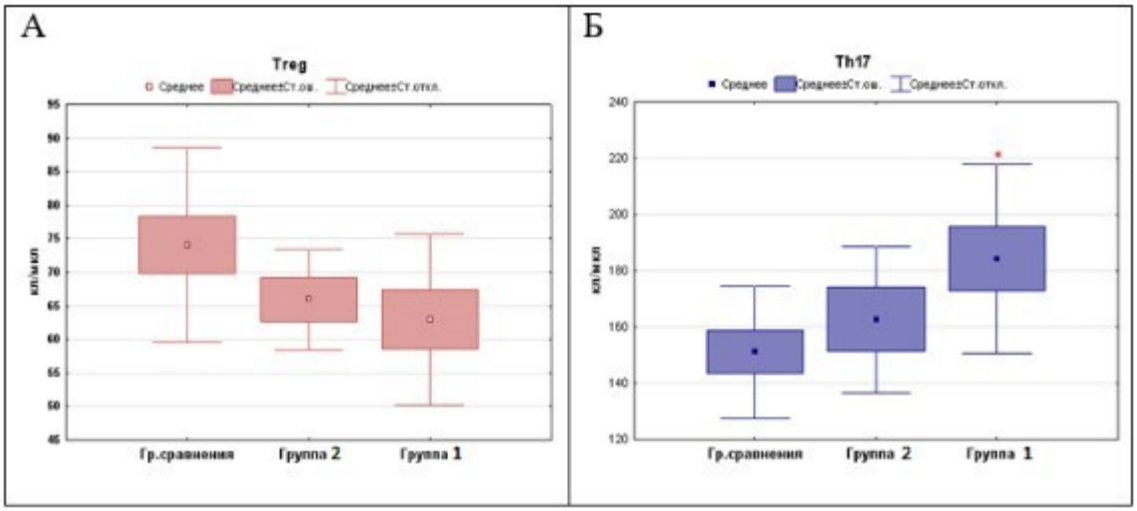
Примечание: * – достоверные отличия между группой пациентов и группой сравнения с p<0,05; красная линия – между группами пациентов по содержанию CD19, p <0,05, синяя линия – между группами пациентов по содержанию NK-клеток, p <0,05

Рисунок 3.21 – Содержание относительного содержания CD19 и NK-клеток в группах пациентов с РС до начала лечения INFβ-1a и в группе сравнения

У пациентов без активных очагов достоверных отличий с группой сравнения по относительному содержанию CD19 и NK-клеток выявлено не было. При этом, наблюдались достоверные различия между группами пациентов с более высокими значениями в группе 2 (Рисунок 3.21).

У детей с РС с активными очагами (группа 1) выявлены более высокие значения относительного содержания популяции TNK клеток относительно группы сравнения (Таблица 3.20).

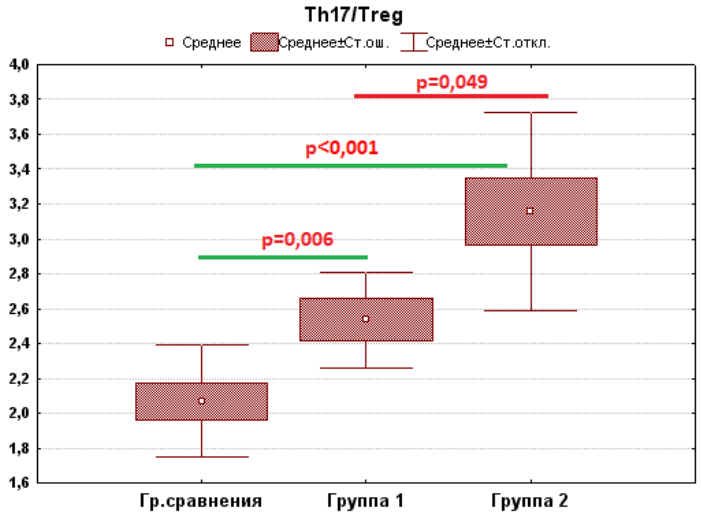
Достоверных отличий по относительному и абсолютному количеству Treg между группами пациентов и группой сравнения выявлено не было (Таблица 3.18, Рисунок 3.22А). В тоже время, в группе с активными очагами наблюдалось значимо более высокое содержание абсолютного количества Th17-лимфоцитов относительно группы сравнения (Рисунок 3.22Б).



Примечание: Гр. сравнения – группа сравнения; * – достоверные отличия между группой пациентов и группой сравнения с p <0,05

Рисунок 3.22 – Содержание абсолютного содержания Treg (А) и Th17-лимфоцитов (Б) в группах пациентов с РС до начала лечения INFβ-1a и в группе сравнения

Интересно также отметить, что соотношение Th17/Treg до введения препарата у всех пациентов с РС был достоверно выше, чем в группе сравнения. При этом, в группе с активными очагами значимо выше, чем в группе без активных очагов (Рисунок 3.23).



Примечание: зеленой линией показаны отличия между группами пациентов и группой сравнения, красной линией показаны отличия между группами пациентов

Рисунок 3.23 – Соотношение Th17/Treg в группах пациентов с РС и в группе сравнения

Проведен анализ содержания основных популяций лимфоцитов у детей с РС в группах с НЭ и эффективностью INFβ-1a в разные периоды лечения (Таблице 3.21).

Таблица 3.21 – Динамика содержания основных популяций лимфоцитов у пациентов с РС при терапии INFβ-1a

Популяция клеток, % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	p $_{1_2}$	Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*До*	*78,5 (74,8 - 81,6)*** *1413 (1087 – 1603)*	*75,1 (72,3 - 77,1)** *1398 (1083 – 1595)**	***	72,1 (67,9-75,2) 1595 (1278-1829)
	0,5года	*73,7 (71,2 - 74,8)* *1188 (926 - 1497,9)***	*73 (69 – 76)* *1276 (855 – 1607)**		
	1 год	*74,7 (67,4 - 78,7)* *1143 (783 – 1309)**	*74,2 (69,4 - 79,4)** *1433 (985 – 1628)*	***	
	1-3 года	*75,2 (69,9 - 77,7* *1215 (1145 – 1468**	*69,4 (63,6 - 79,9)* *1499 (1018 – 1749)*		
CD4	*До*	*41,7 (37,3 - 48,9)** *762 (579 – 1064) **	*45,4 (43,5 - 50,8)*** *796 (654 – 945)*		38,4 (35,2-44,6) 857 (717-960)
	0,5года	*41,5 (39,9 - 46,5)** *666 (464 – 813)**	*41,5 (38,5 – 44)* *710 (594 – 821)**		
	1 год	*41,5(39,0 - 45,1)** *720,3 (559,4 – 812)**	*42,2 (37,9 - 50,5)** *844 (611 – 971)*	***	
	1-3 года	*40 (37 - 43,7)* *727 (677 – 781)**	*46,4 (40,2 - 49,4)*** *915 (645 – 1128)*	**** ***	
CD8	*До*	*27,9 (25,6 - 32,4)* *489 (399 – 575)**	*24 (23,2 - 25,4)** *477 (357 – 515)**	****	26,3 (24,1-31,9) 618 (415-778)
	0,5года	*24,9 (22,1 - 26,3)** *384 (222 – 624)**	*29,2 (24 – 31)* *490 (357 – 621)**	***	
	1 год	*26,7 (23,5 - 29,8)* *418,4 (292,7 - 576,3)**	*25,7 (22,2 - 27,4)* *434 (337 – 615)**		
	1-3 года	*29 (23,6 - 32,2* *493 (415 - 621,8*	*22,2 (19,1 - 29,6)** *494 (337 – 700)*	***	
CD4/CD8	*До*	*1,4 (1,1 - 2,2)*	*1,9 (1,8 - 2,2)*		1,5 (1,2 – 1,8)
	0,5года	*1,7 (1,4 - 2,1)**	*1,5 (1,2 - 1,8)*	***	
	1 год	*1,5 (1,2 - 1,7)*	*1,7 (1,5 - 2,1)**	***	
	1-3 года	*1,5 (0,9 - 1,6)*	*1,8 (1,6 - 2,4)***	****	

Продолжение Таблицы 3.21

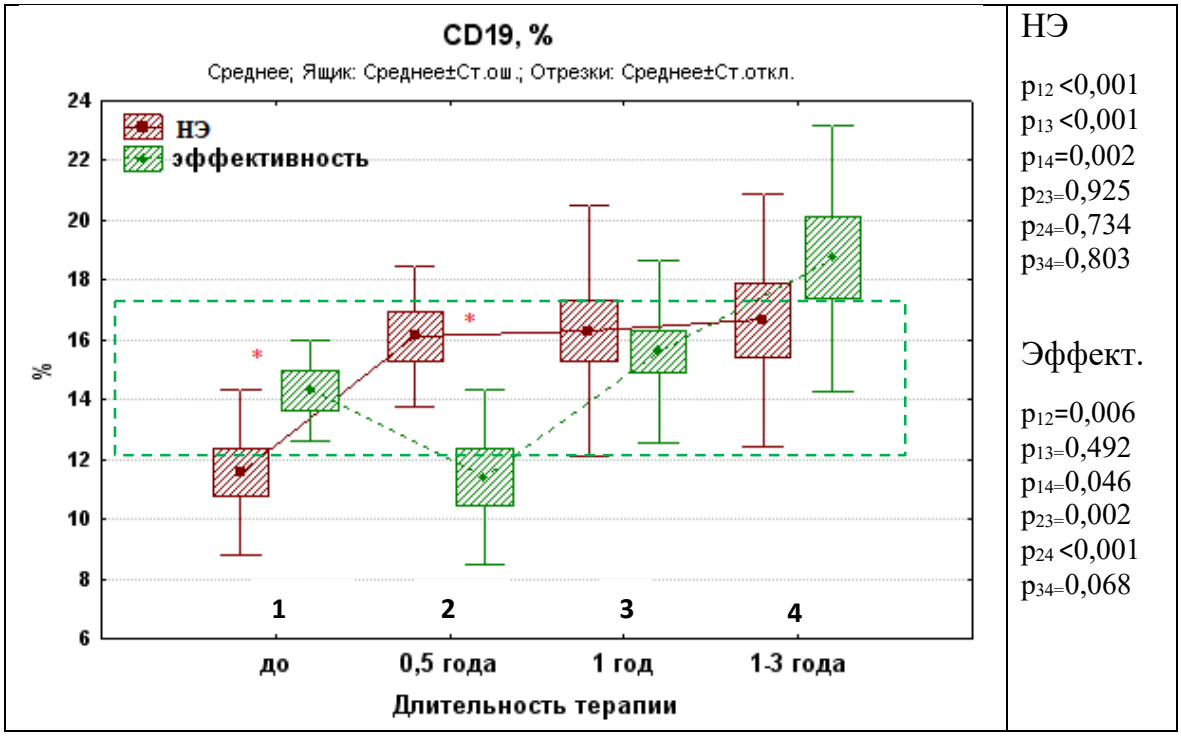
Популяция клеток % от ЛФ абс, *кл/мкл*	Период	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	p $_{1_2}$	Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD19	*До*	*11,2 (8,6 - 16,2)** *197 (137 – 294)***	*14,3 (12,8 – 15)* *264 (210 – 292)*	***	13,5 (12,1-17,5) 304 (252-370)
	0,5года	*16,3 (11,8 - 17,9)* *244 (190 – 384)*	*11,7 (9,8 - 13,1)** *263 (130 – 289)**	****	
	1 год	*15,8 (10 - 20,9)* *268 (141 - 313,7)**	*16 (11 - 18,9)* *270 (197 – 367)**		
	1-3 года	*17,4 (10,7 - 20,2* *279 (169,6 - 316,5*	*18,9 (12,3 - 25,2)** *321 (244 – 476)*		
NK	*До*	*9,5 (8,9 - 11,2)*** *180 (136 – 216)***	*11,6 (10 - 13,7)* *217 (157 – 285)**	***	14,9 (10,9 -17,2) 264 (177-393)
	0,5года	*9,6 (8,6 - 10,8)*** *143,8 (95,2 - 181,4)***	*13,7 (11,9 - 19,6)* *269 (168 – 326)*	**** ****	
	1 год	*10,1 (6,7 - 12,1)*** *131,9 (87 – 209)***	*9,7 (7,1 - 12,8)*** *176 (116 - 276)***	***	
	1-3 года	*11,4 (7,6 - 13,9)** *183,9 (99,2 - 293,1)***	*9,3 (5,9 - 12,1)*** *184 (124 – 258)***		
TNK	*До*	*3,7 (2,1 - 7,1)** *78,8 (32,9 - 195,5)*	*2,9 (1,3 - 4,9)* *39,6 (19,3 - 91,7)*		2,2 (1,3 – 3,6) 48,6 (26,9 – 79,2)
	0,5года	*3,4 (2,2 - 4,7)** *35,4 (28,9 – 136)*	*4,1 (3,4 - 8,4)*** *75,5 (40,1 - 119,2)**		
	1 год	*4,2 (2,6 - 5,9)** *51,7 (29,2 - 87,7)*	*2,4 (1,4 - 4,3)* *44 (30,9 - 85,1)*	***	
	1-3 года	*5 (2,9 - 6,3)*** *80,1 (36,7 – 111)*	*1,9 (1,4 - 3,1)* *39,9 (31,9 - 55,8)*	**** ***	

Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения с p <0,05; **– достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения с p <0,001; *** – достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с p <0,05; **** –достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с p <0,001

Анализ динамики содержания CD3 лимфоцитов у пациентов с РС с НЭ терапии относительно группы с эффективностью INFβ-1a показал фазные изменения: значимо более высокие значения относительного содержания до терапии, достоверно более низкие значения абсолютного содержания к году терапии (Таблица 3.21). Содержание CD4 Т-лимфоцитов достоверно не отличалось между группами пациентов с РС до начала терапии и к концу индукционного курса, а к году терапии и в период 1-3 года терапии наблюдались значимо более высокие показатели в группе с НЭ (Таблица 3.21). Выявлены более высокие показатели относительного содержания CD8 Т-лимфоцитов в группе 1 относительно группы 2

до терапии и в 1-3 года терапии, а через 6 месяцев лечения - более низкие показатели в группе 1 (Таблица 3.21).

Анализ динамики относительного содержания CD19 лимфоцитов у пациентов с РС относительно значений референсного диапазона в период лечения показал, что в группе с НЭ показатели были в пределах референсного диапазона, кроме периода до начала терапии INFβ-1a (ниже диапазона) (Рисунок 3.24). В группе пациентов с РС с эффективностью INFβ-1a относительного содержания CD19 лимфоцитов соответствовало референсному диапазону до и в год терапии.



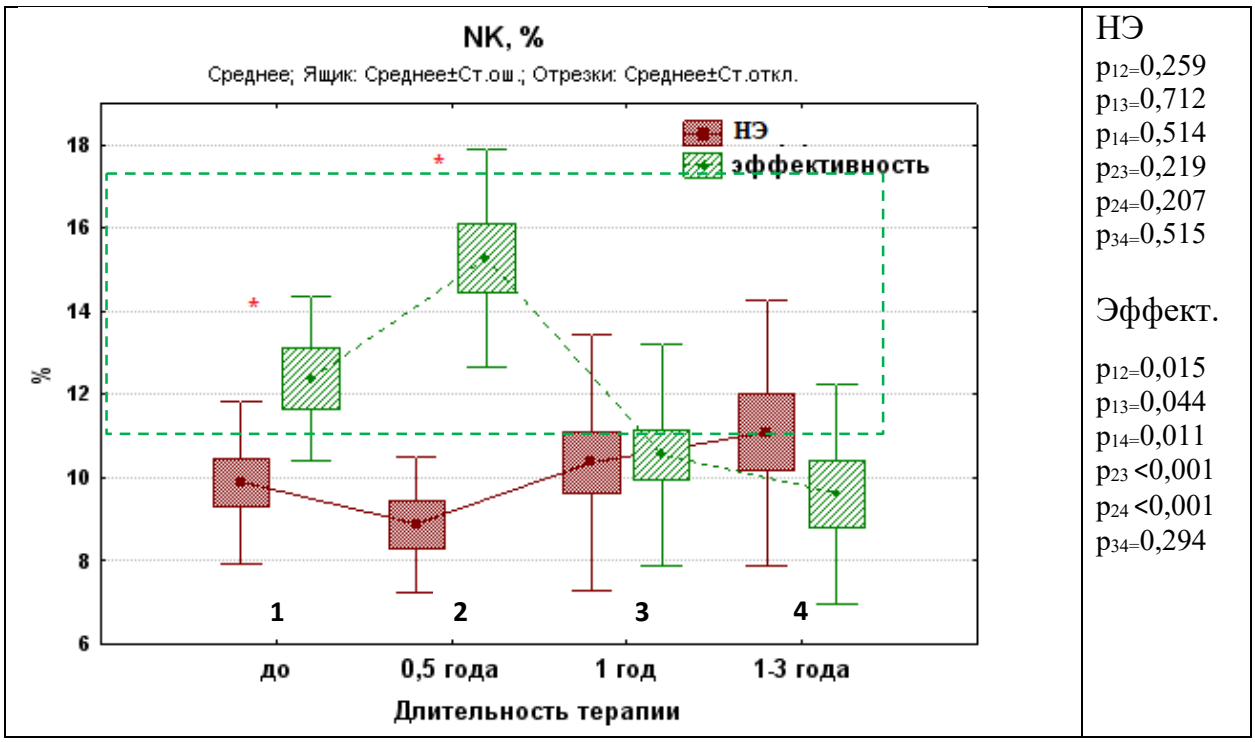
Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов с p <0,05; зеленой штрих-линией показан референсный диапазон (12,1-17,5 %)

Рисунок 3.24 – Динамика относительного содержания CD19 лимфоцитов у пациентов с РС в группах с разной эффективностью терапии INFβ-1a

У пациентов с РС в группе НЭ терапии INFβ-1a показано достоверное увеличение относительного содержания CD19 к концу индукционного курса, к году и 1-3 года терапии (Рисунок 3.24). В группе пациентов с РС с эффективностью INFβ-1a наблюдалось достоверно снижение CD19 к концу индукционного курса, увеличение к году и 1-3 году терапии относительно периода до начала INFβ-1a (Рисунок 3.24). При этом, в группе пациентов с НЭ терапии относительно группы пациентов с эффективностью лечения наблюдались значимо более низкие

показатели CD19 до начала терапии и достоверно более высокие к году лечения (Таблица 3.21, Рисунок 3.24).

Анализ динамики относительного содержания NK-клеток у пациентов с РС относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ – показатели ниже диапазона, кроме периода 1-3 года терапии INFβ-1a (в пределах диапазона) (Рисунок 3.25); в группе с эффективностью терапии – в пределах диапазона, кроме периода в 1 год и 1-3 года терапии INFβ-1a (ниже диапазона) (Рисунок 3.25).



Примечание: p – достоверность различий между разными периодами лечения INFβ-1a; * – достоверность различий между группами пациентов в одном периоде наблюдения с p <0,05; зеленой штрих-линией показан референсный диапазон – (10,9-17,2) %

Рисунок 3.25- Относительное содержание NK-клеток у пациентов с РС в группах с разной эффективностью терапии INFβ-1a

У пациентов с РС при НЭ терапии INFβ-1a относительное содержание NK-клеток значимо не изменялось в течении всего периода наблюдения (Рисунок 3.25). В группе пациентов с РС с эффективностью INFβ-1a наблюдалось достоверно повышение содержания NK-клеток к концу индукционного курса, достоверное снижение к году и 1-3 году терапии относительно периодов до начала INFβ-1a и окончания индукционного курса (Рисунок 3.25). При этом, в группе пациентов с НЭ терапии относительно группы пациентов с эффективностью лечения

наблюдались значимо более низкие показатели NK-клеток до начала терапии и после индукционного курса (Таблица 3.21, Рисунок 3.25).

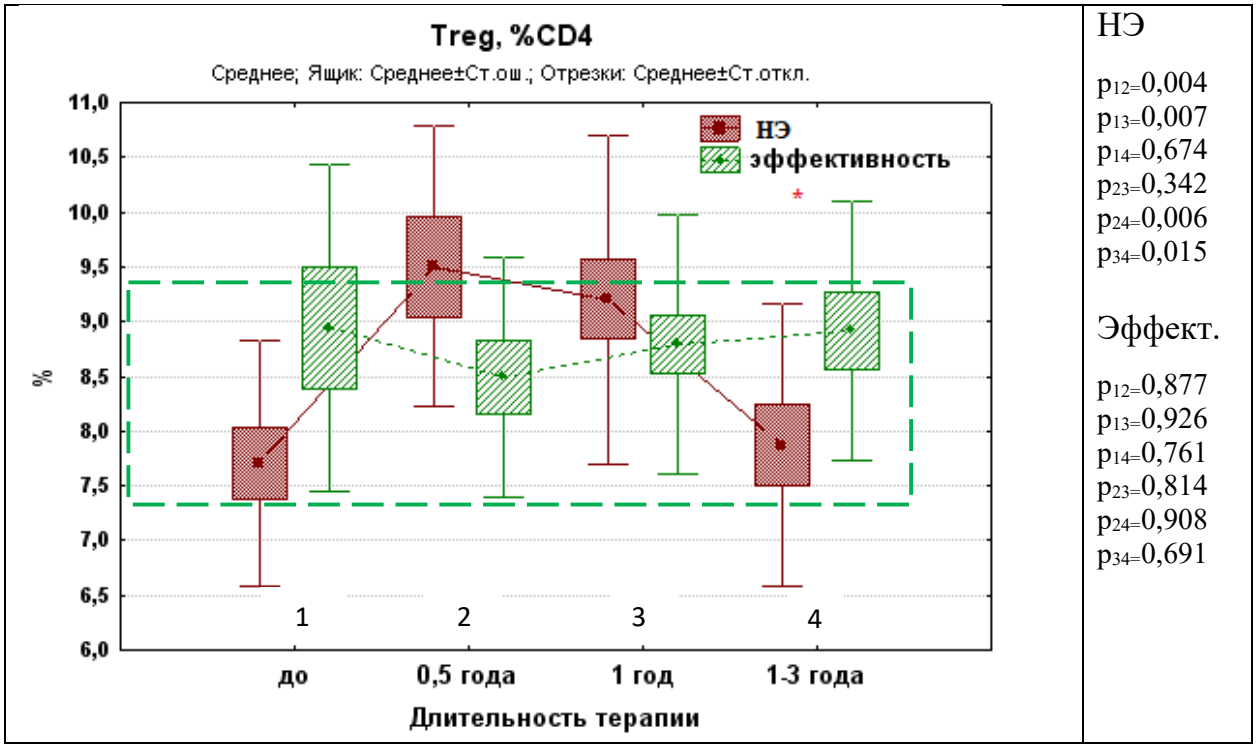
Анализ изменений содержания малых $CD4^+$ Т-лимфоцитов показал, что содержание Thact между группами пациентов с РС достоверно не отличалось, кроме года терапии – значимо более низкие показатели в группе с НЭ (Таблица 3.22).

Таблица 3.22 – Динамика содержания малых популяций лимфоцитов у пациентов с РС на INFβ-1a

Популяция клеток % от CD4 абс от CD4, кл/*мкл*	Периоды	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Treg	*До*	*7,5 (6,2 - 8,5)* *66,6 (40,2 - 83,2)*	*8,5 (6,8 - 12,1)* *70,6 (59,5 - 79,2)*
	0,5года	*9,4 (8,1 - 10,9)* *60 (40,5 - 66,6)*	*8,6 (6,9 - 10,1)* *52,6 (47,8 - 70,0)*
	1 год	*9,1 (7,8 - 10,3)* *62,5 (32,4 - 79,2)*	*8,3 (7,6 - 9,7)* *62,2 (54,6 – 79)*
	1-3 года	*7,9 (6,8 - 9,1)* *55 (44,4 – 64)*	*8,2 (7,9 - 9,8)**** *76,9 (56,2 - 90,9)*****
Thact	*До*	*18,1 (13,1 - 22,3)** *152 (99,5 - 184,1)**	*20,6 (12,5 - 27,5)** *151,5 (92,4 – 207)*
	0,5года	*22,8 (12 - 30,6)* *119,3 (83,4 - 177,9)*	*19,5 (17 - 22,1)* *165 (105 – 201)*
	1 год	*21,6 (15,6 - 26,1)* *142 (81,4 - 173,6)*	*18,5 (15 - 26,9)* *157 (118 – 201)****
	1-3 года	*21,5 (18,9 - 24,9)* *149 (98,1 - 176,9)*	*21,4 (13,7 - 24,1)* *193 (109 – 241)*
Th17	*До*	*21,3 (17,5 - 28,5)*** *178 (141 - 212,5)**	*20,9 (16,9 - 21,6)** *158 (130 - 203)*
	0,5года	*24,6 (20,4 - 33,4)* *155,3 (92,9 – 223)*	*16,5 (14,1 - 20,3)***** *127,9 (89 - 185)*
	1 год	*21,8 (18 - 29,4)* *133 (95 – 158)*	*20,2 (16,8 - 24,5)* *155 (128 - 188)****
	1-3 года	*21,8 (19,1 - 28,6)* *152,5 (109 - 159,4)*	*17,5 (16,2 - 21,8)***** *177 (107 - 193)*
Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения с p <0,05; ** – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения с p <0,001; *** – достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с p <0,05; **** –достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с p <0,001			

Анализ динамики относительного содержания Treg лимфоцитов у пациентов с РС относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в

группе с НЭ – в пределах диапазона, кроме периода после индукции INFβ-1a (выше диапазона) (Рисунок 3.25); в группе с эффективностью терапии – в пределах диапазона (Рисунок 3.25).

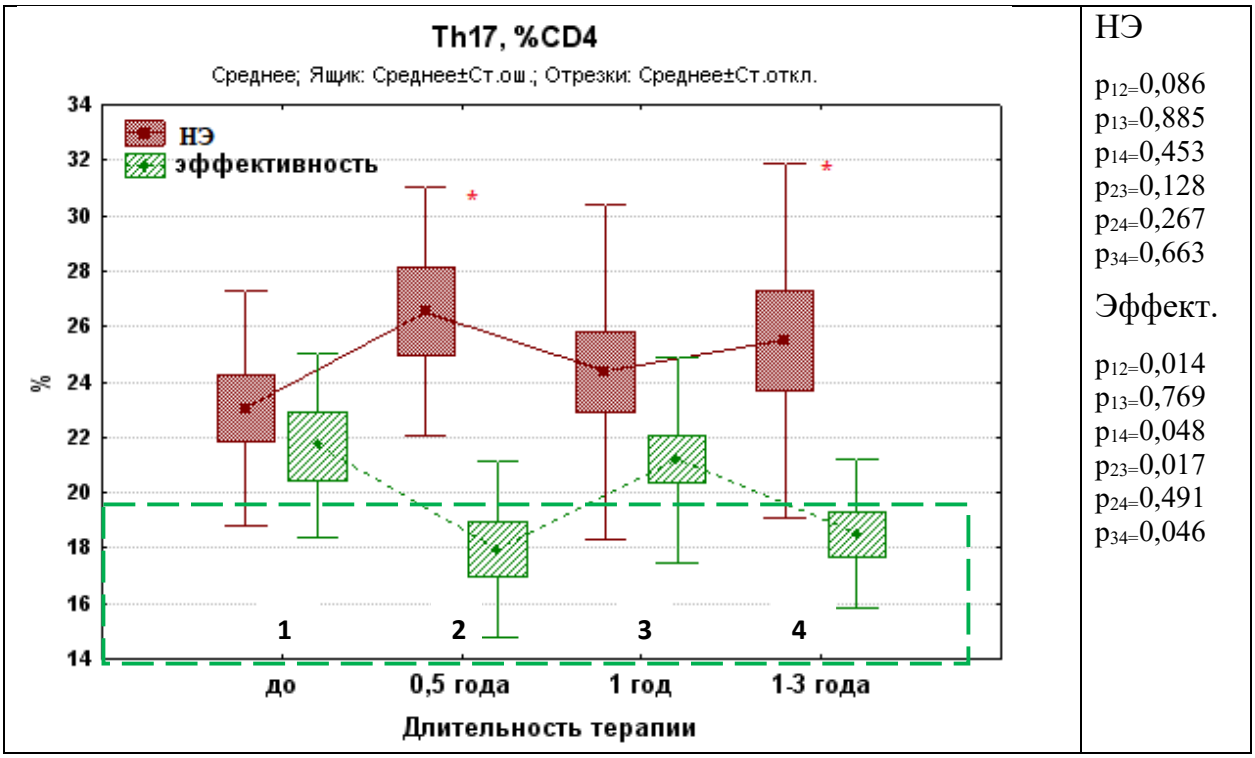


Примечание: * – достоверность отличий между группами с p<0,05; зеленой штрих-линией показан референсный диапазон – (7,3 – 9,4) %

Рисунок 3.26 – Динамика относительного содержания Treg лимфоцитов у пациентов при терапии INFβ-1a

У пациентов с РС при НЭ терапии INFβ-1a показано достоверное увеличение относительного содержания Treg лимфоцитов к концу индукционного курса и к году терапии (Рисунок 3.26). У пациентов с РС при эффективности INFβ-1a значимых изменений содержания Treg лимфоцитов не выявлено (Рисунок 3.26). При этом, в группе пациентов с НЭ терапии относительно группы пациентов с эффективностью лечения наблюдались значимо более низкие показатели Treg лимфоцитов к периоду 1-3 года терапии INFβ-1a (Таблица 3.22, Рисунок 3.26).

Анализ динамики относительного содержания Th17-лимфоцитов у пациентов с РС относительно значений референсного диапазона в период лечения показал: в группе с НЭ – выше диапазона на протяжении периода лечения (Рисунок 3.27); в группе с эффективностью терапии – выше диапазона до начала и к году терапии, в пределах диапазона - к 6 месяцам и 1-3 года лечения (Рисунок 3.27).



Примечание: * – достоверность отличий между группами с $p<0,05$; зеленой штрих-линией показан референсный диапазон – (14 – 19,4) %

Рисунок 3.27 – Динамика относительного содержания Th17-лимфоцитов у пациентов с РС при терапии INFβ-1a

В группе пациентов с РС с НЭ терапии достоверных изменений содержания относительного содержания Th17-лимфоцитов выявлено не было (Рисунок 3.27). В группе пациентов с РС с эффективностью INFβ-1a выявлены фазные изменения относительного содержания Th17-лимфоцитов в процессе лечения: снижение к концу индукционного курса, увеличение к году терапии и снижение к периоду 1-3 года лечения относительно периода до начала терапии INFβ-1a (Рисунок 3.27). При этом, в группе пациентов с НЭ терапии относительно группы пациентов с эффективностью лечения наблюдались значимо более высокие показатели Th17-лимфоцитов к концу индукционного курса и к 1-3 года лечения (Таблица 3.22, Рисунок 3.27).

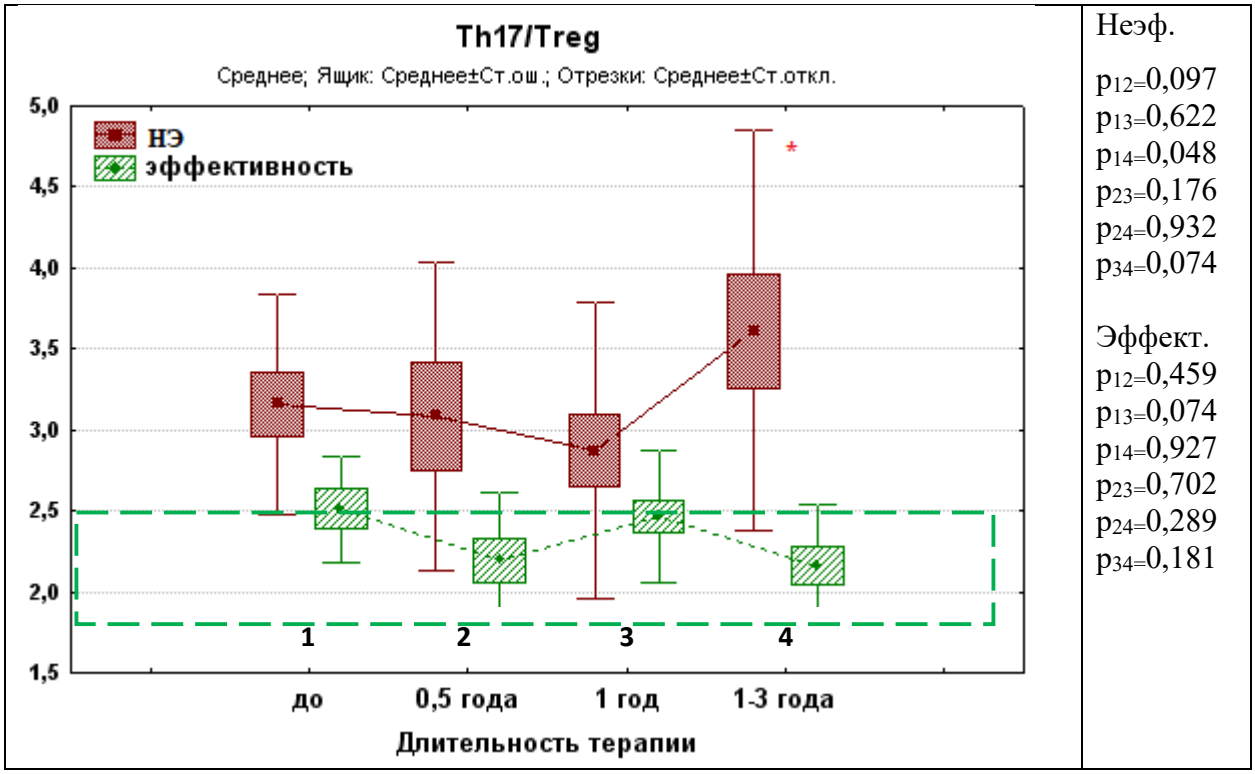
Динамика изменения соотношения Th17/Treg у пациентов с РС показала достоверно более высокие показатели в группе 1 с недостаточной эффективностью лечения относительно группы сравнения во все периоды наблюдения (Таблица 3.23).

Таблица 3.23 – Динамика соотношения Th17/Treg лимфоцитов у детей с РС при терапии INFβ-1a и в группе сравнения

Период ГИБП	Группа 1	Группа 2	Группа сравнения
До	3,33 (2,41-4,11)**	2,56 (2,11-3,06)*	1,97 (1,63-2,51)
30 нед	2,69 (1,82-3,21)*	2,19 (1,72 -2,57)	
52 нед	2,39 (1,95 – 3,69)*	2,28 (1,88 -2,74)*	
1-3 года	2,75 (2,0 – 4,55)**	2,13 (1,69 -2,59)***	
Примечание: * – достоверность отличий между группами и группой сравнения с p<0,05; ** – достоверность отличий между группами и группой сравнения с p<0,001; *** – достоверность отличий между группами пациентов с p<0,05			

У пациентов с РС в группе с эффективностью терапии после индукционного курса и в период 1-3 года терапии достоверных различий с группой сравнения выявлено не было (Таблица 3.23).

Анализ динамики соотношения Th17/Treg в группе пациентов с НЭ показал значимое увеличение индекса к периоду 1-3 года лечения (Рисунок 3.28).



Примечание: * – достоверность отличий между группами с p<0,05; штрих-линией показан диапазон возрастной нормы (1,7-2,5) (старше 12 лет)

Рисунок 3.28 – Динамика соотношения Th17/Treg у пациентов с РС в группах с разной эффективностью терапии INFβ-1a

У пациентов группы с эффективностью терапии достоверных изменений соотношения Th17/Treg в течении всего периода наблюдения не отмечалось. При этом, между группами пациентов наблюдались значимые отличия с более высоким уровнем Th17/Treg у пациентов с НЭ в период 1-3 года терапии (Рисунок 3.28).

С помощью ROC-анализа получено очень хорошее качество для разделительной модели «эффективность – неэффективность» у пациентов с РС старше 12 лет после года терапии INFβ-1a. Определено пороговое значение (cut-off) для соотношения Th17/Treg, выше которого можно прогнозировать неэффективность проводимой терапии (Таблица 3.24, Рисунок 3.29).

Таблица 3.24 – Показатели ROC-анализа для модели «эффективность – неэффективность» по соотношению Th17/Treg у пациентов с РС при терапии INFβ-1a

Возрастная группа	AUC (95% доверит. инт)	Cut-off	Se, %	Sp, %
>12 лет	0,881 (0,843- 0,919)	2,75	66,0	94,1
Примечание: AUC – площадь под кривой, Se- чувствительность, Sp – специфичность				

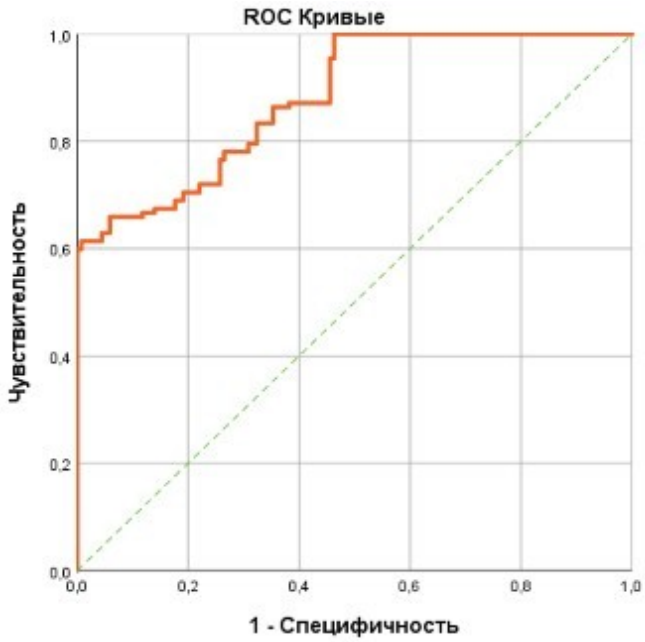


Рисунок 3.29 – ROC-кривая для разделительной модели «эффективность – неэффективность» у пациентов с РС

Анализ гистограмм распределения Th17/Treg у пациентов с РС для групп с эффективностью и НЭ терапии INFβ-1a показал, что соотношение Th17/Treg ниже

порогового значения в большем проценте случаев наблюдалось также, как при ВЗК и ПС, в группе с эффективностью терапии и составляло 94% случаев (Рисунок 3.30).

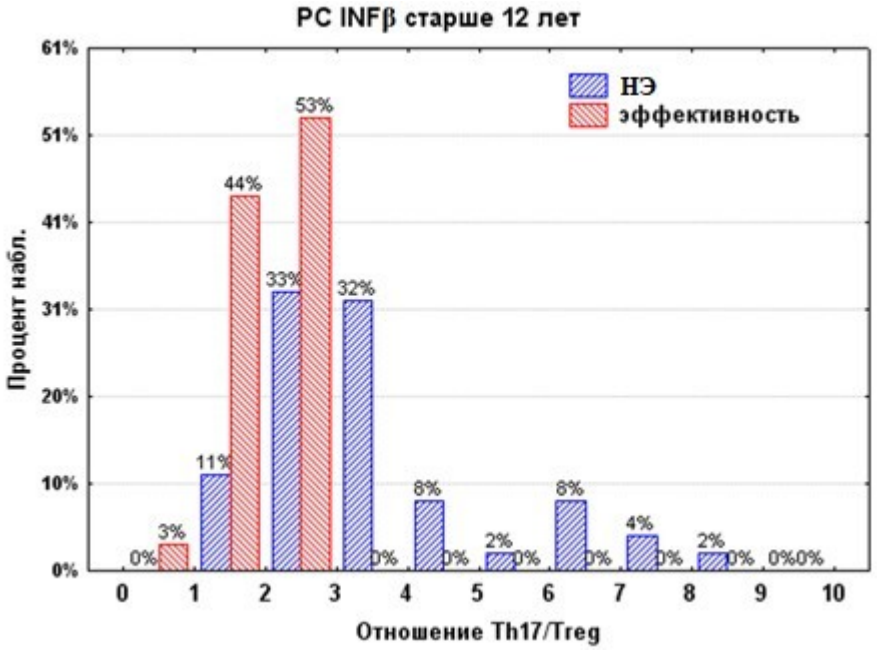


Рисунок 3.30 - Гистограммы распределения соотношения Th17/Treg у пациентов с РС при терапии INFβ-1a к году терапии

Таким образом, у пациентов с РС:

1) у пациентов с РС к году терапии INFβ-1a независимо от эффективности ГИБП выявлено значимое увеличение относительного содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов и снижение относительного содержания NK-клеток относительно группы сравнения;
2) в группе с эффективным лечением к году терапии выявлено повышение абсолютного содержания популяции $CD4^+$ Т-клеток при снижении абсолютного содержания популяции цитотоксических CD8 лимфоцитов;
3) группа с эффективным лечением характеризовалась более высоким содержанием CD19 лимфоцитов до назначения терапии;
4) выявлено более низкое относительное содержание NK-клеток в группе с недостаточно эффективным лечением до и через 6 месяцев лечения относительно группы с эффективностью терапии INFβ-1a и группы сравнения;

5) соотношение Th17/Treg в группе с эффективным лечением не отличалось от диапазона референсных значений на протяжении всего периода лечения, а при недостаточно эффективном лечении было выше возрастного диапазона за счет высоко содержания Th17-лимфоцитов.

Резюме.

Анализ основных и малых популяций CD4 Т-лимфоцитов показал, что у детей с ВЗК, ПС и РС имеются различия между группами с эффективным и недостаточно эффективным лечением.

Для всех обследованных патологий характерно:

1) повышение содержания $CD4^{+}$Тлимфоцитов независимо от эффективности ГИБП к году терапии;

2) повышение соотношения Th17/Treg в группах с недостаточной эффективностью терапии ГИБП во все периоды наблюдения

У пациентов с ВЗК и ПС наблюдалось снижение относительного содержания NK-клеток в группе с эффективностью ГИБП относительно группы с недостаточной эффективностью во все периоды наблюдения, в тоже время, для пациентов с РС в группе с эффективностью терапии отмечалось повышение NK-клеток в периоды до назначения INFβ-1a и через 6 месяцев терапии.

3.1.4. Оценка содержания миелоидных клеток-супрессоров у детей с иммунозависимыми заболеваниями

Клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSCs) играют важную роль в регуляции иммунного ответа. Показано увеличение их содержания у взрослых пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Гранулоцитарная (G-MDSCs) и моноцитарная (M-MDSCs) популяции на разных стадиях иммунозависимых заболеваний могут как активировать пролиферацию Т-клеток, приводя к прогрессированию заболевания, так и подавлять её, способствуя дифференцировке регуляторных Т-клеток (глава 1). Клетки-супрессоры миелоидного происхождения свой иммуносупрессивный эффект осуществляют, в частности, за счет фермента

аргиназы-1 (Arg-1), который катализирует катаболизм L-аргинина до мочевины и L-орнитина, истощая его запас в микроокружении Т-клеток, приводя к ингибированию их пролиферации (глава 1).

У пациентов с ИЗЗ и в группе сравнения анализировали относительное и абсолютное содержание общей популяции миелоидных супрессоров MDSCs ($CD3^-CD19^-CD56^-(Lin^-)HLA\text{-}DR^{-/low}CD33^+CD11b^+$), моноцитарной субпопуляции M-MDSCs ($Lin^-HLA\text{-}DR^{-/low}CD33^+CD11b^+CD14^+$), гранулоцитарной G-MDSCs ($Lin^-HLA\text{-}DR^{-/low}CD33^+CD11b^+CD15^+$), субпопуляции незрелых MDSCs (MG^-) - ($Lin^-HLA\text{-}DR^{-/low}CD33^+CD11b^+CD14^-CD15^-$), а также активность аргиназы-1 в общей популяции MDSCs ($Lin^-HLA\text{-}DR^{-/low}CD33^+CD11b^+Arg\text{-}1^+$).

Содержание популяций миелоидных клеток-супрессоров в зависимости от состояния обострение/ремиссия у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями при лечении ГИБП и в группе сравнения

Проведена оценка содержания миелоидных клеток супрессоров в группах пациентов с ИЗЗ и группе сравнения – n=62 человека (Таблица 3.25).

Таблица 3.25 – Количество пациентов с иммунозависимыми заболеваниями в группах при исследовании миелоидных клеток-супрессоров

Патология	Группы пациентов				
	Возраст	Обострение	Ремиссия	НЭ	Эффект.
ВЗК	13,4 (9,1-16,5)	270	216	121	173
РС	16,8 (15,0-17,6)	51	96	20	34
ПС	10,2 (7,3-13,7)	92	90	58	52

У пациентов с ИЗЗ проводили оценку популяций MDSCs в группах пациентов по активности воспалительного процесса – обострении и ремиссии заболевания (Таблица 3.25). Также, пациенты были разделены на группы с разной эффективностью ГИБП к году терапии – с эффективностью терапии (Эффект) и с недостаточной эффективностью терапии (НЭ) (Таблица 3.25).

Проведенный анализ показал, что у детей с ВЗК, РС и ПС как в обострении, так в ремиссии заболевания наблюдались достоверно более высокие показатели

относительного и абсолютного содержания общей популяции MDSCs относительно группы сравнения (Таблица 3.26).

Таблица 3.26 – Содержание миелоидных клеток-супрессоров у пациентов с ИЗЗ при терапии ГИБП и в группе сравнения

Параметр	Группа сравнения	Группы пациентов			
		Активность	ВЗК[1]	РС[2]	ПС[3]
MDSCs, %	1,6 (0,9-2,5)	Обострение	3,17** (2,34-4,7)	3,5** (2,5-5,6)	3,2** (1,9-3,9)
		Ремиссия	2,3* (1,6-3,2) p_1=0,014	2,7** (2,1-4,5) p_2=0,088	2,5** (1,5-3,4) p_3=0,197
MDSCs, кл/мкл	44 (25,4-53,9)	Обострение	104** (54-166)	80** (68-115)	87** (52-123)
		Ремиссия	73** (57-109) p_1=0,077	64** (41-79) p_2=0,018	76** (47-94) p_3=0,228
M-MDSCs, % MDSCs	9,8 (5,6-16,7)	Обострение	29** (13-65,1)	16,3 (8,8-22,9)	16,6 (3,2-29,5)
		Ремиссия	17,1* (5,1-38,5) p_1=0,045	14,1 (6,8-27,8) p_2=0,467	10,6 (4,8-20,3) p_3=0,262
M-MDSCs, кл/мкл	3,2 (1,3-7,5)	Обострение	27** (9-76)	10** (6-17)	11** (3-30)
		Ремиссия	10** (4-28) p_1=0,024	8** (4-16) p_2=0,082	7* (2-20) p_3=0,197
G-MDSCs, % MDSCs	20,2 (12,3-41,3)	Обострение	13,1 (5,1-38,7)	53,3** (35,5-64,7)	28,9 (17,6-40,5)
		Ремиссия	22,7 (4,5-32,9) p_1=0,574	38,1** (30,2-55,9) p_2=0,096	20,9 (11,1-33) p_3=0,146
G-MDSCs, кл/мкл	8,5 (4,2-15,9)	Обострение	13** (5-41)	38** (25-68)	29** (15-40)
		Ремиссия	13 (4-26) p_1=0, 712	22* (15-43) p_2=0,022	13* (5-27) p_3=0,048

Продолжение Таблицы 3.26

Параметр	Группа сравнения	Группы пациентов			
		Активность	ВЗК[1]	РС[2]	ПС[3]
MDSCs (M^-G^-), % MDSCs	66,3 (46,5-77,2)	Обострение	33,5** (18,7-51,7)	28** (20,2-43,8)	51,2* (36,3-62,3)
		Ремиссия	54,3 (26,5-67,9) p_1=0,037	40,3** (20,6-58,5) p_2=0,230	64,6 (44,6-76,3) p_3=0,059
MDSCs (M^-G^-), кл/мкл	27,4 (12,3-35)	Обострение	37 (19-56)	20 (12-34)	32* (23-53)
		Ремиссия	37* (19-53) p_1=0,95	19 (13-29) p_2=0,843	38** (25-53) p_3=0,645

Примечание: p_1- достоверность различий между группами пациентов с ВЗК в обострении и ремиссии заболевания; p_2- достоверность различий между группами пациентов с РС в обострении и ремиссии заболевания; p_3- достоверность различий между группами пациентов с ПС в обострении и ремиссии заболевания; * - достоверность различий между группами пациентов в состоянии обострения и ремиссии относительно группы сравнения с $p<0,05$;**- достоверность различий между группами пациентов в состоянии обострения и ремиссии относительно группы сравнения с $p<0,001$

У пациентов с ВЗК более высокое содержания MDSCs наблюдалось, в основном, за счет моноцитарной популяции, у пациентов с РС – за счет гранулоцитарной популяции, у пациентов с ПС – за счет популяции незрелых MDSCs (M^-G^-). Наибольшие значения относительного содержания MDSCs среди обследованных патологий наблюдались у пациентов с РС, а абсолютного содержания MDSCs – у пациентов с ВЗК в обострении заболевания (Таблица 3.26).

Состояния «обострение/ремиссия» у пациентов обследованных патологий достоверно отличались либо по общей популяции MDSCs, либо по субпопуляциям MDSCs: при ВЗК в ремиссии заболевания выявлено достоверное снижение относительного количества MDSCs за счет M-MDSCs; при РС и ПС в ремиссии заболевания выявлено достоверное снижение абсолютного содержания MDSCs за счет снижения G-MDSCs (Таблица 3.26).

Сравнение показателей субпопуляций MDSCs при разных патологиях в состоянии обострения заболевания показало значимо более высокое содержание M-MDSCs (% MDSCs) у пациентов с ВЗК относительно пациентов с РС и ПС, более высокое содержание G-MDSCs у пациентов с РС относительно пациентов с ВЗК и

ПС, а также более высокое содержание MDSCs (M^-G^-) у пациентов с ПС относительно пациентов с ВЗК и РС (Рисунок 3.31А).

В состоянии ремиссии значимых различий между патологиями по относительному содержанию M-MDSCs не наблюдалось. Сохранялся более высокий уровень G-MDSCs у пациентов с РС относительно пациентов с ВЗК и ПС, а также более высокий уровень MDSCs (M^-G^-) у пациентов с ПС относительно пациентов с РС (Рисунок 3.31Б).

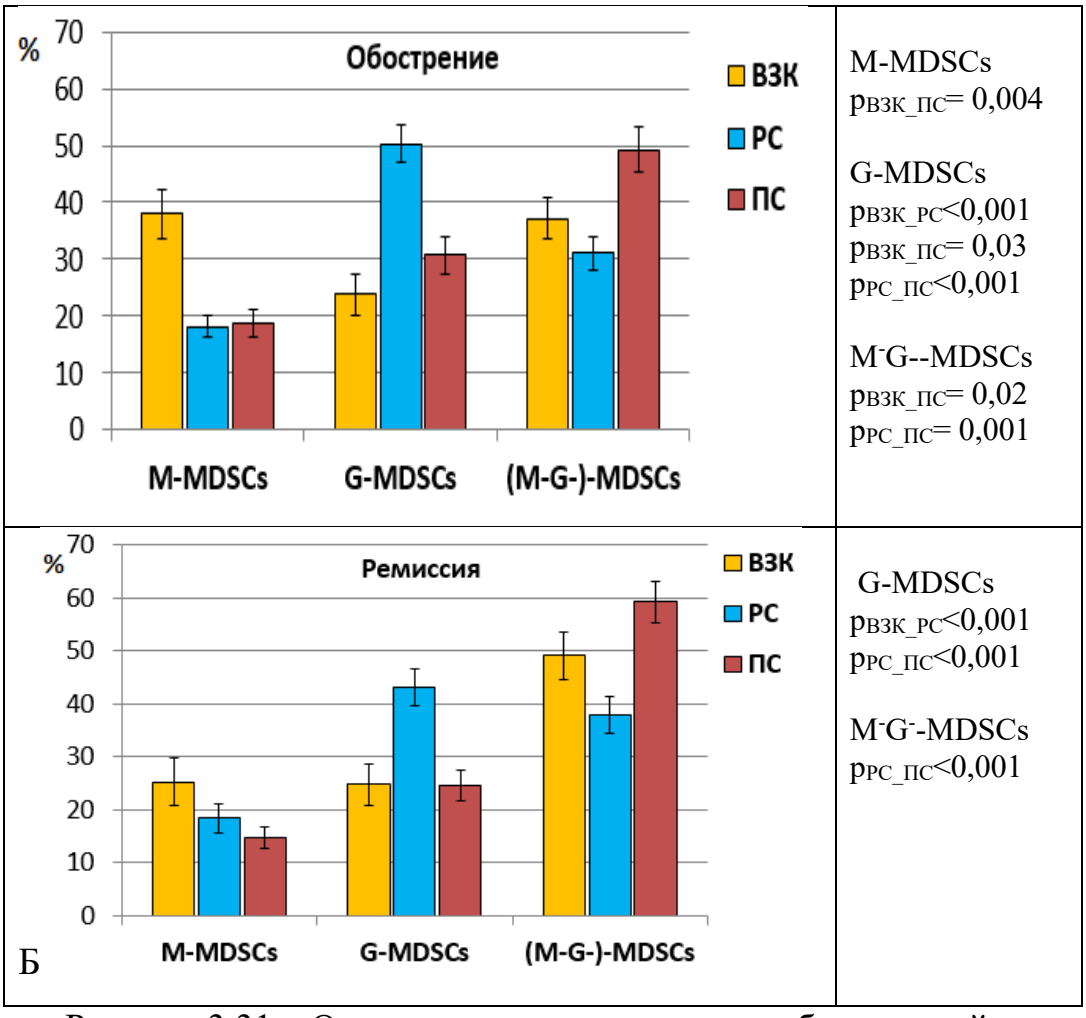


Рисунок 3.31 – Относительное содержание субпопуляций клеток-супрессоров миелоидного происхождения у пациентов с ИЗЗ в обострении (А) и ремиссии (Б) заболевания

Корреляционный анализ содержания миелоидных клеток супрессоров в зависимости от возраста, длительности заболевания и длительности терапии у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями

В связи с тем, что ранее показана зависимость содержания основных и малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов от возраста пациентов и длительности терапии

ГИБП (разделы 3.1.1 – 3.1.3), был проведен корреляционный анализ содержания популяций MDSCs от возраста пациентов, длительности заболевания и длительности проводимой терапии ГИБП.

Значимых корреляционных зависимостей между содержанием общей популяции MDSCs и субпопуляций MDSCs (M-MDSCs, G-MDSCs) от возраста пациентов, длительности заболевания и длительности терапии выявлено не было из-за большого разброса показателей. Коэффициент корреляции Спирмена изменялся в диапазоне от -0,24 (между абсолютным содержание G-MDSCs и возрастом у пациентов с ВЗК) до 0,20 (между абсолютным содержание MDSCs и длительностью терапии у пациентов с ПС).

Активность аргиназы – 1 (Arg-1) в MDSCs у пациентов с ВЗК, РС, ПС

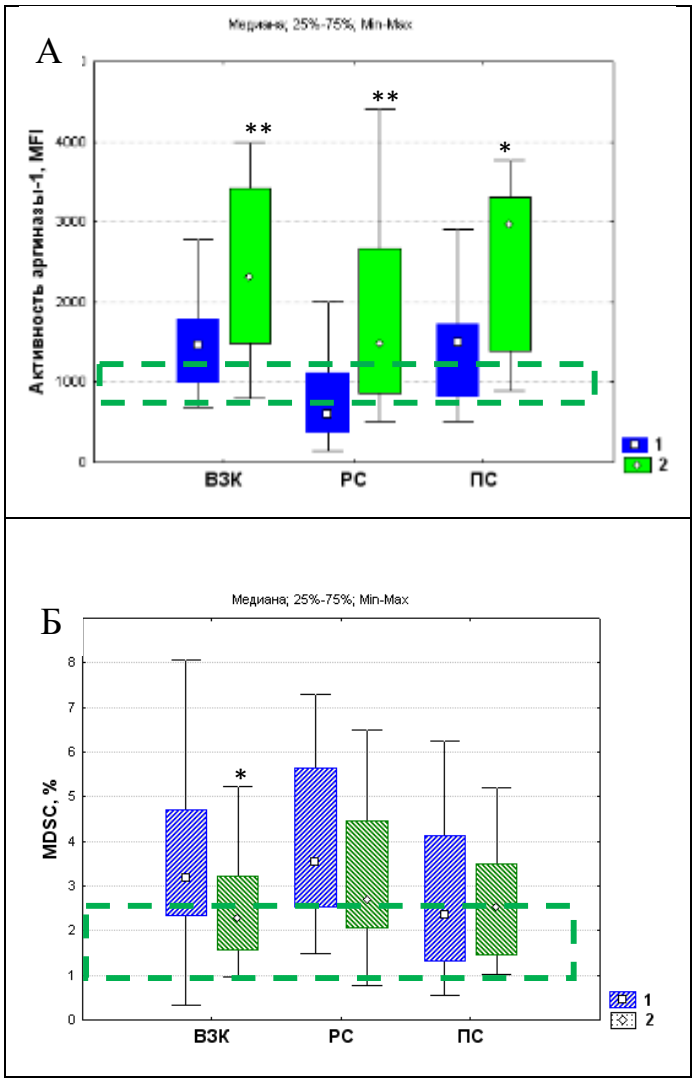
Для определения функциональной активности миелоидных клеток-супрессоров проведена оценка содержания внутриклеточного фермента аргиназы-1 в группах пациентов с ВЗК, ПС и РС и в группе сравнения (Таблица 3.27).

Таблица 3.27 – Активность аргиназы 1 (MFI) в миелоидных клетках-супрессорах у пациентов с ИЗЗ и в группе сравнения

Группа сравнения	Активность процесса	Группы пациентов			
		Группа 1 ВЗК	Группа 2 РС	Группа 3 ПС	p
981 (897 -1114)	Обострение	1468 (1002 -1785)	600 (382 -1125)	1490 (830 -1723)	p_{12}<0,001 p_{13}=0,92 p_{23}<0,001
	Ремиссия	2305** (1486 – 3420)	1477* (870 – 2664)	2968** (1398 -3312)	p_{12}=0,01 p_{13}=0,97 p_{23}=0,005
		$p_{об_р}$<0,001	$p_{об_р}$<0,001	$p_{об_р}$=0,003	
Примечание: p_{12}- достоверность различий между группами пациентов с ВЗК и РС; p_{12}- достоверность различий между группами пациентов с ВЗК и ПС; p_{23}- достоверность различий между группами пациентов ПС и РС; * - достоверность различий между группами пациентов и группой условно - здоровых детей с p<0,05; $p_{об_р}$ – достоверность различий между пациентами в обострении и ремиссии; **- достоверность различий между группами пациентов и группой условно - здоровых детей с p<0,001					

Активность Arg-1 зависела от состояния пациентов и была значимо выше в состоянии ремиссии заболевания при всех обследованных патологиях относительно состояния обострения заболевания и группы сравнения (Таблица 3.25, Рисунок 3.32). При этом, в обострении заболевания у пациентов с ВЗК и ПС активность Arg-1 была также выше, чем в группе сравнения. У пациентов с РС

активность Arg-1 в обострении заболевания была достоверно ниже, чем в группе пациентов с ВЗК, ПС и в группе сравнения (Таблица 3.27, Рисунок 3.32А).



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

Рисунок 3.32 - Активность аргиназы-1 (А) и относительное содержание MDSCs (Б) у пациентов с ВЗК, ПС, РС

Наименьшая активность Arg-1 наблюдалась у пациентов с РС в обострении заболевания, при этом содержание миелоидных клеток супрессоров в обострении заболевания в этой группе пациентов было наибольшим: достоверность различий между пациентами с РС и ВЗК – p=0,011; достоверность различий между пациентами с РС и ПС – p=0,001 (Рисунок 3.32Б).

Корреляционный анализ между содержанием миелоидных клеток супрессоров и содержанием Treg, Th17-лимфоцитов и соотношением Th17/Treg у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями на фоне биологической терапии

Из-за большого разброса показателей выявлены, в основном, слабые достоверные корреляционные зависимости (r от -0,32 до 0,43) между содержанием популяций MDSCs и популяциями Th17-лимфоцитов, Treg и соотношением Th17/Treg у пациентов всех исследованных патологий (Таблица 3.28*)*.

Для всех патологий выявлена значимая положительная корреляционная зависимость между абсолютным содержанием общей популяции MDSCs и содержанием Treg (Таблица 3.28*)*.

У пациентов с РС и ПС наблюдалась прямая корреляционная зависимость между абсолютным содержанием MDSCs и содержанием Th17-лимфоцитов, а также значимая отрицательная зависимость между абсолютным содержанием MDSCs и соотношением Th17/Treg (Таблица 3.28*)*.

Выявлена прямая корреляционная зависимость между абсолютным содержанием MDSCs (M^-G^-) и содержанием Treg у пациентов с ВЗК, РС и ПС, а также между относительным содержанием MDSCs (M^-G^-) и содержанием Treg у пациентов с ПС. Кроме того, выявлена отрицательная корреляционная зависимость между содержанием MDSCs (M^-G^-) и соотношением Th17/ Treg у пациентов с ПС (Таблица 3.28*)*.

Таблица 3.28 – Коэффициенты корреляции Спирмена между популяциями миелоидных клеток супрессоров и содержанием Treg и Th17 лимфоцитов

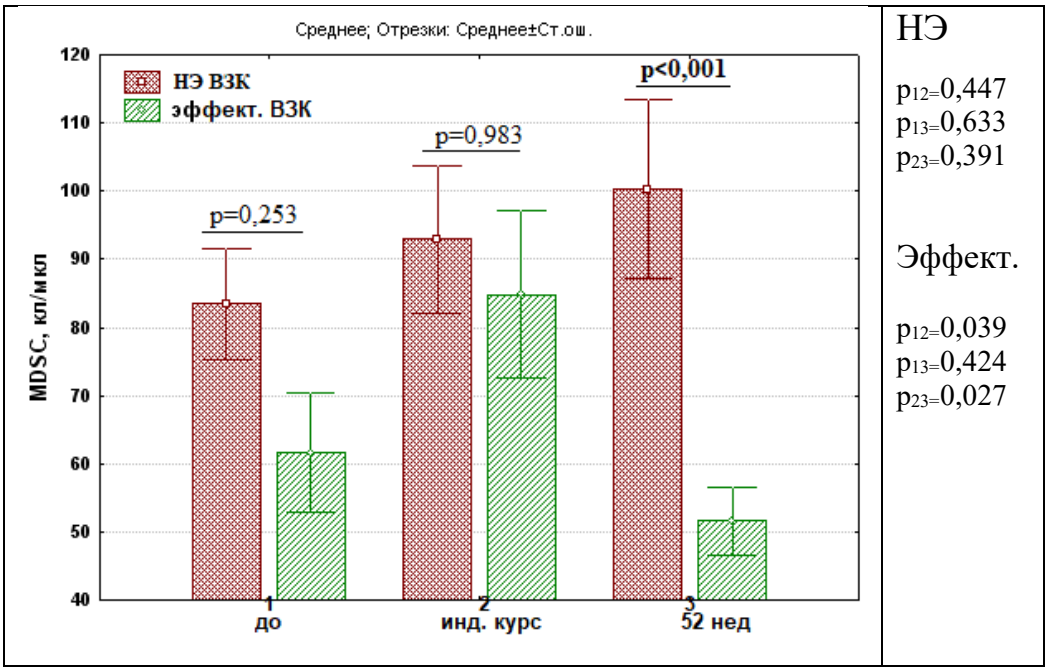
Популяции клеток	Treg	Th17	Th17/Treg
ВЗК			
MDSCs, %	**-0,15**	0,03	0,09
MDSCs, кл/мкл	**0,14**	-0,01	0,06
G-MDSC, %s	0,09	0,02	0,02
G-MDSCs, кл/мкл	0,13	-0,05	0,00
M-MDSCs, %	-0,12	-0,09	-0,04
M-MDSCs, кл/мкл	0,08	-0,08	0,00
MDSCs (M-G-), %	0,10	0,01	-0,05
MDSCs (M-G-), кл/мкл	**0,16**	0,09	0,01
РС			
MDSCs, %	0,11	-0,12	-0,07
MDSCs, кл/мкл	**0,26**	**0,18**	**-0,23**
G-MDSCs, %	-0,07	-0,03	0,03
G-MDSCs, кл/мкл	0,12	0,11	**-0,15**
M-MDSCs, %	0,17	**0,17**	0,07
M-MDSCs, кл/мкл	0,18	0,14	-0,12
MDSCs (M-G-), %	0,02	-0,10	**-0,16**
MDSCs (M-G-), кл/мкл	**0,33**	**0,16**	**-0,32**
ПС			
MDSCs, %	0,00	**-0,21**	-0,14
MDSCs, кл/мкл	**0,33**	**0,18**	**-0,20**
G-MDSCs, %	-0,04	-0,06	-0,03
G-MDSCs, кл/мкл	0,13	0,06	-0,09
M-MDSCs, %	-0,16	0,00	0,11
M-MDSCs, кл/мкл	0,02	0,03	-0,04
MDSCs (M-G-), %	**0,42**	0,05	**-0,20**
MDSCs (M-G-), кл/мкл	**0,43**	**0,19**	**-0,28**

Примечание: жирным шрифтом выделены значения с $p<0,05$; цветовая шкала: красный – максимальное значение, синий – минимальное значение коэффициента корреляции Спирмена

Прогноз эффективности ГИБП у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями в зависимости от содержания MDSCs

У пациентов с ИЗЗ анализировали показатели популяций MDSCs в группах с разной эффективностью и разной длительностью терапии (до начала введения ГИБП - до, индукционный курс – инд. курс, год терапии – 52 нед).

У пациентов с ВЗК до назначения терапии и в период индукционного курса отличий между группами по абсолютному содержанию MDSCs выявлено не было, а к году терапии наблюдалось достоверное снижение MDSCs в группе с эффективным лечением относительно группы с недостаточной эффективностью ГИБП (Рисунок 3.33).

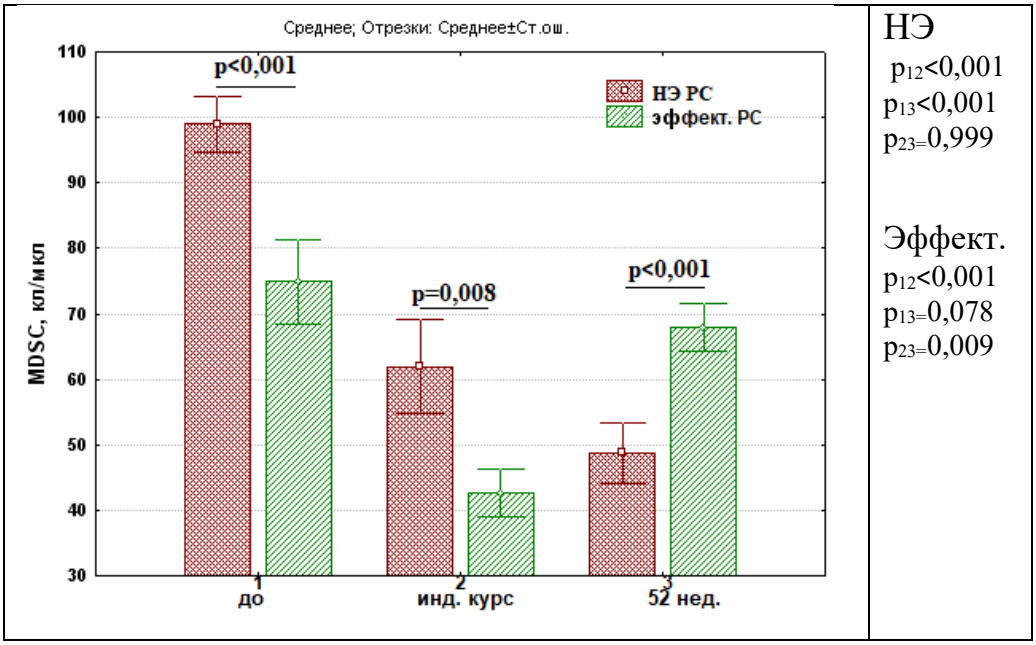


Примечание: p – достоверность различий между группами с НЭ терапией и с эффективной; p_{12}, p_{13}, p_{23} - достоверности отличий между разными периодами введения ГИБП

Рисунок 3.33 – Абсолютное содержание MDSCs в разные периоды введения ГИБП у пациентов с ВЗК

У пациентов с ВЗК в группе с эффективным лечением в период индукционного курса наблюдалось увеличение абсолютного количества MDSCs по сравнению с периодом до назначения ГИБП. В группе с НЭ лечением достоверных отличий по содержанию абсолютного количества MDSCs на протяжении года терапии выявлено не было (Рисунок 3.33).

У пациентов с РС в группе с НЭ терапии выявлено достоверное снижение абсолютного содержания MDSCs к концу индукционного курса и к году терапии относительно периода до начала ГИБП. В группе с эффективностью терапии также, как и в группе с НЭ, наблюдалось снижение показателей MDSCs к концу индукционного курса, а к году ГИБП происходило увеличение их содержание относительно показателей к концу индукционного курса (Рисунок 3.34).



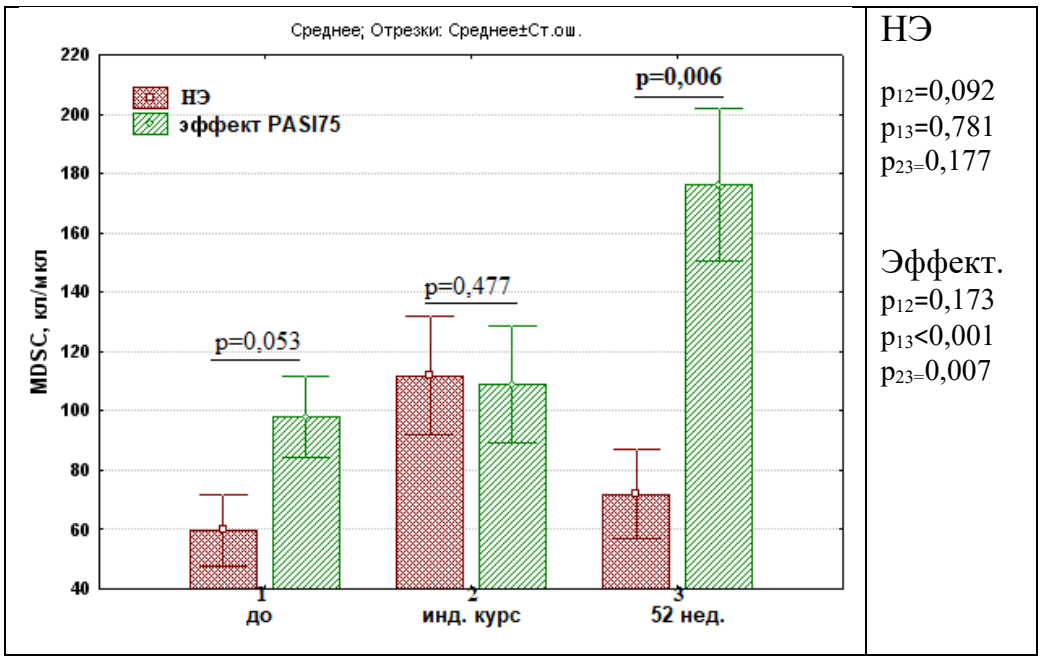
Примечание: p – достоверность различий между группами с НЭ терапией и с эффективной; p_{12}, p_{13}, p_{23} - достоверности отличий между разными периодами введения ГИБП.

Рисунок 3.34 – Абсолютное содержание MDSCs в разные периоды введения ГИБП у пациентов с РС

Сравнительный анализ содержания MDSCs между группами пациентов с РС показал достоверно более низкое содержание в группе с эффективным лечением относительно группы с недостаточным эффектом до начала лечения и после окончания индукционного курса (Рисунок 3.34). К году терапии в группе с эффективным лечением по сравнению с группой с НЭ лечением наблюдалось более высокое содержание абсолютного количества MDSCs (Рисунок 3.34).

Таким образом, у пациентов с РС к концу индукционного курса выявлено снижение абсолютного количества MDSCs в обеих группах, но к году терапии в группе с эффективным лечением содержание MDSCs увеличивалось, а в группе с НЭ терапией – оставалось на уровне значений конца индукционного курса.

У пациентов с ПС также, как и у пациентов с ВЗК, достоверных отличий между группами до начала лечения и в период индукционного курса выявлено не было, при этом, к году терапии абсолютное содержание MDSCs было достоверно выше в группе с эффективным лечением (Рисунок 3.35).



Примечание: p – достоверность различий между группами с неэффективным терапией и с эффективной; p_{12}, p_{13}, p_{23} - достоверности отличий между разными периодами введения ГИБП

Рисунок 3.35 – Абсолютное содержание MDSCs в разные периоды введения ГИБП у пациентов с ПС

В группе с эффективным лечением ГИБП наблюдалось значимое увеличение абсолютного содержания MDSCs к году лечения по сравнению с периодами до назначения терапии и после индукционного курса ГИБП. Достоверных отличий в группе с недостаточным эффектом ГИБП между периодами наблюдения выявлено не было (Рисунок 3.35).

Прогноз эффективности ГИБП у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями в зависимости от содержания регуляторных клеток (MDSCs /Treg)

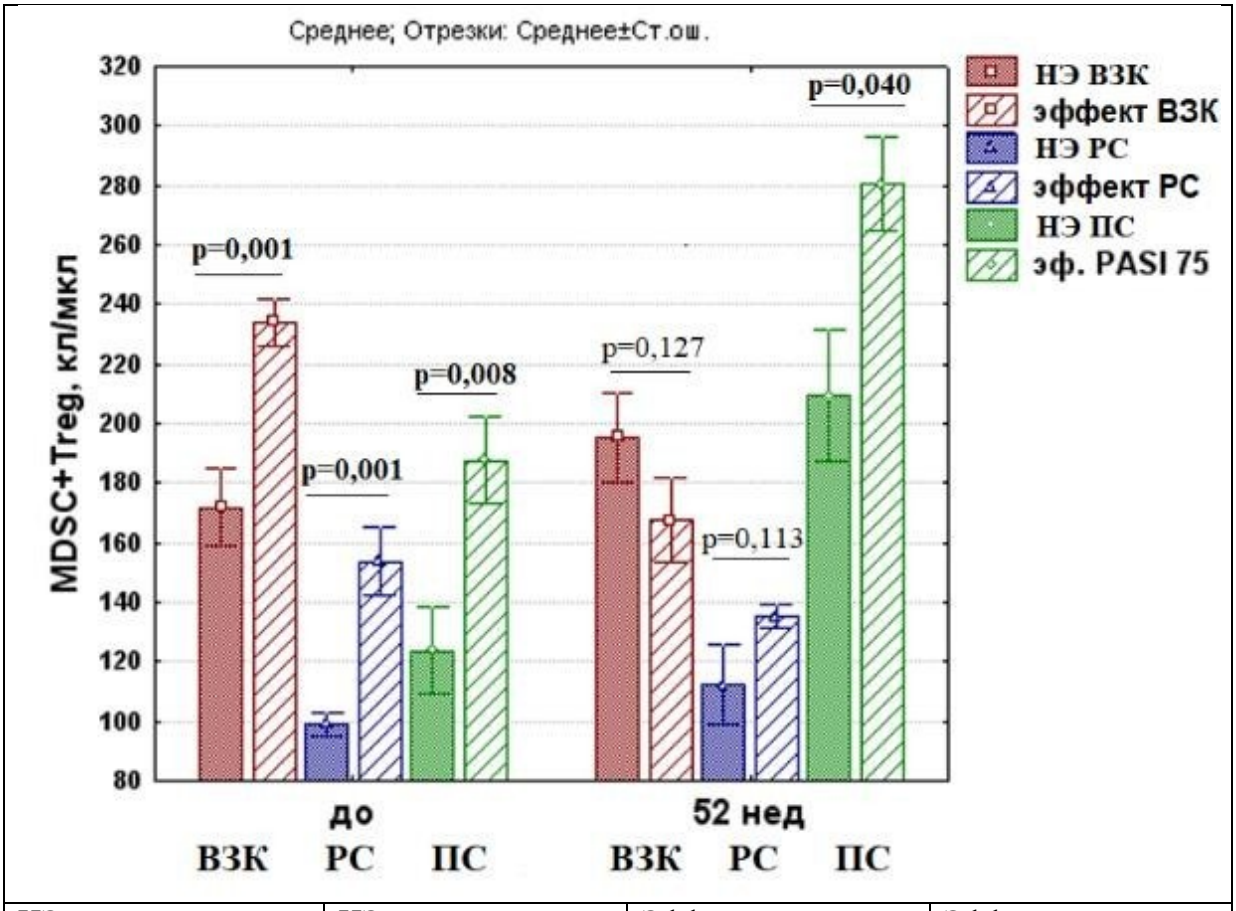
Миелоидные клетки – супрессоры также, как и Т-регуляторные клетки, выполняют иммуносупрессивную функцию. Проведен анализ информативности абсолютного содержания MDSCs и Treg (Reg=MDSCs+Treg) до назначения ГИБП и к году терапии в прогнозе эффективности терапии (Таблица 3.29).

Таблица 3.29 – Абсолютное содержание регуляторных клеток (Reg-клеток) в группах при терапии ГИБП у детей с ИЗЗ (Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$) кл/мкл)

Патология/ ГИБП	ВЗК		РС		ПС	
До ГИБП	НЭ	Эффект.	НЭ	Эффект.	НЭ	Эффект.
	162 (144 - 216)	243** (211 - 243)	105 (82 -115)	144** (103 -170)	111 (50 -189)	162** (120 -216)
52 неделя	НЭ	Эффект.	НЭ	Эффект.	НЭ	Эффект.
	203 (129 -253)	154 (101 - 240)	109 (50 -180)	136 (118 - 152)	243 (179 -275)	264* (214 - 338)
Примечание: * - достоверность различий с $p<0,05$; ** - достоверность различий с $p<0,001$						

До назначения терапии при всех изученных патологиях в группе с эффективным лечением содержание Reg-клеток было значимо выше, чем в группе с НЭ лечением (Таблица 3.29). К году терапии достоверные отличия содержания Reg-клеток между группами пациентов с разной эффективностью терапии ГИБП были выявлены только для пациентов с ПС (Таблица 3.29).

Сравнение абсолютного содержания Reg-клеток между группами пациентов с ВЗК, РС и ПС при разной эффективности лечения показало: в группах с НЭ – достоверно более высокие значения у пациентов с ВЗК по сравнению с пациентами с РС до назначения и к году ГИБП; в группах с эффективностью терапии – до назначения терапии значимо более высокое количество Reg-клеток у пациентов с ВЗК по сравнению с пациентами с РС и ПС, а к году терапии – достоверно большие значения у пациентов с ПС относительно пациентов с ВЗК и РС (Рисунок 3.36).



НЭ: до ГИБП $p_{ВЗК_РС}<0,001$ $p_{ВЗК_ПС}=0,095$ $p_{РС_ПС}=0,257$	НЭ: 52 нед $p_{ВЗК_РС}<0,001$ $p_{ВЗК_ПС}=0,155$ $p_{РС_ПС}=0,058$	Эффект. до ГИБП $p_{ВЗК_РС}<0,001$ $p_{ВЗК_ПС}=0,049$ $p_{РС_ПС}<0,001$	Эффект. 52 нед $p_{ВЗК_РС}=0,012$ $p_{ВЗК_ПС}=0,005$ $p_{РС_ПС}<0,001$

Рисунок 3.36 - 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 (Таблица 3.29, Рисунок 3.36).

С помощью ROC-анализа было выявлено хорошее (у пациентов с ПС) и очень хорошее качество (у пациентов с ВЗК и РС) для разделительной модели «эффективность – неэффективность» терапии и определены пороговые значения Reg-клеток до назначения ГИБП, ниже которых можно прогнозировать развитие недостаточной эффективности терапии у пациентов с ИЗЗ (Таблица 3.30).

Таблица 3.30 – Показатели ROC-анализа для прогноза эффективности терапии ГИБП по содержанию Reg-клеток у пациентов с ИЗЗ до введения ГИБП

Пациенты	AUC (95% доверит. инт)	Cut-off, кл/мкл	Se, %	Sp, %
ВЗК	0,813 (0,673 - 0,952)	213	71	71
РС	0,819 (0,703 - 0,934)	117	69	80
ПС	0,714 (0,569 - 0,859)	145	64	67

Сравнение полученных пороговых значений Reg-клеток при разных патологиях показало, что для достижения хорошего эффекта терапии наибольшее пороговое значение получено у пациентов с ВЗК.

Резюме.

1. У пациентов с иммунозависимыми заболеваниями выявлено увеличение содержания общей популяции MDSCs относительно группы сравнения как в обострении, так и в ремиссии заболевания. Для детей с ВЗК было характерно повышение относительного и абсолютного содержания моноцитарной субпопуляции MDSCs, для детей с РС - гранулоцитарной популяции MDSCs, а для пациентов с ПС – абсолютного содержания незрелой популяции MDSCs.

2. Ремиссия заболевания у пациентов с ВЗК, ПС и РС характеризовалась увеличением активности аргиназы-1 в MDSCs при снижении содержания MDSCs. Наименьшая активность аргиназы-1 на фоне повышения относительного содержания общей популяции MDSCs пациентов отмечалась у пациентов с РС в обострении заболевания.

3. У пациентов с ВЗК, ПС и РС выявлена значимая положительная корреляционная зависимость между абсолютным содержанием общей популяции MDSCs и содержанием Treg.

4. В ответ на терапию ГИБП наблюдались фазные изменения в содержании MDSCs в зависимости от эффективности лечения. К году терапии у пациентов с ВЗК в группе с эффективным лечением выявлялись более низкие показатели, а у

пациентов РС и ПС – более высокие относительно группы с недостаточной эффективностью.

5. Общее количество регуляторных клеток (MDSCs+Treg) у пациентов с эффективностью ГИБП значимо превышало показатели в группе с неэффективностью терапии до начала лечения. Получены пороговые значения для регуляторных клеток (MDSCs +Treg) до назначения ГИБП для прогноза эффективности ГИБП у пациентов с ВЗК, РС и ПС.

3.1.5. Оценка популяций Т-клеток памяти при иммунозависимых заболеваниях

Резидентные Т-клетки памяти (RTM) контролируют локальный иммунный гомеостаз, участвуя в иммунных реакциях, опосредованных различными антигенами, в том числе, аутоантигенами. Показана ведущая роль популяций Т-клеток памяти при хроническом воспалении. RTM продуцируют провоспалительные цитокины (IL-17, IL-22, IFN-γ и др.), привлекая и активируя дендритные клетки, фибробласты, кератиноциты и макрофаги, которые захватывают антигены и продуцируют в свою очередь цитокины (IL-7, IL-15, IL-17), приводя к усилению воспаления. Возможно, активация клеток-памяти лежит в основе непрерывно-рецидивирующего течения иммунозависимых заболеваний.

Корреляционные зависимости содержания Т-клеток памяти от возраста, длительности заболевания, длительности терапии, индексов активности заболевания у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника

Для оценки популяций Т-клеток памяти были обследованы группы пациентов с ИЗЗ (Таблица 3.31).

Таблица 3.31 – Клинико-анамнестическая характеристика пациентов с иммунозависимыми заболеваниями при исследовании популяций Т-клеток памяти

Диагноз	ВЗК	РС	ПС
Количество пациентов	162	116	172
Группа 1 (НЭ)	72	46	76
Возраст пациентов группы 1 (НЭ), лет	15,94 (15,1-14,9)	15,46 (15,2-16,5)	14,6 (11,7-17,1)
Группа 2 (Эффект)	90	70	96
Возраст пациентов группы 2 (Эффект), лет	14,85 (12,7-16,9)	15,8 (15,0-16,7)	13,5 (10,7-14,7)
Длительность заболевания, лет	3,8 (2,6-5,7)	5 (3,0-8,0)	1,7 (0,9-3,4)
ГИБП	IFX /ADA	IFNβ1α	ADA

Пациенты были поделены на группы в зависимости от эффективности ГИБП к году терапии: недостаточная эффективность – группа 1 (НЭ), эффективность – группа 2 (Эффект.). Возраст пациентов в группах был сопоставим. Оценивали следующие популяции Т-клеток памяти: наивные $CD4^+$ Т-клетки (TNAIVE) - $CD3^+CD4^+CD45R0^-CD197(CCR7)^+$; центральные $CD4^+$ Т-клетки памяти (TCM) - $CD3^+CD4^+CD45R0^+CD197(CCR7)^+$; эффекторные $CD4^+$ Т-клетки памяти (TEM) - $CD3^+CD4^+CD45R0^+CD197(CCR7)^-$; терминально-дифференцированные $CD4^+$ Т-клетки памяти (TEMRA) - $CD3^+CD4^+CD45R0^-CD197(CCR7)^-$; наивные $CD8^+$ Т-клетки памяти (TcytNAIVE) - $CD3^+CD8^+CD45R0^-CD197(CCR7)^+$; центральные $CD8^+$ Т-клетки памяти (TcytCM) - $CD3^+CD8^+CD45R0^+CD197(CCR7)^+$; эффекторные $CD8^+$ Т-клетки памяти (TcytEM) - $CD3^+CD8^+CD45R0^+CD197(CCR7)^-$; терминально-дифференцированные $CD8^+$ Т-клетки памяти (TcytEMRA) - $CD3^+CD8^+CD45R0^-CD197(CCR7)^-$. Оценку субпопуляций Т-клеток памяти проводили на разных этапах лечения ГИБП – до назначения терапии (до), после индукционного курса (инд), в год терапии (52 нед).

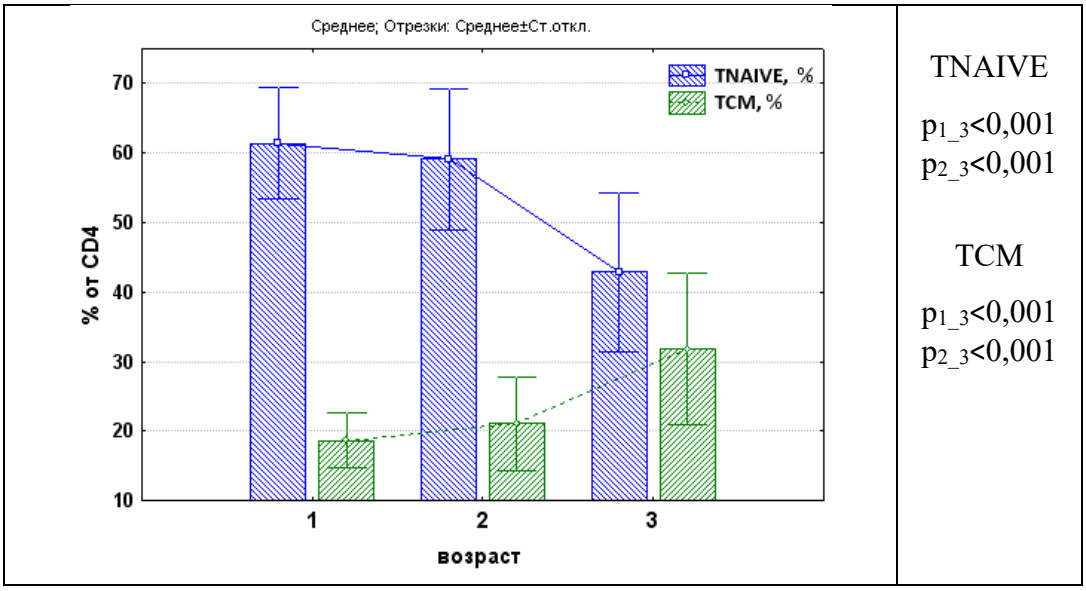
Проведенный корреляционный анализ относительного содержания Т-клеток памяти от возраста показал наличие зависимостей разной степени значимости (Таблица 3.32).

Таблица 3.32 – Коэффициенты корреляции и уровень достоверности популяций Т-клеток памяти от возраста у пациентов с ВЗК при терапии ГИБП

Популяции	r	p
TNAIVE	-0,59	<0,001
TCM	0,52	<0,001
TEM	0,29	<0,001
TcytNAIVE	-0,20	0,01
TcytCM	0,40	<0,001
TcytEM	0,24	0,002

Наблюдались корреляционные зависимости разной степени силы субпопуляций Т-клеток памяти от возраста: слабые положительные для – TEM и TcytEM; слабые отрицательные для – TcytNAIVE; умеренные положительные для – TCM и TcytCM; умеренные отрицательные для – TNAIVE (Таблица 3.32). Корреляционных зависимостей для популяций TEMRA и TcytEMRA от возраста не наблюдалось.

Показано снижение относительного содержания TNAIVE и увеличение относительного содержания TCM с возрастом (Таблица 3.32, Рисунок 3.37).



Примечание: 1 - 8-12 лет; 2 - старше 12-15 лет; 3 - старше 15-18 лет; p – достоверность отличий между возрастными периодами

Рисунок 3.37 – Содержание популяций TNAIVE и TCM в разные возрастные периоды у пациентов с ВЗК на поддерживающей терапии ГИБП

У пациентов с ВЗК не было выявлено значимых корреляционных зависимостей между содержанием популяций Т-клеток памяти и длительностью заболевания.

Анализ содержания популяций Т-клеток памяти от длительности терапии ГИБП выявил слабые корреляционные зависимости для TEM (r=0,17, p=0,03), TEMRA (r=0,17, p=0,03), TcytEMRA (r=0,21, p=0,007).

У пациентов с ВЗК при увеличении индексов активности заболевания (PCDAI/PUCAI>10) наблюдались достоверно более низкие показатели относительного содержания популяции TNAIVE (Рисунок 3.38А*)* и более высокие значения популяций TEM (p<0,001) и TCM (Рисунок 3.38Б).

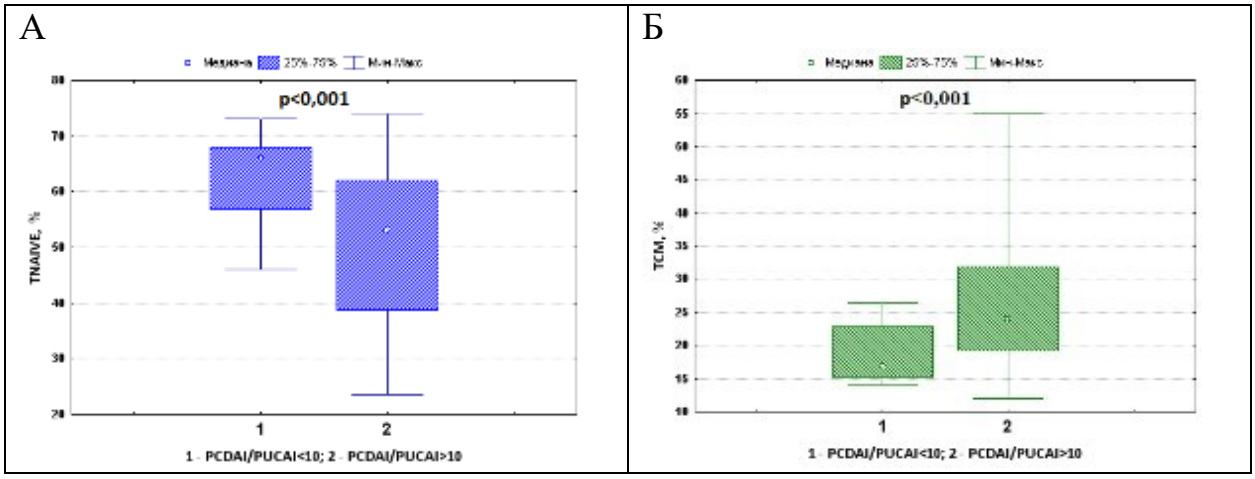


Рисунок 3.38 - Относительное содержание TNAIVE (А) и TCM (Б) в зависимости от индексов активности (PCDAI/PUCAI)

Содержание *$CD4^+$ Т-клеток памяти и $CD8^+$ Т-клеток памяти у пациентов с ВЗК*

Сравнительная оценка субпопуляций Т-клеток памяти у пациентов с ВЗК выявила достоверно более высокие показатели относительного содержания эффекторных $CD4^+$ Т-клеток памяти (TEM) в группе с НЭ (группа 1) относительно группы с эффективностью ГИБП (группа 2) (Таблица 3.33).

Таблица 3.33 – Динамика относительного содержания $CD4^+$ Т-клеток памяти у пациентов с ВЗК с при терапии ГИБП

Популяция клеток, %	Период	Группа 1 (НЭ) Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 (Эффект) Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
TNAIVE	*До*	44,3 (36,3 - 58,6)	53,5 (47,4 - 59,4)
	Инд	50,5 (29,1 - 57,7)	62,7 (56,5 - 65,9)**
	52 нед	47,0 (34,6 - 49,7)	58,4 (48,7 - 67,6)*
TCM	*До*	25,9 (18,1 - 29,2)	30,2 (23,4 - 36,4)
	Инд	34,3 (25,4 - 48,3)	18,9 (14,9 - 22,0)**
	52 нед	20,1 (18,5 - 24,4)	24,3 (15,3 - 31,8)
TEM	*До*	26,7 (18,2 - 32,2)	14,0 (13,3 - 16,0)*
	Инд	17,5 (12,3 - 21,9)	15,4 (13,1 - 20,2)
	52 нед	28,9 (23,3 - 40,9)	15,6 (14,8 - 19,3)**
TEMRA	*До*	2,2 (1,1 - 3,7)	1,4 (1,1 - 1,7)
	Инд	1,1 (0,6 - 2,5)	1,5 (0,9 - 2,1)
	52 нед	2,7 (1,9 - 6,1)	1,8 (0,7 - 1,9)*
Примечание: *– достоверность различий между группами1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$			

По окончании индукционного курса в группе с эффективностью терапии содержание популяции TNAIVE было достоверно выше, а содержание популяции клеток центральной памяти TCM значимо ниже, чем в группе с недостаточной эффективностью ГИБП. К году терапии ГИБП в группе с хорошим эффектом терапии сохранялся высокий уровень TNAIVE на фоне более низкого уровня популяции эффекторной памяти TEM и популяции терминально-дифференцированных клеток памяти TEMRA (Таблица 3.33).

Оценка $CD8^+$Т-клеток памяти у пациентов с ВЗК показала достоверно более высокий уровень наивных клеток памяти (TcytNAIVE) в группе с эффективностью терапии до назначения ГИБП и после окончания индукционного курса (Таблица 3.34).

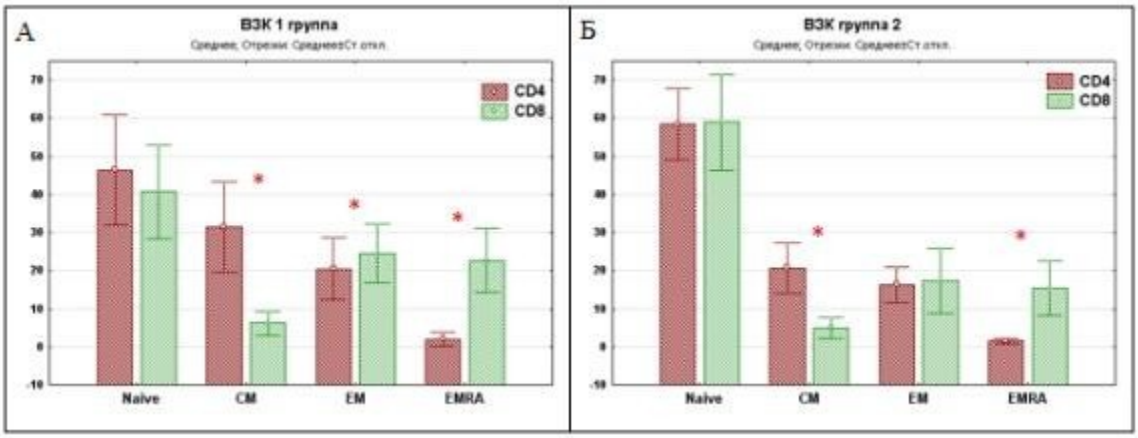
Таблица 3.34 – Динамика относительного содержания $CD8^+$ Т-клеток памяти у пациентов с ВЗК при терапии блокаторами TNF

Популяция клеток, %	Период	Группа 1 (НЭ) $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$	Группа 2 (Эффект) $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$
TcytNAIVE	*До*	34,1 (29,2 - 40,0)	42,5 (40,6 - 45,2)*
	Инд	42,1 (39,1 - 48,7)	62,0 (54,0 - 69,5)**
	52 нед	33,5 (23,5 - 60,0)	57,8 (51,9 - 58,5)
TcytCM	*До*	4,8 (2,9 - 7,9)	6,7 (4,1 - 8,3)
	Инд	5,8 (4,3 - 9,6)	3,2 (2,5 - 6,5)**
	52 нед	3,9 (2,5 - 5,1)	5,3 (2,8 - 6,5)
TcytEM	*До*	31,9 (22,1 - 34,0)	26,5 (17,5 - 36,0)
	Инд	23,6 (17,5 - 28,0)	13,3 (10,2 - 21,5)**
	52 нед	21,6 (16,3 - 40,0)	16,9 (14,7 - 19,5)*
TcytEMRA	*До*	25,3 (18,2 - 32,4)	23,5 (12,8 - 32,5)
	Инд	20,7 (15,8 - 25,6)	16,8 (8,7 - 17,2)**
	52 нед	19,5 (14,8 - 51,5)	24,9 (15,9 - 26,4)
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$			

После окончания индукционного курса относительное содержания $CD8^+$ Т-клеток центральной памяти (TcytCM), TcytEM и популяции TcytEMRA в группе с эффективностью терапии было достоверно ниже, чем в группе с НЭ. К году терапии у пациентов с эффективностью терапии содержание популяции TcytEM было значимо ниже, чем в группе с недостаточно эффективным лечением.

Проведенный анализ соотношений между субпопуляциями $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти у пациентов с ВЗК показал аналогичные изменения в группах с НЭ и эффективностью ГИБП: содержание TNAIVE и TcytNAIVE практически не отличалось, уровень ТСМ значимо превышал TcytCM, а содержание TEMRA было меньше содержания популяции TcytEMRA (Рисунок 3.39). Отличия по

соотношению между клетками $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клеток памяти наблюдались для эффекторных субпопуляций: в группе 1 уровень TcytEM был выше, чем TEM; в группе 2 достоверной разницы между субпопуляциями EM выявлено не было (Рисунок 3.39).



Примечание: * - достоверность различий между CD4 и CD8 клетками памяти в группах с p<0,001; * - достоверность различий между CD4 и CD8 в группах с p<0,05

Рисунок 3.39 – Популяции $CD4^+$Т-клеток памяти и $CD8^+$Т-клеток памяти у пациентов с ВЗК в группе 1 (А) и в группе 2 (Б)

Проведенный ROC-анализ у пациентов с ВЗК после индукционного курса ГИБП показал отличное и очень хорошее качество для разделительной модели «эффективность – неэффективность» для относительного содержания следующих популяций Т-клеток памяти: TNAIVE, TCM, TcytNAIVE, TcytEMRA (Таблица 3.35, Рисунок 3.40).

Таблица 3.35 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по популяциям клеток памяти у пациентов с ВЗК после индукционного курса ГИБП в прогнозе эффективности терапии

Популяции клеток, %	AUC (95% доверит. инт)	Cut-off, %	Se, %	Sp, %
TNAIVE	0,807 (0,719 - 0,895)	58,1	70,4	83,3
TCM	0,915 (0,851 - 0,980)	23,2	86,1	85,2
TcytNAIVE	0,873 (0,793 - 0,952)	53,1	81,5	80,6
TcytEMRA	0,811 (0,707 - 0,915)	17,1	72,2	70,4

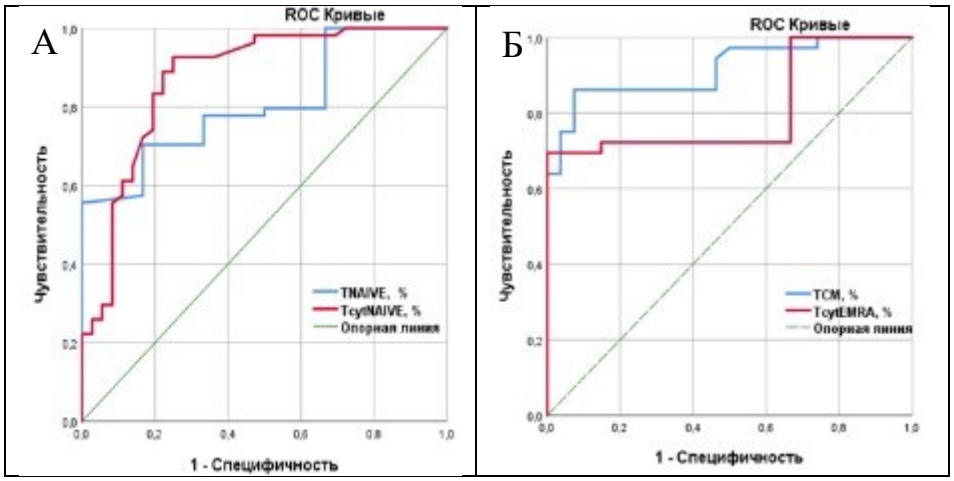


Рисунок 3.40 – ROC-кривые для разделительной модели состояний «эффективность – неэффективность» по популяциям Т-клеток памяти у пациентов с ВЗК после индукционного курса ГИБП: TNAIVE, TcytNAIVE (А); TCM, TcytEMRA (Б)

ROC-анализ также был проведен для относительного содержания других популяций Т-клеток памяти, но из-за большого разброса показателей были получены более низкие показатели площади под кривой AUC (95% доверит. инт): TEMRA – 0,466 (0,335– 0,597), TEM - 0,556 (0,335– 0,597), TcytCM – 0,750 (0,650-0,850), TcytEM – 0,772 (0,668-0,875).

У пациентов с ВЗК были определены пороговые значения для относительного содержания популяций TNAIVE, TcytNAIVE, выше которых можно прогнозировать эффективность ГИБП (Таблица 3.35). Для относительного содержания популяций TCM, TcytEMRA также были получены пороговые значения, ниже которых можно прогнозировать эффективность ГИБП.

Корреляционные зависимости содержания Т-клеток памяти от возраста, длительности заболевания, длительности терапии, наличия активных очагов у пациентов с рассеянным склерозом

Проведенный корреляционный анализ у пациентов с РС показал зависимость относительного содержания клеток памяти от возраста (Таблица 3.36)

Таблица 3.36 – Коэффициенты корреляции и уровень достоверности популяций клеток памяти от возраста у пациентов с РС при терапии INFβ-1a

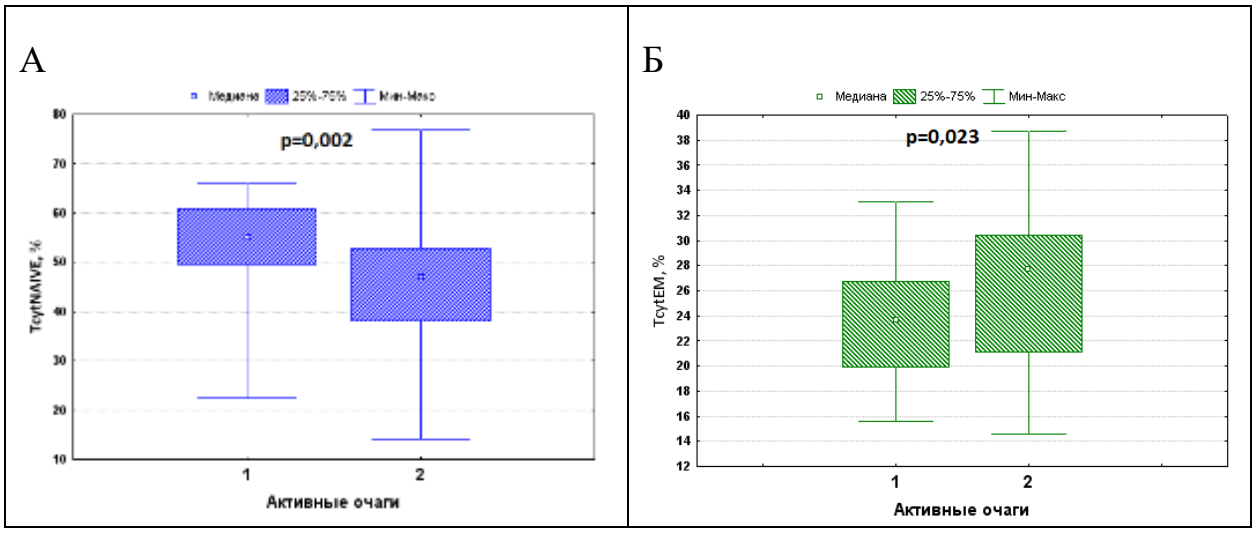
Популяции	r	p
TNAIVE	-0,43	<0,001
TCM	0,43	<0,001
TcytNAIVE	-0,336	<0,001
TcytEM	0,35	<0,001
TcytEMRA	0,27	0,004

У пациентов с РС при лечении INFβ-1a наблюдалось снижение относительного содержания TNAIVE и TcytNAIVE клеток с возрастом. В то время как, для относительного содержания TCM, TcytEM и TcytEMRA с возрастом наблюдалось их увеличение (Таблица 3.36).

У пациентов с РС выявлена умеренная зависимость относительного содержания TEM (r=0,32, p<0,001) и TEMRA (r=0,35, p<0,001) от длительности заболевания.

Зависимость от длительности терапии ГИБП выявлена только для относительного содержания TEMRA (r=0,26, p =0,004).

Оценка относительного содержания Т-клеток памяти в зависимости от наличия активных очагов у пациентов с РС показала более низкие значения TcytNAIVE (Рисунок 3.41А*)* и более высокие значения TcytEM (Рисунок 3.41Б) у пациентов с активными очагами в головном мозге относительно группы пациентов без наличия активных очагов.



Примечание: 1 – группа пациентов с РС без активных очагов; 2 - группа пациентов с РС с активными очагами

Рисунок 3.41 – Относительное содержание TcytNAIVE (А) и TcytEM (Б) в зависимости от наличия или отсутствия активных очагов

Содержание $CD4^+$ Т-клеток памяти и $CD8^+$ Т-клеток памяти у пациентов с РС

Сравнение пациентов с РС с недостаточной эффективностью ГИБП (группа 1) и эффективностью ГИБП (группа 2) показала, что достоверных отличий по относительному содержанию TNAIVE и TCM между группами пациентов с РС не было во все периоды наблюдения (Таблица 3.37).

Таблица 3.37 – Динамика относительного содержания $CD4^+$ Т-клеток памяти у пациентов с РС с разной эффективностью терапии INFβ-1a

Популяция клеток, %	Период	Группа 1 (НЭ) Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 (Эффект) Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
TNAIVE	*До*	61,9 (51,1 - 69,5)	63,2 (42,0 - 64,9)
	Инд	44,9 (31,7 - 58,2)	55,8 (52,7 - 56,1)
	52 нед	54,0 (33,8 - 65,7)	53,4 (48,6 - 56,6)
TCM	*До*	21,2 (15,6 - 27,7)	17,9 (15,1 - 30,6)
	Инд	27,2 (18,2 - 36,5)	25,0 (23,1 - 29,2)
	52 нед	28,2 (20,9 - 29,0)	24,9 (21,0 - 26,8)
TEM	*До*	14,6 (11,2 - 23,0)	18,9 (14,0 - 19,7)
	Инд	23,9 (21,8 - 29,6)	16,2 (14,0 - 19,3)**
	52 нед	14,1 (13,5 - 25,1)	19,1 (17,0 - 26,0)
TEMRA	*До*	0,88 (0,63 - 1,65)	1,1 (0,8 - 2,1)
	Инд	1,9 (1,5 - 2,8)	1,7 (0,7 - 1,8)*
	52 нед	3,0 (1,3 - 3,5)	1,3 (0,6 - 3,1)
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$			

У пациентов с РС получено достоверно более высокое относительное содержание популяций ТЕМ и TEMRA в группе с НЭ относительно группы с эффективностью терапии только в период после индукционного курса.

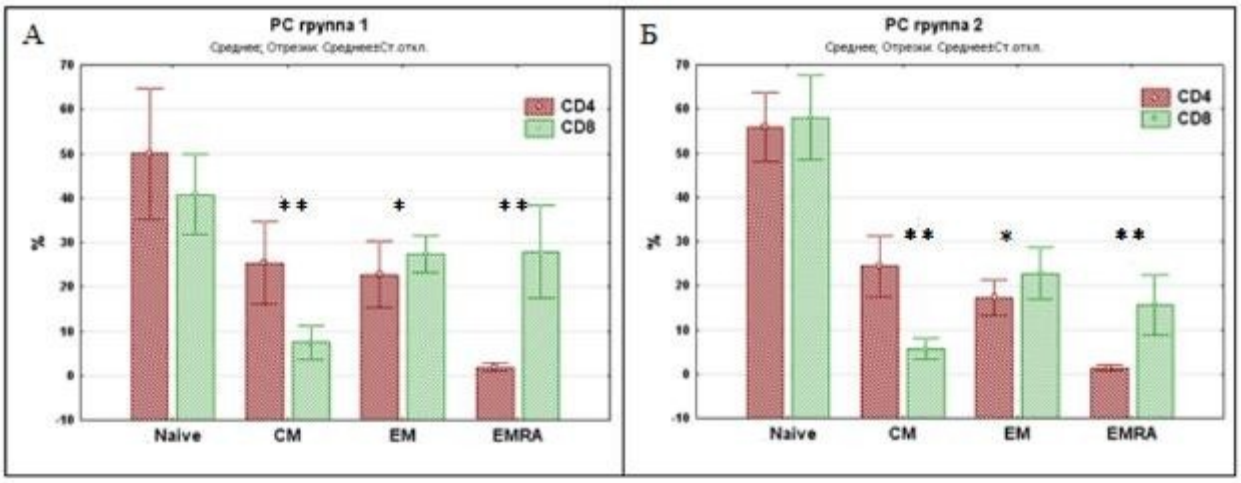
Получены достоверные отличия по относительному содержанию популяций TcytNAIVE, TcytCM, TcytEM в группе с НЭ относительно группы с эффективностью терапии до назначения ГИБП (Таблица 3.38).

Таблица 3.38 – Динамика относительного содержания $CD8^+$Т-клеток памяти у пациентов с РС с разной эффективностью терапии INFβ-1a

Популяция клеток, %	Периоды	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
TcytNAIVE	*До*	49,1 (37,2 - 53,5)	65,2 (54,0 - 75,2)**
	Инд	36,8 (33,2 - 43,9)	55,0 (48,6 - 59,9)**
	52 нед	41,9 (33,8 - 44,9)	51,9 (49,9 - 55,9)
TcytCM	*До*	7,2 (4,6 - 10,2)	3,7 (3,4 - 5,6)*
	Инд	7,7 (4,6 - 10,4)	5,2 (5,1 - 8,8)
	52 нед	3,6 (3,5 - 4,4)	5,1 (3,2 - 6,4)
TcytEM	*До*	29,3 (23,8 - 32,3)	20,6 (14,9 - 22,9)*
	Инд	27,3 (25,5 - 29,5)	20,7 (19,9 - 30,9)
	52 нед	29,1 (27,8 - 33,7)	26,3 (20,6 - 28,4)
TcytEMRA	*До*	17,1 (11,9 - 26,7)	9,7 (5,1 - 24,6)
	Инд	32,8 (24,9 - 39,5)	16,7 (12,4 - 21,9)**
	52 нед	24,6 (17,6 - 34,9)	16,9 (13,0 - 34,4)
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$			

Наблюдалось достоверно более высокое содержание популяции TcytNAIVE у пациентов с РС в группе с эффективностью терапии относительно группы с НЭ до назначения ГИБП и эти различия между группами сохранялись и в период после индукционного курса. Кроме того, до назначения ГИБП относительное содержание TcytCM, TcytEM было достоверно ниже у пациентов с РС в группе с хорошим эффектом. Также, наблюдалось достоверно более низкое содержание TcytEMRA в группе пациентов с эффективностью ГИБП после индукционного курса, но к году терапии достоверных различий между группами не отмечалось.

Анализ содержания Т-клеток памяти у пациентов с РС показал, что соотношение между популяциями $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клеток памяти в группах 1 и 2 были аналогичными (Рисунок 3.42).



Примечание: * – достоверность различий между CD4 и CD8 в группах с p<0,05; ** – достоверность различий между CD4 и CD8 в группах с p<0,001

Рисунок 3.42 – Популяции $CD4^+$ Т-клеток памяти и $CD8^+$ Т-клеток памяти у пациентов с РС в группе 1 (А) и в группе 2 (Б)

Показано, что относительное содержание CD4+Т-клеток памяти было достоверно выше в популяциях клеток СМ и ниже в популяциях ЕМ и EMRA как в 1 (Рисунок 3.42А), так и во 2 группе, аналогично результатам у пациентов с ВЗК (Рисунок 3.42Б).

ROC-анализ для групп пациентов с РС в период после индукционного курса показал отличное и очень хорошее качество для разделительной модели «эффективность – неэффективность» для относительного содержания популяций Т-клеток памяти: ТЕМ, TcytEMRA (Рисунок 3.43А), TcytNAIVE (Рисунок 3.43Б).

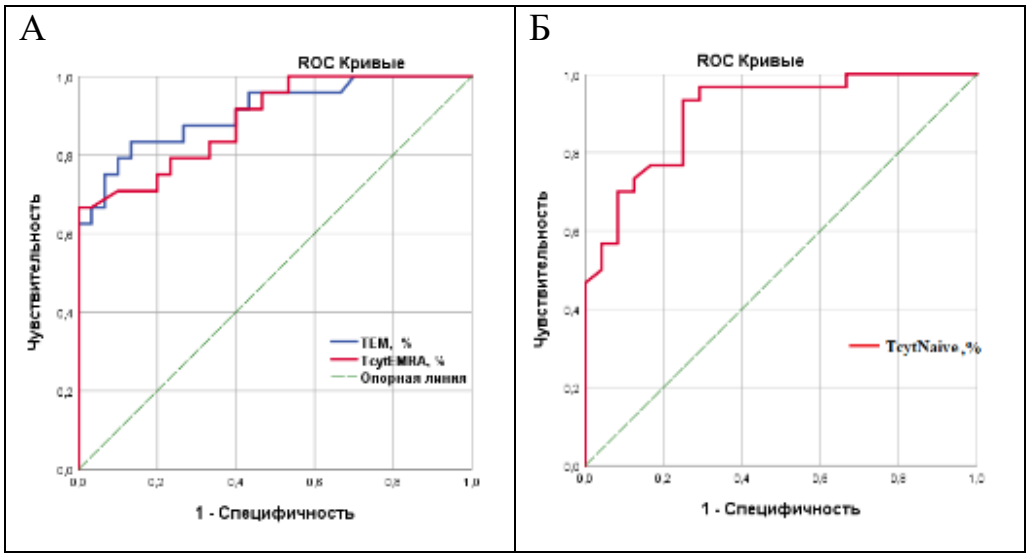


Рисунок 3.43 – ROC-кривые для разделительной модели состояний «эффективность – неэффективность» по популяциям Т-клеток памяти у пациентов с РС после индукционного курса: ТЕМ, TcytEMRA (А); TcytNAIVE (Б)

Получены пороговые значения для относительного содержания популяций TcytNAIVE, выше которых можно прогнозировать эффективность ГИБП (Таблица 3.39). Для относительного содержания популяций TEM, TcytEMRA получены пороговые значения, ниже которых можно прогнозировать эффективность ГИБП.

Таблица 3.39 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по популяциям клеток памяти у пациентов с РС после индукционного курса ГИБП в прогнозе эффективности терапии

Популяции клеток	AUC (95% доверит. инт)	Cut-off, %	Se, %	Sp, %
TEM, %	0,909 (0,829 - 0,989)	19,5	83,3	83,3
TcytNAIVE, %	0,903 (0,824 - 0,982)	42,4	93,3	75
TcytEMRA, %	0,890 (0,805 - 0,975)	21,5	75	76,7

ROC-анализ для других популяций клеток памяти не показал хорошего качества разделительной модели из-за большого разброса показателей. Значения AUC (95% доверит. инт) были следующие: TEMRA – 0,680 (0,550-0,850), TCM – 0,500 (0,325-0,675), TcytCM – 0,550 (0,381-0,719), TcytEM – 0,550 (0,376-0,724).

Корреляционные зависимости содержания Т-клеток памяти от возраста, длительности заболевания, длительности терапии, индексов PASI у пациентов с псориазом

У пациентов с ПС получены зависимости относительного содержания Т-клеток памяти от возраста и длительности заболевания (Таблица 3.40).

Таблица 3.40 – Корреляционные коэффициенты для популяций Т-клеток памяти в зависимости от возраста и длительности заболевания у пациентов с ПС

Популяции	От возраста		От длительности заболевания	
	r	p	r	p
TNAIVE	-0,39	<0,001	-0,39	<0,001
TCM	0,27	<0,001	0,18	0,002
TEM	0,23	0,002	0,30	<0,001
TEMRA	0,26	0,007	0,25	0,002
TcytNAIVE	-0,20	0,008	-	-
TcytCM	0,50	<0,001	0,49	<0,001

Получена умеренная отрицательная зависимость между относительным содержанием TNAIVE (Рисунке 3.44А), слабая отрицательная зависимость TcytNAIVE и возрастом. Относительное содержание TCM, TEM, TEMRA, TcytCM (Рисунке 3.44Б) увеличивалось с возрастом.

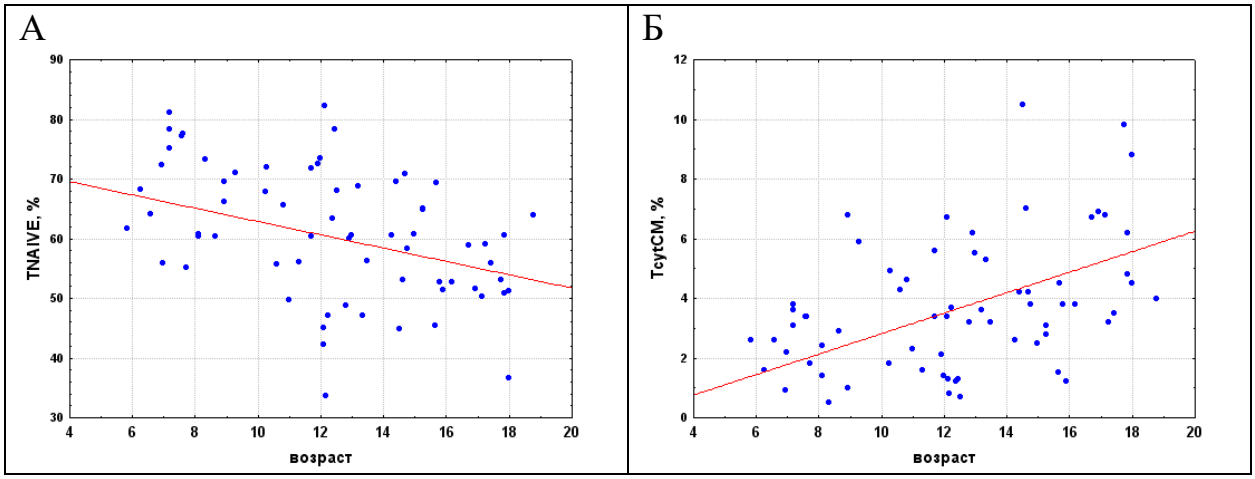


Рисунок 3.44 – Корреляционные зависимости относительного содержания TNAIVE (А) и TcytCM (Б) от возраста у пациентов с ПС

У пациентов с ПС выявлена зависимость от длительности заболевания для тех же популяций Т-клеток памяти, что и от возраста, кроме TcytNAIVE (зависимости не выявлено) (Таблица 3.40).

У пациентов с ПС не было выявлено зависимости относительного содержания популяций Т-клеток памяти от длительности терапии ГИБП.

Оценка относительного содержания популяций TNAIVE, TCM от индекса PASI показала достоверное снижение TNAIVE в группе пациентов с PASI>10

(Рисунок 3.45А). В тоже время, в этой же группе наблюдалось увеличение популяции центральных CD4+ Т-клеток памяти (TCM) (Рисунок 3.45Б).

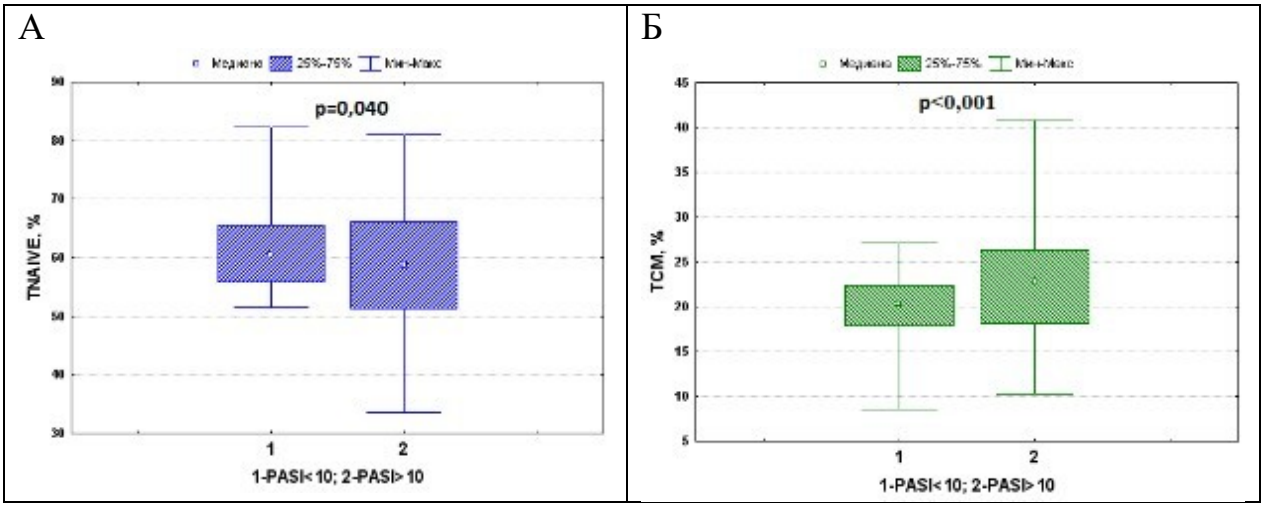


Рисунок 3.45 – Относительное содержание TNAIVE (А) и TCM (Б) в зависимости от индекса PASI у пациентов с ПС

Содержание $CD4^+$Т-клеток памяти и $CD8^+$Т-клеток памяти у пациентов с псориазом

Сравнительная оценка групп пациентов с ПС показала достоверно более высокое относительное содержание TNAIVE в группе с эффективностью ГИБП (группа 2) и более низкое содержания популяций TEM, TEMRA относительно группы с недостаточной эффективностью ГИБП (группа 1) во все периоды наблюдения (Таблица 3.41).

Таблица 3.41 – Динамика относительного содержания $CD4^+$Т-клеток памяти у пациентов с ПС с разной эффективностью терапии ГИБП

Популяция клеток, %	Периоды	Группа 1 (НЭ) Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 (Эффект) Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
TNAIVE	*До*	49,6 (45,4 - 60,7)	64,3 (60,1 - 72,7)**
	Инд	50,2 (45,0 - 59,1)	68,4 (59,2 - 73,6)**
	52 нед	52,2 (51,6 - 53,2)	63,0 (56,2 - 68,1)**
TCM	*До*	23,3 (17,2 - 28,6)	19,4 (16,5 - 23,8)
	Инд	26,4 (22,7 - 29,3)	18,9 (17,7 - 22,4)**
	52 нед	21,2 (20,5 - 22,6)	20,5 (16,8 - 23,5)
TEM	*До*	19,3 (15,3 - 24,7)	11,5 (7,2 - 12,7)*
	Инд	17,6 (10,2 - 19,9)	10,2 (7,5 - 14,1)**
	52 нед	18,5 (13,9 - 19,2)	11,1 (9,1 - 15,9)**
TEMRA	*До*	4,2 (3,5 - 7,5)	2,3 (1,5 - 3,7)*
	Инд	3,9 (2,8 - 4,3)	2,5 (1,7 - 4,9)*
	52 нед	8,9 (4,7 - 10,7)	2,8 (1,7 - 5,1)**
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$			

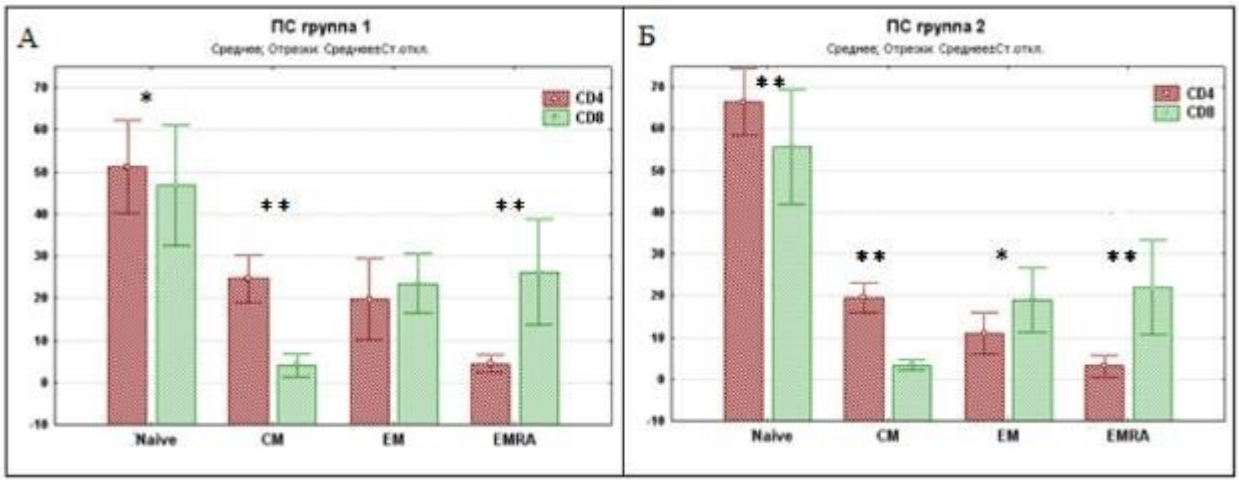
Относительное содержание Т-клеток центральной памяти было достоверно снижено в группе 2, но только в период после индукционного курса ГИБП.

Достоверные отличия по $CD8^+$ Т-клеткам памяти между группами пациентов с ПС были получены только для популяций TcytNAIVE – более высокие показатели в группе 2 после индукционного курса, TcytEM – более низкие показатели в период до назначения ГИБП и после индукционного курса (Таблица 3.42).

Таблица 3.42 – Динамика относительного содержания $CD8^+$Т-клеток памяти у пациентов с ПС с разной эффективностью терапии ГИБП

Популяция клеток, %	Периоды	Группа 1 $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$	Группа 2 $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$
TcytNAIVE	*До*	52,1 (39,3 - 59,1)	51,6 (44,2 - 67,4)
	Инд	46,1 (38,8 - 53,9)	60,7 (40,6 - 69,6)*
	52 нед	61,5 (21,7 - 63,4)	52,4 (42, 8 - 57,7)
TcytCM	*До*	3,2 (2,3 - 4,5)	3,6 (2,6 - 3,8)
	Инд	4,9 (0,8 - 6,7)	3,4 (2,9 - 3,5)
	52 нед	5,0 (1,2 - 9,8)	2,3 (1,6 - 3,0)
TcytEM	*До*	24,6 (20,7 - 31,2)	19,5 (11,3 - 22,4)*
	Инд	24,4 (21,5 - 26,6)	17,1 (11,8 - 22,3)*
	52 нед	13,1 (11,6 - 32,8)	22,2 (19,5 - 27,7)
TcytEMRA	*До*	18,2 (14,8 - 27,7)	21,5 (13,2 - 27,5)
	Инд	27,6 (18,9 - 36,6)	19,3 (14,7 - 27,1)
	52 нед	20,3 (15,3 - 44,3)	24,0 (17,3 - 28,9)
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$			

Сравнительный анализ соотношения популяций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти у пациентов с ПС показал наличие достоверных аналогичных отличий в группе 1 и группе 2 (Рисунок 3.46).



Примечание: * – достоверность различий между CD4 и CD8 в группах с $p<0,05$; ** – достоверность различий между CD4 и CD8 в группах с $p<0,001$

Рисунок 3.46 – Популяции $CD4^+$Т-клеток памяти и $CD8^+$Т-клеток памяти у пациентов с ПС в группе 1 (А) и в группе 2 (Б)

Относительное содержание TNAIVE и TCM было выше по сравнению с TcytNAIVE и TcytCM соответственно, а содержание TEMRA ниже в сравнении с TcytEMRA как в группе 1 (Рисунок 3.46А), так и в группе 2 (Рисунок 3.46Б).

Проведенный ROC-анализ у пациентов с ПС в период после индукционного курса показал хорошее и очень хорошее качество для разделительной модели «эффективность – неэффективность» для относительного содержания следующих популяций Т-клеток памяти: TCM, TNAIVE, TEM (Рисунок 3.47).

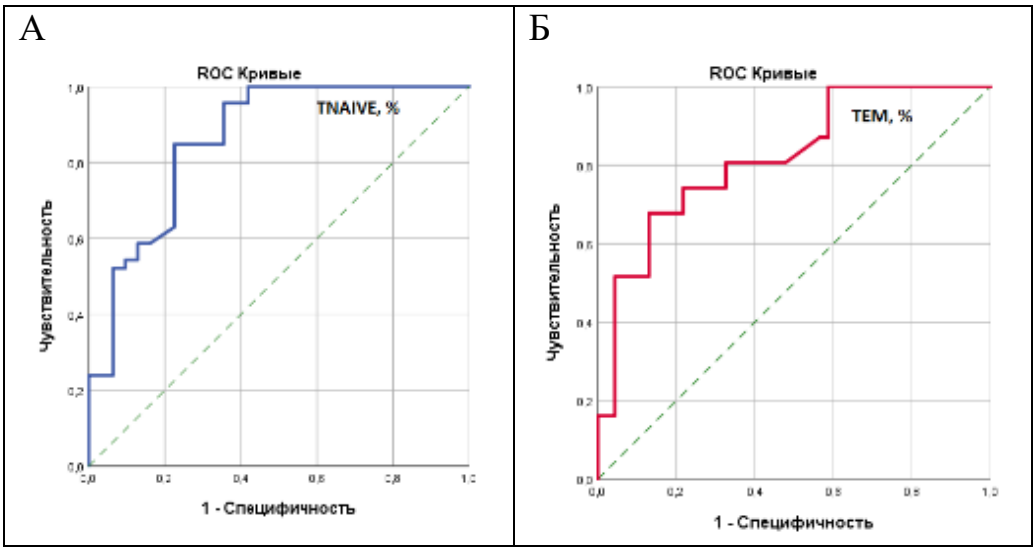


Рисунок 3.47 – ROC-кривые для разделительной модели состояний «эффективность – неэффективность» для популяций клеток памяти TNAIVE (А) и TEM (Б) у пациентов с ПС

Для относительного содержания популяции TNAIVE у пациентов с ПС были получены пороговые значения, выше которых можно прогнозировать эффективность ГИБП. Для относительного содержания популяции TEM получены пороговые значения ниже которых можно прогнозировать эффективность ГИБП (Таблица 3.43).

Таблица 3.43 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по популяциям Т-клеток памяти после индукционного курса у пациентов с ПС в прогнозе эффективности терапии ГИБП

Популяции клеток	AUC (95% доверит. инт)	Cut-off, %	Se, %	Sp, %
TNAIVE, %	0,860 (0,772 - 0,948)	58,9	84,8	77,4
TCM, %	0,765 (0,644 - 0,886)	22,2	77,4	67,7
TEM, %	0,819 (0,724 - 0,914)	12,9	74,2	73,9

Для других популяций Т-клеток памяти также был проведен ROC-анализ, но из-за больших разбросов показателей получены недостаточно хорошие показатели

AUC (95% доверит. инт): TcytNAIVE – 0,689 (0,567- 0,811), TEMRA – 0,741 (0,627-0,854), TcytCM – 0,572 (0,425-0,720), TcytEMRA – 0,593 (0,463-0,723), TcytEM – 0,708 (0,587- 0,830).

Резюме.

1. У пациентов с ВЗК, РС и ПС выявлена зависимость содержания субпопуляций Т-клеток памяти от возраста. При всех патологиях отмечалось снижение TNAIVE с возрастом. Для популяций Т-клеток памяти получена умеренная корреляционная зависимость от длительности заболевания: положительная для TEM, TEMRA- у пациентов с РС; отрицательная для популяции TNAIVE и положительная для популяций TEM и TcytCM - у пациентов с ПС.

2. При ВЗК и ПС наблюдалось снижение доли наивных Т-клеток памяти и увеличение доли популяции Т-клеток центральной памяти при увеличении индексов активности заболевания. У пациентов с РС в группе пациентов с наличием активных очагов также выявлялось снижение содержания наивных Т-клеток памяти и увеличение доли популяции Т-клеток эффекторной памяти.

3. Выявлено повышение содержания популяции наивных CD4+ Т-клеток памяти в группе с эффективностью лечения ГИБП у пациентов с ВЗК во все периоды наблюдения (до ГИБП, после индукционного курса, к году терапии ГИБП), у пациентов с ПС - (после индукционного курса, к году терапии).

4. Выявлено повышение доли популяции наивных CD8+Т-клеток в группе с эффективностью лечения ГИБП у пациентов с ВЗК и РС до назначения ГИБП и после индукционного курса, а у пациентов с ПС – после индукционного курса.

5. У пациентов с ВЗК, ПС и РС наблюдалось снижение доли популяции центральных CD4+ Т-клеток памяти в группе с эффективностью лечения ГИБП после индукционного курса.

6. Соотношение долей $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти было аналогично для пациентов всех обследованных пациентов: содержание CD4 Т-клеток центральной памяти было выше, чем содержание CD8+ Т-клеток центральной памяти; $CD8^+$ Т-клетки памяти превалировали в популяции терминально-дифференцированной памяти.

7. У пациентов с ВЗК, РС и ПС определены значения cut-off для относительного количества наивных и Т-клеток памяти. При значениях выше пороговых для TNAIVE и TcytNAIVE можно ожидать эффективность ГИБП, при значениях выше пороговых для TCM, TEM, TcytEMRA можно ожидать развитие недостаточной эффективности ГИБП.

Материалы, изложенные в разделе 3.1 опубликованы [40, 41, 42, 45, 66, 67, 69].

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

Антигенная стимуляция активирует дифференцировку и пролиферацию наивных Т-лимфоцитов с образованием эффекторных клеток. Этот процесс сопряжен с перестройкой метаболизма покоящихся лимфоцитов с окислительного фосфорилирования (OXPHOS) на аэробный гликолиз (феномен Варбурга) в условиях достаточного поступления кислорода. Гликолиз в сравнении с OXPHOS менее эффективен по количеству образующегося АТФ на 1 молекулу глюкозы, но при этом во время активации Т-клеток интенсивность реакций гликолиза увеличивается в десятки раз и в ходе 10 ферментных стадий гликолиза при превращении глюкозы в пируват, генерируются промежуточные молекулы для синтеза нуклеиновых кислот, липидов и аминокислот, необходимых для построения структур клеток во время процесса пролиферации Т-клеток. Известно, что для субпопуляций активированных $CD4^+$ Т-клеток (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22) характерно усиление процессов гликолиза.

Воздействие на метаболические пути рассматривается как перспективное направление для лечения ИЗЗ. Так, например, ингибирование гликолиза в Т-лимфоцитах с помощью 2-дезоксиглюкозы приводит к снижению воспалительного процесса при ревматоидном артрите.

В данном разделе оценивали метаболическую активность популяций лимфоцитов по количеству белков OXPHOS и гликолиза у пациентов с ИЗЗ, уровеню активности отдельных митохондриальных ферментов: сукцинатдегидрогеназы (II комплекс OXPHOS), глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (сопряженность гликолиза с циклом Кребса), а также содержание популяций лимфоцитов с экспрессией ферментов пуринергической системы регуляции (эктонуклеотидазы $CD39^+$ и $CD73^+$) у пациентов с ИЗЗ при разной эффективности терапии.

Для выполнения поставленной задачи пациенты с ВЗК (ВЗК IFX – пациенты, получающие инфликсимаб; ВЗК ADA - пациенты, получающие адалимумаб), с ПС (при терапии ADA) и с РС (при терапии INFβ-1a) были поделены на группы в зависимости от эффективности ГИБП к году терапии – группа 1 (недостаточная эффективность – НЭ), группа 2 (эффективность) (Таблица 3.44).

Таблица 3.44 – Распределение пациентов с ИЗЗ по группам в зависимости от эффективности ГИБП при исследовании активности СДГ/ГФДГ

Группы / Патология	НЭ	Эффективность	Всего пациентов
ВЗК IFX	56	57	113
ВЗК ADA	30	34	64
ПС	27	49	76
РС	40	37	77
Группа сравнения	46		

3.2.1. Метаболическая активность популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности блокаторов TNF у детей с воспалительными заболеваниями кишечника

Активность СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов в группах с ВЗК IFX до назначения терапии

У пациентов с ВЗК сравнили активность СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов между группами с разной эффективностью терапии инфликсимабом до начала введения препарата и относительно группы сравнения (Таблица 3.45).

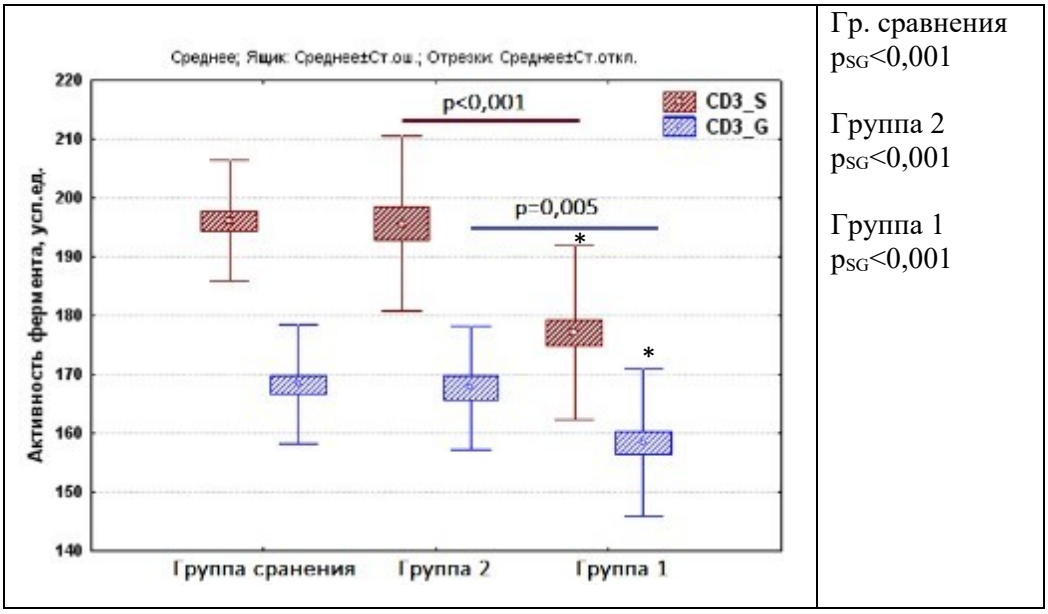
Таблица 3.45 – Активность СДГ и ГФДГ в основных и малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов у пациентов с ВЗК при разной эффективности IFX до назначения терапии

Популяция клеток	Ферменты	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	p $_{1_2}$	Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*СДГ*	170,8 (166,6 - 187,1)**	195,8 (190 - 204,8)	****	196,0 (188,2 - 201,6)
	ГФДГ	155,9 (150,4 - 168,7)**	168,7 (158,7 - 172,1)	***	168,9 (162,1 - 176,2)
CD4	*СДГ*	171,7 165 - 186,5)**	193,6 (183,9 - 209,2)	****	195,0 (184,8 - 202,2)
	ГФДГ	151,6 (147 - 165,1)**	165,6 (156,1 - 172,9)	****	166,7 (162,1 - 174,1)
CD8	*СДГ*	175,9 (166,6 - 192,5)**	196,7 (185,5 - 206,2)	****	198,8 (192,9 - 204,9)
	ГФДГ	165,2 (160 - 177,7)*	173,6 (165,9 - 177,8)		177,7 (168,3 – 179,6)
CD19	*СДГ*	134,6 (127 - 145,1)**	142,9 (132,3 - 154,9)*	***	150,0 (141,9 – 156)
	ГФДГ	141,3 (133,2 - 148,8)**	145,5 (140,6 - 152,3)*		151,5 (146,2 - 158)
NK	*СДГ*	162,7 (153,7 - 173,1)**	166,5 (159,8 - 185,5)*		181,9 (175,4 - 189,6)
	ГФДГ	163,2 (160,7 - 167,8)*	166 (163,1- 173,8)*		167,0 (161,4 – 174,5)
Thact	*СДГ*	193,6 (180,4 – 205,7)*	216,9 (190,6 – 229,0)*	****	199 (192,1 - 206,6)
	ГФДГ	172,0 (163,5 – 181,5)**	181,6 (171,5 – 186,9)		181,6 (174,5 - 190,4)
Treg	*СДГ*	183,7 (178,1 – 196,3)**	204,6 (189,9 - 223,7)	****	203,7 (195,9 - 210,5)
	ГФДГ	169,4 (167,1 – 173,8)**	176,8 (164,8 - 186,6)	***	177,6 (172,5 - 182,2)
Th17	*СДГ*	185,3 (176,4 – 188,1)**	186,5 (186 - 191,8)	****	193,9 (186,1 - 200,6)
	ГФДГ	166,8 (158,0 – 175,5)**	166,4 (154,6 - 166,5)	****	168,9 (160,9 - 175,8)

Примечание: * - достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, p<0,05; ** - достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, p<0,001; *** – между группами 1 и 2 с p<0,05; **** – достоверность различий между группами 1 и 2 с p<0,001

Анализ активности СДГ и ГФДГ во всех исследованных популяциях лимфоцитов показал достоверное снижение в группе 1 (НЭ) у пациентов ВЗК IFX относительно группы сравнения (Таблица 3.45). При этом в группе 2 пациентов ВЗК IFX активность СДГ и ГФДГ была значимо ниже относительно группы сравнения только в популяциях В-лимфоцитов и NK-клеток, а также выявлялись достоверно более высокие значения активности СДГ в Thact (Таблица 3.45).

Сравнение активности СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов показало, что в популяции CD3 лимфоцитов активность СДГ достоверно выше, чем активность ГФДГ в группе сравнения и у пациентов ВЗК IFX группы 1 и группы 2 (Рисунок 3.48).



Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ

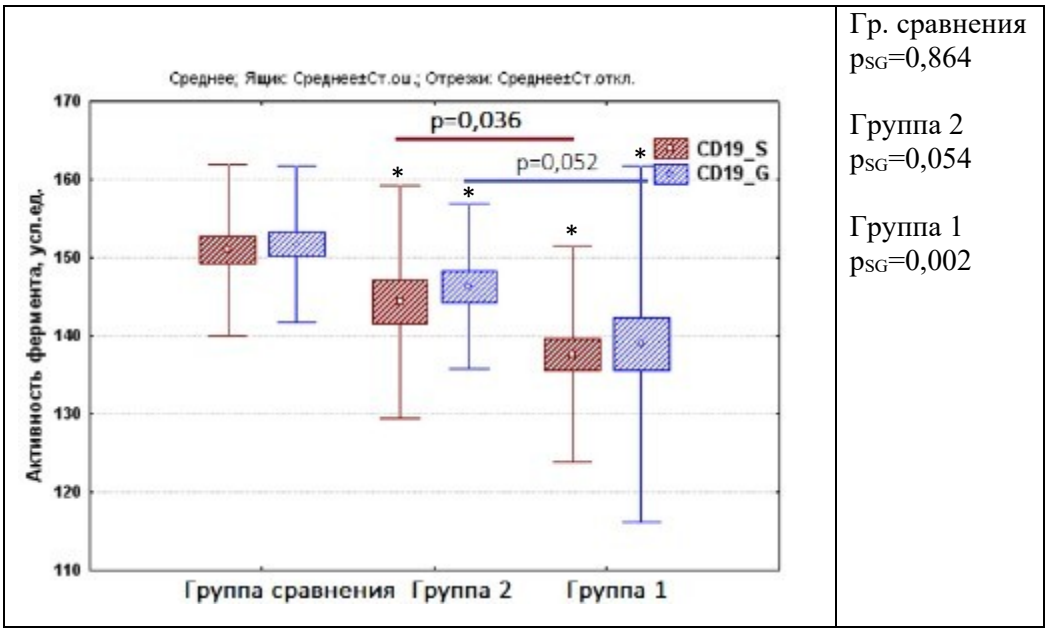
Рисунок 3.48 – Активность СДГ и ГФДГ в CD3 лимфоцитах у детей с ВЗК до назначения IFX и в группе сравнения

Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов достоверно было ниже в группе 1 относительно группы сравнения (1,17 (1,09-1,21) и составляло – 1,12 (1,08-1,16), p=0,011. В группе 2 относительно группы сравнения отличий по соотношению СДГ/ГФДГ не выявлено, в этой группе соотношение составляло – 1,15 (1,14-1,18), p=0,676. Соотношение СДГ/ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов у пациентов группы 1 (НЭ) было значимо ниже, чем в группе 2 (p=0,005). При этом, активность СДГ и ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов у

пациентов группы 2 достоверно не отличалась от группы сравнения и была выше, чем у пациентов группы 1 (Рисунок 3.48; Таблица 3.45).

В группе сравнения показатели активности СДГ и ГФДГ в популяции В-лимфоцитов не отличались, а у пациентов ВЗК IFX в группе 1 (НЭ) активность ГФДГ была достоверно выше, чем активность СДГ. Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции CD19 лимфоцитов в группе 1 (НЭ) было достоверно ниже, чем в группе сравнения (0,96 (0,93-0,99) против 1,00 (0,97-1,05), p=0,009). В группе 2 соотношение ферментов не отличалось от группы сравнения и составляло – 0,97 (0,95-1,01), p=0,141. При этом, показатель соотношения СДГ/ГФДГ в популяции CD19 лимфоцитов между группами пациентов ВЗК IFX с разной эффективностью лечения достоверно не различался (p=0,149).

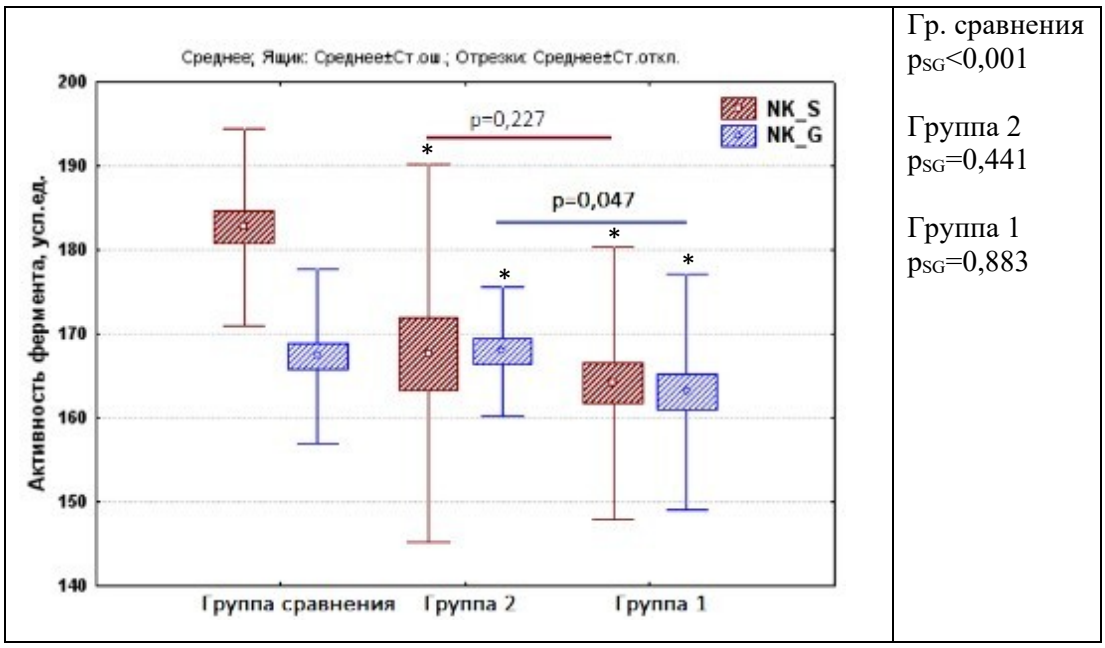
В группах пациентов 1 и 2 наблюдались достоверно более низкие показатели активности как СДГ, так и ГФДГ в популяции В-лимфоцитов относительно группы сравнения (Рисунок 3.49, Таблица 3.45). При этом, активность СДГ в группе 2 была значимо выше, чем в группе 1 у пациентов ВЗК IFX (Рисунок 3.49*)*.



Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ

Рисунок 3.49 – Активность СДГ и ГФДГ в CD19 лимфоцитах у детей с ВЗК до назначения IFX и в группе сравнения

Анализ активности дегидрогеназ в популяции NK-клеток показал, что в группе сравнения активность СДГ значимо выше, чем активность ГФДГ. У пациентов ВЗК IFX в обеих группах значимых отличий в популяции NK-клеток между показателями активности СДГ и ГФДГ не наблюдалось (Рисунок 3.50).



Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ

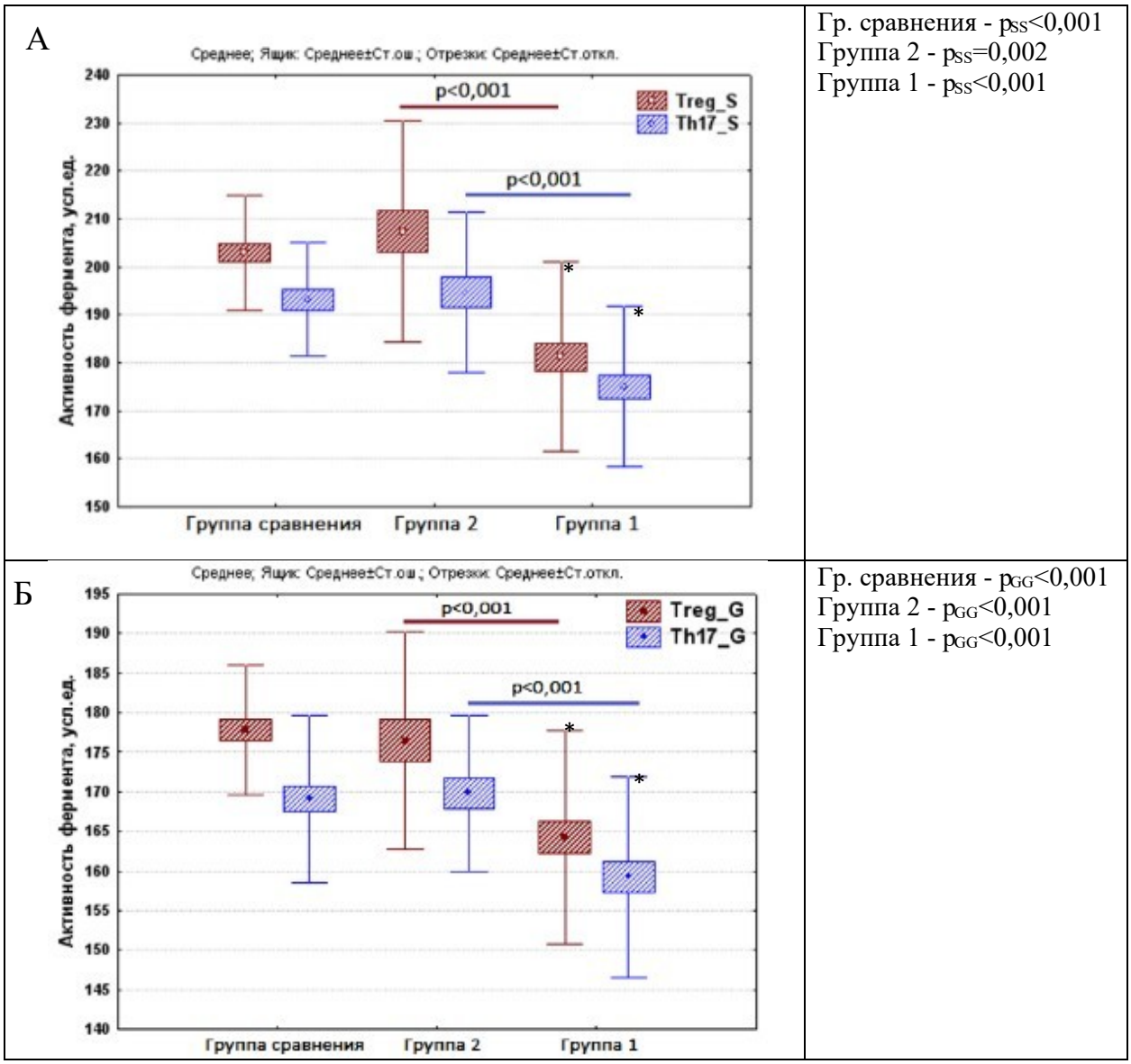
Рисунок 3.50 – Активность СДГ и ГФДГ в NK-клетках у детей с ВЗК до назначения IFX и в группе сравнения

Активность СДГ и ГФДГ в популяции NK-клеток в группах 1 и 2 пациентов была достоверно ниже, чем в группе сравнения. В группе 1 пациентов ВЗК IFX наблюдалось достоверное снижение активности ГФДГ в NK-клетках относительно группы 2 (Рисунок 3.50).

Соотношение ферментов в популяции NK-клеток в группе сравнения (1,07 (1,02-1,14)) было достоверно выше, чем в группе пациентов группы 1 (1,00 (0,98-1,05), p <0,001) и в группе 2 (1,01 (0,98-1,07), p=0,001). Соотношение СДГ/ГФДГ в популяции NK лимфоцитов между группами 1 и 2 пациентов ВЗК IFX достоверно не отличалось (p=0,687).

Анализ активности ферментов в субпопуляциях $CD4^+$ Т-клеток показал, что активность СДГ в Treg выше активности СДГ в Th17-лимфоцитах как в группе сравнения, так и у детей с ВЗК. При этом, выявлено, что в группе 1 (НЭ) показатели

активности СДГ и ГФДГ в популяции Treg значимо ниже, чем в группе 2 и в группе сравнения (Рисунок 3.51).



Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами в популяции Treg; синей чертой показана достоверность между группами в популяции Th17-лимфоцитов

Рисунок 3.51 – Активность СДГ в Treg и Th17-лимфоцитах (А), ГФДГ в Treg и Th17-лимфоцитах (Б) у детей с ВЗК до назначения IFX и в группе сравнения

Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции Treg в группе 1 пациентов ВЗК IFX достоверно не отличалось от группы сравнения (1,13 (1,09-1,18) и составляло – 1,16 (1,07-1,22), p=0,235. В то же время, соотношение СДГ/ГФДГ было значимо выше в группе 2 по сравнению с группой сравнения и составляло – 1,14 (1,08 – 1,25), p=0,001. При этом, разницы в соотношении СДГ/ГФДГ в

популяции Treg между группами 1 и 2 пациентов ВЗК IFX выявлено не было (p=0,192).

Соотношение активности ферментов СДГ/ГФДГ в популяции Th17-лимфоцитов было ниже в группе 1 пациентов ВЗК IFX относительно группы сравнения (1,09 (1,05-1,14) против 1,15 (1,09-1,20), p=0,003) и относительно группы 2 (1,14 (1,11-1,16), p=0,001). Значимых отличий в соотношении СДГ/ГФДГ в популяции Th17-клеток между группой 2 и группой сравнения выявлено не было (p=0,769).

Активность СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК ADA до назначения терапии

В группе 1 пациентов ВЗК ADA выявлены более низкие значения активности СДГ и ГФДГ относительно группы сравнения практически во всех популяциях лимфоцитов за исключением активности СДГ в Thact и ГФДГ в Th17-лимфоцитах (Таблица 3.46).

Таблица 3.46 – Активность СДГ и ГФДГ в основных и малых популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК при разной эффективности ADA до назначения терапии

Популяция клеток	Ферменты	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	p_{1_2}	Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*СДГ*	182,5 (170,8 - 184,3)**	194,0 (192,2 - 196,9)	***	196,0 (188,2 - 201,6)
	ГФДГ	162,6 (161,5 - 165,7)*	167,8 (151,4 - 168,8)*		168,9 (162,1 - 176,2)
CD4	*СДГ*	181,5 (179,3 - 184,9)**	195,2 (192,1 - 208,2)	***	195,0 (184,8 - 202,2)
	ГФДГ	159,9 (156,4 - 165,6)*	164,9 (152,9 - 168,2)*		166,7 (162,1 - 174,1)
CD8	*СДГ*	177,1 (158,8 - 189,1)**	197,2 (194,9 - 202,8)	****	198,8 (192,9 - 204,9)
	ГФДГ	166,4 (162,1 - 172,1)*	170,0 (156,3 - 172,7)*		177,7 (168,3 - 179,6)

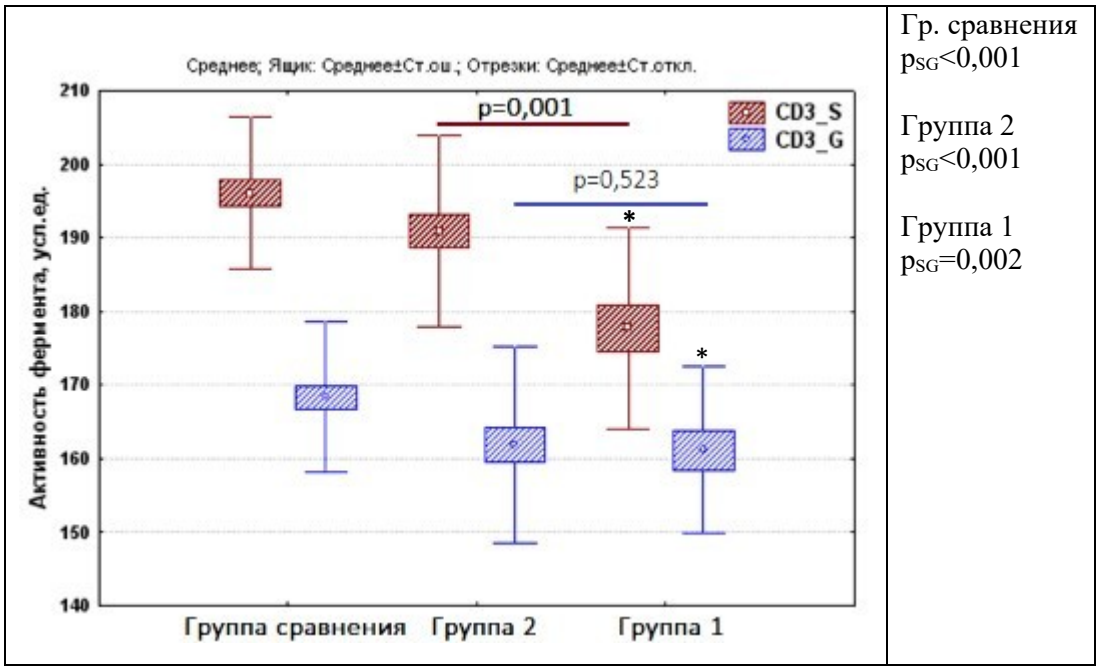
Продолжение Таблицы 3.46

Популяция клеток Ферменты		Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	p $_{1_2}$	Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD19	*СДГ*	134,1 (124,4 - 141,9)*	143,1 (137,4 - 148,0)*	***	150,0 (141,9 - 156)
	ГФДГ	144,0 (139,6 - 155,9)*	142,3 (137,2 - 160,5)		151,5 (146,2 - 158)
NK	*СДГ*	133,1 (128,1 - 170,4)**	165 (123,7 - 167,8)*		181,9 (175,4 - 189,6)
	ГФДГ	162,0 (150,4 - 166,9)*	164,2 (138,6 - 170,4)*		167,0 (161,4 - 174,5)
Thact	*СДГ*	193,6 (180,4 - 205,7)	202,3 (195,6 - 226,9)	***	199 (192,1 - 206,6)
	ГФДГ	172,0 (163,5 - 181,5)*	174,6 (172,4 - 176,9)*		181,6 (174,5 - 190,4)
Treg	*СДГ*	183,7 (178,1 - 196,3)**	199,2 (189,2 - 208,5)	****	203,7 (195,9 - 210,5)
	ГФДГ	169,4 (167,1 - 173,8)*	174,5 (161,6 - 175,1)*		177,6 (172,5 - 182,2)
Th17	*СДГ*	185,3 (176,4 - 188,1)*	186,5 (186,0 - 191,8)*		193,9 (186,1 - 200,6)
	ГФДГ	166,8 (158,0 - 175,5)	166,4 (154,6 - 166,5)*		168,9 (160,9 - 175,8)

Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, p<0,05; ** – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, p<0,001; *** – между группами 1 и 2 с p <0,05; **** – достоверность различий между группами 1 и 2 с p <0,001

В группе 2 у пациентов ВЗК ADA значимо более низкие значения активности СДГ наблюдались в популяциях В-лимфоцитов, NK-клетках и Th17-лимфоцитах, а по активности ГФДГ - во всех популяциях, кроме В-лимфоцитов относительно группы сравнения (Таблица 3.46).

Активность СДГ в популяции CD3 лимфоцитов во всех изученных группах была значимо выше, чем активность ГФДГ (Рисунок 3.52).



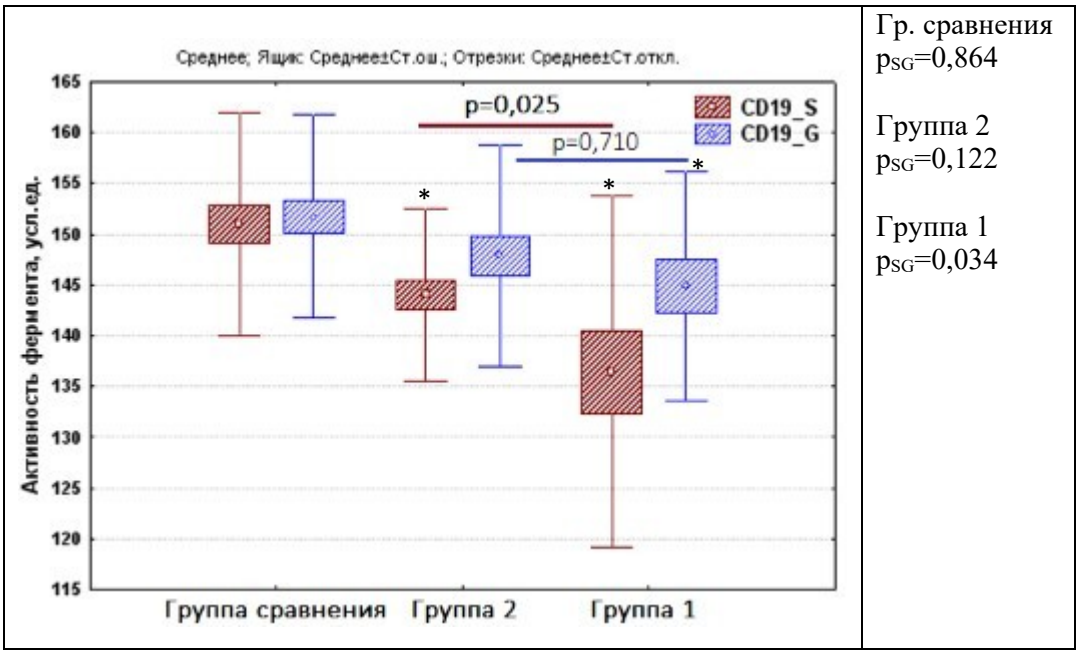
Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ.

Рисунок 3.52 – Активность СДГ и ГФДГ в CD3 лимфоцитах у детей с ВЗК до назначения ADA и в группе сравнения

В группе 1 у пациентов ВЗК ADA активность СДГ в популяции CD3 лимфоцитов была значимо ниже, чем в группе 2 и в группе сравнения (Рисунок 3.52, Таблица 3.46). По активности ГФДГ в CD3 лимфоцитах значимых отличий между группами пациентов не выявлено (Рисунок 3.52).

Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов у пациентов ВЗК ADA было достоверно ниже в группе 1 относительно группы сравнения (1,13 (1,12 - 1,15) против 1,17 (1,09 - 1,21), p=0,025) в основном за счёт снижения активности СДГ. Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов в группе 2 значимо не отличалось от группы сравнения и составляло 1,15 (1,12 - 1,33), p=0,923. Показатели соотношения СДГ/ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов между группами пациентов 1 и 2 не отличались (p=0,171).

В популяции В-лимфоцитов у пациентов группы 1 наблюдались достоверно более низкие значения активности СДГ, чем ГФДГ (в группе сравнения и в группе 2 достоверных различий не выявлено) (Рисунок 3.53).



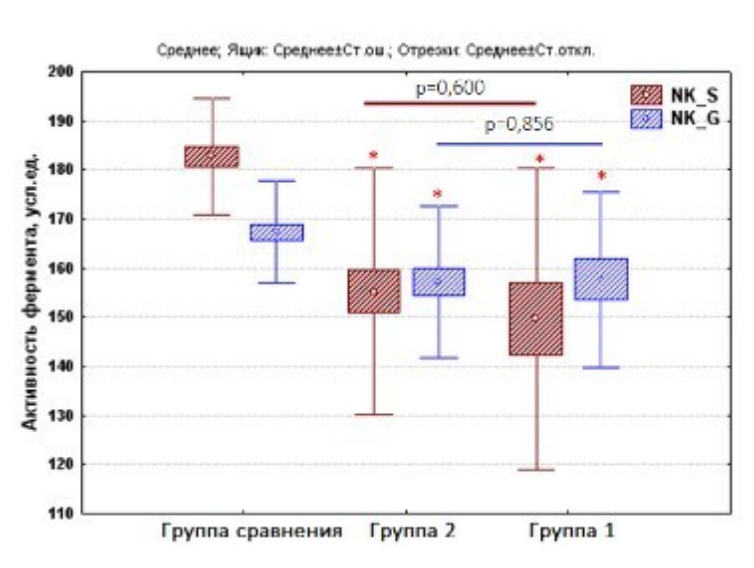
Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ

Рисунок 3.53 – Активность СДГ и ГФДГ в CD19 лимфоцитах у детей с ВЗК до назначения ADA и в группе сравнения

Отмечались достоверно более низкие значения активности СДГ в популяции В-лимфоцитов у пациентов ВЗК ADA относительно группы сравнения в группе 1 и группе 2, а по активности ГФДГ – более низкие значения только в группе 1 (Рисунок 3.53). Значимые отличия между группами пациентов наблюдались только по активности СДГ (значимо более низкие значения в группе 1) (Рисунок 3.53).

Соотношение ферментов в популяции CD19 лимфоцитов в группе 1 было достоверно ниже, чем в группе сравнения (1,00 (0,97-1,05) и составляло – 0,96 (0,93-0,98), p=0,016. В группе 2 соотношение ферментов не отличалось от показателей группы сравнения – 0,97 (0,94-1,04), p=0,923. При этом, по соотношению СДГ/ГФДГ в популяции CD19 лимфоцитов группы пациентов ВЗК ADA достоверно не отличались (p=0,272).

В популяции NK-клеток показатели активности СДГ и ГФДГ у пациентов ВЗК ADA в группах 1 и 2 были значимо ниже, чем в группе сравнения (Рисунок 3.54).



Гр. сравнения p_{SG}<0,001

Группа 2 p_{SG}=0,864

Группа 1 p_{SG}=0,814

Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ

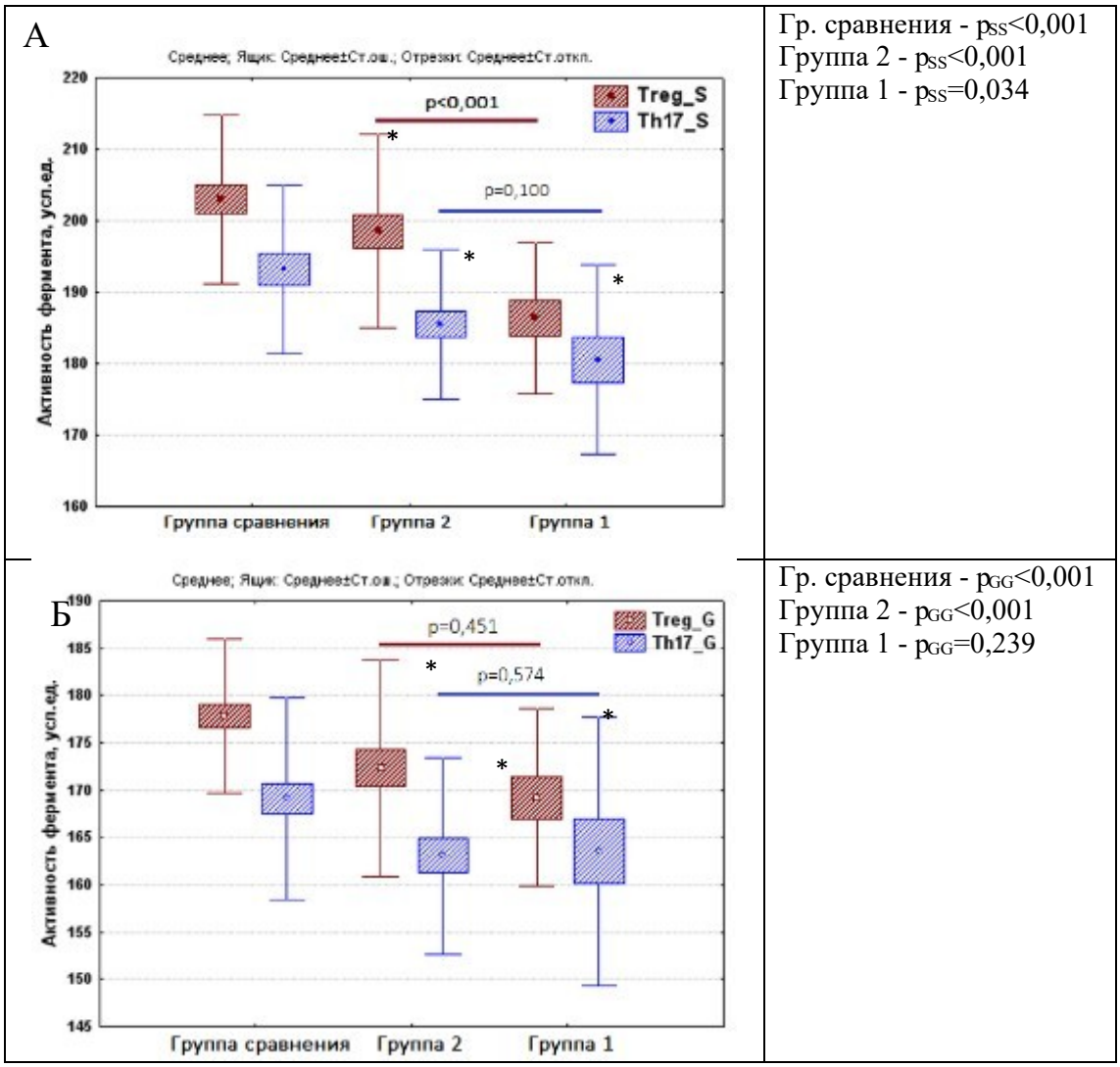
Рисунок 3.54 – Активность СДГ и ГФДГ в NK лимфоцитах у детей с ВЗК до назначения ADA и в группе сравнения

Сравнение показателей активности СДГ и ГФДГ в популяции NK-клеток выявила более высокие значения СДГ, чем ГФДГ только в группе сравнения. У пациентов ВЗК ADA в группе 1 и группе 2 значимых отличий между активностью СДГ и ГФДГ не выявлено (Рисунок 3.54). Соотношение ферментов в популяции NK-клеток у пациентов ВЗК ADA достоверно отличалось от группы сравнения (1,07 (1,02-1,14)) и было ниже в группе 1 – 0,94 (0,88-1,03), p <0,001 и в группе 2 – 0,98 (0,89-1,00), p<0,001. По соотношению СДГ/ГФДГ в популяции NK-клеток группы пациентов ВЗК ADA достоверно не отличались (p=0,474).

Анализ активности митохондриальных дегидрогеназ в малых $CD4^+$ Т-лимфоцитах показал достоверно более низкую активность СДГ в Th17-лимфоцитах, чем в популяции Treg во всех исследованных группах (группа сравнения, группы пациентов ВЗК ADA) (Рисунок 3.55А). В то время как активность ГФДГ была значимо ниже в популяции Th17, чем в Treg в группе сравнения и в группе 2 у пациентов ВЗК ADA. В группе 1 достоверных отличий по активности ГФДГ между популяциями Th17 и Treg не выявлено (Рисунок 3.55Б).

У пациентов ВЗК ADA относительно группы сравнения значимо более низкие значения активности СДГ отмечались в популяции Treg в группе 1, а в Th17-

лимфоцитах - в обеих группах (Рисунок 3.55А). В обеих группах у пациентов ВЗК ADA выявлялись значимо более низкие значения активности ГФДГ в популяции Treg относительно группы сравнения, а для Th17-лимфоцитов - только в группе 2. При этом, достоверно более низкая активность СДГ в популяции Treg отмечалась в группе 1, чем в группе 2 (Рисунок 3.55А). Достоверных отличий между группами пациентов ВЗК ADA по активности ГФДГ в популяциях Treg и Th17-лимфоцитов не выявлено (Рисунок 3.55Б).



Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами в популяции Treg; синей чертой показана достоверность между группами в популяции Th17-лимфоцитов

Рисунок 3.55 – Активность СДГ в Treg и Th17-лимфоцитах (А), ГФДГ в Treg и Th17-лимфоцитах (Б) у детей с ВЗК до назначения ADA и в группе сравнения

Соотношение ферментов в популяции Treg лимфоцитов у пациентов ВЗК ADA в группе 1 достоверно не отличалось от группы сравнения (1,13 (1,09-1,18) и

составляло – 1,15 (1,11-1,18), p=0,367. В то же время, соотношение СДГ к ГФДГ у пациентов ВЗК ADA в группе 2 было достоверно выше относительно группы сравнения и составляло – 1,14 (1,12-1,35), p=0,049. При этом, по соотношению СДГ/ГФДГ в популяции Treg лимфоцитов группы пациентов ВЗК ADA достоверно не отличались (p=0,523).

Соотношение активности ферментов СДГ/ГФДГ в популяции Th17-лимфоцитов у пациентов ВЗК ADA достоверно не отличалось от показателей группы сравнения (1,15 (1,09-1,20) и составляло: в группе 1 – 1,09 (1,05-1,14), p=0,103; в группе 2 – 1,14 (1,11-1,16), p=0,489. По соотношению СДГ/ГФДГ в популяции Th17-лимфоцитов группы пациентов ВЗК ADA также достоверно не отличались (p=0,224).

Таким образом, анализ соотношения СДГ/ГФДГ у пациентов ВЗК IFX и ВЗК ADA в отдельных популяциях лимфоцитов показал достоверное отличие группы 1 и группы 2 относительно группы сравнения: в популяции В-лимфоцитов выявлено более низкое значение показателя у пациентов группы 1; в NK клетках – более низкие значения у пациентов обеих групп; в Treg - более высокое значение в группе 2.

Активность СДГ и ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК с разной эффективностью лечения IFX

Анализ активности митохондриальных дегидрогеназ в основных популяциях лимфоцитов показал, что в группе ВЗК IFX активность СДГ в популяциях лимфоцитов CD3, CD4, CD8 была достоверно более низкая в группе НЭ (группа 1) по сравнению с группой с эффективным лечением (группа 2) на протяжении всего периода наблюдений, а в популяции CD19 лимфоцитов – в течении года терапии (Таблица 3.47). Активность СДГ в NK клетках была значимо ниже в группе с НЭ после индукционного курса и к году терапии IFX.

Таблица 3.47 – Динамика активности СДГ и ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК IFX при терапии IFX

Популяция клеток Ферменты		Период терапии ГИБП	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*СДГ ГФДГ*	*До*	170,8 (166,6 - 187,1) 155,9 (150,4 - 168,7)	195,8 (190 - 204,8)** 168,7 (158,7 - 172,1)*
		Инд.курс	185,7 (166,7 - 193,7) 163,9 (154,3 - 166,8)	190,6 (183,6 - 210,9) * 167,8 (163 - 170,4) *
		52 нед	170,4 (159,5 - 188,4) 161,7 (148,2 - 171,7)	200,9 (183,7 - 211,8) ** 174,9 (166,7 - 185,3) **
		1-3 года	171,9 (160,9 - 184,2) 159,1 (146,3 - 171,5)	184,5 (169,5 - 196,6) * 167,8 (154,3 - 174,1)
CD4	*СДГ ГФДГ*	*До*	171,7 (165 - 186,5) 151,6 (147 - 165,1)	193,6 (183,9 - 209,2) ** 165,6 (156,1 - 172,9) **
		Инд.курс	186 (170,8 - 195,1) 162,3 (153,4 - 167,6)	195,1 (185,9 - 211,5) * 169,5 (159,9 - 172,4) *
		52 нед	178 (168,3 - 189,7) 160,2 (151,3 - 170,7)	202 (184,7 - 221,9) ** 173,3 (162,8 - 184,1) **
		1-3 года	176,3 (162,9 - 189,9) 157,2 (144,2 - 170,4)	191,1 (177,5 - 198,9) ** 164,2 (149,9 - 174,5)
CD8	*СДГ ГФДГ*	*До*	175,9 (166,6 - 192,5) 165,2 (160 - 177,7)	196,7 (185,5 - 206,2) ** 173,6 (165,9 - 177,8)
		Инд.курс	184,2 (159,7 - 195,3) 167,6 (156,9 - 171,9)	190,8 (182,2 - 204,4) * 170 (165,1 - 174,6)
		52 нед	165,3 (158,6 - 190,3) 167,8 (153,8 - 174,1)	200,5 (184,1 - 211,6) ** 177 (170,8 - 185,2) **
		1-3 года	172,2 (160,2 - 189,3) 160,5 (151,2 - 172,2)	181,7 (166,7 - 198,5) * 168 (157,8 - 178,9)
CD19	*СДГ ГФДГ*	*До*	134,6 (127 - 145,1) 141,3 (133,2 - 148,8)	142,9 (132,3 - 154,9)* 145,5 (140,6 - 152,3)
		Инд.курс	138,1 (131,2 - 142,5) 142,7 (135,9 -148,1)	146,4 (138,8 - 155,2) * 145,9 (143,7 - 158,4) *
		52 нед	131,3 (129,2 - 141,8) 137,4 (131,2 - 159,3)	147,4 (137,8 - 160,4) ** 150,6 (145 - 163,6) **
		1-3 года	135,9 (125,1 - 142,4) 142,8 (132,5 - 158,8)	134,2 (125,9 - 151,4) 145,5 (137,5 - 157,5)
NK	*СДГ ГФДГ*	*До*	162,7 (153,7 - 173,1) 163,2 (160,7 - 167,8)	166,5 (159,8 - 185,5) 166 (163,1- 173,8)
		Инд.курс	157,7 (142,9 - 170,9) 161,7 (142,6 - 169,9)	175,6 (157,4 - 186,9) * 169,7 (160,8 - 178,6) *
		52 нед	147,4 (130,5 - 169,9) 165,6 (156,5 - 168,9)	174,3 (159,3 - 184,6) ** 168,8 (158,7 - 172,7)
		1-3 года	159,2 (129,5 - 175,7) 162,6 (148,9 - 173,9)	153,5 (129,9 - 166,5) 155,1 (138,1 - 162,5) *

Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$;
** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$

Активность ГФДГ в популяциях CD3, CD4 лимфоцитов была достоверно ниже в группе 1 по сравнению с группой 2 во все периоды до года лечения (Таблица 3.47). В популяции CD8 лимфоцитов более низкие показатели активности ГФДГ в группе 1 по сравнению с группой 2 наблюдались к году терапии. Активность ГФДГ в популяции В-лимфоцитов в группе НЭ была значимо ниже относительно группы с эффективностью ГИБП на 16 и 52 неделях терапии. Активность ГФДГ в NK-клетках изменялась сложным образом: в группе 1 была достоверно ниже по сравнению с группой 2 до назначения ГИБП и к концу индукционного курса, к году терапии не отличалась от показателей активности в группе с эффективным лечением, а в период «1-3 года» была достоверно выше, чем в группе с эффективным лечением.

Активность СДГ и ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК с разной эффективностью лечения ADA

Анализ активности митохондриальных дегидрогеназ в основных популяциях лимфоцитов при разной длительности терапии в группе ВЗК ADA показал, что в группе с НЭ по сравнению с группой с эффективностью лечения выявлялись достоверно более низкие значения активности ферментов, которые зависели от популяции клеток и длительности терапии. Так, достоверно более низкие показатели СДГ в CD3 Т-лимфоцитах наблюдались до назначения ADA и в период «1-3 года» лечения (Таблица 3.48*)*.

Таблица 3.48 – Динамика активности СДГ и ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у пациентов ВЗК ADA при разной эффективности ADA

Популяция клеток Ферменты		Период терапии ГИБП	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	182,5 (170,8 - 184,3) 162,6 (161,5 - 165,7)	194,0 (192,2 - 196,9)* 167,8 (151,4 - 168,8)
		Инд.курс	176,9 (152,3- 187,5) 166,9 (157,3- 169,2)	174,5 (179,8 - 180,2) 179 (150,9 - 191) *
		52 нед	174,9 (159,3 - 180,7) 156,9 (145,3 - 166,8)	180,9 (167,2 - 192,7) 167,2 (161,1 - 183,9) *
		1-3 года	165,6 (154,4 - 179,8) 154,7 (136,7 - 163,7)	204,6 (183,2 - 220,2)** 173,9 (164,6 - 181,9) **
CD4	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	181,5 (179,3 - 184,9) 159,9 (156,4 - 165,6)	195,2 (192,1 - 208,2) * 164,9 (152,9 - 168,2)
		Инд.курс	179,3 (162,5 - 187,1) 167,7 (156,9- 172,7)	183 (179,8 - 192,9) 178,1 (170,6 - 189,6) **
		52 нед	177,3 (166,2 - 183,8) 165,9 (155 - 178,9)	187,5 (182,6 - 197,6) ** 171,3 (162,6 - 189,4)
		1-3 года	178,3 (162,7 - 187,5) 149,4 (135,3 - 164,8)	210,5 (185,9 - 218,3) ** 173,7 (164,8 - 179,9) **
CD8	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	177,1 (158,8 - 189,1) 166,4 (162,1 - 172,1)	197,2 (194,9 - 202,8) ** 170,0 (156,3 - 172,7)
		Инд.курс	172,7 (152,3 - 185,2) 166,8 (157,2- 167,1)	166,3 (159,5 - 169,7) 181,9 (173,9 - 194,3) **
		52 нед	173,8 (154 - 179,8) 170 (156,4 - 185)	172 (160,7 - 195,9) 168,5 (160,5 - 184,6)
		1-3 года	168,4 (149,2 - 176,5) 154,9 (136 - 164,5)	198,2 (184,7 - 226,3) ** 174,3 (167,6 - 181,1) **
CD19	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	134,1 (124,4 - 141,9) 144,0 (139,6 - 155,9)	143,1 (137,4 - 148,0) * 142,3 (137,2 - 160,5)
		Инд.курс	132,7 (120,6 - 139,4) 150,2 (138,8- 151,4)	148,6 (136,5 - 150,6) * 156,8 (147,9 - 168,8) *
		52 нед	135,9 (125,4 - 147,3) 145,8 (130,9 - 155,8)	130,1 (127,1 - 144,8) 151,8 (135 - 158,3)
		1-3 года	127,4 (121,6 - 134,2) 133,4 (124,5 - 148,7)	141,8 (125,1 - 149,9) * 156,6 (138,4 - 174,9) *
NK	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	133,1 (128,1 - 170,4) 162,0 (150,4 - 166,9)	165 (123,7 - 167,8) 164,2 (138,6 - 170,4)
		Инд.курс	138,1 (127,5- 147,8) 152,66 (145,7- 170,8)	162,3 (155 - 200,6) * 180,3 (173,6 - 192,3) **
		52 нед	155,7 (137,2 - 165,9) 149,3 (142,5 - 167,9)	155,2 (146,1 - 181,2) 158,5 (147,2 - 174)
		1-3 года	136,8 (115,4 - 159,7) 146,7 (135,7 - 156)	149,6 (132,3 - 169,9) 160,2 (150,2 - 170,4) *
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$				

В популяции CD4 Т-лимфоцитов в группе 1 относительно группы 2 выявлены значимо более низкие показатели активности СДГ до назначения ADA, к году терапии и в период 1-3 года (Таблица 3.48*)*.

В популяции В-лимфоцитов в группе 1 по сравнению с группой 2 показатели СДГ были значимо ниже до назначения ADA, после индукционного курса и в период 1-3 года терапии (Таблица 3.48).

В NK-клетках достоверно более низкие значения выявлены в группе 1 по сравнению с группой 2 до назначения терапии и после индукционного курса (Таблица 3.48).

Активность ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов была ниже в группе 1 по сравнению с группой 2 в разные периоды наблюдения: в популяции CD3 Т-лимфоцитов была значимо ниже после индукционного курса и далее во все периоды наблюдения; в популяции CD4 Т-лимфоцитов и в NK клетках – после индукционного курса и к году терапии; в популяции CD8 Т-клетках – к концу индукционного курса и в период «1-3 года»; в популяции CD19 лимфоцитах – после индукционного курса и к году терапии (Таблица 3.46).

Таким образом, у пациентов с ВЗК независимо от применяемых блокаторов TNF (инфликсимаб, адалимумаб) в группе с недостаточной эффективностью лечения выявлены достоверно более низкие активности СДГ до назначения терапии в популяциях лимфоцитов CD3, CD4, CD8 и CD19, что может являться прогностическим показателем при оценке эффективности терапии ГИБП.

Активность СДГ и ГФДГ в малых популяциях CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с ВЗК в разные периоды лечения IFX

Особый интерес представляло изучение активности внутриклеточных ферментов в малых популяциях CD4+ Т-лимфоцитов – Treg, Th17-лимфоцитах, Thact в связи с их ролью в прогнозе эффективности ГИБП у детей с ИЗЗ, как показано в разделе 3.1.

В группе ВЗК IFX анализ динамики активности СДГ в популяциях Thact, Treg и Th17-клеток показал достоверно более низкие значения активности в группе 1 по сравнению с группой 2 во все периоды наблюдения (Таблица 3.49).

Таблица 3.49 – Динамика активности СДГ и ГФДГ в малых популяциях CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов ВЗК при разной эффективности IFX

Популяция клеток Ферменты		Период терапии ГИБП	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Thact	*СДГ ГФДГ*	*До*	193,6 (180,4 - 205,7) 172,0 (163,5 - 181,5)	216,9 (190,6 - 229,0) ** 181,6 (171,5 - 186,9) *
		Инд.курс	192,1 (168,9 - 209,5) 174,2 (165,0 - 183,4)	215,3 (195,9 - 231,7) * 184,0 (175,9 - 188,3) *
		52 нед	181,8 (176,9 - 203,7) 175,2 (161,4 - 186,5)	220,6 (195,8 - 234,3) ** 190,1 (181,9 – 197,4) *
		1-3 года	188,9 (167,8 - 200,7) 169,9 (154,5 - 182,2)	202,6 (191,7 - 214,1) ** 180,9 (167,4 - 190,6) *
Treg	*СДГ ГФДГ*	*До*	183,7 (178,1 - 196,3) 169,4 (167,1 - 173,8)	204,6 (189,9 - 223,7) ** 176,8 (164,8 - 186,6) *
		Инд.курс	191,5 (172,7 - 202,6) 170,9 (160,8 - 176,4)	198,6 (185 - 214,8) * 178,2 (166,5 - 180,7)
		52 нед	177,6 (171,8 - 203,7) 170,4 (161,6 - 178,9)	212,4 (191 - 233,6) ** 186,4 (176,9 - 192,4) **
		1-3 года	184,6 (168,9 - 196,3) 168,7 (155,9 - 178,8)	193,1 (190 - 204,1) * 174,5 (171 - 183,7)
Th17	*СДГ ГФДГ*	*До*	185,3 (176,4 - 188,1) 166,8 (158,0 - 175,5)	199,5 (182,7 - 204,7) ** 170,1 (164 - 176,4) **
		Инд.курс	181,9 (158,9 - 195,5) 162,8 (155,4 - 167)	192,7 (181,7 - 210,1) * 169,2 (165,9 - 171,9) *
		52 нед	162,6 (157,1 - 189) 160,7 (153,2 - 168,9)	203,8 (178,2 - 217,3) ** 177,9 (166,4 - 185,7) **
		1-3 года	170,5 (150,7 - 185) 156,9 (142,8 - 169,3)	183,7 (182,2 - 195,1) * 168,6 (167,1 - 174,4)
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$				

Активность ГФДГ в популяции Thact в группе 1 была значимо ниже, чем в группе 2 во все периоды наблюдения. Активность ГФДГ в популяции Treg в группе 1 была значимо ниже, чем в группе 2 до назначения ГИБП и к году терапии. Активность ГФДГ в Th17-лимфоцитах была достоверно ниже в группе 1 по сравнению с группой 2 во все периоды наблюдения за исключением периода «1-3 года» (Таблицы 3.49).

Активность СДГ и ГФДГ в малых популяциях CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с ВЗК в разные периоды лечения ADA

Анализ динамики показателей активности СДГ в малых $CD4^+$ Т-лимфоцитах у пациентов ВЗК ADA показал, что в популяции Treg активность СДГ была

достоверно ниже в группе 1 в сравнении с группой 2 во все периоды наблюдения (Таблица 3.50).

Таблица 3.50 – Динамика активности СДГ и ГФДГ в популяциях Treg и Th17-лимфоцитов у пациентов группы ВЗК при терапии ADA

Популяция клеток Ферменты		Период терапии ГИБП	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Thact	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	193,6 (180,4 – 205,7) 172,0 (163,5 – 181,5)	202,3 (195,6 – 226,9)* 174,6 (172,4 – 176,9)
		Инд.курс	193,0 (169,6 - 213,5) 184,2 (168,1 – 188,2)	198,4 (192,1 – 210,4) 194,3 (186,4 – 206,4)**
		52 нед	182,2 (167,3 – 198,5) 178,1 (167,9 – 193,2)	194,4 (191,9 – 212,1) * 184,7 (167,8 – 190,7)
		1-3 года	181,3 (169,4 – 200,1) 164,9 (149,2 – 180,2)	226,7 (199,8 – 240,4) ** 190,6 (184,3 – 192,2) **
Treg	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	183,7 (178,1 - 196,3) 169,4 (167,1 - 173,8)	199,2 (189,2 - 208,5) ** 174,5 (161,6 - 175,1)
		Инд.курс	174,4 (162,2 - 193,1) 175,5 (166,5 - 188,5)	192,2 (183,9 – 206,0) * 184,5 (179,5 – 189)
		52 нед	178,3 (166,4 - 190,9) 178,3 (163,3 - 186,2)	195,5 (187,6 - 203,1) ** 184,1 (164,1 - 195,6) *
		1-3 года	177 (168 - 189,6) 164,4 (145,2 - 173,2)	205,9 (190,3 - 215,5) ** 178,8 (172,7 - 187,7) **
Th17	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	185,3 (176,4 - 188,1) 166,8 (158 - 175,5)	186,5 (186 - 191,8) 166,4 (154,6 - 166,5)
		Инд.курс	155 (150,9 - 177,1) 163,4 (156,3 - 170,6)	182,3 (176,6 - 188,6) ** 176,4 (170 – 184) *
		52 нед	168,3 (155,8 - 179,8) 162,4 (152,6 - 176,7)	179,1 (170,3 - 190,6) * 169,5 (158,3 - 181,6)
		1-3 года	166,7 (150,4 - 182,8) 153,4 (134,8 - 166,8)	192 (176,5 - 197,4) * 166,9 (163,9 - 174,4) *
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$				

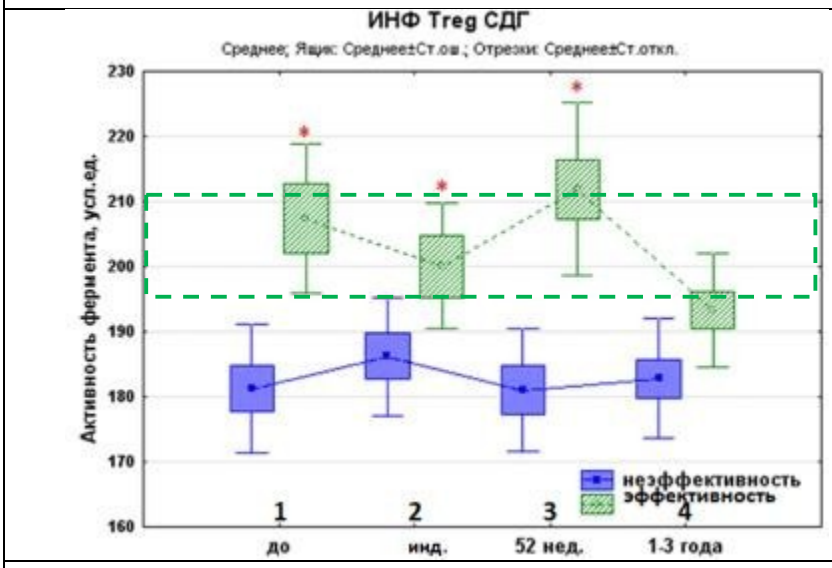
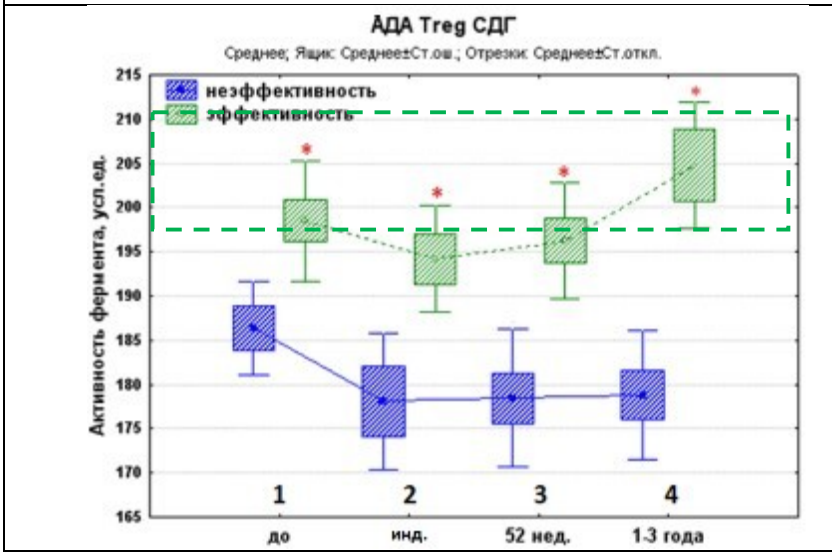
Активность СДГ у пациентов ВЗК ADA в популяции Thact и Th17-лимфоцитов была достоверно ниже в группе 1 по сравнению с группой 2 кроме отдельных периодов: в Thact – кроме периода после индукционного курса, в Th17-лимфоцитах - кроме периода до назначения ГИБП (Таблица 3.50).

Активность ГФДГ в Thact и Th17-лимфоцитах была достоверно ниже в группе 1 по сравнению с группой 2 после индукционного курса и в период «1-3 года» терапии ГИБП (Таблица 3.50). Активность ГФДГ в популяции Treg у

пациентов ВЗК ADA была значимо ниже в группе 1 по сравнению с группой 2, начиная с года терапии и в период «1-3 года» терапии ADA (Таблица 3.50).

Необходимо отметить, что в группах ВЗК IFX и ВЗК ADA до назначения терапии активность СДГ в Treg и в Thact в группе с эффективным лечением (группа 2) была достоверно выше, чем в группе с НЭ, что может являться прогностическим критерием эффективности ответа на блокаторы TNF, независимо от препарата.

В группах ВЗК IFX и ВЗК ADA с недостаточной эффективностью терапии активность СДГ в популяции Treg была ниже показателей квартильного диапазона ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$) группы сравнения (Рисунок 3.56). У пациентов групп ВЗК IFX (инфликсимаб – ИНФ) с НЭ и ВЗК ADA (адалимумаб – АДА) с НЭ активность СДГ в Treg не изменялась между периодами наблюдения (Рисунок 3.56А, Б).

А  	НЭ p_{12}=0,147 p_{13}=0,645 p_{14}=0,469 p_{23}=0,346 p_{24}=0,349 p_{34}=0,723 Эффект. p_{12}=0,417 p_{13}=0,517 p_{14}=0,003 p_{23}=0,072 p_{24}=0,143 p_{34}<0,001
Б  	НЭ p_{12}=0,108, p_{13}=0,075, p_{14}=0,039, p_{23}=0,803, p_{24}=0,715, p_{34}=0,969 Эффект. p_{12}=0,307, p_{13}=0,452, p_{14}=0,219, p_{23}=0,6, p_{24}=0,053, p_{34}=0,051

Примечание: * – достоверность отличий между группами, p<0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон для активности СДГ Treg (196-211 усл.ед.)

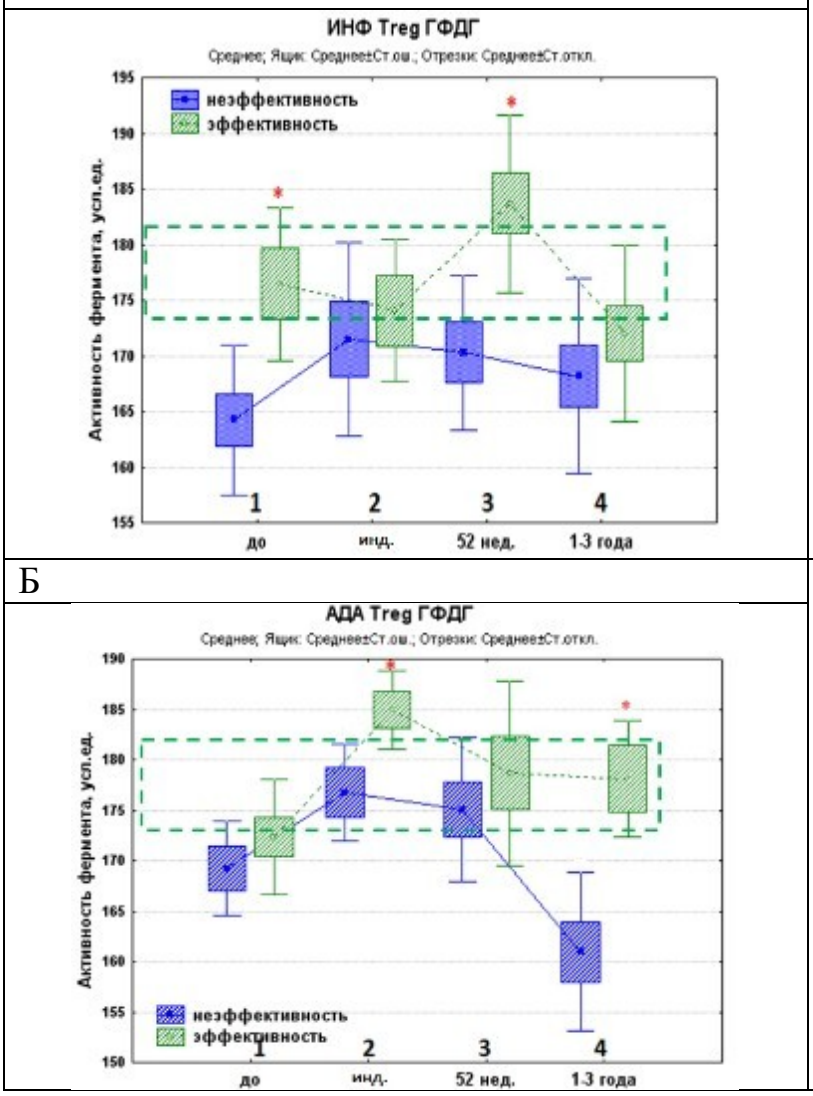
Рисунок 3.56 – Динамика активности СДГ в Treg в группах ВЗК IFX (А) и ВЗК ADA (Б) при разной эффективности терапии

В то же время, в группе пациентов с эффективностью IFX активность СДГ находилась в пределах референсного диапазона за исключением периода «1-3 года» лечения (ниже референсного диапазона) (Рисунок 3.56А).

В группе пациентов с ВЗК с эффективностью ADA активность СДГ в Treg была в пределах референсного диапазона и достоверно увеличивалась к периоду «1-3 года» терапии (Рисунок 3.56Б).

Активность ГФДГ в Treg лимфоцитах у пациентов группы ВЗК IFX с недостаточной эффективностью терапии была ниже референсного диапазона и значимо не изменялась в течении всего периода наблюдения (Рисунок 3.57А).

А	НЭ p_{12}=0,147 p_{13}=0,645 p_{14}=0,469 p_{23}=0,346 p_{24}=0,349 p_{34}=0,723 Эффект. p_{12}=0,417 p_{13}=0,517 p_{14}=0,003 p_{23}=0,072 p_{24}=0,143 p_{34}<0,001
Б	НЭ p_{12}=0,092 p_{13}=0,089 p_{14}=0,066 p_{23}=0,856 p_{24}=0,002 p_{34}=0,046 Эффект. p_{12}<0,001 p_{13}=0,067 p_{14}=0,035 p_{23}=0,696 p_{24}=0,065 p_{34}=0,439

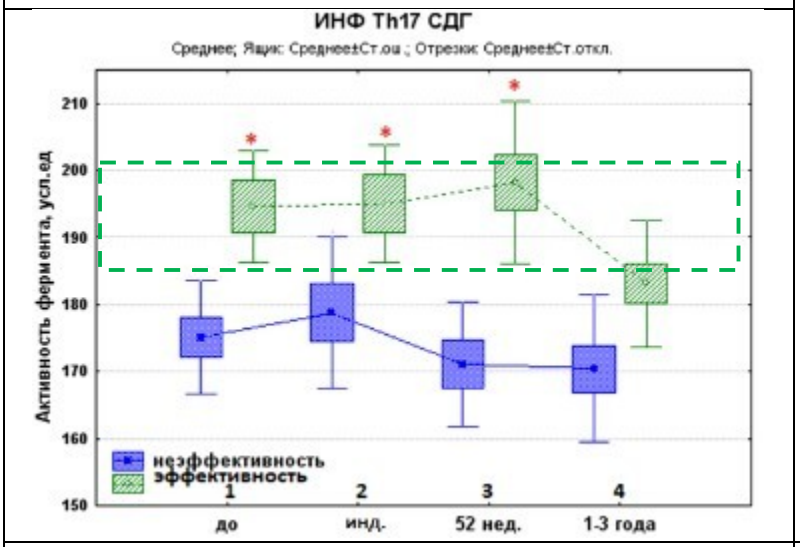
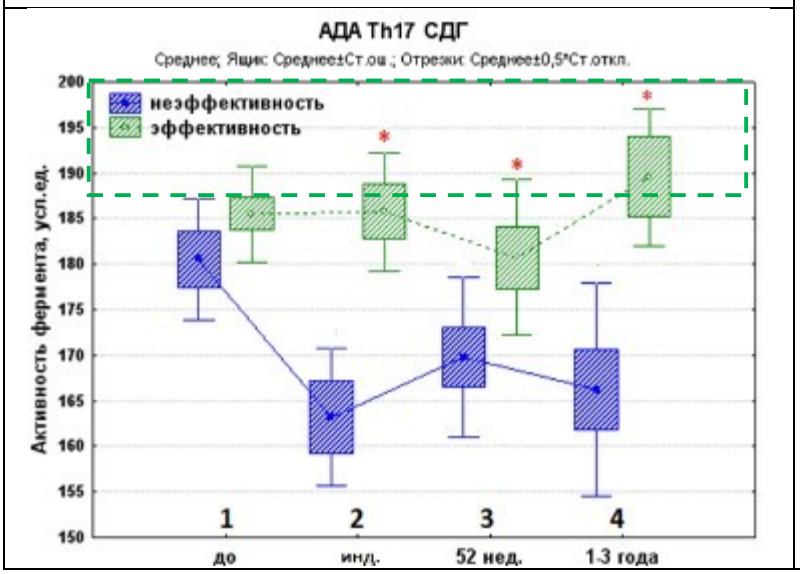


Примечание: * – достоверность отличий между группами, p <0,05; ИНФ – пациенты при терапии IFX; АДА – пациенты при терапии ADA; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон для активности ГФДГ Treg (173-182 усл.ед.)

Рисунок 3.57 – Динамика активности ГФДГ в Treg в группах ВЗК IFX (А) и ВЗК ADA (Б) при разной эффективности терапии

Активность ГФДГ в Treg в группе пациентов ВЗК ADA с НЭ после индукционного курса и к году терапии была в пределах референсного диапазона, но к периоду «1-3 года» значимо снижалась. Активность ГФДГ в Treg в группе с эффективностью ADA была в пределах референсного интервала в течение всего периода наблюдения за исключением повышения активности к концу индукционного курса (Рисунок 3.57Б).

Активность СДГ в Th17-лимфоцитах в группе пациентов с НЭ IFX была ниже референсного диапазона и не изменялась во все периоды наблюдения (Рисунок 3.58А).

А 	НЭ p_{12}=0,323 p_{13}=0,202 p_{14}=0,248 p_{23}=0,149 p_{24}=0,053 p_{34}=0,823 Эффект. p_{12}=0,939 p_{13}=0,510 p_{14}=0,007 p_{23}=0,007 p_{24}=0,015 p_{34}<0,001
Б 	НЭ p_{12}=0,002 p_{13}=0,02 p_{14}=0,039 p_{23}=0,227 p_{24}=0,605 p_{34}=0,682 Эффект. p_{12}=0,132 p_{13}=0,08 p_{14}=0,34 p_{23}=0,214 p_{24}=0,391 p_{34}=0,108

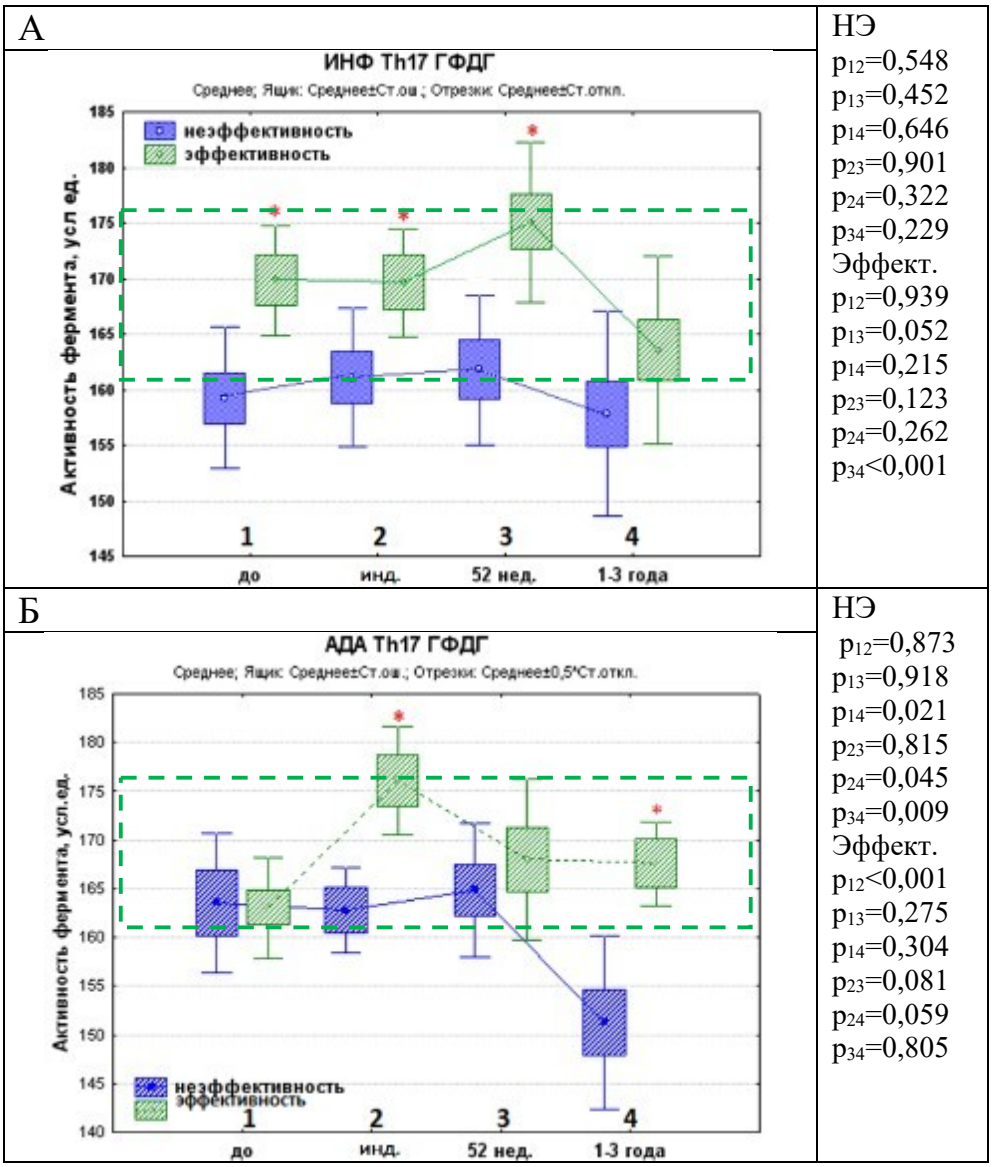
Примечание: * – достоверность отличий между группами, p <0,05; ИНФ – пациенты при терапии IFX; АДА – пациенты при терапии ADA; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности СДГ в Th17-клетках (186-201 усл.ед.)

Рисунок 3.58 – Динамика активности СДГ в Th17-лимфоцитах в группах ВЗК IFX (А) и ВЗК ADA (Б) при разной эффективности терапии

В группе с хорошим эффектом IFX активность СДГ в Th17-клетках была в пределах диапазона референсных значений до года терапии, а к периоду «1-3 года» снижалась до нижней границы референсного интервала (Рисунок 3.58А).

В группе пациентов с НЭ ADA активность СДГ в Th17-лимфоцитах была ниже диапазона референсных значений в течение всего периода наблюдения (Рисунок 3.58Б). В группе пациентов с эффективностью ADA значения активности СДГ находились в референсном диапазоне, кроме года терапии (ниже диапазона группы сравнения) и значимо не изменялась в течение всего периода наблюдений (Рисунок 3.58Б).

Активность ГФДГ в Th17-лимфоцитах в группе пациентов с неэффективностью терапии IFX была ниже диапазона референсных значений до начала терапии и к периоду «1-3 года», после индукционного курса и к году терапии соответствовала нижней границе референсных значений, в течение всего периода наблюдений значимо не изменялась (Рисунок 3.59А).



Примечание: * – достоверность отличий между группами с p <0,05; ИНФ – пациенты при терапии IFX; АДА – пациенты при терапии ADA; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности ГФДГ в Th17-лимфоцитах (161-176 усл.ед.)

Рисунок 3.59 – Динамика активности ГФДГ в Th17-лимфоцитах в группах ВЗК IFX (А) и ВЗК ADA (Б) при разной эффективности терапии

Активность ГФДГ в Th17-лимфоцитах в группе пациентов с эффективностью терапии IFX была в пределах диапазона референсных значений на протяжении всего периода наблюдений (Рисунок 3.59А).

Активность ГФДГ в Th17-лимфоцитах в группе пациентов с неэффективностью терапии ADA до начала терапии и к году терапии находилась в диапазоне референсных значений (Рисунок 3.59Б). После года терапии наблюдалось значимое снижение активности ГФДГ к периоду «1-3 года» терапии (Рисунок 3.59Б). В группе с эффективностью терапии активность ГФДГ была в

диапазоне референсных значений и наблюдалось значимое увеличение показателя к концу индукционного курса относительно значений до начала терапии (Рисунок 3.59Б).

Таким образом, анализ митохондриальных ферментов в основных и малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов у пациентов с ВЗК при разной эффективности терапии блокаторами TNF-α (инфликсимаб, адалимумаб) показал более низкую активность СДГ и ГФДГ в группе с неэффективностью лечения в сравнении с группой с эффективным лечением в разные периоды наблюдения. У пациентов группы ВЗК IFX до назначения терапии выявлена достоверная разница в активности ферментов между группами пациентов с разной эффективностью терапии в основных популяциях Т-клеток (CD3, CD4, CD8, CD19), а также в малых – Th17-лимфоцитах, Thact, Treg, с более низкими значениями в группе с НЭ. Для пациентов группы ВЗК ADA до назначения терапии выявлены значимо более низкие показатели активности СДГ в группе с недостаточной эффективностью терапии для всех изученных популяций кроме NK-клеток.

Также важно отметить, что активность СДГ в популяциях Treg и Th17-лимфоцитов у пациентов с ВЗК с неэффективностью терапии независимо от применяемого блокатора TNF была ниже диапазона референсных значений в течении всего периода наблюдений.

ROC – анализ для разделительной модели «эффективность – неэффективность» блокаторов TNF у пациентов с ВЗК

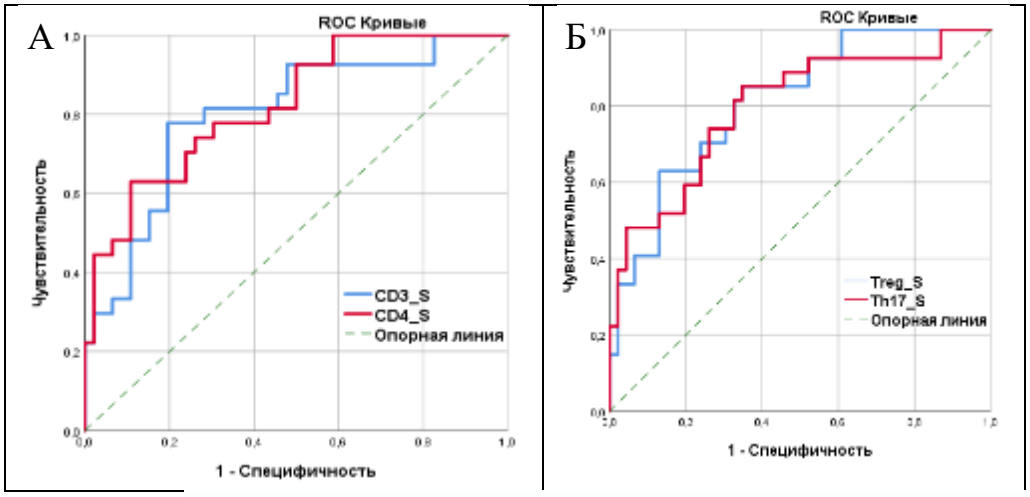
Для оценки информативности показателей активности СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов в прогнозе эффективности терапии блокаторами TNF у пациентов с ВЗК был проведён ROC–анализ для разделительной модели «эффективность – неэффективность» на разных этапах терапии.

Проведённый ROC–анализ по активности СДГ до начала терапии IFX показал очень хорошее качество (AUC>0,8) разделительной модели для популяций CD3, CD4, Treg, а также хорошее качество (AUC>0,7) разделительной модели для популяции Th17-лимфоцитов (Таблица 3.51).

Таблица 3.51 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность - неэффективность» по активности СДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК до назначения IFX

Популяция клеток	AUC	cut-off, усл.ед. (Se %; Sp %)
Активность СДГ в CD3	0,801 (0,694 - 0,908)	189,6 (78; 78)
Активность СДГ в CD4	0,823 (0,726 - 0,919)	186,8 (74; 74)
Активность СДГ в Treg	0,812 (0,714 - 0,91)	184,7 (82; 67)
Активность СДГ в Th17	0,798 (0,689 - 0,906)	185,8 (74; 74)
Примечание: AUC – площадь под кривой, p<0,05; Se – чувствительность; Sp – специфичность		

Для разделительной модели «эффективность – неэффективность» у пациентов с ВЗК IFX получены пороговые значения активности СДГ в популяциях лимфоцитов до назначения ГИБП, ниже которых можно прогнозировать развитие неэффективности IFX к году терапии (Таблица 3.51, Рисунок 3.60).



Примечание: А – ROC-кривые для активности СДГ в популяциях CD3 и CD4 лимфоцитов; Б - ROC-кривые для активности СДГ в популяциях Treg и Th17-лимфоцитов

Рисунок 3.60 – ROC-кривые для разделительной модели «эффективность - неэффективность» по активности СДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК до назначения IFX

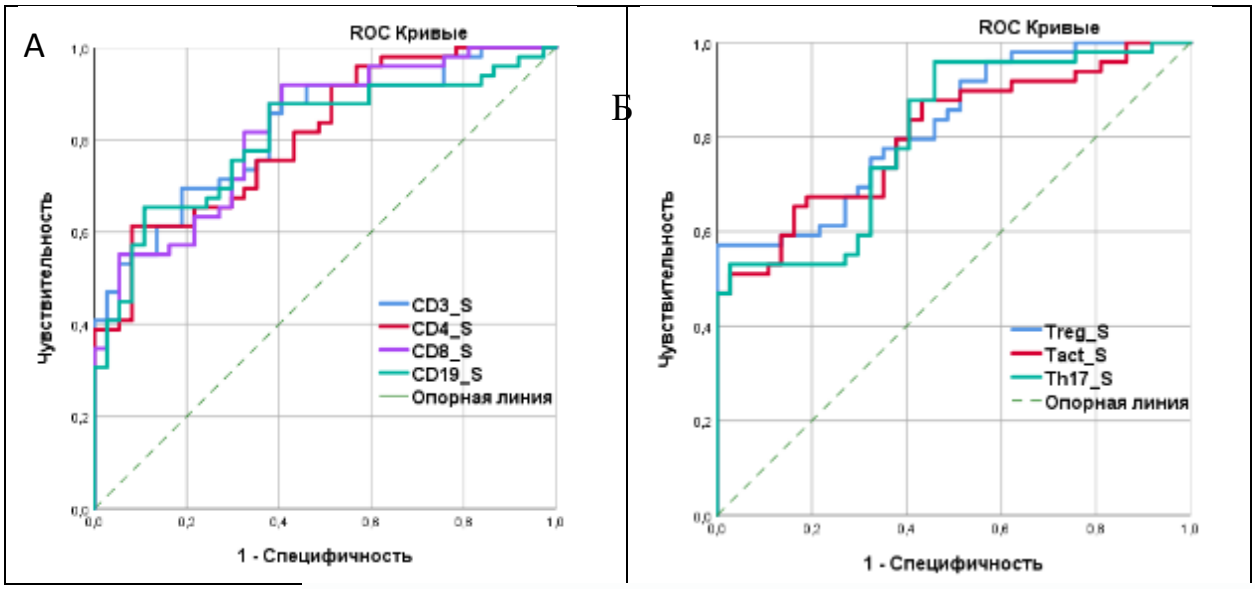
К году терапии IFX ROC-анализ для разделительной модели «эффективность – неэффективность» у пациентов с ВЗК показал очень хорошее качество (AUC>0,8) разделительной модели по активности СДГ для популяций CD3, CD4, CD8, CD19, Treg, Thact, Th17-лимфоцитов (Таблица 3.52).

Таблица 3.52 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность - неэффективность» по активности СДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК к году терапии IFX

Показатель	AUC	cut-off, усл.ед (Se %; Sp %)
Активность СДГ в CD3	0,821 (0,735 - 0,907)	187,4 (71; 70)
Активность СДГ в CD4	0,809 (0,721 - 0,898)	187,8 (67; 68)
Активность СДГ в CD8	0,821 (0,735 - 0,908)	185,6 (71; 70)
Активность СДГ в CD19	0,805 (0,712 - 0,897)	140,1 (69; 70)
Активность СДГ в Treg	0,824 (0,740 - 0,909)	188,2 (76; 68)
Активность СДГ в Thact	0,805 (0,715 - 0,895)	201,1 (67; 68)
Активность СДГ в Th17	0,806 (0,715 - 0,897)	179,0 (74; 68)
Примечание: AUC – площадь под кривой, $p<0,05$; Se – чувствительность; Sp – специфичность		

Получены пороговые значения по активности СДГ для популяций лимфоцитов, ниже которых можно ожидать неэффективность проводимой терапии IFX (Таблица 3.52).

ROC-кривые для активности СДГ в популяциях CD3, CD4, CD8, CD19 Treg, Thact, Th17-лимфоцитов представлены на Рисунке 3.61.



Примечание: А – ROC-кривые для активности СДГ в популяциях лимфоцитов CD3, CD4, CD8, CD19; Б - ROC-кривые для активности СДГ в популяциях Treg, Thact, Th17-лимфоцитов

Рисунок 3.61 – ROC-кривые для разделительной модели «эффективность - неэффективность» по активности СДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК к году лечения IFX

В ROC-анализе для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по активности СДГ у пациентов с ВЗК до начала терапии ADA для популяций CD3, CD4, Treg, Thact получено – AUC>0,7 (хорошее качество) (Таблица 3.53).

Таблица 3.53 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность - неэффективность» по активности СДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК до назначения ADA

Показатель	AUC	cut-off, усл.ед (Se %; Sp %)
Активность СДГ в CD3	0,771 (0,626 - 0,917)	186,4 (79; 78)
Активность СДГ в CD4	0,735 (0,596 - 0,874)	188,4 (79; 78)
Активность СДГ в CD8	0,794 (0,652 - 0,937)	194,1 (77; 89)
Активность СДГ в Treg	0,794 (0,671 - 0,917)	186,4 (82; 67)
Активность СДГ в Thact	0,742 (0,604 - 0,879)	195,1 (79; 67)
Примечание: AUC – площадь под кривой, p<0,05; Se – чувствительность; Sp – специфичность		

У пациентов с ВЗК при лечении ADA получены пороговые значения по активности СДГ для популяций лимфоцитов, ниже которых можно ожидать неэффективность проводимой терапии к году терапии (Таблица 3.53).

Получено хорошее качество (AUC>0,7) разделительной модели «эффективность - неэффективность» по активности СДГ для популяции CD4 лимфоцитов, а также очень хорошее качество для Treg клеток к году терапии ADA. Определены пороговые значения активности СДГ в популяции CD4 лимфоцитов и Treg клеток, ниже которых можно прогнозировать неэффективность терапии ADA (Таблица 3.54, Рисунок 3.62).

Таблица 3.54 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность - неэффективность» по активности СДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК к году терапии ADA

Показатель	AUC	cut-off, усл.ед (Se %; Sp %)
Активность СДГ в CD4	0,752 (0,622 - 0,883)	181,9 (79; 70)
Активность СДГ в Treg	0,810 (0,698 - 0,921)	188,9 (71; 70)

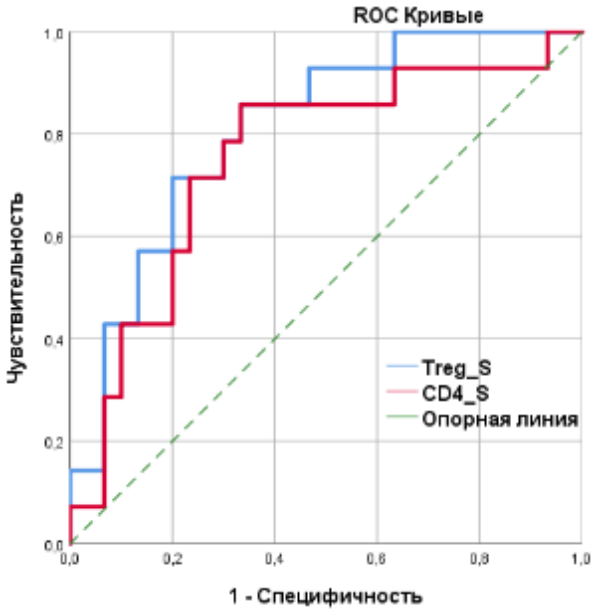


Рисунок 3.62 – ROC-кривые для разделительной модели «эффективность - неэффективность» по активности СДГ в CD4 лимфоцитах и Treg у пациентов с ВЗК к году терапии ADA

Проведённый ROC-анализ по активности ГФДГ в популяциях лимфоцитов на разных этапах терапии IFX и ADA не выявил хорошего качества разделительной модели «эффективность – неэффективность» (AUC<0,7).

Таким образом, для пациентов с ВЗК при лечении IFX и ADA получены пороговые значения активности СДГ в популяциях лимфоцитов до назначения терапии и к году терапии, ниже которых можно прогнозировать развитие неэффективности блокаторов TNF.

3.2.2. Метаболическая активность популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности ADA у детей с вульгарным псориазом

Активность СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ПС до назначения терапии

Активность СДГ и ГФДГ в популяциях Т-лимфоцитов (CD3, CD4, CD8, CD19, NK-клетках, Thact, Treg, Th17-лимфоцитах) у пациентов с ПС группы 1 (недостижение PASI75 к году терапии ADA – НЭ) до назначения блокаторов TNF была достоверно ниже, чем в группе сравнения (Таблица 3.55).

Таблица 3.55 – Активность СДГ и ГФДГ в основных и малых популяциях лимфоцитов у пациентов с ПС при терапии ADA до назначения терапии

Популяция клеток Ферменты		Группа 1 $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$	Группа 2 $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$	p_{1_2}	Группа сравнения $Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$
CD3	*СДГ*	164,4 (161,5 -179,6)**	187,5 (176,1 - 192,1)*	****	196,0 (188,2 - 201,6)
	ГФДГ	135,5 (124,9 -153,9) **	152,4 (136,5 - 173,0)*		168,9 (162,1 - 176,2)
CD4	*СДГ*	171,8 (162,9 -182,8) **	194,9 (182,5 - 205,2)	****	195,0 (184,8 - 202,2)
	ГФДГ	136,5 (126,9 - 153,9) **	152,8 (138,2 - 170,5)*		166,7 (162,1 - 174,1)
CD8	*СДГ*	166,2 (159,4 - 179,8) **	187,9 (171,1 - 195,6)**	***	198,8 (192,9 - 204,9)
	ГФДГ	137,2 (126,2 - 156,1) **	158,6 (139,7 - 170,8)**	***	177,7 (168,3 – 179,6)
CD19	*СДГ*	131,6 (122,5 - 134,3) **	135,6 (124,9 - 141,5)**	***	150,0 (141,9 – 156)
	ГФДГ	123,4 (118,5 - 130,5) **	126,4 (120,2 - 153,3)*		151,5 (146,2 - 158)
NK	*СДГ*	142,0 (134,0 - 154,5) **	155,7 (149,9 - 170,7)**	***	181,9 (175,4 - 189,6)
	ГФДГ	145,0 (134,9 - 157,2) **	159,9 (145,3 - 171,7)	***	167,0 (161,4 – 174,5)
Thact	*СДГ*	186,4 (168,2 - 198,3)**	205,1 (189,5 - 218,5)	***	199 (192,1 - 206,6)
	ГФДГ	150,3 (140,1 - 168,9)**	168,2 (149,4 - 186,9)		181,6 (174,5 - 190,4)
Treg	*СДГ*	175,2 (171,7-197,4)**	197,7 (190,2 - 207,6)	****	203,7 (195,9 - 210,5)
	ГФДГ	148,5 (139,4 - 164,1)**	168,1 (147,8 - 184,1)		177,6 (172,5 - 182,2)
Th17	*СДГ*	170,9 (151,0 -181,2)**	187,5 (173,0 - 200,8)	***	193,9 (186,1 - 200,6)
	ГФДГ	140,5 (129,6 - 152,7)**	157,2 (137,2 - 177,2)		168,9 (160,9 - 175,8)

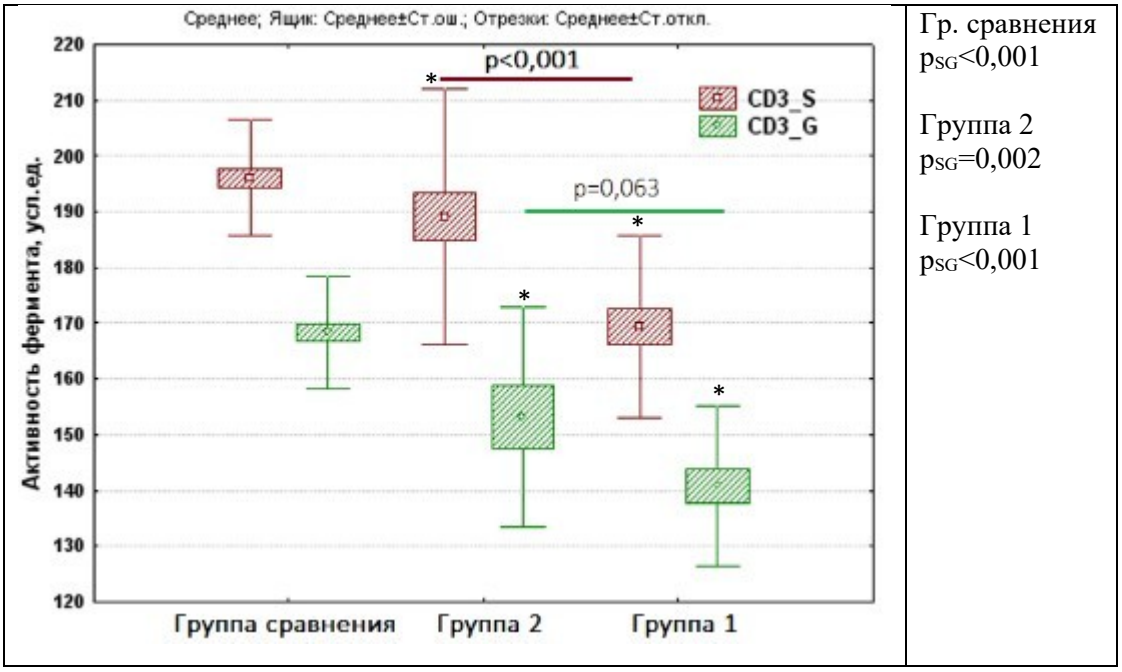
Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, $p<0,001$; *** – между группами 1 и 2 с $p<0,05$; **** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$

Активность СДГ и ГФДГ в группе 2 (достижение PASI75 к году терапии ADA) у пациентов с ПС до назначения терапии была ниже показателей группы сравнения в популяциях CD3, CD8 и CD19 лимфоцитах, а также для активности

СДГ – в популяции NK-клеток и для активности ГФДГ – в популяции CD4 лимфоцитов (Таблица 3.55).

При сравнении активности ферментов между группами пациентов с ПС значимо более низкие значения наблюдались в группе 1, чем в группе 2 по активности СДГ во всех изученных популяциях, по активности ГФДГ – в популяциях CD8 и NK-клеток (Таблица 3.55).

Сравнение показателей активности СДГ и ГФДГ в популяции $CD3^+$ Т-лимфоцитов показало, что в группах пациентов с ПС и в группе сравнения наблюдались достоверно более высокие показатели активности СДГ чем ГФДГ (Рисунок 3.63).



Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p <0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами по активности СДГ; зеленой чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ

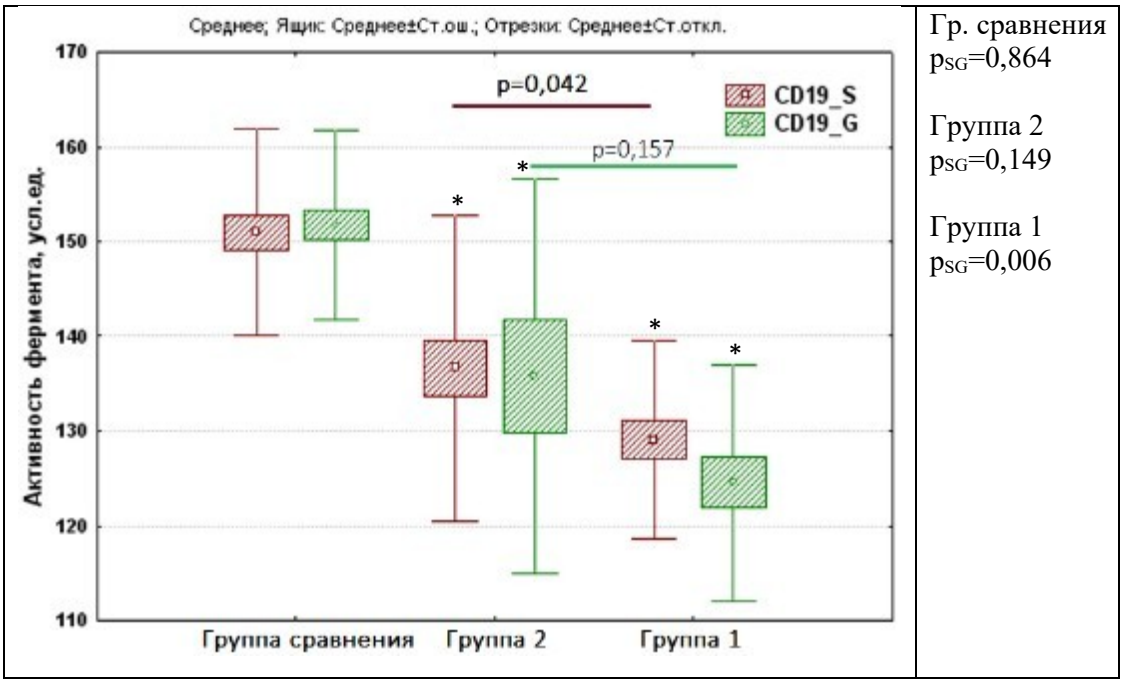
Рисунок 3.63 – Активность СДГ и ГФДГ в CD3 лимфоцитах у детей с ПС до назначения ADA и в группе сравнения

У пациентов с ПС в обеих группах наблюдались достоверно более низкие значения показателей активности СДГ и ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов относительно группы сравнения (Таблица 3.55; Рисунок 3.63).

Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов у пациентов группы 2 не отличалось от группы сравнения (1,20 (1,07-1,33) против 1,17 (1,09-1,21), p=0,351), в группе 1 было выше, чем в группе сравнения

(1,25 (1,10-1,34), p=0,029) за счёт более низких значений активности ГФДГ. Соотношение СДГ/ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов между группами пациентов с ПС достоверно не отличалось (p=0,829).

Сравнение показателей активности СДГ и ГФДГ в популяции В-лимфоцитов не выявило достоверных отличий как в группе сравнения, так и в группе 2 (Рисунок 3.64). В то же время, в группе 1 (НЭ) пациентов с ПС активность СДГ в популяции В-лимфоцитов была значимо выше, чем активность ГФДГ.



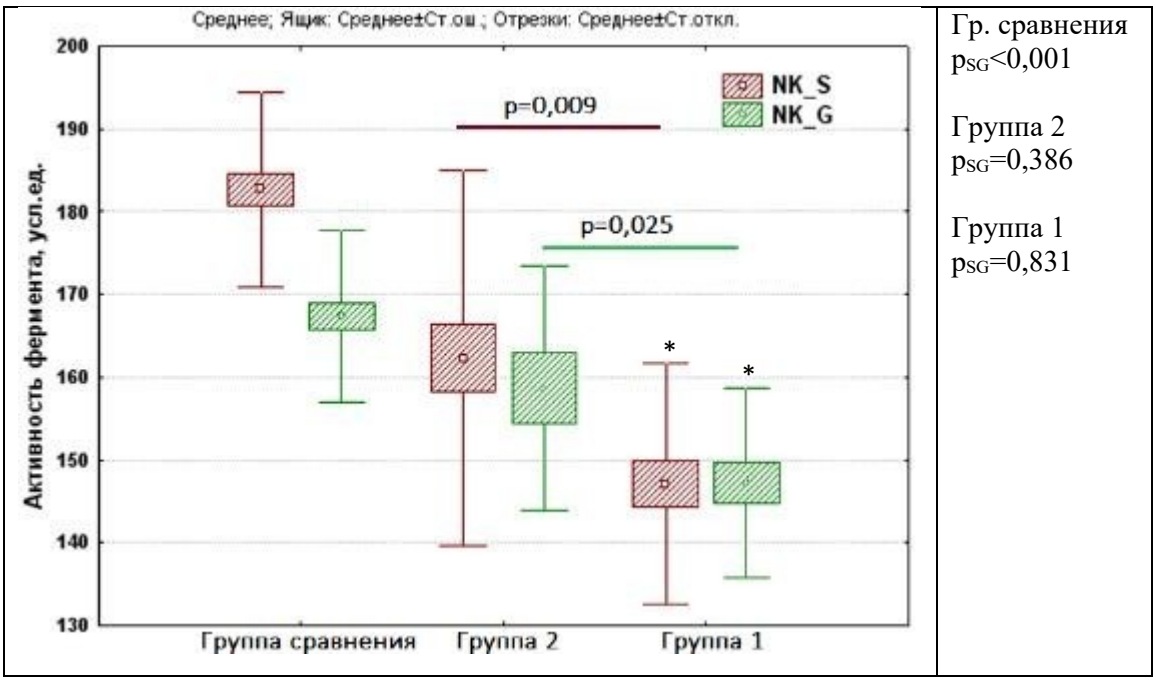
Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ

Рисунок 3.64 – Активность СДГ и ГФДГ в CD19 лимфоцитах у детей с ПС до назначения ADA и в группе сравнения

У пациентов с ПС в обеих группах активность СДГ и ГФДГ в популяции В-лимфоцитов так же, как и в популяции CD3 лимфоцитов, была достоверно ниже показателей группы сравнения. При этом, активность СДГ в группе 1 (НЭ) была значимо ниже, чем в группе 2 (Рисунок 3.64).

Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции CD19 лимфоцитов в группе 1 (НЭ) пациентов с ПС было достоверно выше относительно группы сравнения (группа сравнения 1,00 (0,97-1,05) против группы 1 – 1,07 (1,01-1,14), p=0,022). Показатель соотношения СДГ/ГФДГ в популяции CD19 лимфоцитов между группами 1 и 2 пациентов с ПС достоверно не отличался (p=0,631).

Анализ показателей активности СДГ и ГФДГ в популяции NK-клеток показал, что в группе 1 (НЭ) пациентов с ПС выявлялись достоверно более низкие значения активности СДГ и ГФДГ относительно группы сравнения и группы 2 (Рисунок 3.65).



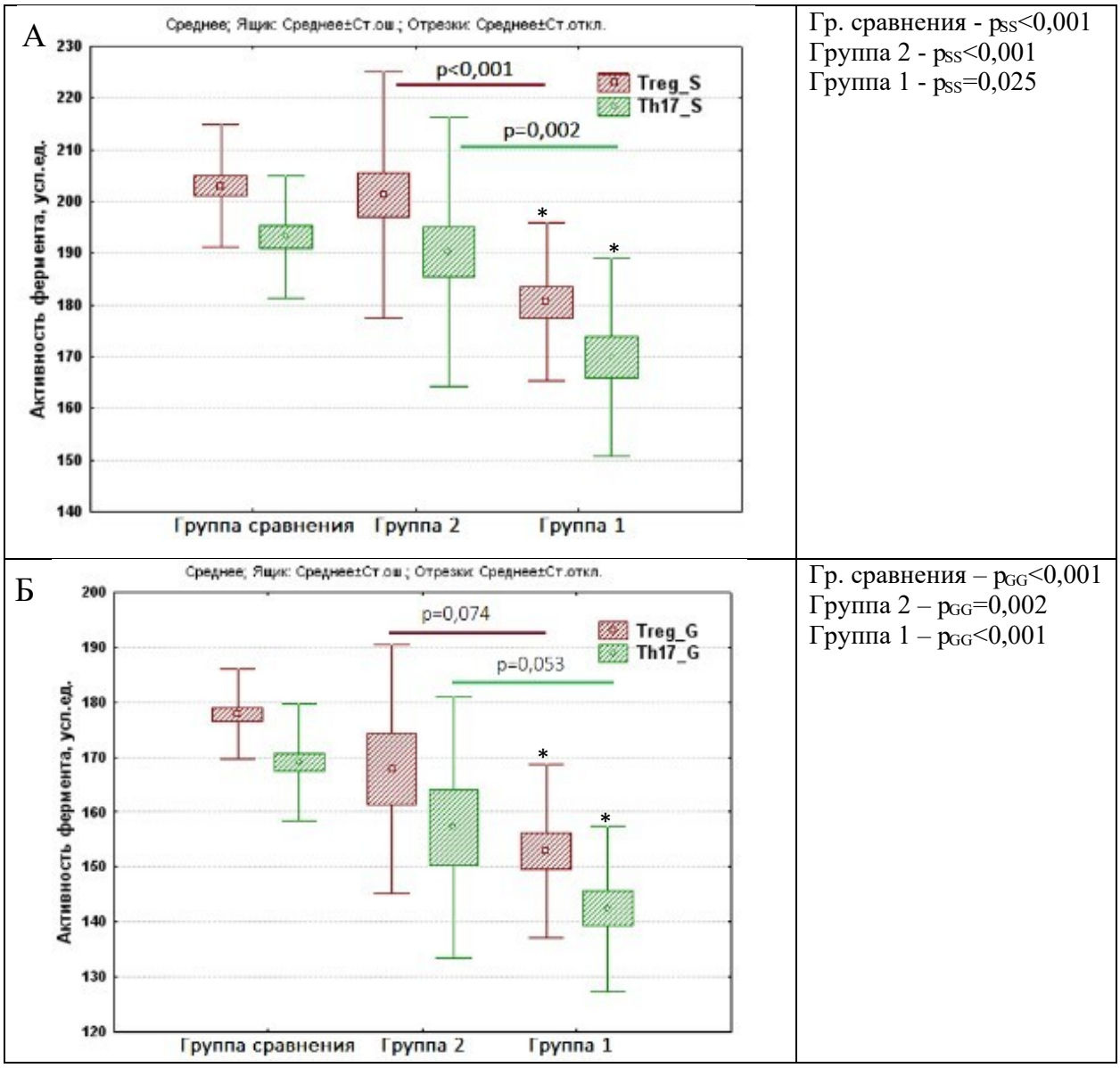
Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p <0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ.

Рисунок 3.65 – Активность СДГ и ГФДГ в NK лимфоцитах у детей с ПС до назначения ADA и в группе сравнения

В группах пациентов с ПС 1 и 2 не было достоверных отличий между активностью СДГ и ГФДГ в популяции NK-клеток. При этом, соотношение СДГ/ГФДГ у пациентов с ПС группы 2 – 1,02 (0,95-1,09) достоверно не отличалось от группы сравнения (1,07 (1,02-1,14), p=0,092), а в группе 1 – 0,99 (0,94-1,09) было ниже, чем в группе сравнения (p=0,003).

Сравнение активности СДГ и ГФДГ в Treg и Th17-лимфоцитах у пациентов с ПС так же, как и в группе сравнения, показало значимо более низкие значения активности ГФДГ, чем СДГ (Таблица 3.55). Уровень достоверности различий для Treg составлял: группа сравнения – p<0,001, группа 2 – p=0,002, группа 1 – p<0,001. Уровень достоверности различий для Th17-лимфоцитов составлял: группа сравнения – p<0,001, группа 2 – p=0,043, группа 1 – p<0,001.

У пациентов с ПС группы 1 получены достоверно более низкие показатели активности СДГ и ГФДГ в Treg и Th17-лимфоцитах относительно группы сравнения (Рисунок 3.66).



Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; коричневой чертой показана достоверность между группами в популяции Treg; синей чертой показана достоверность между группами в популяции Th17-лимфоцитов

Рисунок 3.66 – Активность СДГ в Treg и Th17-лимфоцитах (А), ГФДГ в Treg и Th17-лимфоцитах (Б) у детей с ПС до назначения ADA и в группе сравнения

При этом, наблюдались достоверно более низкие значения по активности СДГ в Treg и в Th17-лимфоцитах в группе 1 пациентов с ПС по сравнению с группой 2 (Рисунок 3.66). Значимых отличий между группами пациентов по

активности ГФДГ в Treg и в Th17-лимфоцитах не было выявлено из-за большого разброса показателей (Рисунок 3.66).

Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции Treg лимфоцитов у пациентов с ПС в группе 1 достоверно было выше, чем в группе сравнения (группа сравнения – 1,13 (1,09-1,18), группа 1 – 1,22 (1,13-1,27), p=0,005). В то же время, в группе 2 соотношение митохондриальных ферментов значимо не отличалось от показателей группы сравнения и составляло - 1,14 (1,08 – 1,25), p=0,647. При этом, по показателю СДГ/ГФДГ в популяции Treg лимфоцитов группы пациентов с ПС достоверно не отличались (p=0,403).

Соотношение ферментов в популяции Th17-лимфоцитов у пациентов с ПС достоверно не отличалось относительно группы сравнения (1,15 (1,09-1,20) и составляло: в группе 1 – 1,27 (1,06-1,36), p=0,185; в группе 2 – 1,19 (1,04-1,35), p=0,60. Также, достоверных отличий по соотношению СДГ к ГФДГ в популяции Treg лимфоцитов не было между группами пациентов с ПС (p=0,833).

Таким образом, у пациентов с ПС выявлено снижение активности митохондриальных ферментов СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов, степень снижения активности зависела от популяции клеток и была наиболее выражена в группе 1 (НЭ). Соотношение СДГ/ГФДГ в этой группе было повышено относительно группы сравнения в популяциях Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и в популяции регуляторных Т-клеток и снижено в популяции натуральных киллеров.

Активность СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ПС при разной эффективности лечения ADA

Анализ активности митохондриальных дегидрогеназ у пациентов с ПС в основных популяциях лимфоцитов с разной эффективностью лечения и при разной длительности терапии показал, что в группе 1 (недостижение PASI 75 к году терапии ADA) активность СДГ в популяциях лимфоцитов CD3, CD4, CD8, NK клетках была значимо ниже, чем в группе 2 (достижение PASI 75 к году терапии ADA) на протяжении года терапии (Таблица 3.56).

Таблица 3.56 – Динамика активности СДГ и ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с ПС при терапии ADA

Популяция клеток Ферменты		Период ADA	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*СДГ*	*До*	164,4 (161,5 -179,6)	187,5 (176,1 - 192,1)**
			135,5 (124,9 -153,9)	152,4 (136,5 - 173,0)
		Инд.курс	171,2 (150,8-175,2)	185,0 (180,4 - 205,2) **
	ГФДГ		128,4 (127,9 - 154,7)	168,4(133,6 - 177,6) **
		52 нед	177,9 (164,1 - 186,9)	188,4 (181,3 - 200,8)*
			159,7 (147,5 - 171,1)	163,6 (146,1 - 169,5)
CD4	*СДГ*	*До*	171,8 (162,9 -182,8)	194,9 (182,5 - 205,2) **
			136,5 (126,9 - 153,9)	152,8 (138,2 - 170,5)
		Инд.курс	183,9 (158,6 - 187,7)	189,4 (184,8 - 208,8) **
	ГФДГ		133,4 (129,0 - 154,6)	165,9 (133,4 - 179,4) *
		52 нед	176,9 (170,8 - 187,5)	189,6 (187,6 - 203,7) *
			161,0 (142,7 - 168,5)	164,9 (137,9 - 168,9)
CD8	*СДГ*	*До*	168,2 (159,4 - 179,8)	187,9 (171,1 - 195,6) *
			137,2 (126,2 - 156,1)	158,6 (139,7 - 170,8) *
		Инд.курс	169,7 (148,1 - 173,7)	183,4 (179,6 - 202,6) **
	ГФДГ		131,2 (129,4 - 160,0)	161,5 (135,9 - 176,7) *
		52 нед	179,7 (164,4 - 187,1)	191,3 (179,9 - 204,7) *
			159,4 (149,5 - 164,6)	163,1 (150,6 - 172,0)
CD19	*СДГ*	*До*	131,6 (122,5 - 134,3)	135,6 (124,9 - 141,5) *
			123,4 (118,5 - 130,5)	126,4 (120,2 - 153,3)
		Инд.курс	127,9 (121,8 - 138,7)	138,9 (123,7 - 148,2)
	ГФДГ		136,8 (121,3 - 140,4)	153,7 (140,4 - 164,7) **
		52 нед	136,4 (122,5 - 147,9)	145,4 (134,4 - 150,1)
			137,9 (124,8 - 141,8)	139,6 (125,3 - 152,9)
NK	*СДГ*	*До*	142,0 (134,0 - 154,5)	155,7 (149,9 - 170,7) *
			145,0 (134,9 - 157,2)	159,9 (145,3 - 171,7) *
		Инд.курс	138,9 (137,5 - 158,1)	155,9 (154,6 - 179,6) *
	ГФДГ		159,9 (142,7 - 166,9)	167,6(166,2 - 178,6)
		52 нед	149,5 (140,1 - 158,2)	161,2 (149,7 - 173,9) *
			157,1 (151,6 - 172,1)	168,9 (167,4 - 169,9)
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$				

Активность СДГ в В-лимфоцитах была достоверно ниже в группе 1 (НЭ ADA) только до назначения ГИБП (Таблица 3.54).

Анализ активности ГФДГ у пациентов с ПС показал достоверно более низкие значения в группе 1 (НЭ) до назначения терапии ADA в популяции CD8 лимфоцитов и в NK клетках, после индукционного курса – в популяциях CD3, CD4, CD8, CD19. К году терапии значимой разницы между группами пациентов по активности ГФДГ в основных популяциях не выявлено (Таблица 3.56).

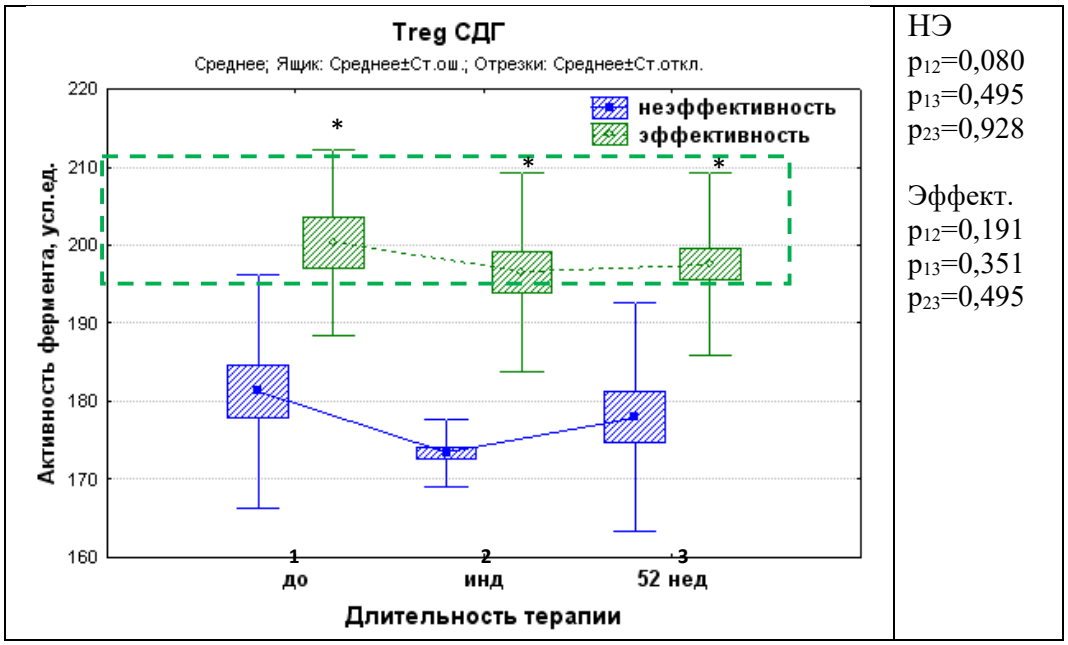
Оценка активности СДГ у пациентов с ПС в малых популяциях CD4 Т-лимфоцитов показала значимо сниженные значения в группе 1 (НЭ) относительно группы 2: в Treg и в Th17-лимфоцитах во все периоды наблюдения, в Thact – до назначения ГИБП и к году терапии (Таблица 3.57).

Таблица 3.57 – Динамика активности СДГ и ГФДГ в малых популяциях CD4 Т-лимфоцитов у пациентов с ПС при терапии ADA

Популяция клеток Ферменты		Период ADA	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Thact	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	186,4 (168,2 - 198,3) 150,3 (140,1 - 168,9)	205,1 (189,5 - 218,5)** 168,2 (149,4 - 186,9)
		Инд.курс	194,5 (171,4 - 201,7) 151,3 (142,7 - 169,6)	198,2 (190,2 - 227,8) 192,9 (174,2 - 196,0) **
		52 нед	184,6 (176,6 - 206,1) 178,4 (157,1 - 186,6)	204,3 (188,6 – 207,6) * 180,8 (155,1 - 185,9)
Treg	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	175,2 (171,7 - 197,4) 148,5 (139,4 - 164,1)	197,7 (190,2 - 207,6) ** 168,1 (147,8 - 184,1)
		Инд.курс	172,3 (168,0 - 176,9) 142,1 (142,1 - 164,8)	189,4 (183,5 - 207,2) ** 178,3 (148,0 - 184,6) *
		52 нед	171,9 (167,5 - 186,4) 166,9 (154,2 - 178,1)	196,6 (187,9 - 202,8) **173,0 (150,7 - 176,9)
Th17	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	170,9 (151,0 -181,2) 140,5 (129,6 - 152,7)	187,5 (173,0 - 200,8) * 157,2 (137,2 - 177,2)
		Инд.курс	169,5 (149,3 - 184,0) 137,8 (126,7 - 153,4)	176,3 (170,7 - 202,9) * 170,9 (137,9 - 177,9) **
		52 нед	170,9 (160,0 - 182,6) 162,9 (146,2 - 177,3)	186,4 (175,8 - 193,9) * 166,4 (134,7 - 170,6)
Примечание: * – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$				

Активность ГФДГ была ниже в группе 1 относительно группы 2 в популяциях Thact и Th17 в период индукционного курса.

Активность СДГ в Treg в группе 1 (недостижение PASI 75 к году терапии) была ниже диапазона референсных значений и не изменялась во все периоды наблюдения (Рисунок 3.67).

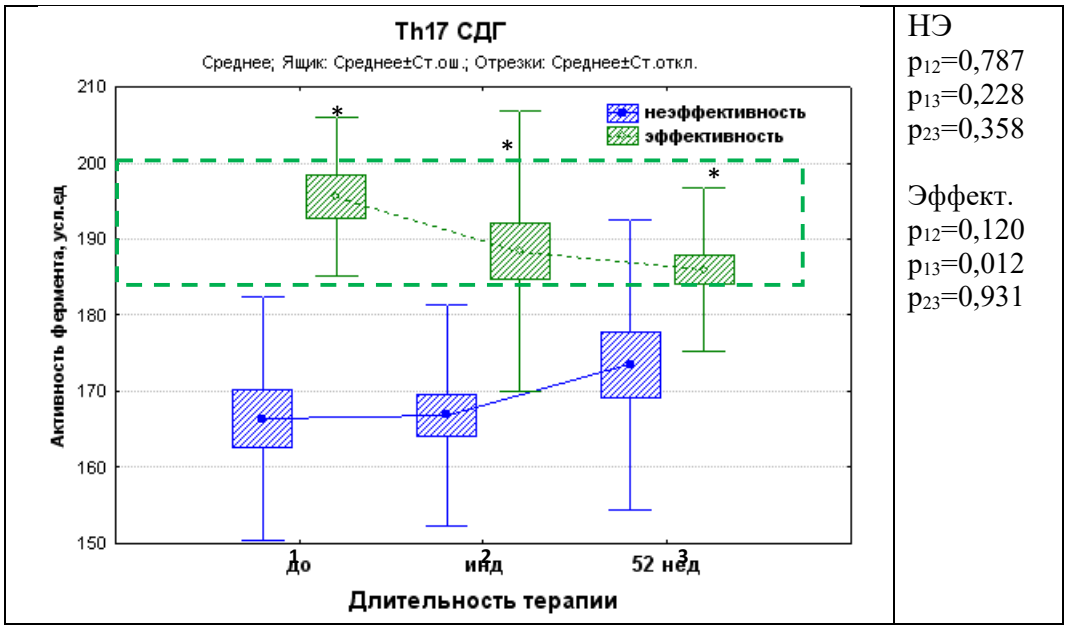


Примечание: * – достоверность отличий между группами, p <0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности СДГ в Treg (196-211 усл.ед.); НЭ – недостижение PASI 75; Эффект. – достижение PASI 75.

Рисунок 3.67 – Динамика активности СДГ в Treg у пациентов с ПС при разной эффективности ADA

В группе 2 (с достижением PASI 75 к году терапии ADA) активность СДГ в Treg находилась в пределах диапазона референсных значений и значимо не изменялась в течение всего периода наблюдения (Рисунок 3.67). При этом, активность СДГ в группе 1 (НЭ) была значимо ниже, чем в группе 2 (с эффективностью ADA) во все периоды наблюдения (Таблица 3.57, Рисунок 3.67).

Активность СДГ в Th17-лимфоцитах в группе 1 (недостижение PASI 75 к году терапии) также, как и активность СДГ в Treg, была ниже референсного диапазона и значимо не менялась во все периоды наблюдения (Рисунок 3.68).

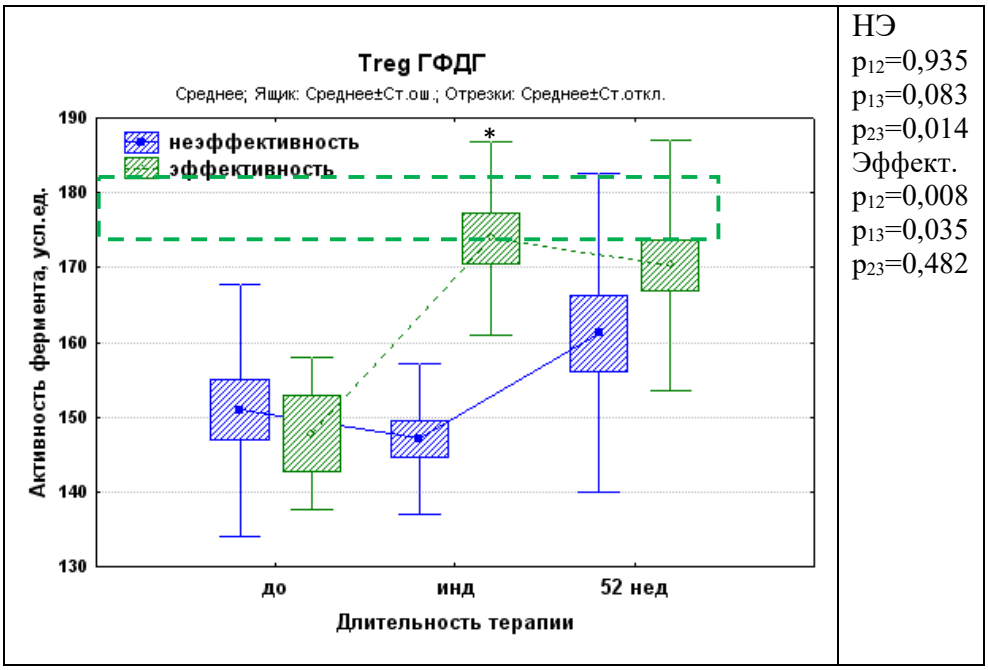


Примечание: * – достоверность отличий между группами, p <0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности СДГ в Th17 (186-201 усл.ед.); НЭ – недостижение PASI 75; Эффект. – достижение PASI 75

Рисунок 3.68 – Динамика активности СДГ в Th17-лимфоцитах у пациентов с ПС при разной эффективности ADA

Активность СДГ в Th17-лимфоцитах в группе 2 (с достижением PASI 75) достоверно снижалась к году терапии ГИБП, но находилась в пределах диапазона референсных значений (Рисунок 3.68). Активность СДГ в Th17-лимфоцитах в группе 2 была выше, чем в группе с недостаточной эффективностью ADA во все периоды наблюдения (Таблица 3.57, Рисунок 3.68).

Активность ГФДГ в Treg лимфоцитах в группе 1 (НЭ) была ниже референсного диапазона и значимо увеличивалась к году терапии (Рисунок 3.69).

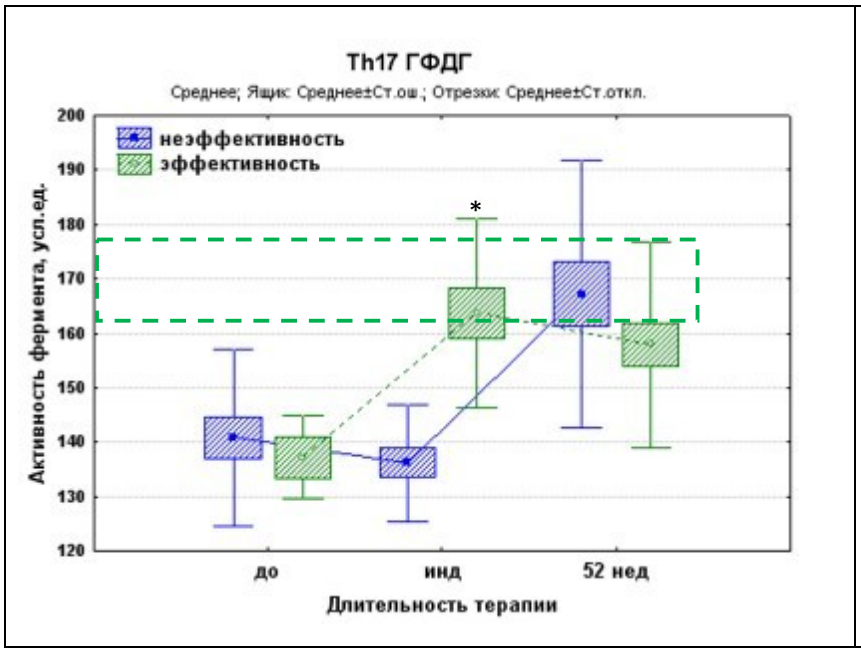


Примечание: * – достоверность отличий между группами, p <0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности ГФДГ в Th17–лимфоцитах 173-182 усл.ед.; НЭ – недостижение PASI 75; Эффект. – достижение PASI 75

Рисунок 3.69 – Динамика активности ГФДГ в Treg лимфоцитах у пациентов с ПС при разной эффективности ADA

Активность ГФДГ в Treg лимфоцитах в группе 2 (с эффективностью ADA) была ниже референсного диапазона до назначения терапии, значимо увеличивалась после индукционного курса и к году терапии (Рисунок 3.69). После индукционного курса в группе пациентов с хорошим эффектом ADA наблюдались достоверно более высокие значения в сравнении с группой 1 (НЭ) (Таблица 3.57, Рисунок 3.69).

Активность ГФДГ в Th17-лимфоцитах в группе 1 (НЭ) была ниже референсного диапазона до назначения ADA и после индукционного курса, и значимо увеличивалась к году терапии (Рисунок 3.70). Активность ГФДГ в Th17-лимфоцитах в группе с эффективностью ADA была ниже референсного диапазона до назначения терапии, значимо увеличивалась к концу индукционного курса и сохранялась на нижней границе референсного интервала к году терапии (Рисунок 3.70). После индукционного курса, между группами пациентов с ПС наблюдались достоверные отличия в показателях активности ГФДГ в Th17-лимфоцитах с более высокими значениями в группе с эффективностью ADA (Таблица 3.57, Рисунок 3.70).



Примечание: * – достоверность отличий между группами, p <0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности ГФДГ в Th17-лимфоцитах (161-176 усл.ед.); НЭ – недостижение PASI 75; Эффект. – достижение PASI 75

Рисунок 3.70 – Динамика активности ГФДГ в Th17-лимфоцитах у пациентов с ПС при разной эффективности ADA

Таким образом, у пациентов с ПС активность СДГ в основных и малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов в группе с недостижением PASI 75 была ниже, чем в группе с достижением PASI 75 до назначения терапии и может являться прогностическим критерием эффективности терапии к году терапии. Активность ГФДГ после индукционного курса ГИБП в Treg и Thact клетках была достоверно ниже в группе с недостижением PASI 75, чем в группе с достижением PASI 75 и может также рассматриваться в качестве прогностического критерия эффективности терапии к году.

ROC–анализ для разделительной модели «эффективность – неэффективность» ГИБП по активности митохондриальных дегидрогеназ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ПС

Проведённый ROC–анализ в разные периоды лечения ГИБП (до терапии, индукционный курс, к году терапии) показал отличное (AUC>0,9) и очень хорошее (AUC>0,8) качество разделительной модели «эффективность – неэффективность» по активности СДГ в популяциях CD4 лимфоцитов и Treg (Таблица 3.58).

Таблица 3.58 – Показатели ROC-анализа в разделительной модели «эффективность-неэффективность» ГИБП для активности СДГ в популяции CD4 и Treg у детей с псориазом

Показатель	AUC	cut-off, усл.ед (Se %; Sp %)
До начала ГИБП		
Активность СДГ в CD4	0,984 (0,952- 0,997)	192,6 (86; 89)
Активность СДГ в Treg	0,810 (0,658 - 0,961)	194,7 (71; 67)
После индукции		
Активность СДГ в CD4	0,897 (0,812 - 0,981)	187,7 (83; 86)
Активность СДГ в Treg	0,874 (0,783 - 0,964)	181,5 (83; 93)
52 недели ГИБП		
Активность СДГ в CD4	0,817 (0,675 - 0,959)	186,2 (79; 75)
Активность СДГ в Treg	0,841 (0,711 - 0,971)	183,6 (91; 75)
Примечание: AUC – площадь под кривой, $p < 0,05$; Se – чувствительность; Sp - специфичность		

У пациентов с ПС получены пороговые значения активности СДГ в популяциях CD4 лимфоцитов и Treg в разные периоды лечения, ниже которых можно прогнозировать развитие недостаточной эффективности терапии ADA (Таблица 3.58).

ROC-кривые для разделительной модели «эффективность-неэффективность» по активности СДГ в CD4 и Treg представлены на Рисунке 3.71.

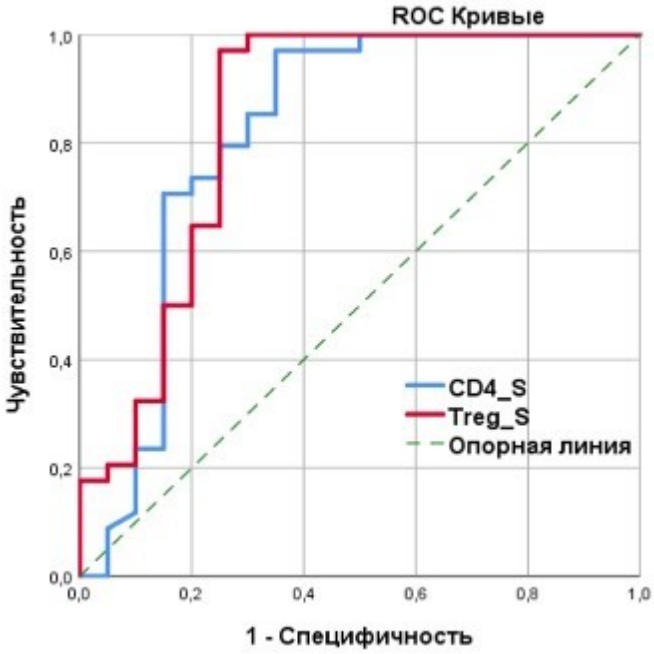


Рисунок 3.71 – ROC-кривые для разделительной модели «эффективность-неэффективность» на 52 неделе ГИБП по активности СДГ в популяции CD4 лимфоцитов и Treg у детей с ПС

Таким образом, показана информативность оценки метаболической активности популяций Т-лимфоцитов по активности СДГ в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом.

3.2.3. Метаболическая активность популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности INFβ-1a у детей с рассеянным склерозом

Активность СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с РС до назначения терапии

На первом этапе анализа были оценены показатели активности ферментов СДГ и ГФДГ в основных и малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов у детей с РС до введения препарата. Пациенты с РС были разделены на группы по эффективности терапии INFβ-1a к году лечения (в зависимости от активности очагов демиелинизации по МРТ).

У пациентов с РС с недостаточной эффективностью терапии (группа 1 – НЭ) в основных популяциях лимфоцитов CD3, CD4, CD8, CD19, NK и малых

популяциях (Treg, Th17, Thact) активность изучаемых ферментов была значимо ниже, чем в группе сравнения, кроме активности ГФДГ в NK-клетках (достоверных различий не выявлено) (Таблица 3.59).

Таблица 3.59 – Активность СДГ и ГФДГ в основных и малых популяциях лимфоцитов у пациентов с РС при разной эффективности INFβ-1a до назначения терапии

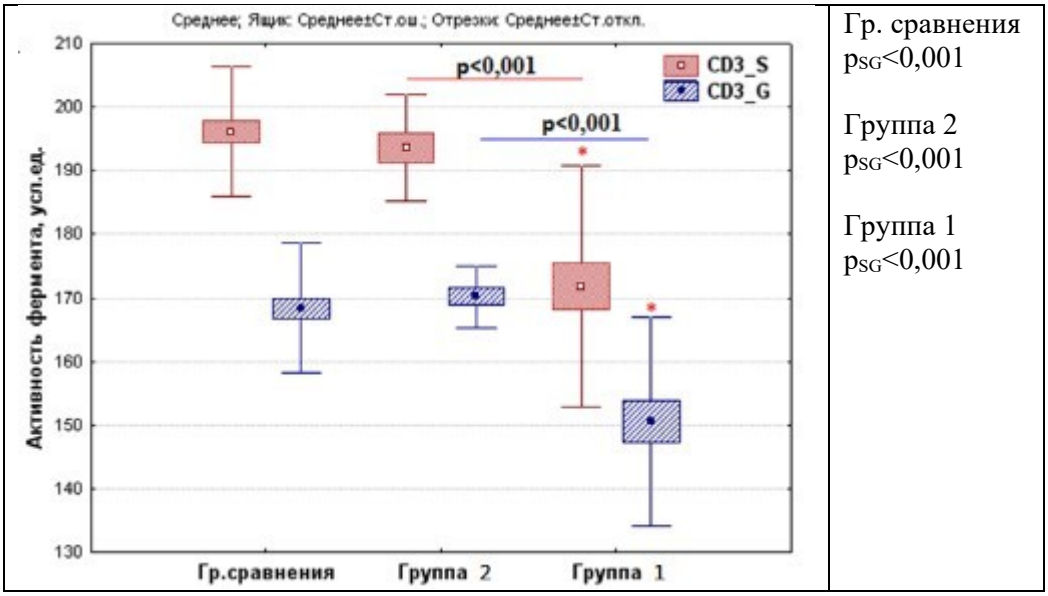
Популяция клеток Ферменты		Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	p_{1_2}	Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*СДГ*	178,6 (154,8 - 182,2)**	195,6 (189 - 200,9)	****	196,0 (188,2 - 201,6)
	ГФДГ	157,9 (133,5 - 161,3)**	172,7 (166 - 173,9)	****	168,9 (162,1 - 176,2)
CD4	*СДГ*	174,8 (161,9 - 186,1) **	198,5 (194,5 - 200,4)	****	195,0 (184,8 - 202,2)
	ГФДГ	154,8 (139,5 – 160)**	168,4 (164,4 - 169,8)	****	166,7 (162,1 - 174,1)
CD8	*СДГ*	180 (153,8 - 186,3)**	197,8 (190,8 - 203,5)	****	198,8 (192,9 - 204,9)
	ГФДГ	163,6 (133,4 - 168,1)**	174,1 (169,2 - 176,6)	****	177,7 (168,3 – 179,6)
CD19	*СДГ*	137 (116,5 – 148)**	154,4 (131,2 - 154,6)		150,0 (141,9 – 156)
	ГФДГ	140,4 (126,1 – 144,1)**	152,9 (140,4 - 155,0)	***	151,5 (146,2 - 158)
NK	*СДГ*	162 (156,5 - 166,6)**	183,4 (176,0 - 187,2)	****	181,9 (175,4 - 189,6)
	ГФДГ	164,9 (153,9 – 171)	173,7 (170,9 - 176,0)*	****	167,0 (161,4 – 174,5)
Thact	*СДГ*	178,7 (168,2 - 198,2)**	207,7 (204,4 - 219,8)*	****	199 (192,1 - 206,6)
	ГФДГ	164,9 (146,5 - 172,6)**	181,0 (179,3 – 181)	****	181,6 (174,5 - 190,4)
Treg	*СДГ*	175,7 (173,2 – 184)**	201,9 (195,1 - 205,9)	***	203,7 (195,9 - 210,5)
	ГФДГ	160,7 (152,2 – 164)**	176,5 (172,9 - 178,5)	***	177,6 (172,5 - 182,2)
Th17	*СДГ*	179,9 (150,7 - 191,7)*	193,1 (186,8 - 201,3)	***	193,9 (186,1 - 200,6)
	ГФДГ	159,4 (138,7 - 166,1)*	170,1 (169,9 - 174,5)	***	168,9 (160,9 - 175,8)

Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, $p<0,001$; *** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,05$; **** – достоверность различий между группами 1 и 2 с $p<0,001$

У пациентов с НЭ INFβ-1a (группа 1) до назначения терапии активность СДГ и ГФДГ была достоверно ниже относительно группы с эффективностью терапии (группа 2) во всех изученных популяциях, за исключением активности СДГ в В-лимфоцитах (Таблица 3.59).

У пациентов с РС с эффективностью терапии INFβ-1a активность СДГ и ГФДГ в основных и малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов не отличалась от группы сравнения, за исключением активности СДГ в Thact и активности ГФДГ в популяции NK клеток (достоверно выше в группе пациентов с эффективностью терапии INFβ-1a относительно группы сравнения) (Таблица 3.59).

Сравнение показателей активности СДГ и ГФДГ в популяции CD3 Т-лимфоцитов показало, что в группах пациентов с РС и в группе сравнения наблюдались достоверно более высокие показатели активности СДГ по сравнению с показателями активности ГФДГ (Рисунок 3.72).



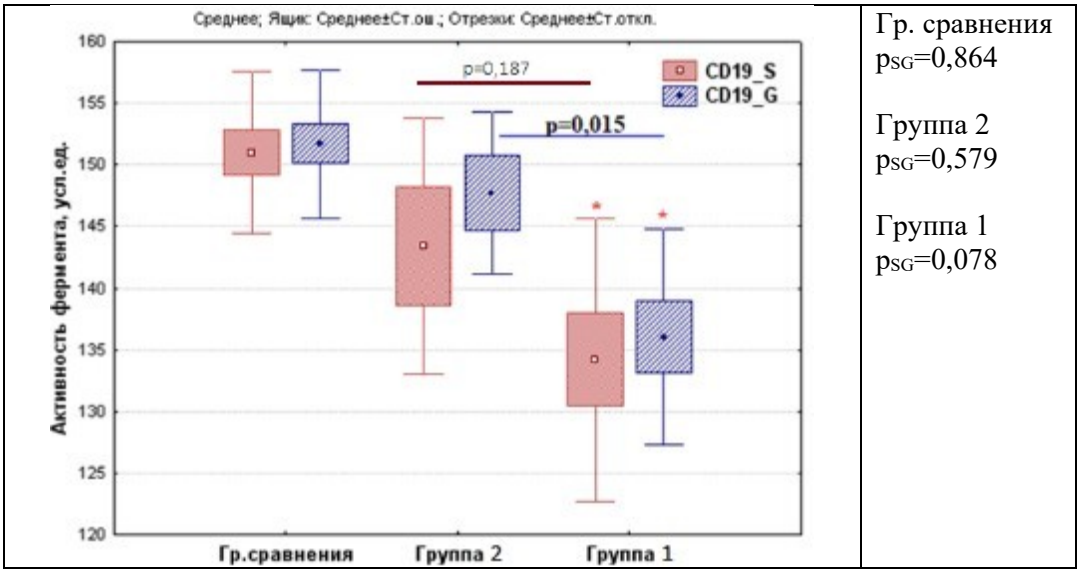
Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, $p<0,05$; красной чертой показана достоверность различий между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность различий между группами по активности ГФДГ

Рисунок 3.72 – Активность СДГ и ГФДГ в CD3 лимфоцитах до назначения INFβ-1a у детей с РС с разной эффективностью лечения и в группе сравнения

У пациентов с РС в группе 1 (НЭ) выявлены достоверно более низкие значения активности СДГ и ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов относительно группы сравнения и группы 2 (Рисунок 3.72).

Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции CD3 лимфоцитов у пациентов с РС достоверно не отличалось от группы сравнения (1,17 (1,09-1,21) и составляло в группе 1 – 1,12 (1,10-1,17), p=0,20; в группе 2 – 1,16 (1,14-1,17), p=0,31. По этому показателю группы пациентов с РС также достоверно не отличались (p=0,47).

Сравнение активности СДГ и ГФДГ в популяции В-лимфоцитов показало, что в группах пациентов с РС, как и в группе сравнения, показатели активности СДГ достоверно не отличались от показателей ГФДГ (Рисунок 3.73).



Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p <0,05; коричневой чертой показана достоверность различий между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность различий между группами по активности ГФДГ

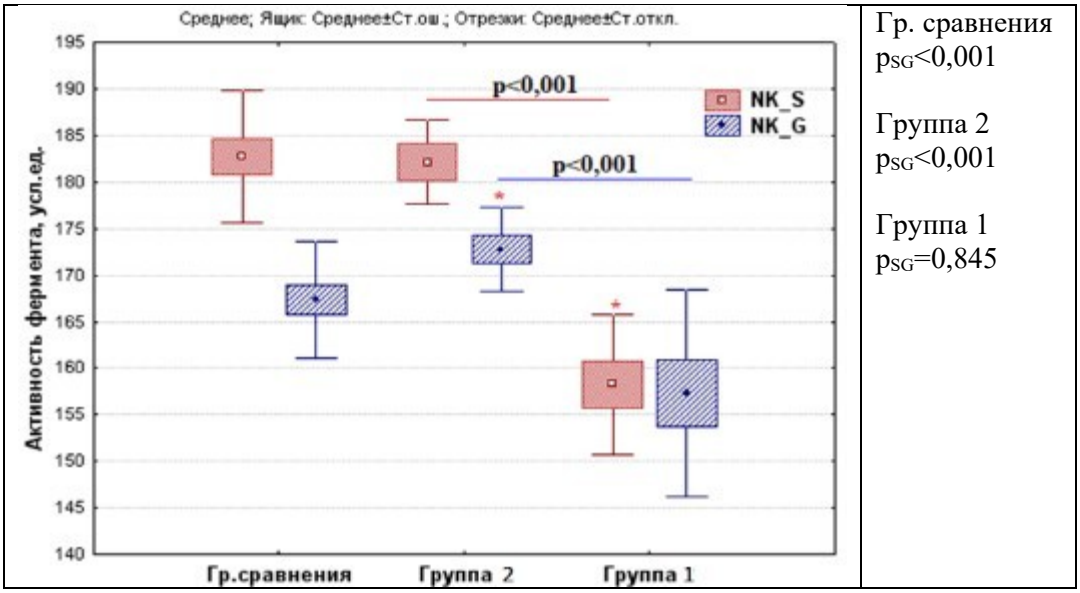
Рисунок 3.73 – Активность СДГ и ГФДГ в CD19 лимфоцитах до назначения терапии у детей с РС с разной эффективностью INFβ-1a и в группе сравнения

У пациентов с РС в группе 1 наблюдались достоверно более низкие значения активности ГФДГ в популяции В-лимфоцитов относительно группы сравнения и группы 2 (Рисунок 3.73).

Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции CD19 лимфоцитов у пациентов с РС достоверно не отличалось от группы сравнения (1,00 (0,97-1,05) и составляло в группе 1 – 0,97 (0,96-1,04), p=0,127; в группе 2 – 0,98 (0,89-1,01), p=0,198. По показателю СДГ/ГФДГ в популяции В-лимфоцитов группы пациентов с РС также достоверно не отличались (p=0,735).

Сравнение показателей активности СДГ и ГФДГ в популяции NK-клетках показало, что в группе 2 пациентов с РС и в группе сравнения показатели

активности СДГ достоверно были выше показателей ГФДГ, а в группе 1 – значимо не отличались (Рисунок 3.74). При этом, в группе 1 активность СДГ и ГФДГ в популяции NK-клеток была достоверно ниже, чем в группе 2 (Рисунок 3.74).

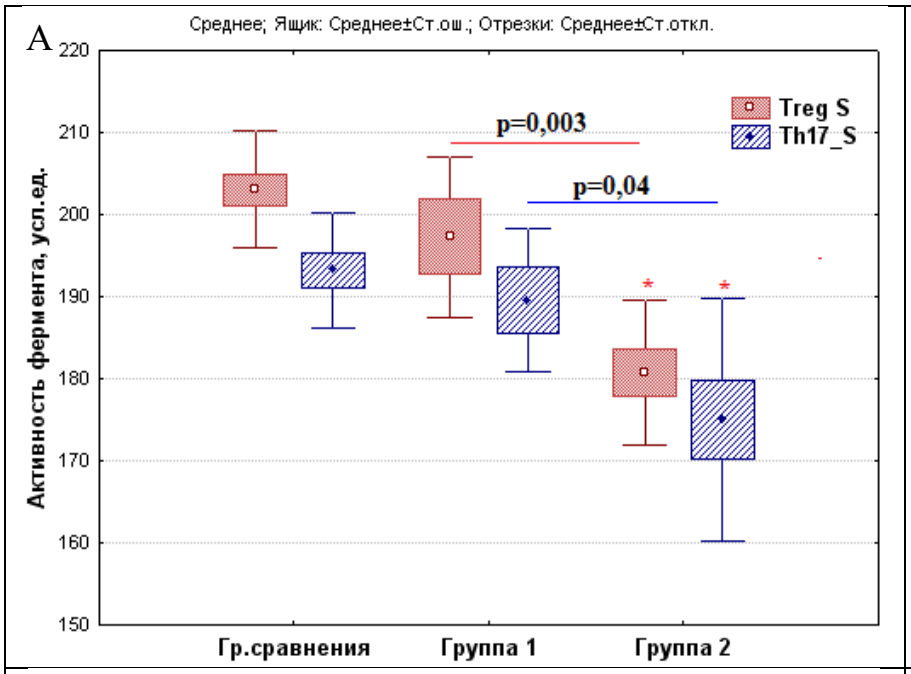


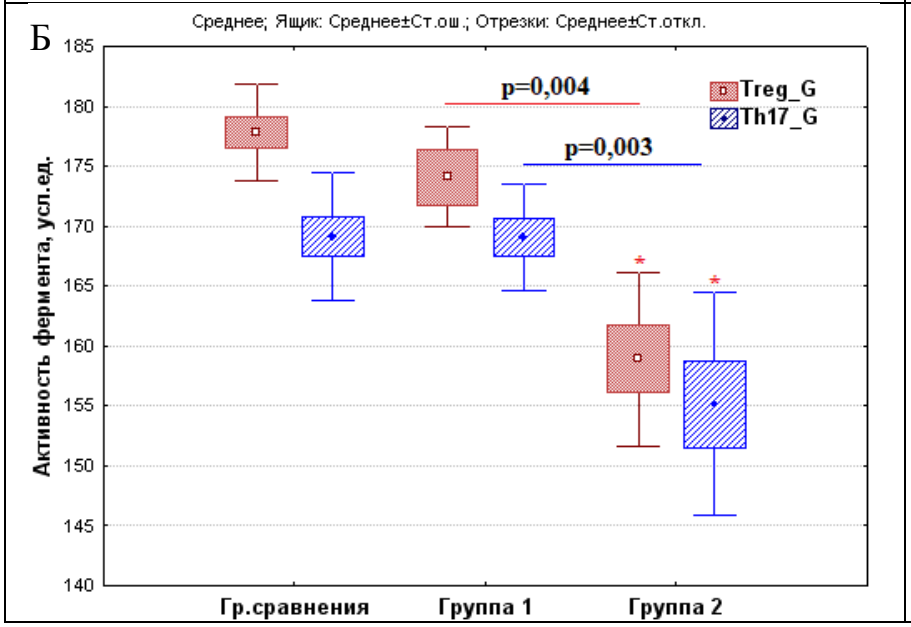
Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; красной чертой показана достоверность различий между группами по активности СДГ; синей чертой показана достоверность различий между группами по активности ГФДГ

Рисунок 3.74 – Активность СДГ и ГФДГ в NK клетках до назначения терапии у детей с РС при разной эффективности терапии INFβ-1a и в группе сравнения

Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции NK-клеток в группе сравнения (1,07 (1,02-1,14)) было достоверно выше, чем в группе 1 пациентов с РС (0,99 (0,96-1,03), p<0,001) и не отличалось от показателей группы 2 (1,07 (1,06-1,08), p=0,776). При этом, показатель соотношения СДГ/ГФДГ в популяции NK-клеток в группе 2 пациентов с РС был значимо выше, чем в группе 1 (p=0,003).

Анализ активности СДГ в Treg и в Th17-лимфоцитах показал, что в группах пациентов с РС также, как и в группе сравнения, активность СДГ в Treg была значимо выше активности СДГ в Th17-лимфоцитах (Рисунок 3.75А).





Примечание: * – достоверность различий относительно группы сравнения, p<0,05; красной чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ в Treg; синей чертой показана достоверность между группами по активности ГФДГ в Th17.

Рисунок 3.75 – Активность СДГ (А) и ГФДГ (Б) в Treg и Th17-лимфоцитах у детей с РС при разной эффективности терапии INFβ-1a и в группе сравнения

Сравнение активности ГФДГ в Treg и в Th17-лимфоцитах у пациентов с РС в обеих группах не выявило достоверных различий между популяциями лимфоцитов. В тоже время, в группе сравнения активность ГФДГ в Treg была достоверно выше, чем активность ГФДГ в Th17-лимфоцитах (Рисунок 3.75Б). Получено, что у пациентов группы 1 с РС активность СДГ и ГФДГ в популяциях

Treg и Th17-лимфоцитах была ниже, чем в группе сравнения и в группе 2 (Рисунок 3.75).

Соотношение ферментов СДГ/ГФДГ в популяции Treg лимфоцитов у пациентов с РС в группе 2 было достоверно выше, чем в группе сравнения (1,13 (1,09-1,18) против 1,20 (1,16-1,26), p<0,001). В группе 1 соотношение митохондриальных ферментов значимо не отличалось от показателей группы сравнения (1,13 (1,09-1,22), p=0,519) и было значимо меньше, чем в группе 2 (p=0,029).

Показатель соотношения ферментов СДГ/ГФДГ в популяции Th17-лимфоцитов у пациентов с РС в группах 1 и 2 не отличался от значений в группе сравнения (1,15 (1,09-1,20)) и составлял в группе 1 – 1,11 (1,09-1,17), p=0,344; в группе 2 – 1,14 (1,09-1,15), p=0,185. Группы 1 и 2 с РС по показателю СДГ/ГФДГ в Th17-лимфоцитах не отличались (p=0,669).

Таким образом, у пациентов с РС при недостаточной эффективности терапии INFβ-1a (группа 1) выявлено снижение активности СДГ и ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов CD3, CD4, CD8, NK и малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов (Treg, Th17, Thact) относительно группы с эффективным лечением и группы сравнения. У пациентов с РС в отдельных популяциях лимфоцитов выявлено достоверное отличие по соотношению активности митохондриальных ферментов СДГ/ГФДГ относительно группы сравнения: в NK клетках более низкое значение показателя у пациентов группы 1; в Treg – более высокое в группе 2.

Активность СДГ и ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с РС при разной эффективности лечения INFβ-1a

У пациентов с РС до назначения терапии в группе 1 выявлены достоверно более низкие значения активности СДГ по сравнению с группой 2: во всех популяциях кроме В-лимфоцитов; после индукционного курса – в CD8 лимфоцитов; к году терапии – в CD3, CD4, и CD8 лимфоцитах; в период «1-3 года» – во всех исследованных популяциях лимфоцитов (Таблица 3.60).

Таблица 3.60 – Динамика активности СДГ и ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с РС при терапии INFβ-1a

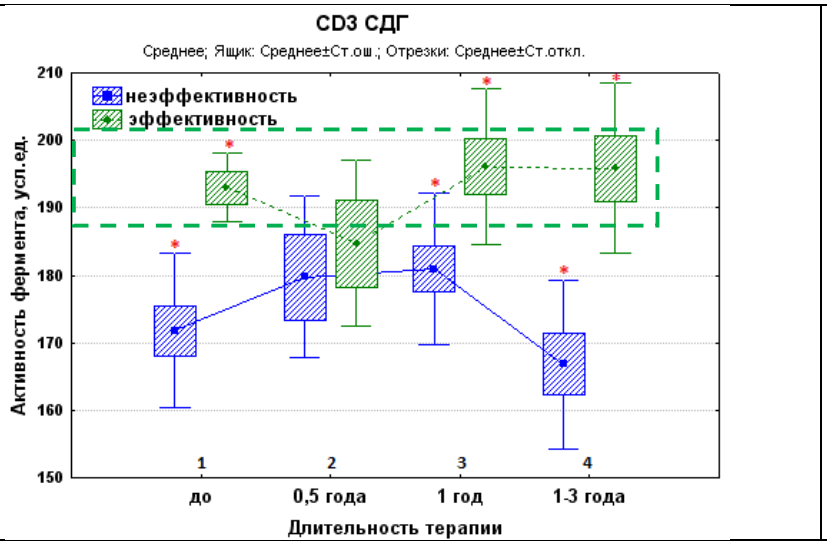
Популяция клеток Ферменты		Период терапии ГИБП	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
CD3	*СДГ ГФДГ*	*До*	*178,6 (154,8 - 182,2) 157,9 (133,5 - 161,3)*	*195,6 (189 - 200,9)** 172,7 (166 - 173,9) ***
		30 нед	183 (174,5 - 183,2) 162,7 (157,9 - 162,8)	190,5 (173,1 - 194,8) 161,9 (160,9 - 169,2)
		52 нед	*181,7 (177,1 - 192,4) 161,5 (141,5 - 166,9)*	*192,8 (175,8 - 205,4)* 168,2 (158,7 - 175,1) **
		1-3 года	*179,1 (147 - 181,7) 179,1 (128,4 - 161,9)*	*192,8 (175,8 - 202,1))** 203,9 (158,7 - 173,3))***
CD4	*СДГ ГФДГ*	*До*	*174,8 (161,9 - 186, 1) 154,8 (139,5 - 160)*	*198,5 (194,5 - 200,4))** 168,4 (164,4 - 169,8))***
		30 нед	*186,1 (185 - 203,3) 161,7 (161,1 - 171,1)*	*199 (190,6 - 200,4) 186,1 (185 - 203,3)*
		52 нед	*183,3 (175,7 - 195,4) 158,1 (139,3 - 163,5)*	*203,1 (180,9 - 209,6) * 167,4 (156,8 - 174,4) **
		1-3 года	*182,9 (152,4 - 182,5) 133,1 (131,9 - 158,1)*	*191,1 (180,9 - 209,6) ** 143,1 (156,8 - 174,4) ***
CD8	*СДГ ГФДГ*	*До*	*180 (153,8 - 186,3) 163,6 (133,4 - 168,1)*	*197,8 (190,8 - 203,5) ** 174,1 (169,2 - 176,6) ***
		30 нед	*174,4 (170 – 178) 163,7 (163,6 - 167,4)*	*190,8 (189 - 200,4) * 163,2 (124,3 - 175,2)*
		52 нед	*183,9 (175,7 - 195,9) 167,6 (141,3 - 173,2)*	*191,1 (178,1 - 208,5) * 173,9 (165,2 - 178,9) **
		1-3 года	*171,8 (142,6 - 184,6) 183,3 (126,1 - 168,2)*	*190,2 (178,1 - 199,5) 205,7 (165,2 - 176,1) ***
CD19	*СДГ ГФДГ*	*До*	*137 (116,5 – 148) 140,4 (126,1 – 144,1)*	*154,4 (131,2 - 154,6) 152,9 (140,4 - 155,0) **
		30 нед	*162,4 (148 - 168,4) 157,9 (137,6 - 161,7)*	*134 (134,1 - 138,1) * 140,1 (183,8 - 140,4)*
		52 нед	*138,3 (130,7 - 152,3) 138,9 (126,3 - 145,4)*	*143,1 (130,1 - 170,7) 145,8 (136,7 - 163,1) **
		1-3 года	*179,4 (129,5 - 142,4) 178,3 (135,4 - 140,2)*	*202,7 (137,4 - 170,7) * 197,7 (137,7 - 163,1) **
NK	*СДГ ГФДГ*	*До*	*162 (156,5 - 166,6) 164,9 (153,9 – 171)*	*183,4 (176,0 - 187,2) ** 173,7 (170,9 - 176,0) ***
		30 нед	*190 (184 - 195,5) 176,3 (173,3 - 177,4)*	*188,1 (177,8 - 196,3) 180,7 (186,4 - 200,6)*
		52 нед	*175,3 (164,5 - 192,2) 167,6 (141,7 - 175,9)*	*189,7 (182,8 - 196,7) 173,7 (166,9 - 177,9) **
		1-3 года	*172,9 (152,1 - 191,5) 155,4 (137,9 - 168,7)*	*179,7 (182,8 - 197,7) * 168,2 (171,9 - 177,9) **

Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с $p<0,001$

Необходимо отметить, что к концу индукционного курса в группе 1 выявлены достоверно более высокие значения активности СДГ в популяции В-лимфоцитов, чем в группе 2 (Таблица 3.60).

Активность ГФДГ у пациентов с РС в группе 1 также имела достоверно более низкие значения, чем в группе 2: до назначения терапии; к году и к периоду «1-3 года» терапии во всех исследованных популяциях лимфоцитов (Таблица 3.60).

У пациентов с РС в группе 1 (НЭ) активность СДГ в популяции CD3 лимфоцитов была достоверно ниже диапазона референсных значений на протяжении всего периода наблюдений (Таблица 3.60, Рисунок 3.76).



НЭ	Эффект.
p_{12}=0,337	p_{12}=0,456
p_{13}=0,045	p_{13}=0,845
p_{14}=0,695	p_{14}=0,899
p_{23}=0,770	p_{23}=0,234
p_{24}=0,147	p_{24}=0,226
p_{34}=0,018	p_{34}=0,925

Примечание: * – достоверность различий между группами, p <0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности СДГ в популяции CD3 лимфоцитов (188-202 усл.ед.)

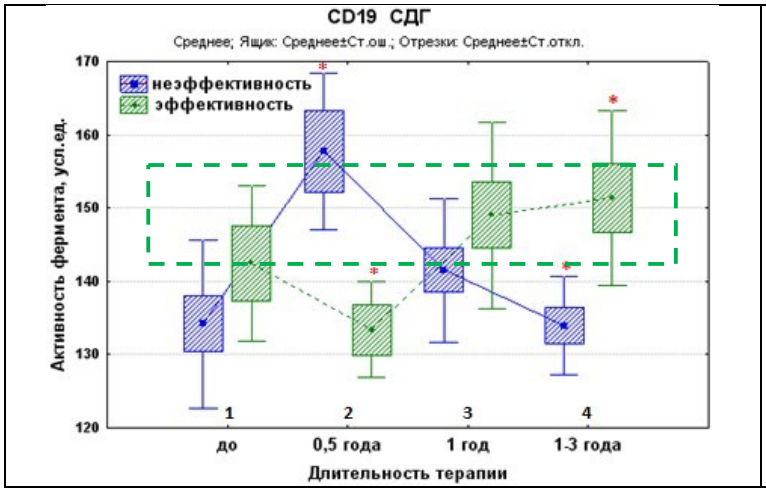
Рисунок 3.76 – Динамика активности СДГ в CD3 лимфоцитах у детей с РС при разной эффективности INFβ-1a

При этом, активность СДГ в группе НЭ значимо увеличивалась к году терапии INFβ-1a, а затем снижалась к периоду «1-3 года» лечения (Рисунок 3.76).

В группе пациентов с РС с хорошим эффектом терапии INFβ-1a активность СДГ в популяции CD3 лимфоцитов соответствовала референсному интервалу, значимо не изменялась и имела достоверно более высокие значения по сравнению с пациентами с НЭ во все периоды, кроме 0,5 года терапии (Рисунок 3.76).

В В-лимфоцитах у пациентов с НЭ наблюдали фазные изменения активности СДГ: через 6 месяцев терапии активность СДГ значимо повышалась и была выше верхней границе референсного интервала относительно периода до лечения и

достоверно превышала показатели группы с эффективным лечением. К году терапии активность СДГ в группе НЭ достоверно снижалась и не отличалась от показателей группы с эффективным лечением. К периоду «1-3 года» терапии активность СДГ в группе НЭ была ниже референсного интервала и группы с хорошим эффектом лечения (Рисунок 3.77).



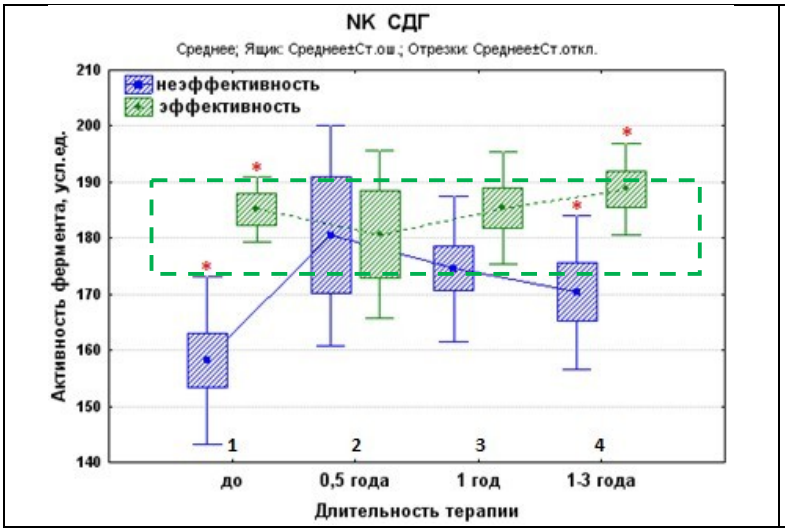
Неэф.	Эффект.
p_{12}=0,005	p_{12}=0,123
p_{13}=0,256	p_{13}=0,582
p_{14}=0,869	p_{14}=0,518
p_{23}=0,028	p_{23}=0,043
p_{24}=0,002	p_{24}=0,016
p_{34}=0,170	p_{34}=0,757

Примечание: * – достоверность различий между группами с p<0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности СДГ в CD19 лимфоцитах (142-156 усл.ед.)

Рисунок 3.77 – Динамика активности СДГ в CD19 лимфоцитах у детей с РС при разной эффективности терапии INFβ-1a

В группе пациентов с РС с эффективным лечением ГИБП активность СДГ в В-лимфоцитах была в пределах референсного диапазона за исключением периода «0,5 года» лечения (ниже референсного диапазона и ниже группы НЭ) и увеличивалась к году и к периоду «1-3 года» лечения (Рисунок 3.77).

Активность СДГ в NK-клетках у пациентов с РС в группе с НЭ до назначения INFβ-1a терапии и к периоду «1-3 года» была ниже референсного диапазона и достоверно ниже группы с эффективным лечением. В этой группе пациентов активность СДГ в NK-клетках значимо увеличивалась и была в пределах референсного диапазона к 6 месяцам лечения и к году терапии (Рисунок 3.78). В группе пациентов с эффективным лечением активность СДГ была в пределах референсного диапазона и значимо не изменялась в течение всего периода наблюдения (Рисунок 3.78).



Неэф.	Эффект.
p_{12}=0,008	p_{12}=0,821
p_{13}=0,013	p_{13}=0,423
p_{14}=0,114	p_{14}=0,346
p_{23}=0,301	p_{23}=0,889
p_{24}=0,231	p_{24}=0,654
p_{34}=0,562	p_{34}=0,638

Примечание: * – достоверность различий между группами, p<0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности СДГ в NK клетках (175-190 усл.ед.)

Рисунок 3.78 – Динамика активности СДГ в NK клетках у детей с РС при разной эффективности INFβ-1a

Активность СДГ и ГФДГ в малых популяциях CD4 $^+$ Т-лимфоцитов у пациентов с РС при разной эффективности лечения INFβ-1a

Активность СДГ в популяциях Thact, Treg и в Th17-лимфоцитах в группе с НЭ была значимо ниже, чем в группе с эффективным лечением до начала терапии, к году терапии и в период лечения «1-3 года» (Таблица 3.61).

Таблица 3.61 – Динамика активности СДГ и ГФДГ в малых популяциях CD4 Т-лимфоцитов у пациентов с РС при а терапии INFβ-1a

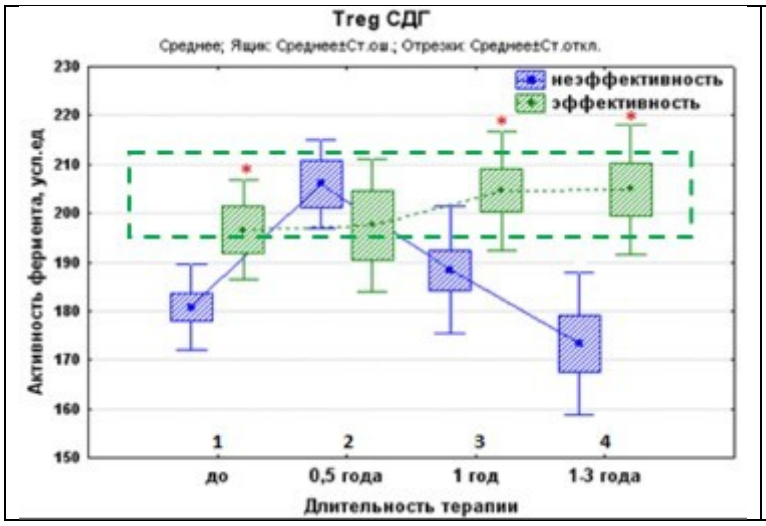
Популяция клеток Ферменты		Период терапии	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Thact	*СДГ ГФДГ*	*До*	*178,7 (168,2 - 198,2) 164,9 (146,5 - 172,6)*	*207,7 (204,4 - 219,8) ** 181,0 (179,3 - 181**)*
		30 нед	*221,8 (215,1 - 222,2) 188,6 (185 - 188,8)*	*205,5 (171,1 - 219,8) 179,9 (186 - 181)*
		52 нед	*193,2 (177 - 209,1) 171,6 (156,4 - 179,3)*	*202,7 (196,8 - 218,6)* 176,4 (154,2 - 186,9)*
		1-3 года	*133,1 (168,6 - 192,6) 155,7 (130,5 - 171,6)*	*145,8 (196,8 - 218,6) ** 173,7 (160,2 - 186,9)*

Продолжение Таблицы 3.59

Популяция клеток Ферменты		Период терапии	Группа 1 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)	Группа 2 Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)
Treg	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	*175,7 (173,2 - 184)* *160,7 (152,2 - 164)*	*201,9 (195,1 - 205,9)** *176,5 (172,9 - 178,5) **
		30 нед	*207,5 (199,2 - 219,5)* *175,1 (130,7 - 183,4)*	*212,5 (181,9 - 213,9)* *195,5 (202,7 - 200,5) **
		52 нед	*190,8 (182,9 - 207,9)* *153,6 (117,6 - 169,1)*	*205,7 (183,8 - 217,1) ** *168,8 (164,8 - 184,2) **
		1-3 года	*149,1 (158,3 - 188,4)* *154,6 (138,8 - 169,1)*	*167,4 (183,8 - 217,1)*** *173,9 (166,9 - 184,2) ***
Th17	*СДГ* *ГФДГ*	*До*	*179,9 (150,7 - 191,7)* *159,4 (138,7 - 166,1)*	*193,1 (186,8 - 201,3) ** *170,1 (169,9 - 174,5) **
		30 нед	*201 (194 - 207,8)* *174,9 (171,9 - 178)*	*188,8 (165,5 - 200)* *170,1 (168 - 180,8)*
		52 нед	*184,3 (178,1 - 192,7)* *162,7 (140,3 - 168,9)*	*197,7 (183 - 209,2) *** *165,8 (134,9 - 178,8) **
		1-3 года	*160,2 (149,6 - 182,3)* *160,5 (155,2 - 164,1)*	*178,4 (183 - 209,2) *** *176,4 (164 - 178,8) ***
Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с $p<0,001$				

Активность ГФДГ у пациентов с РС в группе 1 была достоверно ниже, чем в группе 2 в популяции Thact в период до терапии и к периоду «1-3 года», в Th17-лимфоцитах – во все периоды наблюдения кроме периода после индукционного курса, а в популяции Treg лимфоцитов – во все периоды наблюдения (Таблица 3.61).

Активность СДГ в Treg в группе пациентов с РС с НЭ была в пределах диапазона референсных значений только к 6 месяцев лечения, в остальные периоды наблюдения активность СДГ была ниже диапазона референсных значений и ниже значений группы 2 (Рисунок 3.79).



Неэф.	Эффект.
p_{12}<0,001	p_{12}=0,456
p_{13}=0,045	p_{13}=0,261
p_{14}=0,897	p_{14}=0,249
p_{23}=0,016	p_{23}=0,952
p_{24}<0,001	p_{24}=0,796
p_{34}=0,031	p_{34}=0,925

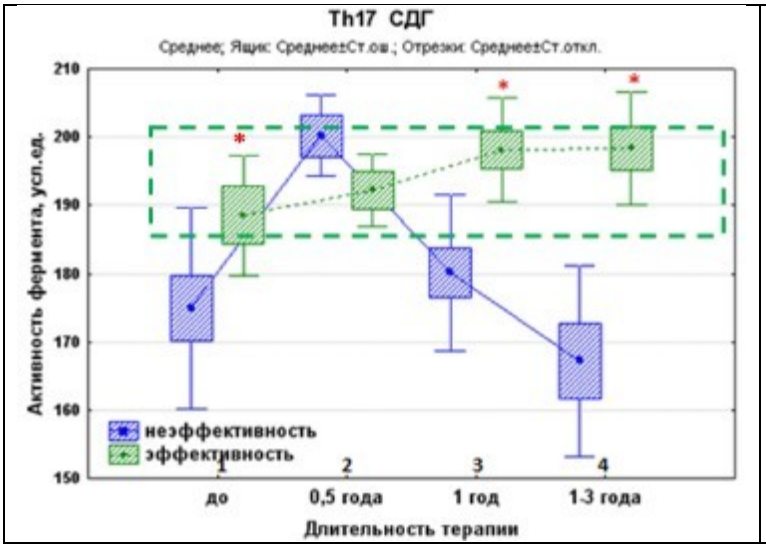
Примечание: * – достоверность различий между группами, p <0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности СДГ в Treg (195-211 усл.ед.)

Рисунок 3.79 – Динамика активности СДГ в популяции Treg у детей с РС при разной эффективности терапии INFβ-1a

В группе пациентов с НЭ наблюдались фазные изменения активности СДГ в Treg - увеличение активности к 6 месяцам терапии с последующим снижением к году и к периоду «1-3 года» лечения (Рисунок 3.79).

В группе пациентов с РС с эффективным лечением INFβ-1a активность СДГ в Treg находилась в пределах диапазона референсных значений и значимо не изменялась в течении всего периода наблюдения (Рисунок 3.79*)*.

Динамика активности СДГ в Th17-лимфоцитах у пациентов с РС была аналогична изменениям активности фермента в Treg (Рисунок 3.80).

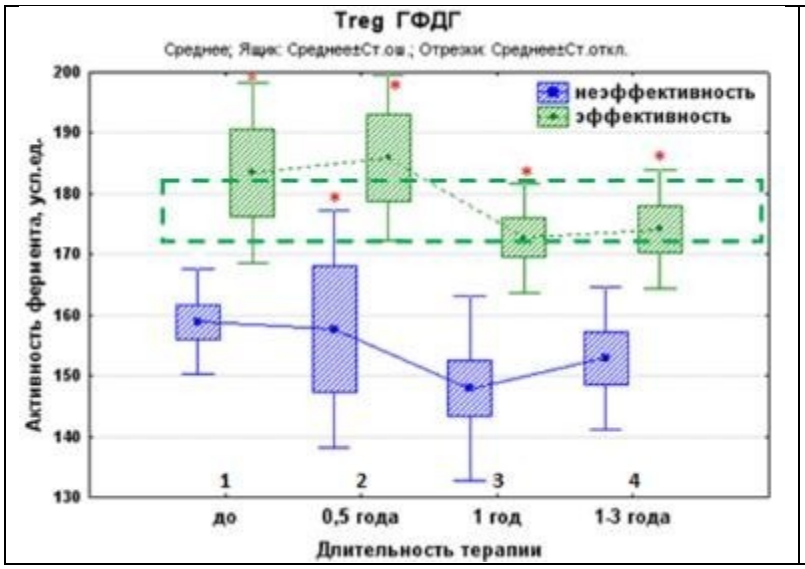


Неэф.	Эффект.
p_{12}=0,002	p_{12}=0,722
p_{13}=0,376	p_{13}=0,204
p_{14}=0,325	p_{14}=0,325
p_{23}<0,001	p_{23}=0,411
p_{24}<0,001	p_{24}=0,588
p_{34}=0,024	p_{34}=0,909

Примечание: * – достоверность различий между группами, p<0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности СДГ в популяции Th17 лимфоцитов (186-201 усл.ед.)

Рисунок 3.80 – Динамика активности СДГ в Th17-лимфоцитах у детей с РС при разной эффективности терапии INFβ-1a

Активность ГФДГ в Treg в группе пациентов с НЭ во все периоды наблюдения была ниже диапазона референсных значений, достоверно ниже значений группы пациентов с хорошим эффектом ГИБП и значимо не изменялась в течении всего периода наблюдений (Рисунок 3.81).



Неэф.	Эффект.
p_{12}=0,741	p_{12}=0,456
p_{13}=0,348	p_{13}=0,261
p_{14}=0,869	p_{14}=0,518
p_{23}=0,198	p_{23}=0,018
p_{24}=0,307	p_{24}=0,027
p_{34}=0,562	p_{34}=0,677

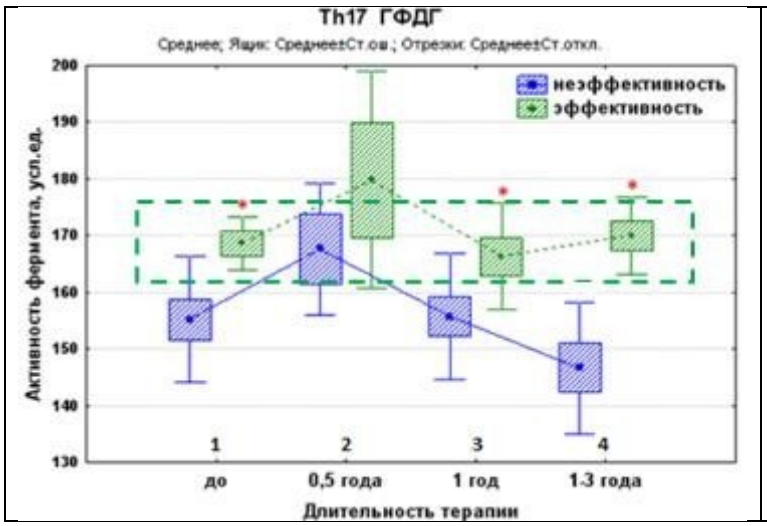
Примечание: * – достоверность различий между группами, p <0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности ГФДГ в популяции Treg (173-182 усл.ед.)

Рисунок 3.81 – Динамика активности ГФДГ в популяции Treg у детей с РС при разной эффективности терапии INFβ-1a

В группе пациентов с РС с хорошим эффектом ГИБП активность ГФДГ в популяции Treg до терапии и к 6 месяцам терапии была выше диапазона

референсных значений, а к году и к периоду «1-3 года» лечения достоверно снижалась и находилась в пределах референсного диапазона (Рисунок 3.81).

Активность ГФДГ в Th17-лимфоцитах у пациентов с РС в группе НЭ через 6 месяцев лечения находилась в диапазоне референсных значений, в остальные периоды наблюдения была ниже диапазона референсных значений и группы с эффективным лечением. При этом, у пациентов с РС в группе НЭ наблюдалось достоверное увеличение активности ГФДГ в Th17-лимфоцитах к 6 месяцам лечения и значимое снижение после года терапии INFβ-1a (Рисунок 3.82).



Неэф.	Эффект.
p_{12}=0,041	p_{12}=0,628
p_{13}=0,726	p_{13}=0,790
p_{14}=0,189	p_{14}=0,755
p_{23}=0,006	p_{23}=589
p_{24}<0,001	p_{24}=0,869
p_{34}=0,562	p_{34}=0,599

Примечание: * – достоверность различий между группами, p <0,05; зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон активности ГФДГ в Th17-лимфоцитах (161-176 усл.ед.)

Рисунок 3.82 – Динамика активности ГФДГ в популяции Th17-лимфоцитов у детей с РС при разной эффективности терапии INFβ-1a

В группе пациентов с РС при эффективном лечении активность ГФДГ в Th17-лимфоцитах находилась в пределах диапазона референсных значений, за исключением периода 6 месяцев (выше диапазона референсных значений) и достоверно не изменялась в течении всего периода наблюдения (Рисунок 3.82).

Таким образом, активность митохондриальных ферментов в основных и малых популяциях лимфоцитов у пациентов с РС при недостаточно эффективном лечении (появление активных очагов на МРТ) была достоверно ниже относительно группы сравнения и группы пациентов с хорошим эффектом INFβ-1a (отсутствие активных очагов).

ROC–анализ для разделительной модели «эффективность – неэффективность» ГИБП по активности митохондриальных дегидрогеназ в популяциях лимфоцитов у пациентов с РС

Проведённый ROC–анализ для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по активности СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов до назначения ГИБП показал хорошее (AUC>0,7) и очень хорошее (AUC>0,8) качество разделения для популяций CD4 лимфоцитов, NK клеток и регуляторных Т-лимфоцитов (Таблица 3.62, Рисунок 3.83).

Таблица 3.62 – Показатели ROC-анализа в разделительной модели «эффективность-неэффективность» ГИБП по активности СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов до назначения INFβ-1a у детей с РС

Показатель	AUC	cut-off, усл.ед (Se %; Sp %)
До начала INFβ-1a		
Активность СДГ в CD4	0,743 (0,565 - 0,921)	184,6 (75; 64)
Активность СДГ в NK	0,866 (0,705- 0,996)	180,9 (88; 91)
Активность СДГ в Treg	0,878 (0,760 - 0,996)	187 (75; 77)
Активность ГФДГ в NK	0,852 (0,701 - 0,995)	172,7 (75; 91)
Активность ГФДГ в Treg	0,761 (0,583 - 0,940)	168,1 (75; 91)

Получены пороговые значения по активности СДГ у пациентов с РС до назначения INFβ-1a в популяциях лимфоцитов, ниже которых можно прогнозировать развитие неэффективности ГИБП к году терапии: для CD4 лимфоцитов с вероятностью 75%, для NK клеток с вероятностью 88% и для Treg клеток с вероятностью 75% (Рисунок 3.83А).

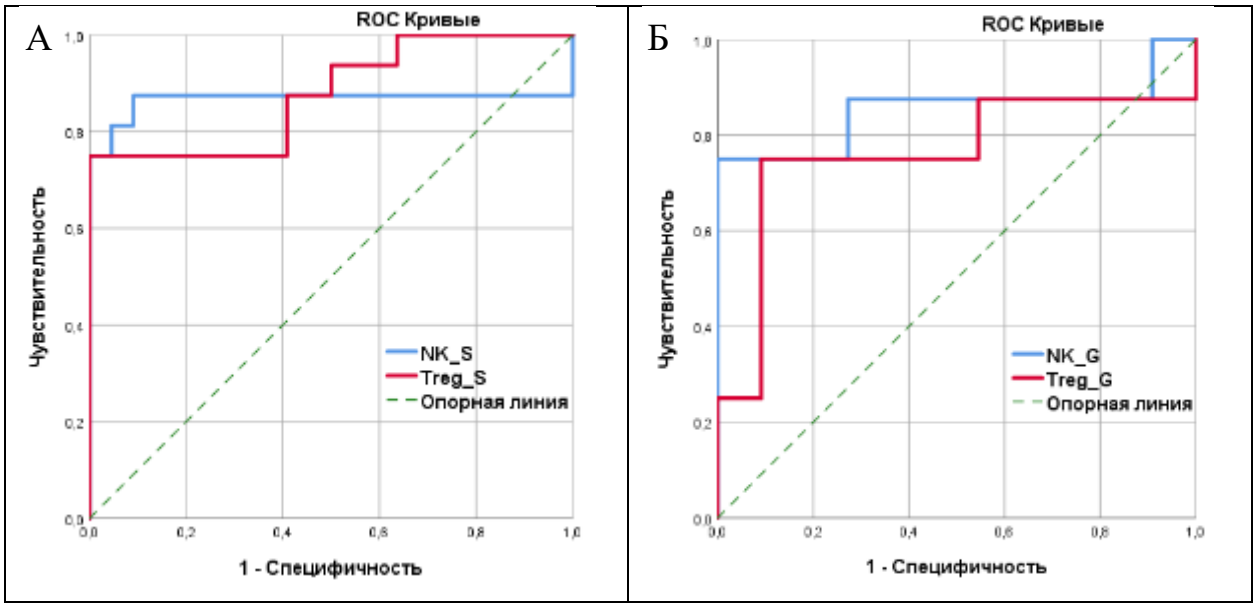


Рисунок 3.83 – ROC-кривые для разделительной модели «эффективность-неэффективность» по активности СДГ (А) и ГФДГ (Б) в популяциях NK лимфоцитов и Treg до назначения INFβ-1a у детей с РС

Также получены пороговые значения по активности ГФДГ до назначения INFβ-1a, ниже которых у пациентов с РС можно прогнозировать развитие неэффективности ГИБП к году терапии: в популяциях NK клеток с вероятностью 75% и в Treg с вероятностью 75% (Рисунок 3.83Б).

3.2.4. Оценка содержания белков окислительного фосфорилирования и гликолиза в лизатах лимфоцитов у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями и в группе сравнения

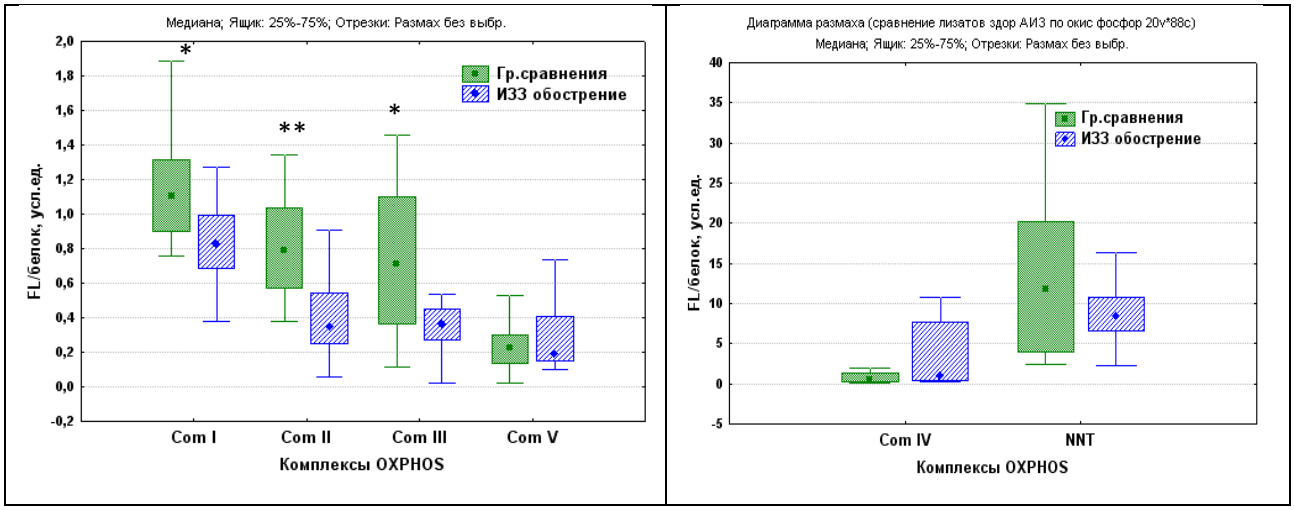
На следующем этапе работы был проведен количественный анализ белков окислительного фосфорилирования и гликолиза в лизатах лимфоцитов у пациентов в обострении ИЗЗ (30 детей с вульгарным псориазом, 36 детей с ВЗК) и у 32 детей группы сравнения с помощью мультиплексного анализа.

Проведенное исследование у пациентов с ИЗЗ показало значимое снижение белков I – III комплексов OXPHOS относительно группы сравнения (Таблица 3.63).

Таблица 3.63 – Содержание белковых комплексов OXPHOS в группе сравнения и у пациентов с ИЗЗ в обострении заболевания (FL/белок, усл. ед.)

Комплекс	Группа сравнения	Пациенты с ИЗЗ (обострение)
Complex I: НАД*Н - убихинон оксидоредуктаза	1,10 (0,90 - 1,31)	0,8 * (0,66 - 0,91)
Complex II: Сукцинат убихинон оксидоредуктаза	0,79 (0,57 - 1,04)	0,35 ** (0,24 - 0,50)
Complex III: Убихинон цитохром С оксидоредуктаза	0,71 (0,37 - 1,10)	0,36 * (0,28 - 0,45)
Complex IV: Цитохром С оксидаза	0,54 (0,26 - 1,33)	0,62 (0,40 - 7,50)
Complex V: АТФ синтаза	0,23 (0,14 - 0,30)	0,18 (0,15 - 0,39)
NNT: Никотинамид нуклеотид трансгидрогеназа	11,83 (4,00 – 20,27)	7,91 (5,82 - 10,17)
Примечание: * – достоверность различий между группой сравнения и пациентами с p<0,05; ** – достоверность различий между группой сравнения и пациентами с p<0,001		

Выявлено снижение НАДФ-убихинон оксидоредуктазы (I комплекс) на 28% (p=0,002), сукцинат убихинон оксидоредуктазы (II комплекс) на 56% (p<0,001), убихинон цитохром С оксидоредуктаза (III комплекс) на 49% (p=0,009) у детей с ИЗЗ в обострении относительно группы сравнения (Таблица 3.63, Рисунок 3.84).



Примечание: * – достоверность различий между группами, p <0,05;
**-. достоверность различий между группами, p <0,001.

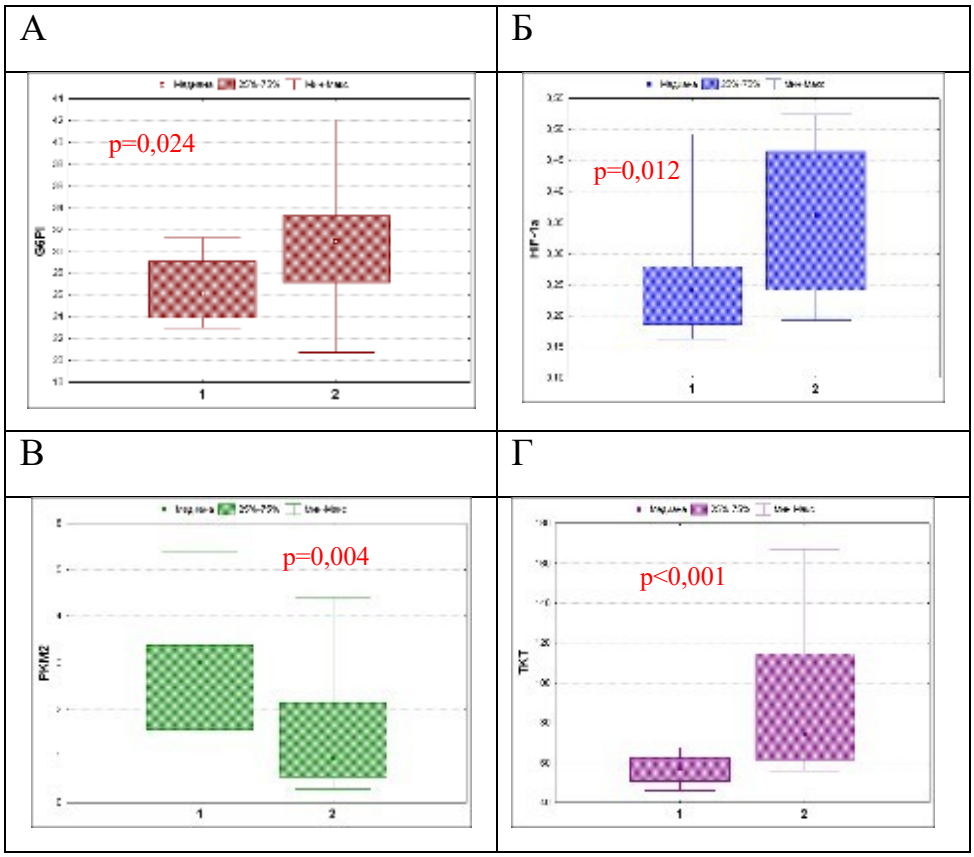
Рисунок 3.84 – Содержание белковых комплексов OXPHOS в группе сравнения и у пациентов с ИЗЗ в обострении заболевания

Проведенный анализ содержания белков гликолиза в группе пациентов с ИЗЗ и в группе сравнения показал, что интенсивность флюоресценции (IF) белков

гликолиза у детей с ИЗЗ была увеличена для белков: глюкозо-6-фосфат изомеразы (G6PI) на 18% (p=0,024), гипоксия-индуцируемого фактора 1-альфа (HIF-1α) на 50% (p=0,012), транскетолазы (TKT) на 29% (p=0,004) и снижена для M2 изоформы пируваткиназы (PKM2) на 68% (p<0,001) (Таблица 3.64, Рисунок 3.85).

Таблица 3.64 – Содержание белков гликолиза в группе сравнения и у пациентов с ИЗЗ в обострении заболевания (FL/белок, усл. ед.)

Комплекс	Группа сравнения	ИЗЗ обострение
ENO1 - Енолаза 1	0,52 (0,39 – 1,07)	0,80 (0,58 – 0,91)
G6PI (Глюкозо-6-фосфат изомераза)	26,1 (23,9 – 29,1)	30,9 (27,1 – 33,3)*
HIF-1a (Гипоксия-индуцируемый фактор 1-альфа)	0,24 (0,19 – 0,28)	0,36 (0,24 – 0,46)*
LDHA (A цепь L-лактат дегидрогеназы)	10,83 (4,74 – 13,36)	5,52 (2,15 – 5,7)
LDHB (B цепь L-лактат дегидрогеназы)	27,6 (25,3 – 28,9)	29,8 (21,4 – 34,5)
PKM2 (M2 изоформа пируваткиназы)	3,0 (1,57 – 3,37)	0,93 (0,56 – 2,14)*
TKT (Транскетолаза)	57,2 (50,9 – 62,5)	73,7 (61,7 – 114,5)**
Примечание: * – достоверность различий между группой сравнения и пациентами с p <0,05; ** – достоверность различий между группой сравнения и пациентами с p <0,001		



Примечание: А – Глюкозо-6-фосфат изомераза; Б – Гипоксия-индуцируемый фактор 1-альфа; В – М2 изоформа пируваткиназы; Г – Транскетолаза

Рисунок 3.85 – Содержание белков гликолиза в группе сравнения (1) и у пациентов с ИЗЗ в обострении заболевания (2) (FL/белок, усл. ед.)

Получено, что сравнение активности СДГ, измеренной иммуноцитохимическим методом, и количество белка II комплекса OXPHOS по результатам мультиплексного анализа показало хорошее соответствие показателей - r=0,68, p=0,004 (Рисунок 3.86).

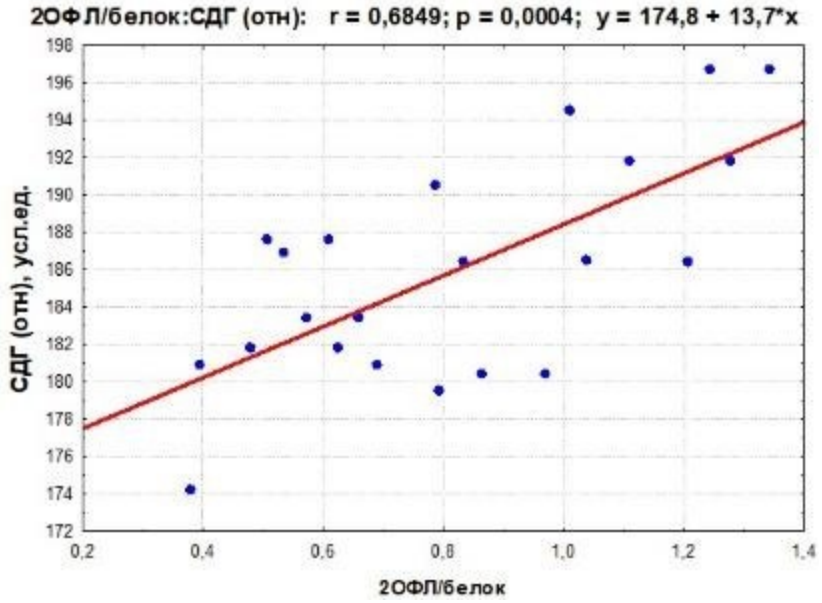


Рисунок 3.86 – Зависимость активности СДГ и содержания белка II этапа дыхательной цепи

Таким образом, анализ содержания белков окислительного фосфорилирования выявил снижение показателей I-III комплексов OXPHOS у пациентов с ИЗЗ в состоянии обострения. Содержание белков гликолиза глюкозо-6-фосфат изомеразы, гипоксия-индуцируемого фактора 1-альфа и транскетолазы было увеличено, а М2 изоформы пируваткиназы снижено относительно группы сравнения. У пациентов с ИЗЗ наибольшее снижение выявлено в содержании белка II комплекса дыхательной цепи, что согласуется с полученными ранее данными о снижении активности СДГ у детей с ИЗЗ в стадии обострения.

Резюме.

1. Показано снижение активности СДГ в основных и малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов до назначения ГИБП у пациентов с ВЗК при неэффективности терапии относительно группы пациентов с эффективностью терапии к году лечения и группы сравнения: у пациентов при лечении IFX – в популяциях CD3, CD4, CD8, CD19, Th17-лимфоцитов и в регуляторных Т-клетках; у пациентов при лечении ADA – в популяциях CD3, CD4, CD8 и Treg.

2. Выявлено снижение активности ГФДГ в популяциях CD3, CD4, в регуляторных Т-клетках и Th17-лимфоцитах до назначения терапии у пациентов с ВЗК с неэффективностью IFX относительно группы пациентов с эффективностью

терапии. У пациентов с ВЗК при лечении ADA достоверных отличий по активности ГФДГ между группами пациентов не наблюдалось.

3. Показатель соотношения активности СДГ к ГФДГ у пациентов с ВЗК до назначения терапии в популяции Treg независимо от ГИБП (IFX/ADA) выше в группе пациентов с эффективностью терапии относительно группы сравнения.

4. Установлено снижение активности СДГ у пациентов с ВЗК в группе с неэффективностью терапии относительно группы пациентов с эффективностью в патогенетически значимых популяциях Treg и Th17-лимфоцитах во все периоды лечения у пациентов при лечении IFX, у пациентов при лечении ADA - только в Treg.

5. У пациентов с ВЗК в разделительной модели «эффективность – неэффективность» получены пороговые значения активности СДГ в популяциях лимфоцитов до назначения терапии, ниже которых можно прогнозировать развитие неэффективности блокаторов TNF к году терапии: у пациентов на IFX - в Treg и Th17-лимфоцитах - 185 усл.ед., 186 усл.ед. соответственно; у пациентов терапии на ADA в Treg лимфоцитах - 186 усл.ед.

6. У пациентов с ВЗК в разделительной модели «эффективность – неэффективность» получены пороговые значения активности СДГ в популяциях лимфоцитов к году терапии: у пациентов на IFX - в Treg и Th17-лимфоцитах -188 усл.ед., 179 усл.ед. соответственно; у пациентов при лечении ADA - в Treg лимфоцитах - 189 усл.ед. Снижение активности СДГ ниже пороговых значений после индукционного курса терапии позволяет прогнозировать потерю эффективности проводимой терапии блокаторами TNF.

7. У пациентов с ПС до назначения ADA в группе пациентов с недостижением PASI 75 относительно группы сравнения и группы пациентов с достижением PASI 75 выявлены более низкие значения активности митохондриальных дегидрогеназ: СДГ - в основных и малых популяциях лимфоцитов; ГФДГ – в CD8+ Т-лимфоцитах и NK-клетках.

8. У пациентов с ПС в группе с неэффективностью терапии ADA показаны более низкие значения активности СДГ в патогенетически значимых

популяциях Treg и Th17-лимфоцитах во все периоды лечения относительно группы пациентов с эффективностью лечения

9. У пациентов с ПС в разделительной модели «эффективность – неэффективность» получены пороговые значения по активности СДГ в популяциях CD4+ Т-лимфоцитов и в регуляторных Т-клетках, ниже которых можно прогнозировать развитие неэффективности ГИБП: до назначения терапии – 193 усл.ед. в обеих популяциях; после индукционного курса – 188 усл.ед. и 182 усл.ед.; к году терапии – 186 усл.ед. и 184 усл.ед. соответственно.

10. У пациентов с РС при недостаточной эффективности терапии INFβ-1a в основных и малых популяциях CD4+ Т-лимфоцитов активность СДГ и ГФДГ достоверно ниже до назначения терапии INFβ-1a, чем в группе сравнения (за исключением отсутствия отличий по ГФДГ в NK-клетках), а также ниже чем в группе с эффективностью терапии (кроме отсутствия отличий по активности СДГ в В-лимфоцитах).

11. У пациентов с РС установлены отличия по соотношению СДГ к ГФДГ до назначения терапии INFβ-1a относительно группы сравнения: более низкие показатели в NK клетках у пациентов с недостаточной эффективностью; более высокие показатели в регуляторных Т-клетках у пациентов с эффективностью ГИБП

12. У пациентов с РС в популяции $CD8^+$ Т-лимфоцитов показано достоверное снижение активности СДГ в группе с недостаточной эффективностью относительно группы с эффективностью терапии во все периоды лечения ГИБП

13. У пациентов с РС в Treg и Th17-лимфоцитах выявлено достоверное снижение активности СДГ и ГФДГ у пациентов с недостаточной эффективностью INFβ-1a относительно группы пациентов с эффективностью ГИБП во все периоды наблюдения кроме индукционного курса.

14. У пациентов с РС в разделительной модели «эффективность – неэффективность» получены пороговые значения активности митохондриальных дегидрогеназ в популяциях лимфоцитов до назначения INFβ-1a с наилучшими значениями ROC-анализа, ниже которых можно прогнозировать развитие

неэффективности ГИБП для активности СДГ в NK-клетках и Treg – 181 усл.ед. и 187 усл.ед. соответственно; для активности ГФДГ в NK-клетках и Treg – 173 усл.ед. и 168 усл.ед. соответственно.

15. У пациентов с ИЗЗ в обострении заболевания выявлено снижение белков окислительного фосфорилирования НАД*Н - убихинон оксидоредуктазы на 28%, сукцинат убихинон оксидоредуктазы на 56%, убихинон цитохром С оксидоредуктазы на 49% и увеличение содержания белков гликолиза – глюкозо-6-фосфат изомеразы на 18%, гипоксия-индуцируемого фактора 1-альфа на 50% и транскетолазы на 29% и снижение М2 изоформы пируваткиназы на 68%.

16. Показано хорошее соответствие результатов определения активности СДГ иммуноцитохимическим методом и с помощью мультиплексного анализа.

3.2.5. Оценка содержания малых популяций Т-хелперов, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями

Пуринергическая система регуляции оказывает модулирующее действие на системные и местные воспалительные реакции при иммунозависимых заболеваниях. АТФ является сигналом опасности – DAMP (damage associated molecular patterns) и активирует пуринергические рецепторы на близлежащих клетках, приводя, в конечном итоге, к секреции провоспалительных цитокинов, хемокинов, образованию активных форм кислорода и дифференцировке эффекторных Т-клеток. Уровень внеклеточного АТФ контролируется ферментами - эктонуклеотидазами CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 – E-NTPDase1) и CD73 (ecto-5'-nucleotidase - Ecto5'NTase), которые экспрессируются на разных типах клеток (Treg, NK, моноциты, дендритные клетки и др.). CD39 и CD73 катализируют последовательное дефосфорилирование АТФ до аденозина, обладающего противовоспалительными свойствами. Эктонуклеотидаза CD73 выполняет свои ферментативные свойства не только экспрессируясь на поверхности клеток, но и находясь в растворимой форме.

В данном разделе работы оценивали содержание популяций Treg, Thact, Th17-лимфоцитов, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, у пациентов с ИЗЗ в обострении и ремиссии, в группах с разной эффективностью ГИБП (до начала терапии, после индукционного курса, к году терапии).

3.2.5.1. Содержание малых популяций CD4+ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73 и АТФ-азная активность CD39 в Treg у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника

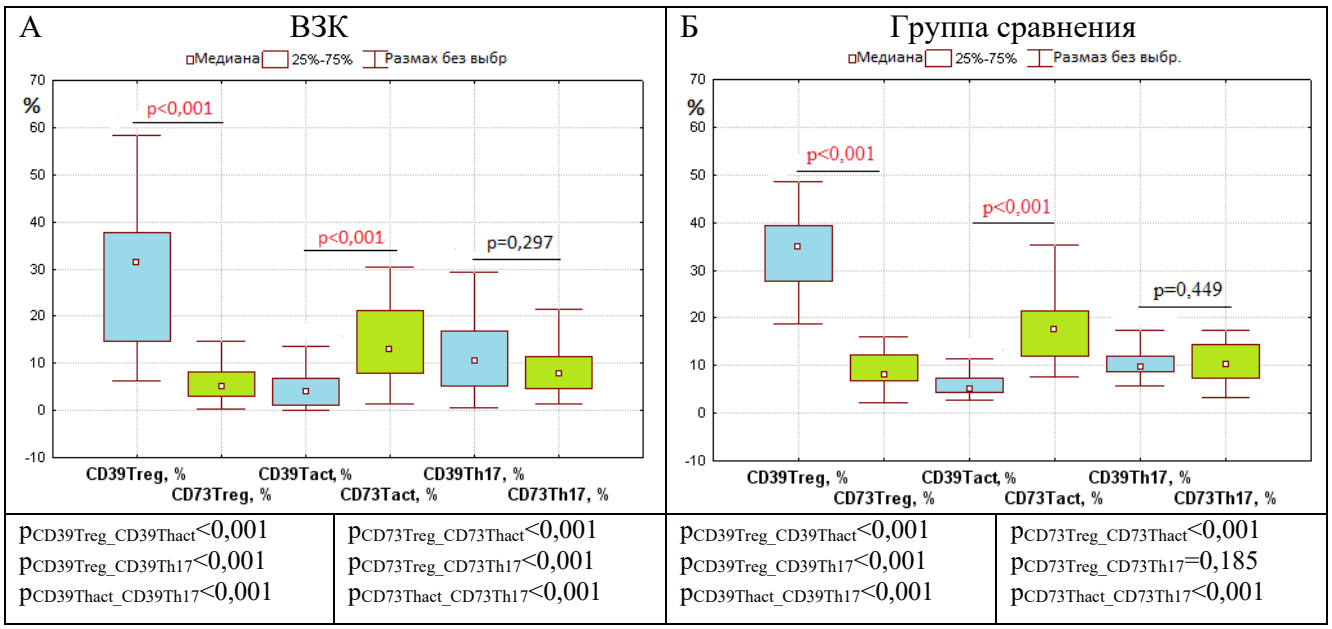
Анализ содержания популяций Treg, Thact, Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73 у детей с ВЗК (CD39Treg, CD73Treg, CD39Thact, CD73Thact, CD39Th17, CD73Th17) показал, что наибольшее относительное содержание клеток с экспрессией фермента CD39 выявлено в популяции Treg (CD39Treg, % Treg) – от 6 до 58% от Treg, наименьшее содержание - в популяции Thact – от 0 до 14% от популяции Thact. Наибольшее содержание клеток с экспрессией фермента CD73 наблюдалось в Thact – от 2 до 30% от популяции Thact. В группе сравнения содержание популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73 (Min-Max) также было максимальным в популяции Treg: CD39Treg – 19-49% от Treg, а минимальным в популяции Thact: CD39Thact – 3-11%. Максимальное относительное содержание клеток с экспрессией CD73 в группе сравнения также, как у пациентов с ВЗК, выявлено в популяции активированных хелперов: CD73Thact – 8-35% от популяции Thact. Группа пациентов с ВЗК и группа сравнения по возрасту не отличались:12,6 (3,4-18,0) лет против 13,5 (3,4-18,0) лет; p=0,212.

Относительное содержание клеток с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у пациентов с ВЗК было значимо ниже в популяциях Treg и Thact относительно группы сравнения (Таблица 3.65). При этом, уровень Th17-лимфоцитов с экспрессией фермента CD39 у пациентов с ВЗК и в группе сравнения не отличался, а содержание популяции CD73Th17 было значимо ниже у пациентов с ВЗК (Таблица 3.65).

Таблица 3.65 – Относительное содержание минорных популяций Т-лимфоцитов ($CD4^+$), экспрессирующих CD39 и CD73 у пациентов с ВЗК и в группе сравнения

Фермент / Популяция	Пациенты с ВЗК Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$), n=174		Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$), n=46	
	CD39	CD73	CD39	CD73
Treg, %	29,3* (15,0-37,6)	4,9* (2,6-8,3)	34,2 (27,2-38,4)	8,7 (6,9-12,2)
Thact, %	4,1* (1,6-7,2)	13,9* (9,4-21,1)	5,1 (4,4-7,4)	17,3 (12,3-21,7)
Th17,%	10,0 (5,2-16,8)	7,7* (5,3-12,2)	9,7 (8,8-12,4)	10,3 (7,4-16,6)
Примечание: * – достоверность различий между группой пациентов с ВЗК и группой сравнения, p<0,05				

Доля клеток с экспрессией CD39 и CD73 в популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК, как и в группе сравнения, зависела от популяции клеток: в популяции Treg количество клеток с экспрессией CD39 было достоверно выше, чем с экспрессией CD73, в популяции Thact, наоборот, содержание клеток с экспрессией CD73 было значимо выше, чем с экспрессией CD39 (Рисунок 3.87).



$p_{CD39Treg_CD39Thact}$<0,001 $p_{CD39Treg_CD39Th17}$<0,001 $p_{CD39Thact_CD39Th17}$<0,001	$p_{CD73Treg_CD73Thact}$<0,001 $p_{CD73Treg_CD73Th17}$<0,001 $p_{CD73Thact_CD73Th17}$<0,001	$p_{CD39Treg_CD39Thact}$<0,001 $p_{CD39Treg_CD39Th17}$<0,001 $p_{CD39Thact_CD39Th17}$<0,001	$p_{CD73Treg_CD73Thact}$<0,001 $p_{CD73Treg_CD73Th17}$=0,185 $p_{CD73Thact_CD73Th17}$<0,001

Примечание: p – достоверности между популяциями лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73

Рисунок 3.87 – Относительное содержание популяций лимфоцитов (Treg, Th17, Thact), экспрессирующих CD39 и CD73, у пациентов с ВЗК (А) и в группе сравнения (Б)

Относительное содержание клеток с экспрессией ферментов CD39 и CD73 в Th17-лимфоцитах достоверно не отличалось как у пациентов с ВЗК, так и в группе сравнения (Рисунок 3.87). Сравнительный анализ содержания клеток с экспрессией эктонуклеотидаз в разных популяциях лимфоцитов показал аналогичные результаты как у пациентов с ВЗК, так и у пациентов группы сравнения. Доля клеток с экспрессией фермента CD39 была достоверновыше в популяции Treg, чем в популяции Thact и в Th17-лимфоцитах. У пациентов с ВЗК и в группе сравнения доля клеток с экспрессией фермента CD73 в Thact была значимо выше по сравнению с экспрессией этого фермента в популяциях Treg и Th17.

У пациентов с ВЗК выявлены прямые корреляционные зависимости между относительным количеством CD39Treg и CD39Thact, а также между содержанием CD39Thact и CD39Th17 (Рисунок 3.88А, Рисунок 3.88Б). Аналогичные прямые зависимости были выявлены для количества клеток с экспрессией фермента CD73: содержание CD73Treg клеток коррелировало с содержанием CD73Th17, содержание CD73Thact с CD73Th17 (Рисунок 3.88В, Рисунок 3.88Г).

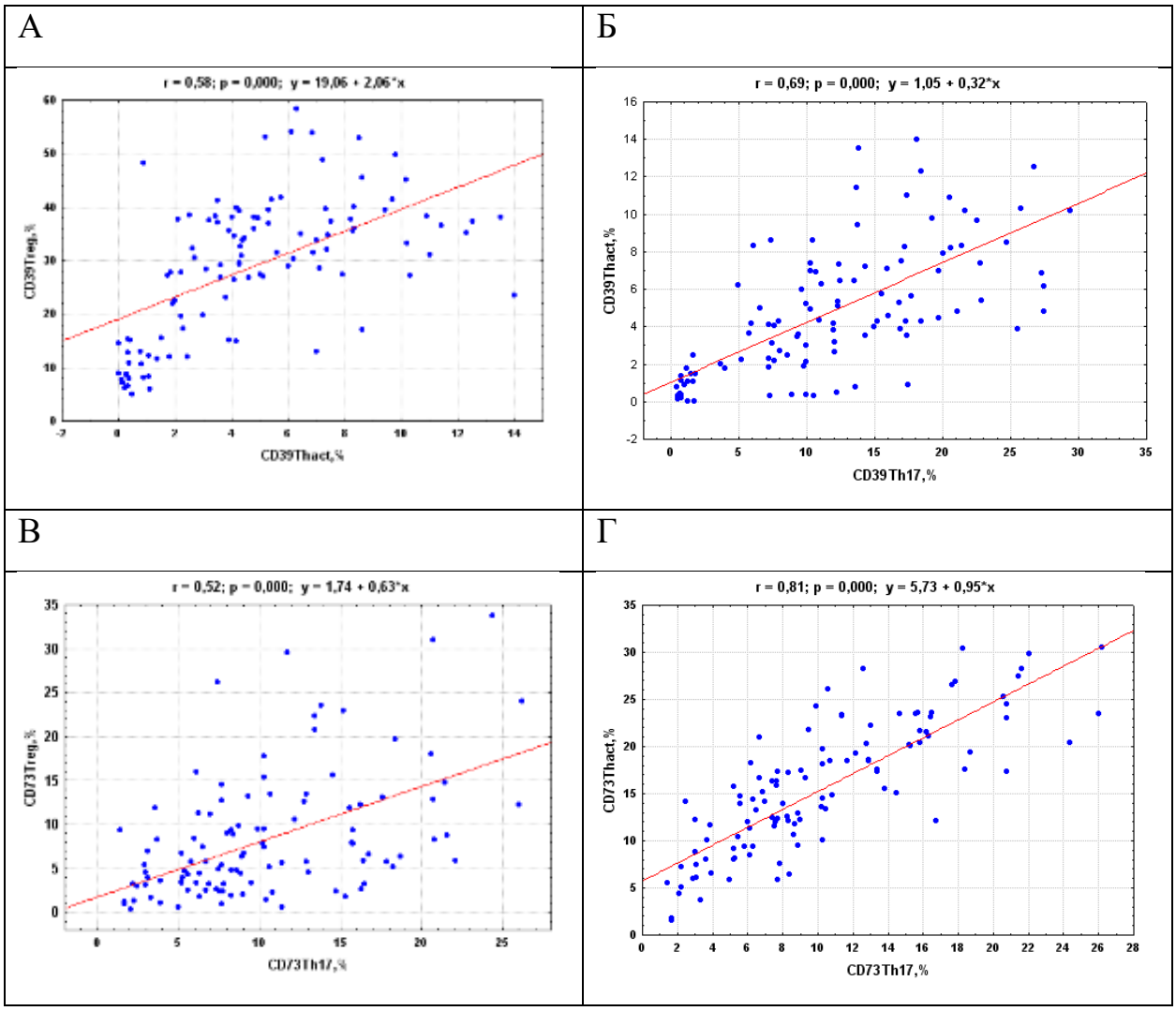


Рисунок 3.88 – Корреляционные зависимости между содержанием малых популяций Treg, Thact, Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73 у детей с ВЗК

При этом, в группе сравнения значимые прямые зависимости были получены только между CD39Thact и CD39Th17 (r=0,47; p=0,001), а также между CD73Thact и CD73Th17 (r=0,44; p=0,002).

Корреляционный анализ между содержанием Treg, Thact и Th17-клеток с экспрессией CD39 и возрастом у пациентов с ВЗК не выявил значимой зависимости. В то же время, в группе сравнения выявлена обратная зависимость содержания клеток CD39Th17 от возраста (r=-0,39; p=0,009).

Содержание доли Th17-лимфоцитов с экспрессией CD73 у пациентов с ВЗК (r=0,43; p<0,001) так же, как и в группе сравнения, увеличивалось с возрастом (r=0,29; p=0,040).

Длительность заболевания у пациентов с ВЗК составляла от 5 месяцев до 7,7 лет, а длительность проводимой терапии от 2-х до 288 недель. Зависимостей содержания клеток с экспрессией эктонуклеотидаз (CD39/CD73) от длительности заболевания и длительности терапии не выявлено.

Проведен сравнительный анализ содержания минорных $CD4^+$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD39 и CD73, у пациентов с БК и ЯК в состоянии обострения и ремиссии заболевания относительно группы сравнения (Таблица 3.66).

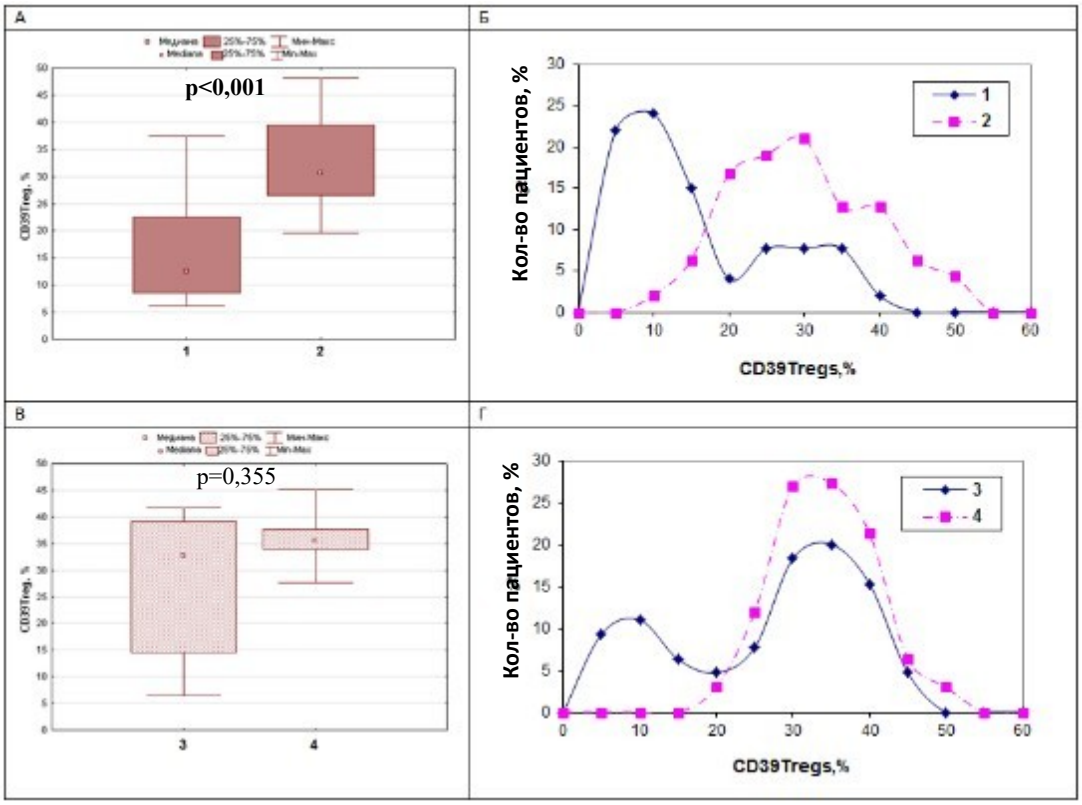
Таблица 3.66 – Относительное содержание Treg, Thact, Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39/CD73 у пациентов с БК и ЯК в обострении, ремиссии заболевания и в группе сравнения

Показатель	БК Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)		ЯК Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)		Группа сравнения (n=46)
	обострение (n=52) PUCAI (23,6 ±1,8)	ремиссия (n=48) PUCAI (9,3 ±0,7)	обострение (n=46) PCDAI (33,1 ±3,0)	ремиссия (n=28) PCDAI (9,0 ±0,3)	
CD39 Treg, %	12,9* (8,9-28,9)	33,5** (26,9-39,6)	32,3 (14,6-39,2)	34,7 (27,7-37,6)	34,2 (27,2-38,4)
CD73 Treg, %	3,9* (3,2 - 5,9)	6,1* (2,8-8,9)	4,8* (2,5-7,0)	5,9 (2,1-12,9)	8,7 (6,9-12,2)
CD39 Thact, %	1,5* (0,4-5,6)	4,6** (3,3-7,9)	4,0* (1,4-5,7)	5,7 (2,2 - 8,3)	5,1 (4,4-7,4)
CD73 Thact, %	13,6 (8,5-20,1)	13,1 (9,5-23,5)	13,3 (8,0-18,2)	16,9 (12,1-21,6)	17,3 (12,3-21,7)
CD39 Th17, %	5,9* (0,8-10,3)	9,9** (7,2-13,7)	13,8 (1,7-17,3)	13,8 (7,6-19,7)	9,7 (8,8-12,4)
CD73 Th17, %	6,8* (5,2-10, 2)	8,2 (5,8-16,5)	6,7* (5,4-9,9)	9,2 (7,7-15,8)	10,3 (7,4-16,6)
Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения с p <0,05; ** – достоверность различий между группами пациентов в обострении и ремиссии заболевания с p <0,05					

В группе детей с БК при обострении заболевания получено достоверно более низкое содержание популяций Treg, Thact, Th17 с экспрессией CD39 и CD73 относительно группы сравнения за исключением содержания Thact с экспрессией CD73 (Таблица 3.66). Между группой пациентов с БК в ремиссии заболевания и группой сравнения достоверных различий выявлено не было, за исключением более низкого содержания Treg с экспрессией CD73 у пациентов с БК (Таблица 3.66).

Для пациентов с ЯК в обострении заболевания было выявлено достоверное снижение доли Treg и Th17, экспрессирующих CD73, доли Thact, экспрессирующих CD39, относительно группы сравнения (Таблица 3.66). Между группой пациентов с ЯК в ремиссии заболевания и группой сравнения достоверных различий получено не было.

Для пациентов с БК выявлено достоверно более низкое содержание Treg с экспрессией CD39 в обострении заболевания по сравнению с группой пациентов в ремиссии (Рисунок 3.89А; Таблица 3.61). Аналогичное снижение выявлено для популяций CD39Thact и CD39Th17 (Таблица 3.66).



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 Б и Г по оси ординат – % пациентов

Рисунок 3.89 – Содержание $CD39^+$ в Treg у пациентов с БК и ЯК в обострении и ремиссии заболевания

Для пациентов с ЯК достоверных отличий между группами в обострении и ремиссии заболевания выявлено не было (большой разброс значений при обострении) (Рисунок 3.89В).

Проведена сравнительная оценка распределения пациентов с БК (Рисунок 3.89Б) и ЯК (Рисунок 3.89Г) в зависимости от содержания Treg с экспрессией CD39 в группах с обострением и ремиссией заболевания. При анализе распределения содержания CD39Treg клеток у пациентов с БК в обострении заболевания выявлялись пациенты с низкими и высокими показателями. Как видно на графиках, точка разделения пациентов в обострении заболевания с высоким и низким содержанием Treg с экспрессией CD39 составляла 20% клеток от популяции Treg (Рисунок 3.89Б, Г). При этом, у 78% пациентов в обострении заболевания (группа 1) популяция CD39Treg клеток составляла менее 20% клеток, а у 82% пациентов в состоянии ремиссии (группа 2) – более 20% клеток (Рисунок 3.89Б). У 33% пациентов с ЯК в группе 3 (обострение) фермент CD39 в популяции Treg экспрессировался менее, чем в 20% клеток, у 67% пациентов – более, чем в 20% Treg (Рисунок 3.89Г). У 100% пациентов с ЯК в ремиссии заболевания (группа 4) содержание CD39Treg было более 20% (Рисунок 3.89Г).

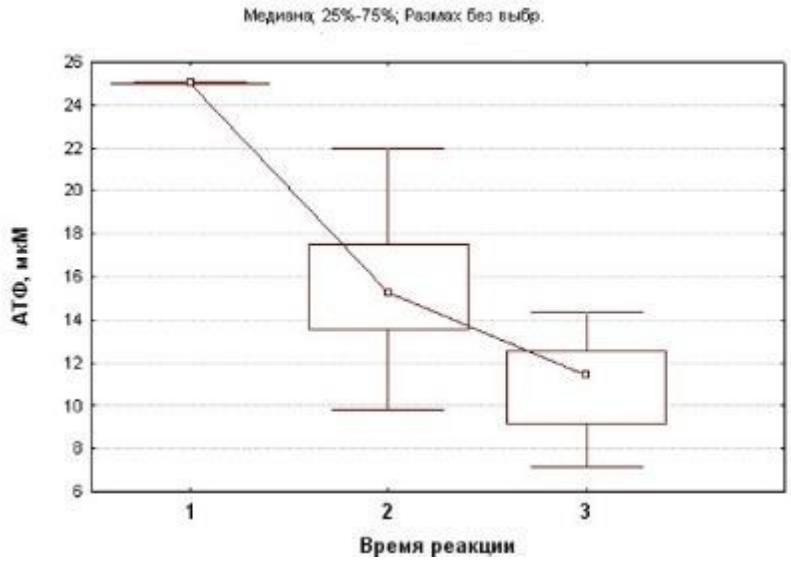
Таким образом, в обострении БК и ЯК выявлялись пациенты как с низким (менее 20%), так и с высоким содержанием CD39Treg, причём в обострении БК большинство пациентов имели низкое содержание популяции CD39Treg (78% пациентов). На следующем этапе работы оценили АТФ-азную активность CD39 в популяции регуляторных Т-клеток.

Каталазная активность CD39 в популяции Treg у пациентов с ВЗК

Каталитическую активность эктонуклеотидазы CD39 в Treg оценивали по динамике снижения экзогенно добавленного АТФ (25 мкМ) к выделенным на клеточном сортере (SONY SH80) клеткам CD39Treg у 68 пациентов ВЗК (обострение ВЗК – 40 пациентов, ремиссия ВЗК - 28 пациентов).

В клеточном осадке всех исследованных образцов АТФ определялась в следовых количествах (Me - 0,029 (0,021-0,031) мкМ). Анализ динамики снижения концентрации экзогенно добавленного АТФ (25 мкМ) у пациентов с ВЗК показал, что в первые 5 минут реакции (время реакции – 2 точка) уровень АТФ снижался с 25 мкМ до 15,3 (13,6- 17,5) мкМ – на 39% от исходного уровня (Рисунок 3.90). Через 30 минут инкубации при 37°С (время реакции – 3 точка) уровень АТФ продолжал

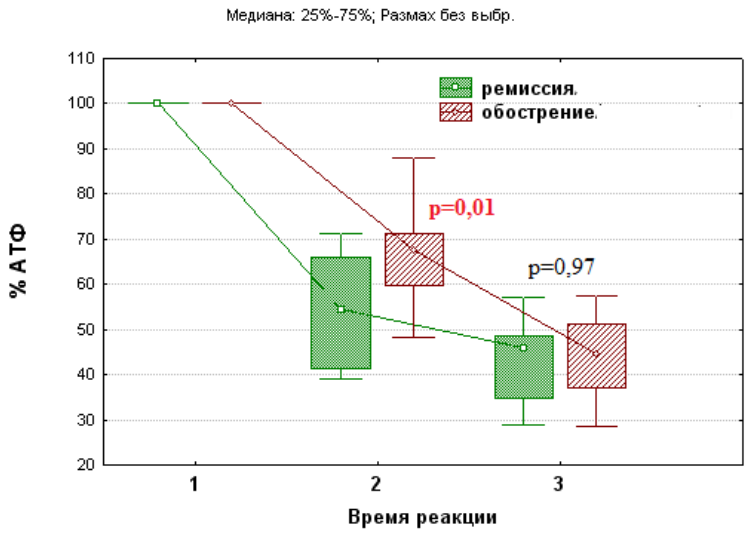
снижаться и составлял 11,4 (9,2-12,6) мкМ, 54,4% от исходного уровня (Рисунок 3.90).



Примечание: по оси абсцисс – время после добавления АТФ: 1 – 0 минут, 2 – 5 минут, 3 – 35 минут

Рисунок 3.90 – Динамика уровня экзогенного АТФ в супернатанте CD39Treg у пациентов с ВЗК

Анализ динамики снижения уровня АТФ у пациентов с ВЗК в состоянии ремиссии и обострения показал, что реакция гидролиза АТФ начинается сразу после добавления экзогенного АТФ (Рисунок 3.91).



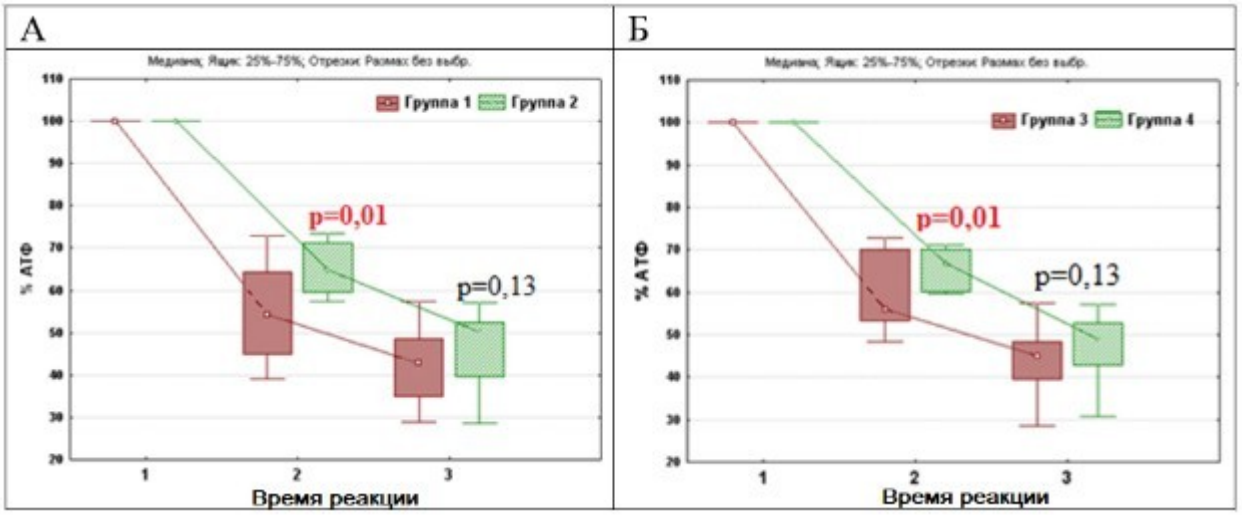
Примечание: по оси абсцисс – время после добавления АТФ: 1 – 0 минут, 2 – 5 минут, 3 – 35 минут. Исходный уровень АТФ соответствует 100%

Рисунок 3.91 – Динамика снижения уровня АТФ в супернатантах CD39Treg у пациентов с ВЗК в состоянии обострения и ремиссии

В состоянии ремиссии ВЗК концентрация АТФ через 5 минут реакции снижалась на 44,5% (Me 54,5 (41,5-65,9) %), в то время как у пациентов в обострении – на 32,5% (Me 67,5 (59,7-71,3) %) (Рисунок 3.91). У пациентов в состоянии ремиссии ВЗК снижение содержания АТФ во 2 точке было значимо больше, чем у пациентов в состоянии обострения (p=0,01) (Рисунок 3.91). Таким образом, можно сделать заключение, что АТФ-азная активность эктонуклеотидазы CD39 в популяции Treg выше у пациентов в состоянии ремиссии, чем у пациентов в обострении заболевания.

Реакция гидролиза АТФ проходила достаточно быстро (минуты) и в точке 3 (через 30 мин инкубации при 37°C) достоверной разницы между группами пациентов с ВЗК в состоянии обострения и ремиссии не выявлено (p=0,97).

Для оценки гидролиза АТФ в зависимости от количества клеток в образцах анализировали группы с низким и высоким уровнем абсолютного содержания популяции CD39Treg и оценивали группы с крайними значениями: группа 1 <300 кл/мкл (Me – 108 (73-247) кл/мкл), группа 2 > 800 кл/мкл (Me – 1228,65 (895-1738) кл/мкл) (Рисунок 3.92А).



Примечание: А – группа 1 (< 300 кл/мкл); группа 2 (> 800 кл/мкл); Б – группа 3 (2,3-4,6 MFI), группа 4 (6,85-7 MFI)

Рисунок 3.92 – Динамика уровня АТФ в зависимости от абсолютного количества CD39Treg у пациентов с ВЗК

Через 5 минут после добавления АТФ (2 точка) наблюдался достоверно меньший уровень АТФ в группе 1 по сравнению с группой 2 (Рисунок 3.92А), что

может свидетельствовать о большей активности фермента CD39 в группе 1. В 3-й точке (через 30 минут после добавления АТФ) достоверной разницы между группами 1 и 2 обнаружено не было. Таким образом, образцы с меньшим количеством клеток показали более высокую активность эктонуклеотидазы CD39. Аналогичным образом анализировали зависимость концентрации АТФ от интенсивности экспрессии CD39 в Treg (MFl – средняя интенсивность флюоресценции) (Рисунок 3.92Б). Образцы были разделены на группы: группа 3 – образцы с показателем флюоресценции FL в диапазоне 2,3-4,6 MFI (Me – 3,9 (3,87-4,25)), группа 4 – образцы с Fl в диапазоне 6,85-7 MFI (Me – 6,76 (6,41-6,9)). Через 5 минут после добавления АТФ снижение концентрации АТФ было достоверно выше в группе 3, чем в группе 4 (p = 0,01) (Рисунок 3.92Б). При этом, снижение концентрации в группе 3 составило 45,5% от исходного уровня, а в группе 4 – 33,3%. Регуляторные Т-клетки с меньшей плотностью экспрессии эктонуклеотидазы CD39 проявляли более высокую ферментативную активность через 5 минут реакции. Через 30 минут реакции достоверных отличий по ферментативной активности CD39 между группами выявлено не было.

Таким образом, у пациентов в состоянии ремиссии ВЗК эктонуклеотидаза CD39 в популяции Treg обладала большей ферментативной активностью по сравнению с пациентами в обострении заболевания. Выявлено, что ферментативная активность CD39 зависела от количества клеток: чем меньше CD39Treg клеток, тем была больше каталитическая активность эктонуклеотидазы.

Содержание Treg, Thact и Th17-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73 у пациентов с ВЗК при разной эффективности блокаторов TNF

Пациенты с ВЗК по эффективности блокаторов TNF к году терапии были поделены на группы с недостаточной эффективностью (НЭ) – группа 1 (n=56) и с эффективностью ГИБП – группа 2 (n=60).

Для оценки информативности показателей пуринергической регуляции в прогнозе эффективности ГИБП у пациентов с ВЗК проведён анализ содержания популяций Treg, Thact и Th17 с экспрессией CD39 и CD73 до введения, после

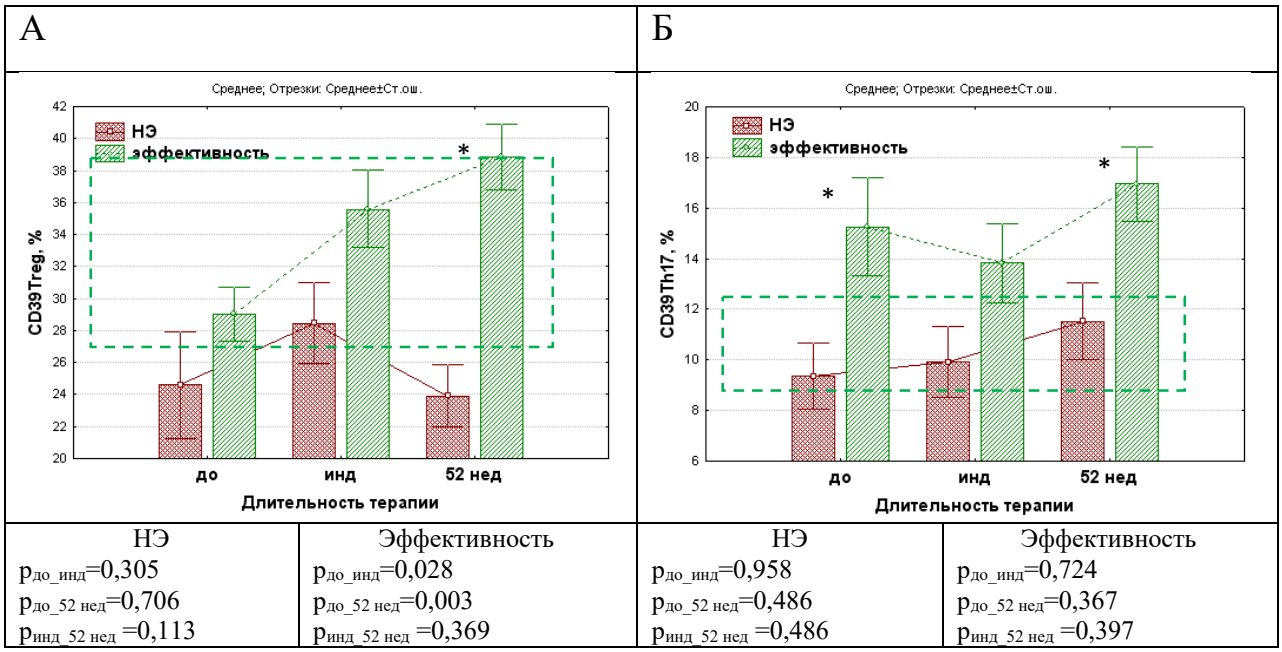
индукционного курса, через год терапии в группах с разной эффективностью лечения к году терапии (Таблица 3.67).

Таблица 3.67 – Относительное содержание Treg, Thact, Th17-лимфоцитов, экспрессирующих CD39 и CD73, у пациентов с ВЗК при разной эффективности блокаторов TNF

Показатель	Период терапии ГИБП	Группа 1 n=56	Группа 2 n=60
CD39Treg, %	*До*	19,8 (12,8-37,7)	31,1 (24,3-35,5)
	Инд.курс	30,4 (17,3-38,1)	35,0 (32,0-39,4)
	52 нед	27,1 (12,2-33,2)	37,3 (29,1-48,3)**
CD73Treg, %	*До*	4,7 (3,3-7,4)	4,4 (2,1-8,4)
	Инд.курс	5,8 (2,5-8,8)	8,9 (7,4-11,9)*
	52 нед	5,3 (2,9-9,5)	12,7 (5,4-18,0) *
CD39Thact, %	*До*	3,0 (0,8-6,2)	4,3 (2,3-8,2)
	Инд.курс	4,4 (2,3-5,7)	7,3 (5,0-9,6) *
	52 нед	3,3 (1,6-7,6)	6,0 (3,9-8,5) *
CD73Thact, %	*До*	13,9 (8,5-20,9)	12,9 (9,4-18,6)
	Инд.курс	12,5 (9,4-16,7)	19,8 (13,9-23,5) *
	52 нед	13,8 (9,5-19,9)	17,6 (14,1-21,6)
CD39Th17, %	*До*	10,0 (5,0-12,1)	15,9 (8,5-20,2) *
	Инд.курс	8,6 (6,6-15,5)	13,9 (12,5-19,2)
	52 нед	11,9 (3,7-18,1)	16,9 (10,3-22,9*)
CD73Th17, %	*До*	6,9 (5,4-11,4)	8,9 (6,0-13,8)
	Инд.курс	6,5 (5,2-8,6)	12,6 (8,4-15,6) *
	52 нед	8,9 (6,0-12,9)	13,4 (7,7-17,6) *
Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с p <0,05; ** – достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с p <0,001			

У пациентов с ВЗК до начала терапии в группе с эффективным лечением (группа 2) выявлено достоверно более высокое содержание CD39Th17 по сравнению с группой НЭ (Таблица 3.67, Рисунок 3.93Б). После индукционного курса в группе с эффективным лечением наблюдалось более высокое содержание $CD4^+$ Т-клеток с экспрессией эктонуклеотидаз в популяциях: CD73Treg, CD39Thact, CD73Thact, CD73Th17 (Таблица 3.67).

К году терапии ГИБП в группе пациентов с эффективным лечением содержание CD39Treg, CD73Treg, CD39Thact, CD39Th17, CD73Th17 клеток было достоверно больше, чем в группе пациентов с НЭ (Таблица 3.67, Рисунок 3.93).



НЭ	Эффективность	НЭ	Эффективность
$p_{до_инд}$=0,305	$p_{до_инд}$=0,028	$p_{до_инд}$=0,958	$p_{до_инд}$=0,724
$p_{до_52\ нед}$=0,706	$p_{до_52\ нед}$=0,003	$p_{до_52\ нед}$=0,486	$p_{до_52\ нед}$=0,367
$p_{инд_52\ нед}$ =0,113	$p_{инд_52\ нед}$ =0,369	$p_{инд_52\ нед}$ =0,486	$p_{инд_52\ нед}$ =0,397

Примечание: А – зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон для популяции CD39Treg – (27,2-38,4) %; Б – зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон для популяции CD39Th17 – (8,8 – 12,4) %

Рисунок 3.93– Динамика относительного содержания Treg (А) и Th17-лимфоцитов (Б) с экспрессией CD39 у пациентов с ВЗК при разной эффективности ГИБП

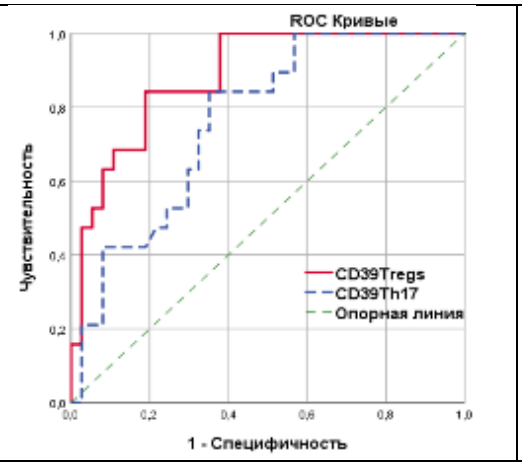
Анализ динамики содержания Treg с экспрессией CD39 показал достоверное увеличение показателя к году лечения относительно исходного уровня в группе с эффективностью терапии (p=0,003, Рисунок 3.93А). Содержание супрессорной популяции Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39 (CD39Th17, supTh17) в группе с эффективностью терапии было значимо выше, чем в группе с НЭ, как до назначения терапии, так и к году терапии ГИБП (Рисунок 3.93Б). К году терапии относительное содержание малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в группе с эффективным лечением не отличалось от показателей группы сравнения за исключением повышения супрессорной популяции CD39Th17 (p=0,002) и популяции CD73Treg (p=0,043) у пациентов с ВЗК.

Проведен ROC-анализ по содержанию малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в разделительной модели «эффективность – неэффективность» у пациентов с ВЗК в разные периоды введения ГИБП (Таблица 3.68, Рисунок 3.94А).

Таблица 3.68 – Показатели ROC-анализа для модели «эффективность – неэффективность» по содержанию малых популяций CD4+ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз у пациентов с ВЗК на разных этапах лечения

Популяции	AUC (95% доверит. инт)		
	До ГИБП	индукция	52 нед
CD39Treg	0,577 (0,385 - 0,769)	0,677 (0,510 - 0,844)	0,885 (0,799 - 0,971)
CD73Treg	0,518 (0,345 - 0,690)	0,692 (0,526 - 0,858)	0,711 (0,566 - 0,855)
CD39Thact	0,644 (0,476 - 0,811)	0,744 (0,578 - 0,911)	0,687 (0,546 - 0,828)
CD73Thact	0,480 (0,305 - 0,655)	0,717 (0,552 - 0,690)	0,651 (0,503 - 0,798)
CD39Th17	0,682 (0,520 - 0,844)	0,672 (0,496 - 0,847)	0,765 (0,641 - 0,888)
CD73Th17	0,560 (0,386 - 0,734)	0,758 (0,597 - 0,918)	0,633 (0,517 - 0,810)
Примечание: AUC – площадь под кривой			

Наилучшее качество разделительной модели получено к году терапии для содержания CD39Treg (очень хорошее качество AUC>0,8) и для содержания CD39Th17 лимфоцитов (хорошее качество AUC>0,7) (Таблица 3.68, Рисунок 3.94).



Пороговые значения содержания Treg и Th17 с экспрессией CD39

Показатель	cut-off, %	Se; Sp
CD39Treg	34,4	84; 81
CD39Th17	15,1	68; 68

Se – чувствительность

Sp - специфичность

Рисунок 3.94 – ROC-кривые для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по содержанию CD39Treg и CD39Th17 к году терапии ГИБП у детей с ВЗК

Определены пороговые значения показателей, ниже которых можно прогнозировать ускользание эффекта терапии ГИБП: CD39Treg – 34,4 % от Treg, CD39Th17 – 15,1 % от Th17 (Рисунок 3.94).

Таким образом:

1) у пациентов с ВЗК снижено содержание Treg с экспрессией эктонуклеотидазы CD39 относительно группы сравнения;

2) у пациентов в ремиссии ВЗК содержание малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией CD39 было выше, чем у пациентов в обострении;

3) у пациентов с БК в обострении заболевания содержание Treg с экспрессией CD39 меньше, чем у пациентов в обострении ЯК;

4) содержание супрессорной популяции CD39Th17 у пациентов в обострении БК достоверно ниже, чем в группе сравнения и может являться маркером состояний обострение/ремиссия;

5) пациенты в обострении ВЗК имеют меньшую АТФ-азную активность эктонуклеотидазы CD39, чем пациенты в ремиссии. Увеличение количества клеток CD39Treg при обострении заболевания является компенсаторной реакцией на дисфункцию эктонуклеотидазы CD39;

6) содержание Treg и Th17-лимфоцитов с экспрессией фермента CD39 к году терапии в группе пациентов с эффективностью ГИБП было значимо больше, чем в группе с недостаточным эффектом от терапии, а содержание супрессорной популяции CD39Th17 в группе с эффективным лечением было выше, чем в группе сравнения;

7) получены пороговые значения для относительного содержания Treg с экспрессией CD39 (34%) и популяции Th17 лимфоцитов с экспрессией CD39 (15%), ниже которых можно прогнозировать снижение эффективности ГИБП к году терапии у пациентов с ВЗК.

3.2.5.2. Содержание малых популяций CD4$^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у пациентов с вульгарным псориазом

Проведен анализ популяций Treg, Thact, Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73 у детей с вульгарным псориазом при лечении адалимумабом. Большая и меньшая экспрессия CD39 и CD73 определялась в одних и тех же популяциях лимфоцитов у детей с ПС и в группе сравнения: CD39Treg (от Treg) от 7 до 66%, CD39Thact от 0 до 21% (от Thact), CD73Thact (от Thact) от 6 до 52%, CD73Th17 (от Th17) от 2,7 до 33% (в группе сравнения: CD39Treg – 21-49%, CD39Thact – 2-11%; CD73Thact – 7-35%, CD73$^+$Th17 – 4,1-33%).

Группы пациентов с ПС и группа сравнения по возрасту не отличались (12,7 (10,4-15,6) лет против 12,6 (10,0-15,9) лет, p=0,721).

У пациентов с ПС относительное содержание малых популяций CD4$^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидазы CD39 не отличалось, а экспрессия CD73 была значимо выше в Th17-лимфоцитах относительно группы сравнения (Таблица 3.69).

Таблица 3.69 – Содержание Treg, Thact, Th17-лимфоцитов, экспрессирующих CD39/CD73 у пациентов с ПС при лечении ADA

Фермент / Показатели	Пациенты с ПС Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$), n=111		Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$), n=37	
	CD39	CD73	CD39	CD73
Treg, %	32,2 (23,2-41,8)	9,9 (5,6-18,4)	34,2 (27,5-39,1)	8,3 (7,2- 2,2)
Thact, %	5,6 (3,0-8,8)	19,2 (15,2-24,1)	5,1 (4,5-6,5)	17,2 (11,6- 1,5)
Th17,%	10,5 (6,2-19,0)	12,4* (9,4-18,6)	9,7 (8,6-12,2)	9,4 (8,2-16,6)
Примечание: * – достоверность различий между группой пациентов с ПС и группой сравнения, p <0,05				

Анализ содержания малых популяций CD4$^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73 выявил аналогичные соотношения между популяциями клеток у пациентов с ПС и в группе сравнения, кроме соотношения популяций CD39Th17 и CD73Treg (не отличались в группе сравнения) (Рисунок 3.95).

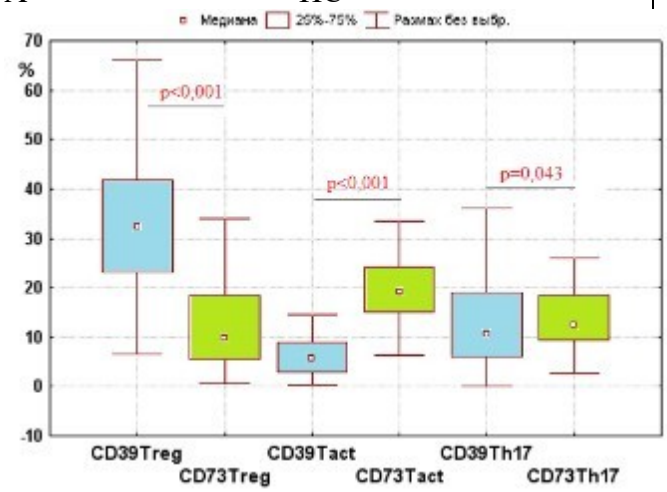
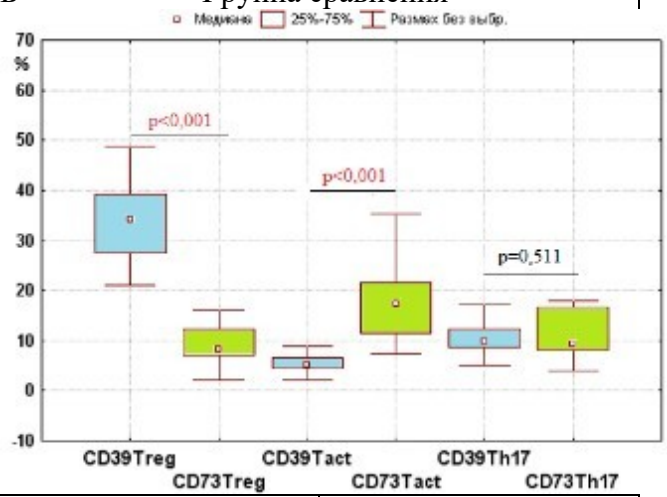
А ПС	Б Группа сравнения
	
$p_{CD39Treg_CD39Thact}<0,001$ $p_{CD39Treg_CD39Th17}<0,001$ $p_{CD39Thact_CD39Th17}<0,001$	$p_{CD73Treg_CD73Thact}<0,001$ $p_{CD73Treg_CD73Th17}=0,012$ $p_{CD73Thact_CD73Th17}<0,001$	$p_{CD39Treg_CD39Thact}<0,001$ $p_{CD39Treg_CD39Th17}<0,001$ $p_{CD39Thact_CD39Th17}<0,001$	$p_{CD73Treg_CD73Thact}<0,001$ $p_{CD73Treg_CD73Th17}=0,188$ $p_{CD73Thact_CD73Th17}<0,001$

Рисунок 3.95 – Относительное содержание малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73 у пациентов с ПС (А) и в группе сравнения (Б)

Так, содержание CD39Treg популяции было достоверно выше в сравнении с CD73Treg. В популяции Thact, наоборот, содержание клеток с экспрессией CD73 было значимо выше, чем с CD39 (Рисунок 3.95). У пациентов с ПС процентное содержание Th17-клеток с экспрессией CD73 было достоверно выше, чем с экспрессией CD39, и выше показателей CD73Th17 в группе сравнения (Таблица 3.69, Рисунок 3.95).

Проведенный корреляционный анализ у пациентов с ПС между содержанием малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией CD39/CD73 выявил значимую прямую зависимость между популяциями CD73Thact и CD73Th17 (Таблица 3.70).

Таблица 3.70 – Показатели корреляционного анализа между относительным содержанием малых популяций лимфоцитов с экспрессией CD39/CD73 у пациентов с ПС

Популяции	Коэффициент корреляции (r)	Достоверность различий (p)
CD39Treg/ CD39Thact	0,56	<0,001
CD39Treg/ CD39Th17	0,45	<0,001
CD39Thact/ CD39Th17	0,57	<0,001
CD73Treg/ CD73Thact	0,44	<0,001
CD73Treg/ CD73Th17	0,28	<0,001
CD73Thact/ CD73Th17	0,78	<0,001

Между другими парами малых популяций с экспрессией эктонуклеотидаз также были выявлены прямые корреляции разной силы (Таблица 3.70).

При этом, в группе сравнения значимые прямые зависимости были получены между CD39Thact и CD39Th17 (r=0,49; p<0,001), а также между CD73Thact и CD73Th17 (r=0,46; p=0,004).

У пациентов с псориазом выявлено увеличение с возрастом только относительного содержания популяции CD73Th17 (r=0,33; p <0,001). В группе сравнения была получена аналогичная зависимость для CD73Th17 (r=0,32; p=0,022).

Длительность заболевания у пациентов с ПС составляла от 9 месяцев до 13 лет, а длительность проводимой терапии – от 2 до 276 недель. Зависимости содержания популяций Treg, Th17 и Thact с экспрессией CD39 и CD73 от длительности заболевания у детей с ПС выявлено не было. Наиболее значимая прямая корреляционная зависимость от длительности терапии получена только для supTh17 (r=0,46; p <0,001).

На следующем этапе работы проанализировали содержание малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у пациентов с ПС в группах с обострением и ремиссией заболевания относительно группы сравнения (Таблица 3.71).

Таблица 3.71 – Содержание Treg, Thact, Th17-лимфоцитов, экспрессирующих CD39/CD73 у пациентов с ПС в обострении, ремиссии заболевания и в группе сравнения

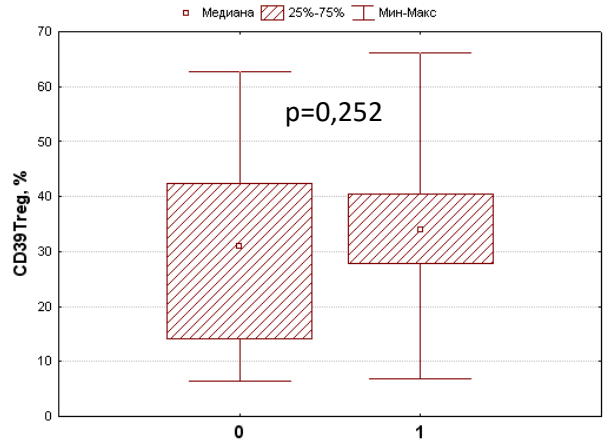
Показатель	ПС		Группа сравнения (n=37)
	обострение (n=67) PASI 15(12-20)	ремиссия (n=44) PASI 5(4-8)	
CD39Treg, %	30,9 (14,1-42,5)	33,9 (27,8-40,5)	34,2 (27,5-39,1)
CD73Treg, %	12,5* (6,4- 8,9)	9,6 (5,2-18,4)	8,3 (7,2-12,2)
CD39Thact, %	5,6 (2,1-7,9)	5,9 (3,6-9,2)	5,1 (4,5-6,5)
CD73Thact, %	19,2 (15,7-24,1)	19,4 (13,4-23,6)	17,2 (11,6-21,5)
CD39Th17, %	10,0 (5,7-15,9)	11,5** (8,3-21,7)**	9,7 (8,6-12,2)
CD73Th17, %	13,1* (9,1-17,5)	11,7* (9,8 - 20,4)	9,4 (8,2-16,6)
Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами пациентов в обострении и ремиссии заболевания, $p<0,05$			

Содержание клеток с экспрессией CD39 в популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов у пациентов с ПС как при обострении, так и при ремиссии заболевания не отличалось от показателей группы сравнения (Таблица 3.71). Достоверно более высокие показатели по содержанию Treg и Th17 с экспрессией фермента CD73 наблюдались у пациентов в обострении заболевания относительно группы сравнения. В ремиссии ПС у пациентов показатель CD73Th17 был также достоверно выше, чем в группе сравнения. При этом, значимые отличия между группами пациентов в обострении и ремиссии заболевания наблюдались только для супрессорной популяции CD39Th17, содержание которой было выше у пациентов в ремиссии ПС.

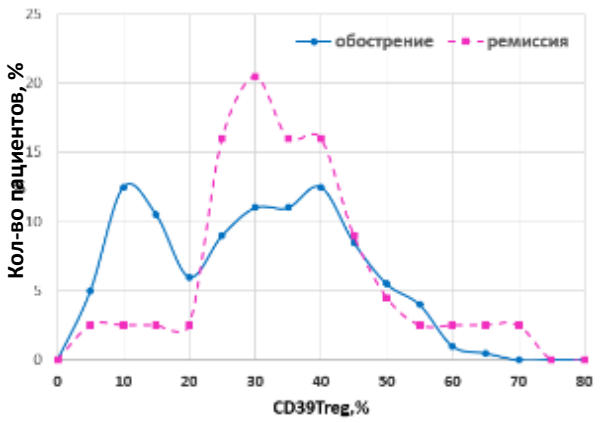
По содержание Treg клеток с экспрессией CD39 группы пациентов с ПС в обострении и ремиссии заболевания не отличались (Рисунок 3.96А). Однако, распределение пациентов в группах по относительному содержанию CD39Treg выявило пациентов с высоким содержанием популяции CD39Treg и в обострении, и в ремиссии заболевания. В обострении заболевания у 34% пациентов выявлено

снижение показателя CD39Treg ниже 20%, в ремиссии заболевания таких пациентов было только 10% (Рисунок 3.96Б).

А



Б



Примечание: 0 – пациенты с ПС в обострении заболевания, 1 – пациенты с ПС в ремиссии заболевания

Рисунок 3.96 – Содержание Treg с экспрессией CD39 у пациентов в обострении и ремиссии ПС (А), распределение пациентов с ПС по содержанию популяции CD39Treg

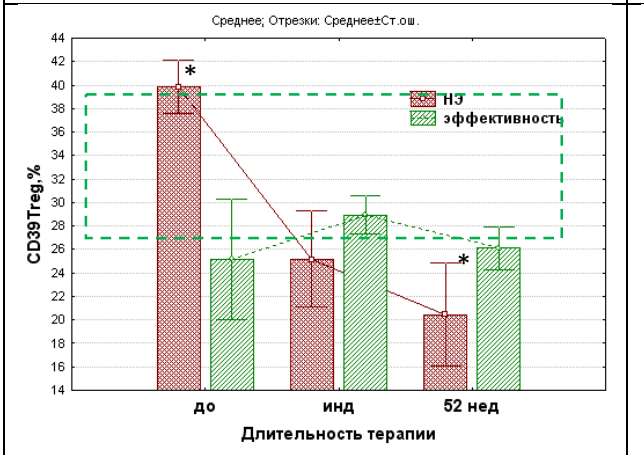
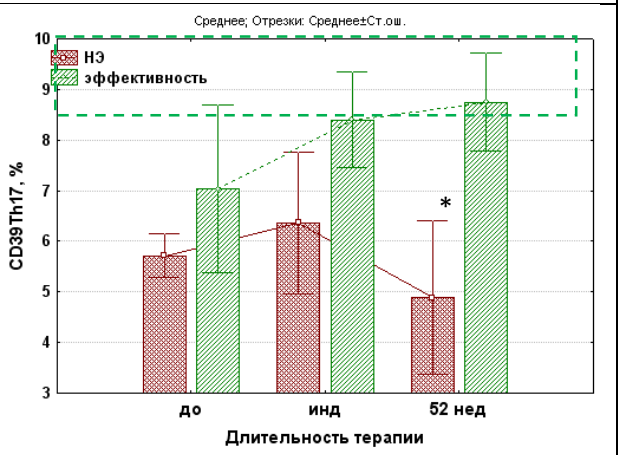
Оценка содержания популяций Treg, Thact и Th17-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 *у пациентов с ПС при разной эффективности адалимумаба*

У пациентов 2-х групп (недостаточная эффективность (НЭ) – группа 1, n=38; эффективность – группа 2, n=24) была проведена оценка содержания малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз при разной эффективности ГИБП в разные периоды лечения (до введения, после индукционного курса, через год терапии) (Таблица 3.72).

Таблица 3.72 – Относительное содержание Treg, Thact, Th17-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 при терапии ADA у пациентов с ПС

Показатель	Период терапии ГИБП	Недостаточная эффективность (Группа 1)	Эффективность (Группа 2)
CD39Treg, %	*До*	42,2 (35,1-47,8)	14,1 (9,7-9,3)*
	Инд.курс	19,8 (13,6-35,5)	28,1 (21,8-35,7)
	52 нед	12,2 (8,5-26,5)	25,3 (20,7-28,8)*
CD73Treg, %	*До*	6,9 (6,6-7,6)	6,9 (2,8-16,5)
	Инд.курс	7,4 (7,2-13,2)	5,6 (3,3-9,9)*
	52 нед	6,7 (6,3-12,9)	9,9 (9,5-20,7)
CD39Thact, %	*До*	6,1 (4,9-7,9)	2,6 (1,3-9,4)
	Инд.курс	3,6 (0,6-6,5)	6,2 (3,6-7,9)*
	52 нед	0,7 (0,5-3,3)	6,7 (2,8-9,1)*
CD73Thact, %	*До*	19,5 (16,4-20,3)	18,3 (16,3-24,4)
	Инд.курс	21,1 (15,5-26,6)	16,2 (13,1-20,9)
	52 нед	18,1 (16,5-29,0)	14,9 (9,7-25,6)*
CD39Th17, %	*До*	6,1 (4,6-6,9)	9,9 (0,5-11,1)
	Инд.курс	7,8 (0,2-11,1)	6,9 (4,9-10,5)
	52 нед	1,3 (0,1-8,3)	10,1 (3,8-11,8)*
CD73Th17, %	*До*	12,4 (9,0-17,5)	8,9 (8,1-14,1)
	Инд.курс	15,4 (8,2-15,9)	11,0 (6,6-15,2)
	52 нед	11,3 (10,6-20,5)	11,5 (7,7-22,0)
Примечание: * – достоверность различий между группами с $p < 0,05$			

Выявлено, что до начала лечения у пациентов с ПС в группе с НЭ наблюдалось более высокое содержание Treg с экспрессией CD39 по сравнению с группой пациентов с эффективным лечением (Таблица 3.72, Рисунок 3.97А).

А	Б
	
НЭ $p_{до_инд}$=0,003 $p_{до_52\ нед}$<0,001 $p_{инд_52\ нед}$ =0,183	Эффективность $p_{до_инд}$=0,379 $p_{до_52\ нед}$=0,514 $p_{инд_52\ нед}$ =0,079	НЭ $p_{до_инд}$=0,436 $p_{до_52\ нед}$=0,138 $p_{инд_52\ нед}$ =0,300	Эффективность $p_{до_инд}$=0,872 $p_{до_52\ нед}$=0,371 $p_{инд_52\ нед}$ =0,324

Примечание: на рисунке А – зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон для CD39Treg – (27,5-39,1) %; на рисунке Б – зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон для CD39Th17 – (8,6-12,2) %

Рисунок 3.97 – Динамика относительного содержания Treg (А) и Th17 (Б) с экспрессией CD39 у пациентов с ПС при разной эффективности ГИБП

К концу индукционного курса ГИБП и к году терапии в группе с НЭ получены значимо более низкие показатели CD39Treg, чем до введения препарата (Рисунок 3.97А). В то же время, у пациентов с хорошим эффектом ГИБП содержание популяции CD39Treg на всем протяжении лечения достоверно не изменялось, но к году терапии было значимо выше по сравнению с группой НЭ (Рисунок 3.97А). Содержание супрессорной популяции CD39Th17 у пациентов в обеих группах значимо не изменялось до конца индукционного курса, но к году терапии было достоверно выше в группе с хорошим эффектом по сравнению с группой с НЭ (Таблица 3.67, Рисунок 3.97Б).

Также выявлено, что в период индукционного курса содержание популяции CD73Treg было выше, а популяции CD39Thact было ниже в группе с НЭ относительно группы 2 (Таблица 3.72). К году терапии в группе с НЭ содержание популяции CD73Thact было выше, а содержание CD39Thact было ниже, чем у пациентов с хорошим эффектом (Таблица 3.72).

К году терапии ГИБП в группе пациентов с эффективным лечением содержание малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз

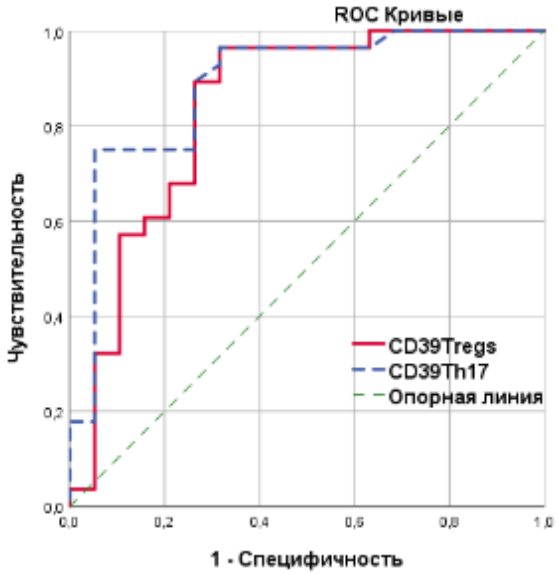
не отличалось от показателей группы сравнения. При этом, в группе с недостаточно эффективным лечением содержание CD39Thact (p=0,015) и CD39Th17 (p=0,035) было достоверно меньше показателей группы сравнения.

Проведен ROC-анализ для модели «эффективность – неэффективность» терапии по содержанию малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73 у пациентов с ПС (Таблица 3.73).

Таблица 3.73 – Показатели ROC-анализа для модели «эффективность – неэффективность» по содержанию малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз на разных этапах терапии ADA у пациентов с ПС

Популяции	AUC (95% доверит. инт)		
	до	инд	52 нед
CD39 Treg, %	0,744 (0,551 - 0,936)	0,615 (0,400 - 0,831)	0,836 (0,706 - 0,967)
CD73 Treg, %	0,519 (0,267 - 0,771)	0,692 (0,546 - 0,838)	0,671 (0,485 - 0,857)
CD39 Thact, %	0,641 (0,405 - 0,877)	0,718 (0,559 - 0,877)	0,782 (0,607 - 0,958)
CD73 Thact, %	0,462 (0,235 - 0,688)	0,662 (0,494 - 0,831)	0,698 (0,551 - 0,845)
CD39 Th17, %	0,576 (0,295 - 0,856)	0,556 (0,349 - 0,762)	0,887 (0,784 - 0,990)
CD73 Th17, %	0,621 (0,423 - 0,819)	0,598 (0,420 - 0,776)	0,521 (0,357 - 0,685)
Примечание: AUC – площадь под кривой			

Получено очень хорошее качество разделительной модели (AUC>0,8) к году лечения и определены пороговые значения для показателей CD39Treg и CD39Th17, ниже которых можно прогнозировать ускользание эффекта от ГИБП (Таблица 3.73, Рисунок 3.98).



Пороговые значения содержания Treg и Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39

Показатель	cut-off, %	Se; Sp
CD39Treg	22,4	75; 74
CD39Th17	7,3	75; 74

Se – чувствительность,
Sp - специфичность

Рисунок 3.98 – ROC-кривые для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по относительному содержанию CD39Treg и CD39Th17 к году терапии ГИБП у детей с ПС

Для показателя CD39Treg cut-off составил 22,4% от Treg, а для CD39Th17 – 7,3% от Th17-лимфоцитов.

Таким образом:

1) у пациентов с псориазом количество Th17-клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазу CD39 (supTh17), значимо выше в ремиссии заболевания, чем в обострении;

2) при эффективном лечении содержание CD39Treg и supTh17 у пациентов с ПС увеличивается к году терапии ГИБП до показателей группы сравнения;

3) получены пороговые значения для содержания Treg и Th17-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидазы CD39 (22,4% от Treg и 7,3% от Th17), ниже которых у пациентов с ПС можно прогнозировать ускользание эффекта от ГИБП после индукционного курса.

3.2.5.3. Содержание малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у пациентов с рассеянным склерозом

Анализ относительного содержания клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, у пациентов с РС показал, что наибольшее содержание лимфоцитов с экспрессией CD39 выявлено в популяции Treg – от 9,8% до 57,6% (Me - 34,5 (29,5-44,6) % от Treg), а наименьшее - в популяции Thact - от 0% до 10,6% (Me - 3,5 (1,8-5,7) % от Thact). Для эктонуклеотидазы CD73 наблюдалась обратная ситуация. Наибольшая доля клеток с экспрессией CD73 выявлена в популяции Thact - от 7,5 % до 41,9 % (Me – 21,9 (16,4-28,9) % от Thact), а наименьшая в Treg – от 4,1% до 33% (Me – 13,2 (9,6-20,9) % от Treg). Пациенты с РС и группа сравнения по возрасту не отличались: 16,2 (14,9-17,2) лет против 14,3 (10,0-17,1) лет, p=0,084.

Анализ относительного содержания клеток с экспрессией эктонуклеотидаз в малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов между пациентами с РС и группой сравнения показал значимые отличия в исследуемых популяциях клеток, кроме популяций CD39Treg и CD39Th17 (Таблица 3.74).

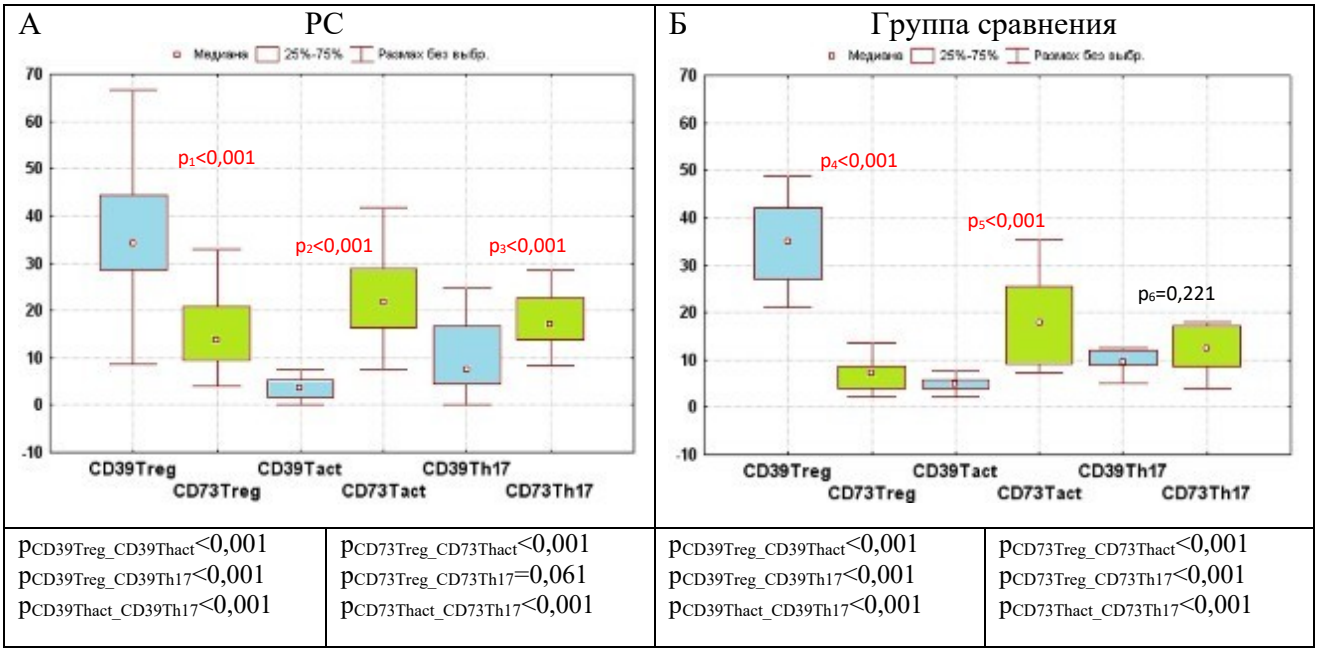
Таблица 3.74 – Содержание Treg, Thact, Th17-лимфоцитов, экспрессирующих CD39/CD73, у пациентов с РС и в группе сравнения

Фермент / Показатели	Пациенты с РС Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$), n=116		Группа сравнения Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$), n=54	
	CD39	CD73	CD39	CD73
Treg, %	34,2 (28,6-44,3)	13,7** (9,6-20,9)	35,0 (27,1-42,1)	7,3 (3,9-8,7)
Thact, %	3,5** (1,7-5,2)	21,8* (16,4-28,9)	4,9 (4,1-5,9)	17,8 (9,2-25,4)
Th17,%	7,6 (4,4-16,7)	17,2** (13,9-22,7)	9,6 (9,0-12,1)	12,4 (8,6-17,1)

Примечание: * – достоверность различий между группой пациентов с РС и группой сравнения, p<0,05; ** – достоверность различий между группой пациентов с РС и группой сравнения, p<0,001

Содержание популяций Treg, Thact и Th17-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидазы CD73 было значимо выше у пациентов с РС относительно группы сравнения.

Анализ доли малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73 у пациентов с РС показал соотношения между популяциями аналогичные группе сравнения, кроме соотношения между содержанием CD39Th17 и CD73Th17 (нет отличий в группе сравнения) (Рисунок 3.99).



$p_{CD39Treg_CD39Thact}<0,001$ $p_{CD39Treg_CD39Th17}<0,001$ $p_{CD39Thact_CD39Th17}<0,001$	$p_{CD73Treg_CD73Thact}<0,001$ $p_{CD73Treg_CD73Th17}=0,061$ $p_{CD73Thact_CD73Th17}<0,001$	$p_{CD39Treg_CD39Thact}<0,001$ $p_{CD39Treg_CD39Th17}<0,001$ $p_{CD39Thact_CD39Th17}<0,001$	$p_{CD73Treg_CD73Thact}<0,001$ $p_{CD73Treg_CD73Th17}<0,001$ $p_{CD73Thact_CD73Th17}<0,001$

Рисунок 3.99 – Относительное содержание популяций лимфоцитов (Treg, Th17, Thact), экспрессирующих CD39 и CD73, у пациентов с РС (А) и в группе сравнения (Б)

Относительное содержание популяции CD39Treg у пациентов с РС и в группе сравнения было достоверно выше, чем содержание популяций CD39Th17 и CD39Thact. Содержание популяции CD73Treg и CD73Th17, наоборот, меньше по сравнению с CD73Thact (Рисунок 3.99).

Проведен корреляционный анализ между содержанием малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73 (Таблица 3.75).

Таблица 3.75 – Показатели корреляционного анализа между относительным содержанием малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией CD39/ CD73 у пациентов с РС

Популяции	Коэффициент корреляции (r)	Достоверность различий (p)
CD39Treg/ CD39Thact	0,38	<0,001
CD39Treg/ CD39Th17	0,39	<0,001
CD39Thact/ CD39Th17	0,37	<0,001
CD73Treg/ CD73Thact	0,27	<0,001
CD73Treg/ CD73Th17	0,34	<0,001
CD73Thact/ CD73Th17	0,66	<0,001

У пациентов с РС получены прямые корреляционные зависимости между популяциями Treg, Thact и Th17 с экспрессией CD39 и CD73. Наиболее сильная прямая зависимость получена между популяциями CD73Thact и CD73Th17 (r=0,66; Таблица 3.75). При этом, в группе сравнения значимые прямые зависимости были получены между CD39Thact и CD39Th17 (r=0,39; p=0,0035), между CD73Thact и CD73Th17 (r=0,59; p<0,001), а также между CD39Treg и CD39Th17 (r=0,40; p=0,0028).

Корреляционный анализ не выявил зависимости относительного содержания клеток Treg, Thact и Th17, экспрессирующих CD39 и CD73, у пациентов с РС от возраста.

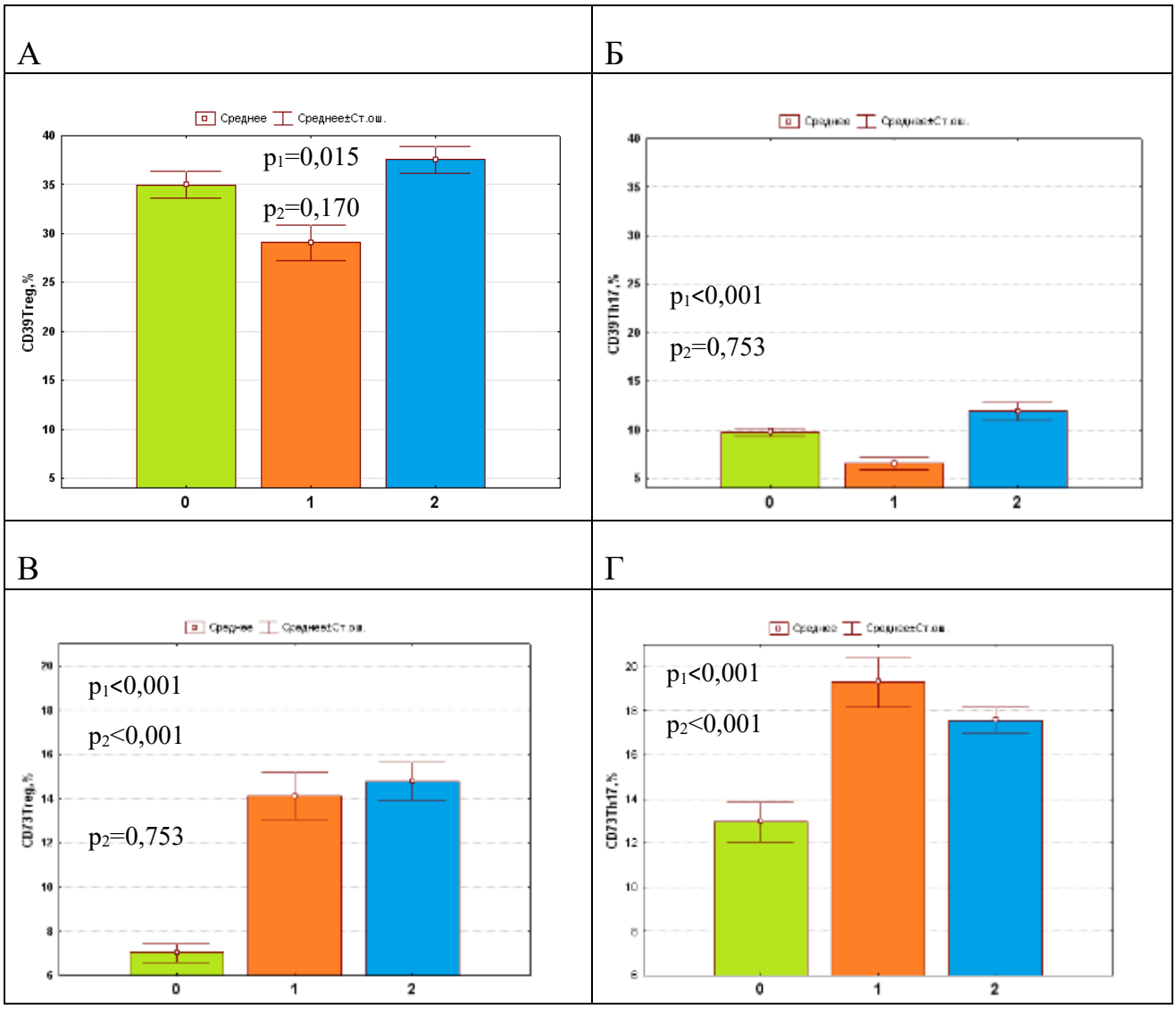
Длительность заболевания у пациентов с РС в группах составляла от 5 месяцев до 7,7 лет, а длительность проводимой терапии от 2 до 190 недель. Зависимости содержания клеток с экспрессией эктонуклеотидаз (CD39/CD73) от длительности заболевания и длительности терапии у пациентов с РС выявлено не было.

Для оценки информативности содержания малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз были проанализированы данные показатели в группах пациентов РС с наличием активных очагов демиелинизации по МРТ и без таковых (Таблица 3.76).

Таблица 3.76 – Относительное содержание Treg, Thact, Th17-лимфоцитов, экспрессирующих CD39/CD73, у пациентов с РС и в группе сравнения

Показатель	РС		p	Группа сравнения (n=54)
	Активные очаги (n=48)	Без активных очагов (n=68)		
CD39Treg, %	32,3* (18,5 - 34,2)	37,5 (32,6 - 44,9)	****	35,0 (27,1 - 42,1)
CD73Treg, %	12,6** (9,8 - 17,1)	14,1 ** (9,3- 18,5)		7,3 (3,9 - 8,7)
CD39Thact, %	3,1** (1,7 - 3,8)	2,6** (1,1 - 5,24)		4,9 (4,1 - 5,9)
CD73Thact, %	24,7* (18,4 - 28,7)	21,4 (19,6 - 25,2)	***	17,8 (9,2 - 25,4)
CD39Th17, %	6,1** (3,3 - 8,4)	9,9 (6,7 - 19,2)	****	9,6 (9,0 -12,1)
CD73Th17, %	16,9 ** (13,1 - 24,5)	16,5 ** (14,4 - 19,6)		12,4 (8,6 - 17,1)
Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов с РС и группой сравнения, p <0,05; **– достоверность различий между группами пациентов с РС и группой сравнения, p <0,001; *** – достоверность различий между группами пациентов с активными очагами и без активных очагов, p <0,05; **** – достоверность различий между группами пациентов с активными очагами и без активных очагов, p <0,001				

Получены достоверные отличия по содержанию клеток с экспрессией CD39 и CD73 между группой пациентов с РС с активными очагами и группой сравнения. Выявлено значимо более низкое содержание Treg, Thact, Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39 и более высокое содержание Treg, Thact, Th17-лимфоцитов с экспрессией CD73 у пациентов в группе с активными очагами относительно группы сравнения (Таблица 3.76). У пациентов без активных очагов (ремиссия) наблюдались более высокие показатели CD73Treg и CD73Th17 при более низких показателях CD39Thact относительно группы сравнения (Таблица 3.76). Получены достоверно более высокие показатели CD39Treg и CD39Th17 у пациентов в группе без активных очагов по сравнению с пациентами с активными очагами. Относительное содержание CD73Thact, наоборот, было достоверно выше у пациентов с активными очагами (Рисунок 3.100).

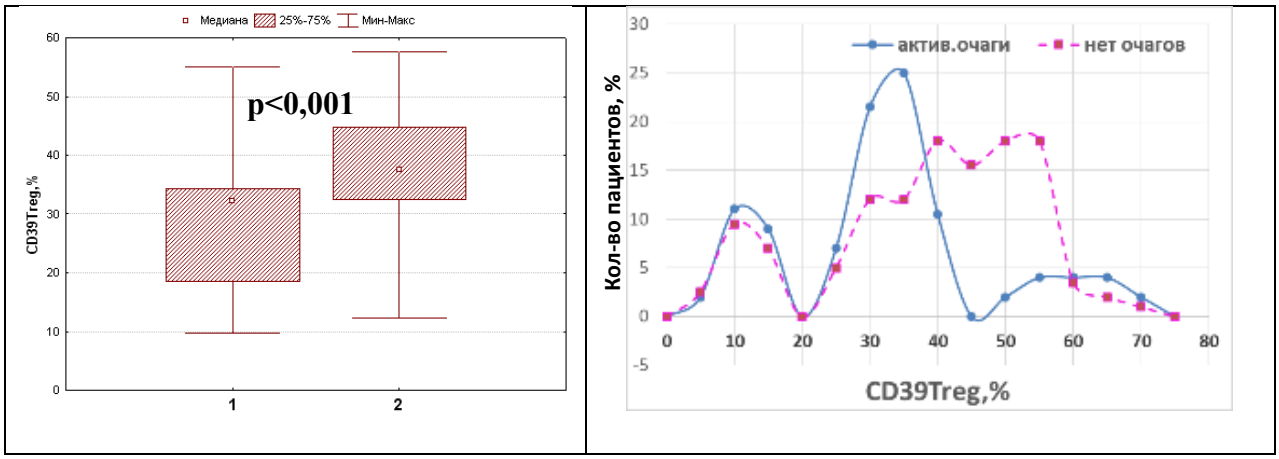


Примечание: 0 – группа сравнения, 1 – группа пациентов с РС с активными очагами по МРТ, 2 - группа пациентов с РС без активных очагов; p_1 – достоверность между пациентами группы 1 и группой сравнения; p_2 – достоверность между пациентами группы 2 и группой сравнения

Рисунок 3.100 – Относительное содержание Treg и Th17-лимфоцитов, экспрессирующих CD39 (А, Б) и CD73 (В, Г), у пациентов с РС и в группе сравнения

Несмотря на то, что группы пациентов с РС достоверно различались по относительному содержанию CD39Treg (Таблица 3.76), анализ распределения пациентов в группах по данному показателю показал, что в обеих группах были пациенты с низкими и с высокими значениями CD39Treg (Рисунок 3.101).

Доля пациентов с содержанием CD39Treg более 20% составляла 78,4% в группе пациентов с активными очагами демиелинизации, а в группе без активных очагов – 84,7% (Рисунок 3.101).



Примечание: 1 – пациенты с активными очагами демиелинизации, 2 – пациенты без активных очагов демиелинизации

Рисунок 3.101 – Относительное содержание Treg с экспрессией CD39 у пациентов с РС с активными очагами демиелинизации и без активных очагов

Таким образом, активность ферментов пуринергической регуляции соотносится с состоянием тяжести у пациентов с РС. В обострении заболевания (активные очаги на МРТ) наблюдается снижение содержания Treg, Thact, Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39 при увеличении популяций клеток с экспрессией CD73.

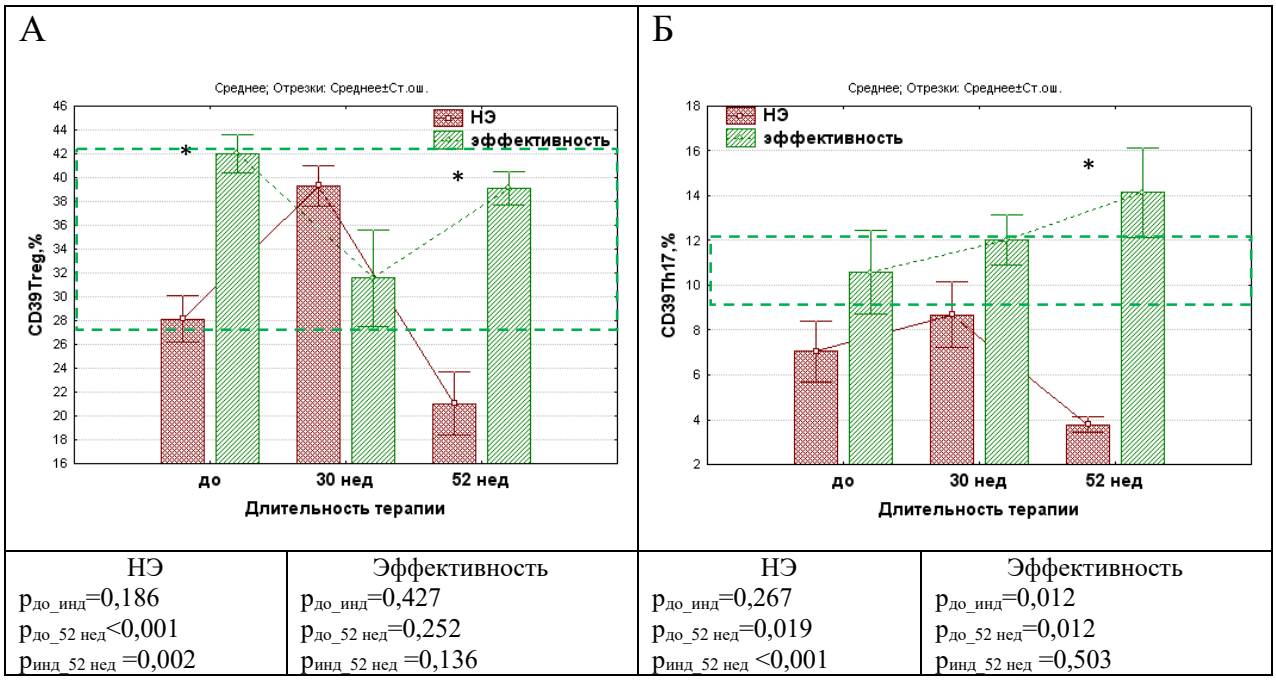
Оценка содержания популяций Treg, Thact и Th17-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у пациентов с РС при разной эффективности терапии INFβ-1a

Пациенты с РС были поделены в зависимости от эффективности терапии INFβ-1a к году лечения на группы: с недостаточной эффективностью терапии (НЭ) – группа 1 (n=30); с эффективностью терапии – группа 2 (n=41). У пациентов 2-х групп с разной эффективностью ГИБП была проведена оценка содержания малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 до введения препарата, после индукционного курса, через год терапии (Таблица 3.77).

Таблица 3.77 – Относительное содержание Treg, Thact, Th17- лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 при разной эффективности терапии INFβ-1a у пациентов с РС

Показатель	Период терапии ГИБП	Недостаточная эффективность (Группа 1)	Эффективность (Группа 2)
CD39Treg, %	*До*	31,2 (29,5-32,7)	38,9 (36,2-49,3)**
	Инд.курс	41,9 (33,9-44,7)	30,2 (13,8-44,3)
	52 нед	18,6 (10,9-32,3)	37,5 (32,8-45,0) **
CD73Treg, %	*До*	11,1 (8,4-11,7)	13,2 (9,6-27,0)*
	Инд.курс	12,4 (6,3-20,1)	15,1 (13,7-19,9)
	52 нед	13,9 (13,2-22,4)	10,8 (8,2-18,5) *
CD39Thact, %	*До*	2,5 (1,7-2,9)	2,9 (1,8-5,9)
	Инд.курс	3,6 (3,1-4,4)	1,6 (1,1-1,9) **
	52 нед	2,4 (0,7-3,8)	5,2 (3,5-5,7) *
CD73Thact, %	*До*	26,7 (24,0-28,4)	22,9 (21,7-25,2) *
	Инд.курс	18,9(13,2-25,1)	21,4 (20,8-30,3) *
	52 нед	18,0 (14,2-24,4)	20,9 (15,3-21,4)
CD39Th17, %	*До*	6,3 (3,1-8,4)	6,8 (6,1-15,9)
	Инд.курс	8,7 (4,5-12,8)	11,1 (8,7-12,5) *
	52 нед	3,2 (2,8-4,2)	11,0 (6,6-24,2) **
CD73Th17, %	*До*	15,2 (13,9-22,8)	17,8 (14,8-18,8)
	Инд.курс	16,3 (14,2-18,1)	20,3 (17,4-26,1)
	52 нед	13,0 (11,5-15,5)	17,1 (14,7-22,5) **
Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с $p < 0,05$; * – достоверность различий между группами пациентов 1 и 2 с $p < 0,001$			

До назначения терапии в группе с НЭ отмечено значимо более низкое содержание Treg с экспрессией CD39 и CD73 и более высокое содержание CD73Thact относительно группы с хорошей эффективностью терапии. К концу индукционного курса выявлено более высокое содержание популяции CD39Thact и более низкое содержание CD73Thact, CD39Th17 в группе с НЭ (Таблица 3.77). К 52 неделе терапии в группе с НЭ отмечено более низкое содержание популяции CD39Treg, CD39Thact, CD39Th17, CD73Th17 и более высокое содержание CD73Treg (Таблица 3.77, Рисунок 3.102).



НЭ	Эффективность	НЭ	Эффективность
$p_{до_инд}$=0,186 $p_{до_52\ нед}$<0,001 $p_{инд_52\ нед}$ =0,002	$p_{до_инд}$=0,427 $p_{до_52\ нед}$=0,252 $p_{инд_52\ нед}$ =0,136	$p_{до_инд}$=0,267 $p_{до_52\ нед}$=0,019 $p_{инд_52\ нед}$ <0,001	$p_{до_инд}$=0,012 $p_{до_52\ нед}$=0,012 $p_{инд_52\ нед}$ =0,503

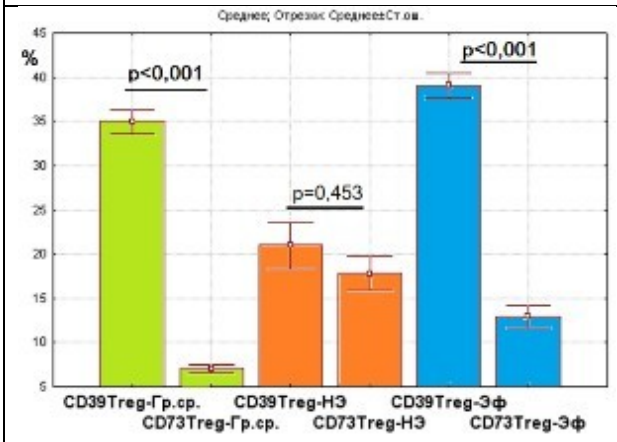
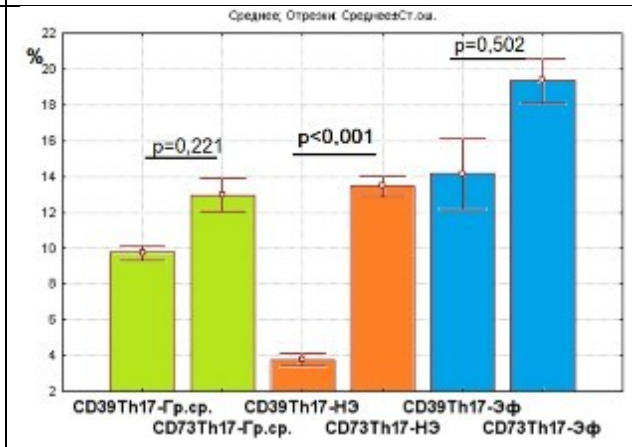
Примечание: на рисунке А – зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон для CD39Treg – (27,1-42,1) %; на рисунке Б – зеленой штрих-линией отмечен референсный диапазон для CD39Th17 – (9,0-12,1) %

Рисунок 3.102 – Динамика относительного содержание Treg (А) и Th17-лимфоцитов (Б) с экспрессией CD39 при разной эффективности терапии INFβ-1a у пациентов с РС

В группе пациентов с НЭ до начала терапии INFβ-1a и после индукционного курса показатели CD39Treg были значимо выше, чем к году терапии (Рисунок 3.102А). В группе пациентов с эффективностью терапии содержание Treg с экспрессией CD39 не изменялось во все периоды наблюдения, а до назначения терапии и к году терапии было достоверно выше, чем к группе с НЭ (Рисунок 3.102А, Таблица 3.77). Для патогенетически важной популяции supTh17клеток (CD39Th17) в группе пациентов с эффективностью терапии отмечено значимое повышение содержание supTh17 к концу индукционного курса и к году терапии относительно показателей до лечения. В группе с НЭ содержание supTh17 популяции к году лечения снижалось и было значимо ниже, чем до начала лечения и после индукционного курса (Рисунок 3.102Б).

Соотношение содержания клеток с экспрессией CD39 и CD73 в популяциях Treg и Th17-лимфоцитов в группе пациентов с эффективностью INFβ-1a к году

терапии было аналогично группе сравнения: CD39Treg > CD73Treg, CD39Th17 = CD73Th17 (Рисунок 3.103).

А Treg		Б Th17	
			
Гр.ср-НЭ CD39Treg-p<0,001 CD73Treg-p<0,001	Гр.ср-Эф CD39Treg-p=0,262 CD73Treg-p<0,001	Гр.ср-НЭ CD39Th17-p<0,001 CD73Th17-p=0,510	Гр.ср-Эф CD39Th17-p=0,289 CD73Th17-p<0,001

Примечание: зеленые столбики – группа сравнения, оранжевые столбики – группа с РС с недостаточной эффективностью INFβ-1a, синие столбики – группа пациентов с эффективностью INFβ-1a

Рисунок 3.103 – Относительное содержание CD39 и CD73 в Treg (А) и в Th17-лимфоцитах (Б) у пациентов с РС к году терапии в группах при разной эффективности ГИБП и в группе сравнения

У пациентов с РС с НЭ терапии содержание Treg с экспрессией CD39 и CD73 достоверно не различалось, а содержание популяции CD39Th17 было достоверно ниже, чем популяции CD73Th17. В то же время, в этой группе пациентов содержание CD39Treg (Рисунок 3.103А), а также содержание популяции CD39Th17 было достоверно ниже, а содержание CD73Treg – значимо выше (Рисунок 3.103Б) показателей группы сравнения.

ROC-анализ для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по содержанию малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией CD39/CD73 у детей с РС показал отличное (AUC>0,9) и очень хорошее (AUC>0,8) качество разделительной модели для относительного содержания Treg, экспрессирующих CD39, а также для содержания Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73 к году терапии (Таблица 3.78).

Таблица 3.78 – Показатели ROC-анализа для модели «эффективность – неэффективность» по относительному содержанию Treg и Th17-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73 у пациентов с РС к году лечения

Показатель	AUC (95% доверит. инт)	cut-off, %	Se; Sp (%)
CD39Treg	0,980 (0,945-1,00)	32,2	90; 94
CD39Th17	0,925 (0,841-1,00)	5,6	80; 88
CD73Th17	0,848 (0,723-0,974)	14,2	85;75
Примечание: AUC – площадь под кривой			

Получены пороговые значения, ниже которых можно прогнозировать развитие недостаточной эффективности терапии INFβ-1a у пациентов с РС к году терапии: CD39Treg – 32,2%, CD39Th17 – 5,6%, CD73Th17 – 14,2%.

ROC-кривые для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по количеству CD39Treg, CD39Th17 и CD73Th17 у детей с РС представлены на Рисунке 3.104.

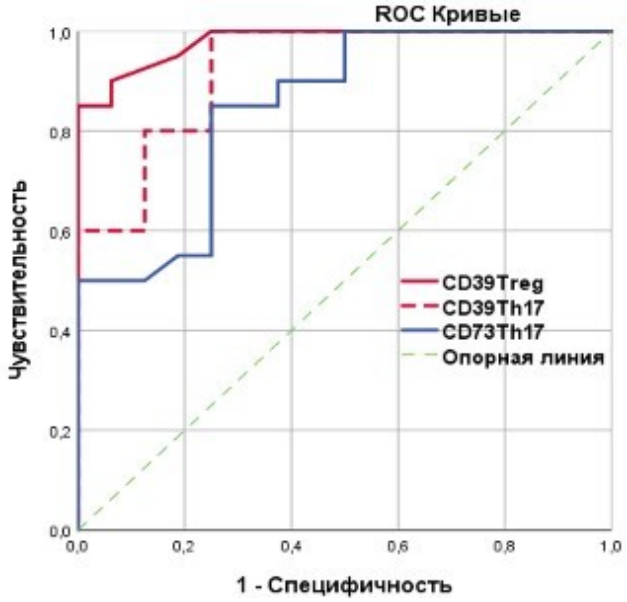


Рисунок 3.104 – ROC-кривые для разделительной модели «эффективность – неэффективность» по содержанию CD39Treg, CD39Th17 и CD73Th17 у детей с РС

Таким образом, у пациентов с РС:

1) соотношение относительного содержания малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, у пациентов с РС аналогичны таковым в группе сравнения;

2) содержание популяций CD39Treg и CD39Th17 достоверно снижено у пациентов с РС с активными очагами демиелинизации относительно группы сравнения; у пациентов с РС в ремиссии заболевания (без активных очагов) содержание популяции CD39Treg не отличается от группы сравнения;

3) в группе пациентов РС без активных очагов демиелинизации достоверно более высокое содержание CD39Treg (до лечения и к году терапии), CD39Th17 (после индукционного курса и к году терапии), чем в группе с активными очагами;

4) динамика содержания малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов с экспрессией CD39/CD73 отличалась в группах пациентов с разной эффективностью ГИБП: в группе пациентов с эффективным лечением выявлено достоверно более высокое содержание CD39Treg и supTh17 в течение года терапии, в группе с НЭ содержание этих популяций снижалось и к году лечения было значимо ниже, чем в группе с эффективным лечением;

5) для пациентов с РС в разделительной модели «эффективность – неэффективность» по содержанию малых популяций $CD4^+$Т-клеток получены пороговые значения содержания Treg с экспрессией CD39 (32,2%), для Th17 лимфоцитов с экспрессией CD39 (5,6%) и CD73 (14,2%). Снижение показателей ниже пороговых значений может свидетельствовать о риске развития неэффективности терапии INFβ-1a.

Резюме.

1. У пациентов с ИЗЗ наибольшее содержание лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидазы CD39 выявлено в популяции Т-регуляторных клеток и составляло Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$): у пациентов ВЗК – 34,2 (28,6 – 44,3) %; у пациентов с ПС – 32,2 (23,2 – 41,8) %; у пациентов с РС - 29,3 (15,0-37,6) % от Treg. Наибольшее содержание лимфоцитов экспрессией CD73 получено в активированных Т-хелперах и составляло Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$): 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.

2. У пациентов с ИЗЗ выявлены аналогичные соотношение между экспрессией CD39 и CD73 в популяции Treg (доля клеток с экспрессией CD39 выше, чем с экспрессией CD73), Thact (доля клеток с экспрессией CD39 ниже, чем с

экспрессией CD73). В популяции Th17-лимфоцитов аналогичные соотношения CD39 и CD73 с группой сравнения наблюдались у пациентов с ВЗК (доли клеток с экспрессией CD39 и CD73 в Th17-лимфоцитах не отличались), у пациентов с ПС и РС доля клеток с экспрессией CD73 значимо выше, чем CD39 в Th17-лимфоцитах.

3. У пациентов в обострении БК и РС содержание Treg и Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39 значимо ниже, чем у пациентов в ремиссии заболевания, у пациентов с ПС – содержание Th17 с экспрессией CD39.

4. У пациентов в обострении ВЗК достоверно ниже АТФ-азная активность эктонуклеотидазы CD39, чем у пациентов в ремиссии. Увеличение количества Treg с экспрессией CD39 при обострении заболевания является компенсаторной реакцией на дисфункцию эктонуклеотидазы CD39.

5. Для всех обследованных патологий (ВЗК, ПС, РС) в группах с достаточной эффективностью ГИБП к году терапии содержание CD39 в Т-регуляторных и Th17-лимфоцитах значимо выше, чем в группах с недостаточной эффективностью.

6. Получены пороговые значения относительного содержания малых популяций CD4+ Т-лимфоцитов, ниже которых можно прогнозировать недостаточную эффективность ГИБП: у пациентов с ВЗК для популяции CD39Treg - 34% и популяции CD39Th17 - 15%; у пациентов с ПС для CD39Treg - 22% и CD39Th17 – 7,3%, у пациентов с РС для популяции CD39Treg – 32,2%, для CD39Th17 – 5,6%, для CD73Th17 – 14,2%.

Материалы, изложенные в разделе 3.2 опубликованы [44, 46, 47, 61, 66, 68, 71, 73, 75, 76, 78].

3.3. Концентрация циркулирующих цитокинов и цитокиновых комплексов у детей с иммунозависимыми заболеваниями

3.3.1. Уровень цитокинов и цитокиновых комплексов у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями в состоянии ремиссии и обострения

Ключевым дефектом в иммунопатогенезе ПС, РС, ЯК и БК, является дисбаланс эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов, приводящий к активации сигнальных путей с последующей выработкой каскада провоспалительных цитокинов.

Проведено мультиплексное количественное определение 25 цитокинов (ЦК) в сыворотке крови у пациентов с ИЗЗ. Оценивалась панель следующих ЦК: IL-1β, GM-CSF, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL25, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31, IL-33, CCL20/MIP3α, TNF-a, TNF-β. Пациенты с БК, ЯК, ПС и РС и были разделены на группы по активности заболевания (клиническая картина; индексы активности, функциональные методы исследования – эндоскопическое исследование при ВЗК, наличие активных очагов демиелинизации на МРТ при РС) и эффективности терапии к году лечения (Таблица 3.79). Для пациентов с ВЗК индексы составляли: PUCAI для БК (>10 – обострение заболевания, ≤10 – ремиссия заболевания), PCDIA для ЯК (>10 – обострение заболевания, ≤10 – ремиссия заболевания). Для пациентов с вульгарным псориазом при оценке активности заболевания учитывали индекс площади поражения PASI (>10 – обострение заболевания, ≤10 – ремиссия заболевания). Группы пациентов с обострением и ремиссией заболевания, недостаточной эффективностью лечения и эффективностью были сравнимы по возрасту при всех обследованных патологиях (Таблица 3.79).

Таблица 3.79 – Клинико-анамнестическая характеристика пациентов с ИЗЗ при исследовании цитокинов

Патология Данные о пациентах		Активность заболевания		Эффективность терапии	
		Обострение	Ремиссия	НЭ	Эффект.
БК	Кол-во	48	32	26	22
	Возраст	15,7 (12,2-16,9)	15,7 (14,1-16,7)	15,5 (12,2-16,9)	16,1 (13,6-17,0)
	p	0,96		0,433	
	Терапия	Анти-TNF			
ЯК	Кол-во	33	20	26	18
	Возраст	14, 8 (13,9-16,0)	15,1 (14,8-16,8)	13,9 (11,1-14,2)	14,6 (11,9-14,9)
	p	0,836		0,911	
	Терапия	Анти-TNF			
ПС	Кол-во	30	59	29	44
	Возраст	8,34 (6,9-12,1)	9,7 (7,7-13,5)	8,4 (7,1-13,1)	10,2 (8,3-13,9)
	p	0,126		0,234	
	Терапия	Анти-TNF			
РС	Кол-во	34	32	28	24
	Возраст	15,9 (15,1-17,2)	16,2 (14,6-17,5)	15,9 (15,1-16,4)	16,1 (14,6-17,9)
	p	0,783		0,358	
	Терапия	IFNβ-1a			

Примечание: p – достоверность различий между группами пациентов; возраст представлен Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)

Анализ уровня цитокинов в сыворотке крови у пациентов с ИЗЗ в обострении и ремиссии заболеваний

Проведено сравнение уровня ЦК у пациентов с ИЗЗ в сыворотке крови в обострении и ремиссии заболевания (Таблица 3.80).

Таблица 3.80 – Уровень цитокинов в сыворотке у пациентов в обострении и ремиссии заболевания ПС, РС, ЯК, БК (Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$) пг/мл)

Патология / Состояние	БК[1]	ЯК[2]	ПС[3]	РС[4]	p
CCL20/MIP3a					
Обострение	34,9 (31,3-70,2)	44,4 (36,6-62,7)	39,2 (32,0-62,1)	21,5(16,9-25,6)	p_{14}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	30,7 (18,6-35,4) **	26,8 (24,2-36,6) **	35,2 (31,2-41,1)	20,1 (8,5-32,0) *	p_{13}, p_{14}, p_{23}, p_{24}, p_{34}
GM-CSF					
Обострение	292 (266-607)	234 (191-376)	325 (296-395)	212 (148-255)	p_{12}, p_{14}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	255 (202-312)*	191 (141-234) *	272 (223-296) **	12,4 (2,1-217)	p_{12}, p_{14}, p_{23}, p_{24}, p_{34}
IFN-γ					
Обострение	6,0 (3,8-14,1)	3,9 (3,2-4,9)	3,8 (3,6-6,3)	3,8 (3,0-9,0)	p_{12}, p_{13}, p_{14},
Ремиссия	3,7 (3,1-5,9) *	3,2 (2,6-3,3) *	3,1 (2,6-3,7) **	3,3 (0,9-8,3)	p_{12}, p_{13}, p_{14}
IL-10					
Обострение	3,9 (3,2-6,9)	3,9 (3,4-7,9)	4,2 (3,5-4,6)	2,6 (0,1-5,1)	p_{14}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	3,2 (1,9-4,2) *	2,9 (2,5-3,6) **	3,4 (2,6-3,9) **	2,4 (0,2-5,1)	
IL-12p70					
Обострение	2,8 (2,6-4,3)	2,4 (2,2-3,1)	2,9 (2,4-3,9)	2,2 (1,9-2,6)	p_{12}, p_{14}, p_{23}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	2,6 (1,8-3,2) *	2,26 (1,80-2,3) *	2,6 (2,3-2,8) *	1,76 (0,3-2,0) *	p_{14}, p_{23}, p_{24}, p_{34}
IL-13					
Обострение	222 (141-427)	135 (100-334)	261 (201-630)	198 (102-313)	p_{23}, p_{34}
Ремиссия	194 (102-263) *	89,7 (47,9-159) *	170 (97,1-323) **	134 (57,4-236)	p_{12}, p_{23}, p_{24}
IL-15					
Обострение	11,4 (8,1-17,1)	7,1 (5,5-10,8)	7,9 (7,1-9,4)	5,5 (3,9-9,2)	p_{12}, p_{14}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	7,3 (4,9-10,4) *	5,5 (4,3-6,9) *	7,7 (6,5-8,4)	5,5 (1,9-10,8)	p_{23}, p_{34}
IL-17A					
Обострение	1,7 (0,9-7,6)	1,3 (0,7-4,9)	0,7 (0,5-0,9)	0,5 (0,3-0,8)	p_{13}, p_{14}, p_{23}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	1,2 (0,6-3,3)	0,5 (0,2-0,8)	0,4 (0,3-0,7) **	0,3 (0,2-1,2)	p_{12}, p_{13}, p_{14}, p_{23}
IL-17E/IL25					
Обострение	64,2 (28,1-175)	33,9 (22,2-69,6)	61,2 (25,7-97,8)	26,6 (10,5-33,4)	p_{12}, p_{14}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	16,9 (11,9-26,7) **	16,3 (12,8-20,4) **	16,9 (14,8-23,7) **	7,7 (2,0-29,9) *	p_{34}
IL-17F					
Обострение	76,5 (55,3-160)	41,8 (27,9-88,7)	73,9 (36,5-99,8)	45,6 (9,7-55,9)	p_{12}, p_{14}, p_{34}
Ремиссия	31,4 (17,1-55,3) **	18,8 (11,9-27,9)	24,5 (22,3-39,8) **	16,8 (2,2-39,6)	p_{12}, p_{14}, p_{23}, p_{34}
IL-1β					
Обострение	0,9 (0,8-2,4)	0,5 (0,4-1,8)	0,4 (0,2-1,5)	1,7 (0,3-2,0)	p_{13}, p_{34}
Ремиссия	0,8 (0,4-1,6)	0,5 (0,2-1,1)	0,4 (0,3-0,7)	1,7 (0,5-2,0)	p_{13}, p_{34}
IL-2					
Обострение	13,1 (6,7-21,7)	5,9 (4,7-15,5)	8,5 (5,9-18,2)	6,3 (4,3-10,8)	p_{12}, p_{14}
Ремиссия	5,9 (4,0-7,7)**	4,7 (3,9-4,7) **	7,3 (3,5-8,5) *	5,2 (2,5-10,8)	p_{23}

Продолжение Таблицы 3.80

Патология / Состояние	БК1	ЯК2	ПС3	РС4	p
IL-21					
Обострение	13,8 (10,4-23,6)	10,2 (7,4-13,6)	11,2 (10,2-16,5)	7,5 (5,3-8,8)	p_{12}, p_{14}, p_{34}
Ремиссия	10,2 (7,6-12,5) **	6,0 (5,3-7,4) **	7,5 (6,8-10,8) **	5,3 (0,9-7,7) *	p_{12}, p_{23},p_{34}
IL-22					
Обострение	1639 (1051-3626)	1205 (1051-1977)	1805 (986-2491)	709 (36 -1444)	p_{14}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	669 (175-986) **	709 (601-973) **	935 (656-999) **	36,0 (36,0-798)	p_{13}, p_{34}
IL-23					
Обострение	2754 (1407-7147)	1535 (1120-3661)	2367 (1343-4515)	929 (8,0-1343)	p_{12}, p_{14}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	770 (389-1280) **	770 (611-1009) **	897 (706-1025) **	83,6 (8,0-1025)	p_{14}, p_{24}, p_{34}
IL-27					
Обострение	1076 (705-1794)	524 (373-899)	776 (693-1128)	519 (395-746)	p_{12}, p_{14}, p_{23}, p_{34}
Ремиссия	416 (301-508) **	378 (292-438) *	532 (445-655) **	559 (335-861)	p_{13}, p_{14}, p_{23}, p_{24}
IL-28A					
Обострение	445 (279-1175)	476 (279-1514)	369 (282-779)	370 (45,0-809)	p_{24}
Ремиссия	231 (119-381) **	194 (157-267) **	224 (182-278) **	45,0 (45,0-255) **	p_{14}, p_{24}, p_{34}
IL-31					
Обострение	132 (57,2-362)	68,6 (50,5-140)	142 (54,9-238)	35,1 (18,2-66,3)	p_{14}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	37,2 (22,6-50,5) **	34,5 (26,4-44,9) **	38,2 (32,4-43,8) **	4,2 (0,7-50,5)	
IL-33					
Обострение	58,8 (27,9-140)	36,5 (24,6-68,0)	54,1 (25,8-101)	20,9 (6,2-28,2)	p_{14}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	16,1 (9,7-25,2) **	18,5 (13,6-24,6) **	18,5 (14,7-21,9) **	2,4 (0,1-22,1)	p_{14}, p_{24}, p_{34}
IL-4					
Обострение	107 (95,2-207)	105 (85,6-153)	295 (89,5-470)	95,1 (27,6-130)	p_{14}, p_{34}
Ремиссия	90,4 (65,9-156) *	95,2 (73,7-95,2) **	85,6 (76,1-124) **	38,6 (4,0-124)	p_{14}, p_{23}, p_{24}
IL-5					
Обострение	6,5 (5,7-13,6)	7,2 (5,3-15,9)	6,9 (5,3-16,1)	5,3 (3,7-6,5)	p_{14}, p_{24}, p_{34}
Ремиссия	4,9 (3,7-6,3) **	4,4 (3,3-5,3) **	4,5 (4,0-5,7) **	1,9 (0,1-4,1) *	p_{14}, p_{24}, p_{34}
IL-6					
Обострение	18,9 (8,7-51,7)	11,5 (6,2-54,2)	9,3 (6,9-53,7)	11,7 (0,9-30,2)	
Ремиссия	6,6 (2,6-8,9) **	4,2 (3,6-4,9) **	5,3 (4,6-6,5) **	1,5 (0,3-5,4) **	p_{12}, p_{14}, p_{23}, p_{24}, p_{34}
IL-9					
Обострение	12,3 (8,9-34,9)	11,0 (7,2-47,9)	11,8 (8,5-64,0)	8,5 (1,8-25,5)	p_{34}, p_{14}
Ремиссия	6,9 (2,4-13,3) **	3,7 (3,0-5,7) **	5,5 (4,7-6,6) **	0,2 (0,2-4,9) **	p_{14}, p_{23}, p_{24}
TNF-a					
Обострение	22,0 (16,2-40,8)	17,9 (13,3-48,8)	24,3 (16,8-62,0)	15,0 (9,7-16,8)	p_{14}, p_{34}
Ремиссия	17,9 (11,2-21,6) *	9,7 (7,1-14,4) *	17,6 (12,0-20,2) **	11,1 (7,4-30,7)	p_{12}, p_{23}
TNF-β					
Обострение	53,6 (16,5-259)	32,0 (20,9-227)	41,8 (16,5-182)	71,9 (3,0-149)	
Ремиссия	15,8 (8,0-29,8)*	8,0 (6,5-10,1) **	7,9 (7,6-10,4) **	3,0 (3,0-7,9) **	p_{12}, p_{13}, p_{14}, p_2

Примечание: p – достоверность различий между пациентами с разными патологиями с $p<0,05$; p_{12} – между БК и ЯК; p_{13} – между БК и ПС; p_{14} – между БК и РС; p_{23} – между ЯК и ПС; p_{24} – между ЯК и РС; p_{34} – между ПС и РС; * – достоверность различий между группами пациентов в обострении и ремиссии заболевания с $p<0,05$; ** – достоверность различий между группами пациентов в обострении и ремиссии заболевания с $p<0,001$

Анализ результатов количественного содержания ЦК в сыворотке крови показал, что при обострении заболевания для всех исследованных патологий наибольшие значения концентрации наблюдались для цитокина IL-23, а наименьшие – IL-1β, за исключением пациентов с РС у которых наименьшая концентрация отмечалась для IL17A. Максимальные значения IL23 определены у пациентов с БК в обострении заболевания (Me – 2754 пг/мл), минимальные значения IL-1β – у пациентов с ПС (Me – 0,4 пг/мл) (Таблица 3.75). При этом, в обострении заболевания каждая патология характеризовалась своим уровнем ЦК, большинство цитокинов достоверно отличались между патологиями, кроме IL6 и TNF-β (Таблица 3.75). Так, у пациентов в обострении РС практически по всем изученным цитокинам значения были наименьшими при сравнении с пациентами других обследованных патологий.

Анализ уровня циркулирующих цитокинов показал, что при ремиссии заболевания наибольшие значения у пациентов с БК и ЯК наблюдались также, как и в обострении заболевания, для цитокина IL-23, у пациентов с ПС – IL-22, а для пациентов РС – IL-27 (Таблица 3.80). При этом, максимальные значения уровня ЦК среди всех обследованных патологий определены у пациентов с ПС для цитокина IL-22 (Me – 935 пг/мл), а минимальные – у пациентов с РС для IL-9 (0,2 пг/мл). Достоверные отличия между группами пациентов в ремиссии при разных заболеваниях отмечались для большинства ЦК, кроме IL-10 и IL-31 (Таблица 3.80).

При сравнении пациентов в обострении и ремиссии заболевания для большинства ЦК наблюдались значимо более высокие значения в обострении заболевания при всех изученных патологиях. У пациентов в обострении как для БК, так и для ЯК, большинство ЦК достоверно отличались ($p<0,05$) за исключением IL-17A и IL-1β. При обострении ПС показано увеличение 22-х из 25 ЦК: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, 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, TNF-α, TNF-β; достоверной разницы не было только для цитокинов CCL20/MIP3a, IL-15, IL-1β. У пациентов в обострении РС наблюдалось достоверное увеличение 9 из 25 ЦК: IL-5, IL-6, IL-9, IL-12p70, IL-17E/IL-25, IL-21, IL-28A, TNF-β ($p<0,001$), GM-CSF. Таким образом, в

группах пациентов с ВЗК, ПС и РС выявлены 8 цитокинов, которые были повышены в обострении относительно ремиссии заболевания: IL-5, IL-6, IL-9, IL-12p70, IL-17E/IL-25, IL-21, IL-28A, TNF-β. При этом, были цитокины, которые повышались только в обострении заболевания при определенной патологии, как например – IL-17A при ПС, CCL20/MIP3a и IL-15 при ВЗК.

Таким образом:

1) наибольшие значения при обострении заболевания у пациентов с БК, ЯК, ПС и РС наблюдались для IL23;

2) наибольшие значения уровня цитокинов у пациентов с ИЗЗ при ремиссии заболевания выявлены для: IL-23 (БК и ЯК), IL-22 (ПС), IL-27(РС);

3) у пациентов с РС уровень большинства цитокинов как при обострении, так и в ремиссии заболевания наименьший при сравнении с другими обследованными патологиями;

4) пациенты в обострении заболеваний при сравнении с ремиссией имеют более высокий уровень для большинства ЦК при всех обследованных патологиях.

Зависимость концентрации циркулирующих цитокинов от длительности заболевания и длительности терапии у пациентов с ИЗЗ

Проведен корреляционный анализ (Спирмена) зависимости концентрации циркулирующих цитокинов у пациентов с ИЗЗ от длительности заболевания и длительности терапии (Таблица 3.81).

Таблица 3.81 – Коэффициенты корреляции уровня циркулирующих цитокинов от длительности заболевания и длительности терапии у пациентов с ИЗЗ

Цитокины	r (p <0,05)							
	Длительность заболевания				Длительность терапии			
	БК	ЯК	ПС	РС	БК	ЯК	ПС	РС
CCL20/MIP3a	-	-	-0,27	-	-0,26	-	-0,25	-
GM-CSF	-	-0,32	-	-	-0,23	-	-	-
IFN-ɤ	-	-0,36	-0,39	-	-	-	-	-
IL-10	-	-0,41	-0,35	-	-0,26	-	-	-0,48
IL-12p70	-	-	-0,32	-	-	-	-	-0,49
IL-13	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-15	-	-	-	-	-	-	-0,27	-
IL-17A	-	-	-0,30	-	-	-	-	-
IL-17E/IL-25	-	-0,36	-0,27	-	-	-	-	-0,33
IL-17F	-	-0,34	-	-	-	-	-	-0,38
IL-1β	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-	-	-	-0,37
IL-21	-	-	-0,29	-	-	-	-	-
IL-22	-	-	-0,31	-	-	-	-	-
IL-23	-	-0,35	-0,37	-0,27	-	-	-	-
IL-27	-	-0,39	-0,42	-	-	-	-	-
IL-28A	-	-0,41	-0,29	-0,25	-0,22	-	-	-0,37
IL-31	-	-0,31	-0,52	-0,27	-	-	-	-
IL-33	-	-0,29	-0,37	-0,26	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-	-	-	-0,40
IL-5	-	-0,48	-	-	-	-	-	-0,34
IL-6	-	-0,33	-	-0,32	-	-	-	-0,34
IL-9	-	-0,27	-	-	-0,22	-	-	-
TNF-α	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF-β	-	-	-	-	-	-	-	-0,33

Обратная корреляционная зависимость от длительности заболевания выявлена для концентрации IL-31 у пациентов с ПС (r=-0,52). Умеренная и слабая обратная корреляционная зависимость наблюдалась между отдельными исследованными ЦК с длительностью заболевания и длительностью терапии ГИБП у пациентов с ИЗЗ. У пациентов с БК не было выявлено зависимости между концентрацией ЦК и длительностью заболевания, а у пациентов с ЯК – зависимости между ЦК и длительностью терапии ГИБП. У пациентов с ПС выявлена умеренная корреляционная зависимость для 9 ЦК от длительности заболевания (Таблица 3.81). У пациентов с РС наблюдалась умеренная корреляционная зависимость между IL-10, IL-12p70 и длительностью терапии. Зависимости концентрации ЦК от возраста не было выявлено в обследованных

группах пациентов с ВЗК, ПС и РС. Необходимо отметить, что для всех значимых корреляционных зависимостей характерен большой разброс показателей.

Комплексы цитокинов, ассоциированные с клетками-продуцентами и с действием (функциями) ЦК у пациентов с ИЗЗ

Проанализировали уровень цитокиновых комплексов с зависимости от клеток-продуцентов и функциональной направленности цитокинов. Рассматривали следующие ЦК комплексы (ЦКК), ассоциированные с клетками.

Комплекс M1 (IL-1/IL-6/TNF-α), ассоциирован с M1 макрофагами [179, 545]. Комплекс cTh1 (IFN-γ+IL12p70+TNF-β+IL2) – ассоциирован с Th1 лимфоцитами: цитокин IL12 необходим для дифференцировки наивных Т-клеток в Th1, которые в свою очередь вырабатывают цитокины IFN-γ, TNF-β, IL2 [318].

Комплекс cTh2 (IL-4+IL-5+IL-13+IL-17E/IL-25+IL-33), ассоциирован с популяцией Th2 лимфоцитов: под действием IL-17E/IL-25 и IL-33 наивные Т-клетки дифференцируются в Th2 лимфоциты, которые в дальнейшем продуцируют цитокины IL-4, IL-5 и IL-13 [179, 318, 336].

Комплекс cTh17 (IL-1β+IL-6+IL-17A+IL-17F+IL-21+IL-22+IL-23) ассоциирован с популяцией Th17-лимфоцитов: под действием IL1β, IL6, IL21 и IL23 происходит дифференцировка наивных Т-клеток в Th17-лимфоциты, которые продуцируют IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22 [636].

ЦКК, ассоциированные с функциями ЦК: fTh2+mast (IL-4+IL-5+IL-31+IL-13) – ЦК, продуцируемые Th2-клетками и тучными клетками [318, 336, 369]; fIL12 (IL-12+IL-23+IL-27) [24, 79, 413, 619]; fTh17 (IL-17A+IL-17F) – основные ЦК, продуцируемые Th17-клетками [636]; fTh2 (IL-4+IL-5+IL-13) – цитокины, продуцируемые Th2 лимфоцитами [318, 336]; fTh22 (IL-13+IL-22) – цитокины, продуцируемые Th22 клетками [318].

При сравнении цитокиновых комплексов между патологиями наибольшие значения для всех ЦКК, ассоциированных с клетками, в обострении заболевания отмечались у пациентов с ПС. При этом, наибольшие значения для всех ЦКК в ремиссии заболевания наблюдались у пациентов с ЯК. Наибольшие значения по

ЦКК выявлены у пациентов с БК в обострении и ремиссии для комплекса cTh17 (Таблица 3.82).

Таблица 3.82 – Уровень цитокиновых комплексов, ассоциированных с клетками-продуцентами, у пациентов в обострении и ремиссии ИЗЗ (Me($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$) пг/мл)

Патология / Состояние	БК[1]	ЯК[2]	ПС[3]	РС[4]	p
M1					
Обострение	51,9 29,3-100	50,7 27,4-129	58,8 30,8-78,7	37,5 21,9-58,2	p_{14}=0,037
Ремиссия	25,2* 18,3-34,2	15,8* 11,5-20,5	23,4* 19,2-25,2	15,4* 12,04-36,94	p_{23}<0,001 p_{12}<0,001
cTh1					
Обострение	88,0 34,1-270	47,1 30,3-294	61,3 34,6-197	80,0 23,6-16	
Ремиссия	36,2* 22,6-45,6	17.5* 15,7-23,0	21.2* 19,5-27,2	15,8* 11,0-33,4	p_{13}<0,001 p_{14}=0,002 p_{12}<0,001
cTh2					
Обострение	588 445-985	465,9 278-848	602,2 424-1161	359 226-490	p_{34}<0,001 p_{23}=0,013 p_{14}<0,001
Ремиссия	346* 243-503	252* 191-282	306* 276-440	269 192-374	p_{23}=0,001 p_{12}=0,008
cTh17					
Обострение	4597 2550-10294	2695 2225-5513	4248 2313-7022	1708 168-2848	p_{34}<0,001 p_{24}<0,001 p_{14}<0,001
Ремиссия	1506* 686-2213	1541* 1238-1961	1895* 1390-2057	180 65,3-2117	p_{34}<0,001 p_{24}=0,021 p_{14}=0,036

Примечание: p - достоверность различий между пациентами с разными патологиями с p<0,05; p_{12} – между ПС и РС; p_{13} – между ПС и ЯК; p_{14} – между ПС и БК; p_{23} – между РС и ЯК; p_{24} - междуРС и БК; p_{34} – между ЯК и БК; * - достоверность различий между обострением и ремиссией с p<0,05 для ПС, РС, ЯК и БК

Выявлено, что значения ЦКК (M1, cTh1, cTh2, cTh17) в ремиссии заболевания были значимо ниже, чем в обострении для пациентов с БК, ЯК и ПС. У детей с РС снижение показателей в ремиссии получено для комплексов M1 и cTh1. Наименьшие значения по ЦКК наблюдались у пациентов с РС в обострении и ремиссии для M1 комплекса. Отличий по цитокиновому профилю cTh1 между исследованными патологиями у пациентов в обострении заболеваний не выявлено. Однако, в ремиссии заболевания достоверные отличия по комплексу cTh1 между

ИЗЗ наблюдались: у пациентов с БК комплекс cTh1 был наибольшим среди других пациентов с ИЗЗ. В обострении заболевания между группами пациентов с ЯК и БК достоверной разницы по уровням ЦКК выявлено не было. В тоже время, в ремиссии этих заболеваний наблюдались достоверные отличия по следующим профилям: M1, cTh1, cTh2. Причем, у пациентов с БК значения этих ЦКК были значимо выше, чем при ЯК. В обострении заболевания также, как и в ремиссии заболевания, у пациентов с РС значения cTh17 были достоверно ниже, чем при ПС, ЯК и БК.

Анализ ЦКК, ассоциированных с функциями клеток, также показал достоверные отличия между пациентами с разными патологиями как в обострении, так и в ремиссии заболеваний (Таблица 3.83).

Таблица 3.83 – Уровень цитокиновых комплексов, ассоциированных с функциями цитокинов, у пациентов в обострении и ремиссии ИЗЗ ($Me(Q_{0.25}-Q_{0.75})$)

Патология / Состояние	БК[1]	ЯК[2]	ПС[3]	РС[4]	p
fTh17					
Обострение	88,6 56,8-166,5	42,7 28,9-93,3	74,3 37,3-104,6	46,3 11,9-56,3	p_{12}=0,008 p_{14}<0,001 p_{34}<0,001
Ремиссия	35,7* 18,0-59,6	19,3* 12,2-28,4	25,2* 22,6-40,20	18,7* 4,7-41,6	p_{12}=0,035 p_{14}=0,041 p_{23}=0,013 p_{34}<0,021
fIL12					
Обострение	3607,3 2145-8968	1975,5 1559-4331	3112,5 1967,5-5623,5	1326,0 803,9-1863,6	p_{12}=0,007 p_{14}<0,001 p_{24}<0,001 p_{34}<0,001
Ремиссия	1291,1* 972-1703	1177,1* 937-1538	1489,2* 1138-1861	991,3 567-1497	p_{23}=0,019 p_{34}<0,003
fTh22					
Обострение	2295,6 1474-3824	1589,2 1173-2297	2230,7 1615-3022	972,5 502,1-1512,9	p_{14}<0,001 p_{24}<0,001 p_{34}<0,001
Ремиссия	840,3* 402-1164	811,4* 699-1045	1034,5* 848-1231	616,3* 214-1029	p_{13}=0,040 p_{23}=0,018 p_{24}=0,042 p_{34}<0,001
fTh2_mast					
Обострение	587,2 441,5-987	467,3 261,1-979	620,9 437-1157	344,4 224,9-480,5	p_{34}<0,001 $p_{23=}$0,014 p_{14}<0,001
Ремиссия	324,8* 251,9-492,8	247,2* 187,9-289,9	304,570* 266,0-434,1	264,7 189,1-370,1	$p_{23=}$0,003 p_{12}=0,008
fTh2					
Обострение	390,7 277,9-680,6	259,4 200,7-758,0	392,4 316-1096	334,8 200,6-457,9	p_{14}=0,018 $p_{23=}$0,004 p_{34}<0,001
Ремиссия	275,4* 204,4-440,4	202,9* 138,6-236,6	276,6* 214,5-406,1	229,8* 144,3-329,8	p_{12}=0,004 p_{23}<0,001 p_{34}=0,034

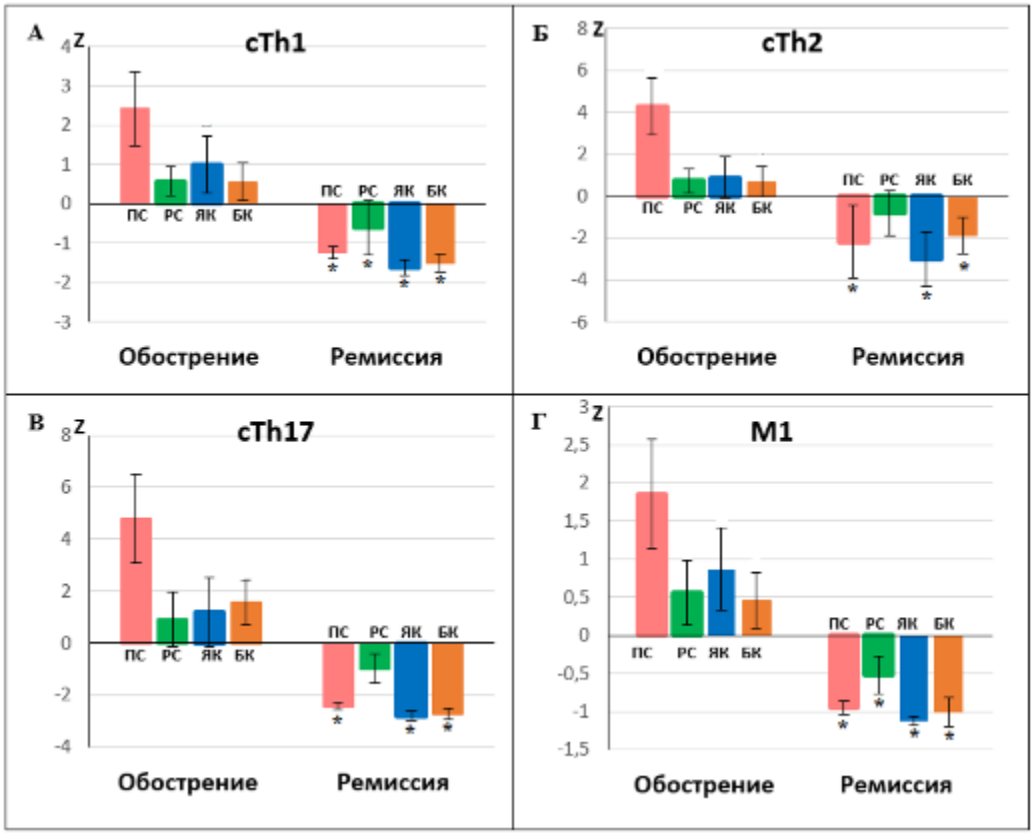
Примечание: p – достоверность различий между пациентами с разными патологиями с p<0,05; p_{12} – между ПС и РС; p_{13} – между ПС и ЯК; p_{14} – между ПС и БК; p_{23} – между РС и ЯК; p_{24} – между РС и БК; p_{34} – между ЯК и БК; * – достоверность различий между обострением и ремиссией с p <0,05для ПС, РС, ЯК и БК

Наибольшие значения для ЦКК, ассоциированных с функциями клеток, в обострении заболевания выявлены у пациентов с БК для fIL12, а наименьшие – у пациентов с ЯК для fTh17. В ремиссии заболевания наибольшие значения

цитокиновых комплексов отмечались у пациентов с ПС для fIL12, а наименьшие – у пациентов с РС для fTh17.

Уровень измеренных цитокинов варьировал в широком диапазоне от значений менее 10 пг/мл до нескольких тысяч пг/мл. Для графического представления состояний «обострение – ремиссия» по уровню ЦКК была использована z-стандартизация (подробнее см. раздел 2.3.).

Проведенный анализ профилей цитокинов, ассоциированных с клетками показал достоверную разницу между состояниями обострения и ремиссии у пациентов с ВЗК и ПС по всем изученным комплексам, а для пациентов с РС – по комплексам cTh1 и M1 (Рисунок 3.105).



Примечание: *– достоверные различия между состоянием обострения и ремиссии по каждой патологии с p <0,05; по оси OY – показаны средние значения по z-score с указанием стандартной ошибки

Рисунок 3.105 – Z-оценка цитокиновых комплексов (А – cTh1, Б – cTh2, В – cTh17, Г – M1), ассоциированных с клетками при иммунозависимых заболеваниях

Анализ ЦКК по функциям у пациентов с БК, ЯК в обострении заболевания показал значимое увеличение цитокиновых комплексов fTh17, fIL12, fTh22, fTh2_mast и fTh2 по сравнению с ремиссией (Рисунок 3.106).

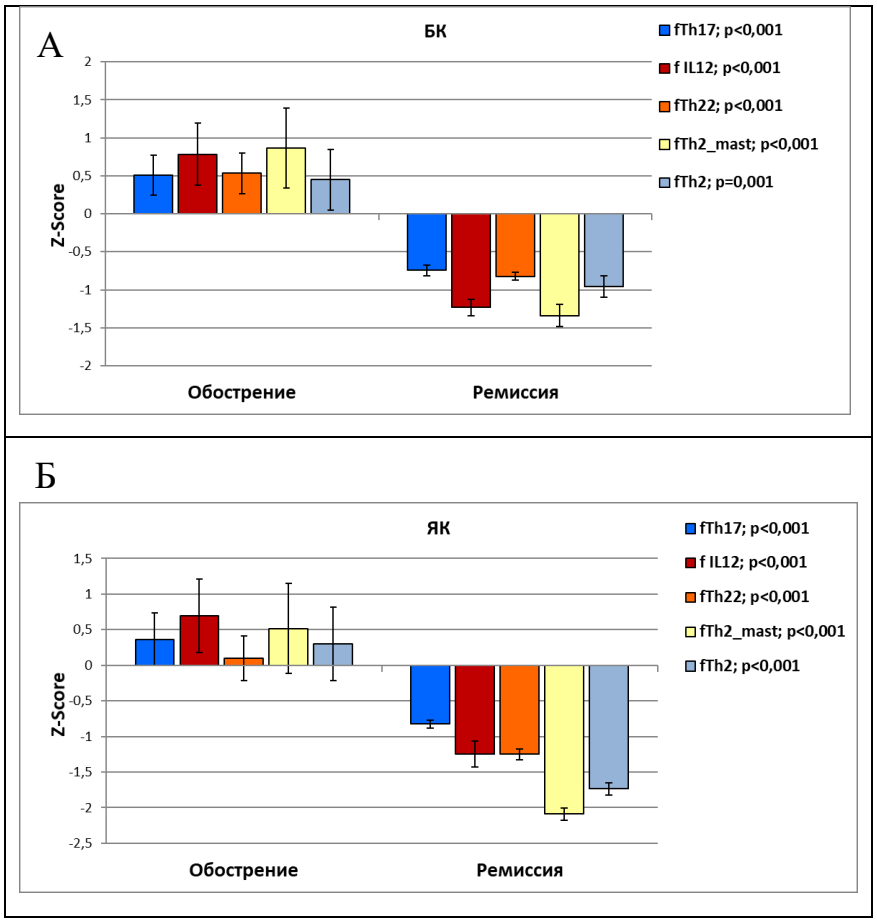
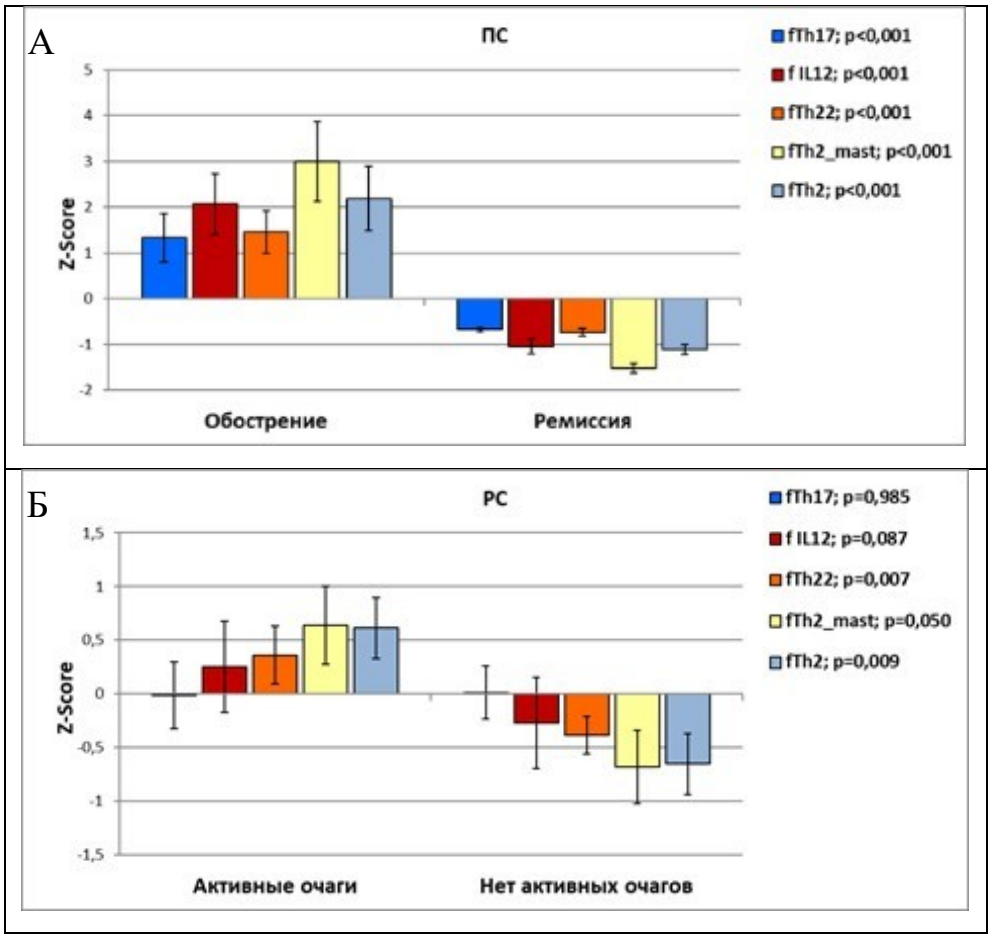


Рисунок 3.106 – Z-оценка цитокиновых комплексов, ассоциированных с функциями при БК (А), ЯК (Б)

У пациентов с ПС значимые отличия между состояниями «обострение – ремиссия» выявлены для всех исследованных комплексов по функциям клеток (Рисунок 3.107А). У пациентов с РС достоверно значимое увеличение наблюдалось только для комплексов fTh22 и fTh2 (Рисунок 3.107Б).



Примечание: по оси OY – показаны средние значения по z-score с указанием стандартной ошибки

Рисунок 3.107 – Z-оценка цитокиновых комплексов, ассоциированных с функциями при ПС (А), РС (Б)

Пороговые значения цитокиновых комплексов для состояний обострение и ремиссия у пациентов с ИЗЗ

Проведенный ROC-анализ позволил получить пороговые значения для разделения состояний «обострение – ремиссия», выше которых можно прогнозировать развитие обострения у пациентов с ИЗЗ (Таблица 3.84). Для большинства ЦКК у пациентов с БК, ЯК и ПС получено очень хорошее качество разделительной модели «обострение-ремиссия». У пациентов с РС для ЦКК было получено высокое качество разделительной модели для комплекса cTh1 (AUC=0,804).

Таблица 3.84 – Пороговые значения цитокинов для состояний обострение/ремиссия у детей с ПС, РС, ЯК, БК

Цитокиновые комплексы	Cut-off, пг/мл/ (Se %; Sp %)			
	БК	ЯК	ПС	РС
M1	30,1 (72,2; 71,4)	20,9 (84,8; 85,0)	27,0 (80,0; 79,7)	27,2 (64,7; 62,5)
AUC	0,808	0,924	0,816	0,721
cTh1	44,62 (68,5; 68,6)	26,7 (81,8; 80,0)	29,9 (83,3; 83,1)	33,1 (70,6; 71,9)
AUC	0,725	0,883	0,892	0,804
cTh2	471 (72,2; 71,4)	278 (75,8; 75,0)	429 (73,3; 72,9)	331 (58,8; 59,4)
AUC	0,779	0,807	0,873	0,652
cTh17	2531 (79,6; 80,0)	2213 (78,8; 80,0)	2140 (80,0; 79,7)	1073 (52,9; 53,1)
AUC	0,863	0,847	0,933	0,610
fTh17	57,6 (74,1; 74,3)	28,7 (78,8; 80)	39,8 (66,7; 66,1)	21,7 (58,8; 59,4)
AUC	0,822	0,843	0,862	0,618
fIL12	1986 (79,6; 80)	1538 (78,8; 75)	1891 (80; 79,7)	1084 (58,8;59,4)
AUC	0,884	0,838	0,932	0,623
fTh22	1340 (81,5; 82,9)	1132 (81,8; 80)	1431 (83,3; 83,1)	664 (58,8; 59,4)
AUC	0,859	0,830	0,931	0,647
fTh2_mast	462 (74,1; 74,3)	283 (63,6; 65)	437 (73,3; 76,3)	334 (58,8; 62,5)
AUC	0,794	0,792	0,885	0,637
fTh2	337 (62,9; 62,9)	212 (60,6; 60)	356 (56,7; 55,9)	268 (58,8; 59,4)
AUC	0,687	0,758	0,769	0,672
Примечание: AUC – площадь под кривой; Se – чувствительность; Sp – специфичность				

ROC-кривые с наилучшим качеством разделительной модели для всех патологий представлены на Рисунке 3.108.

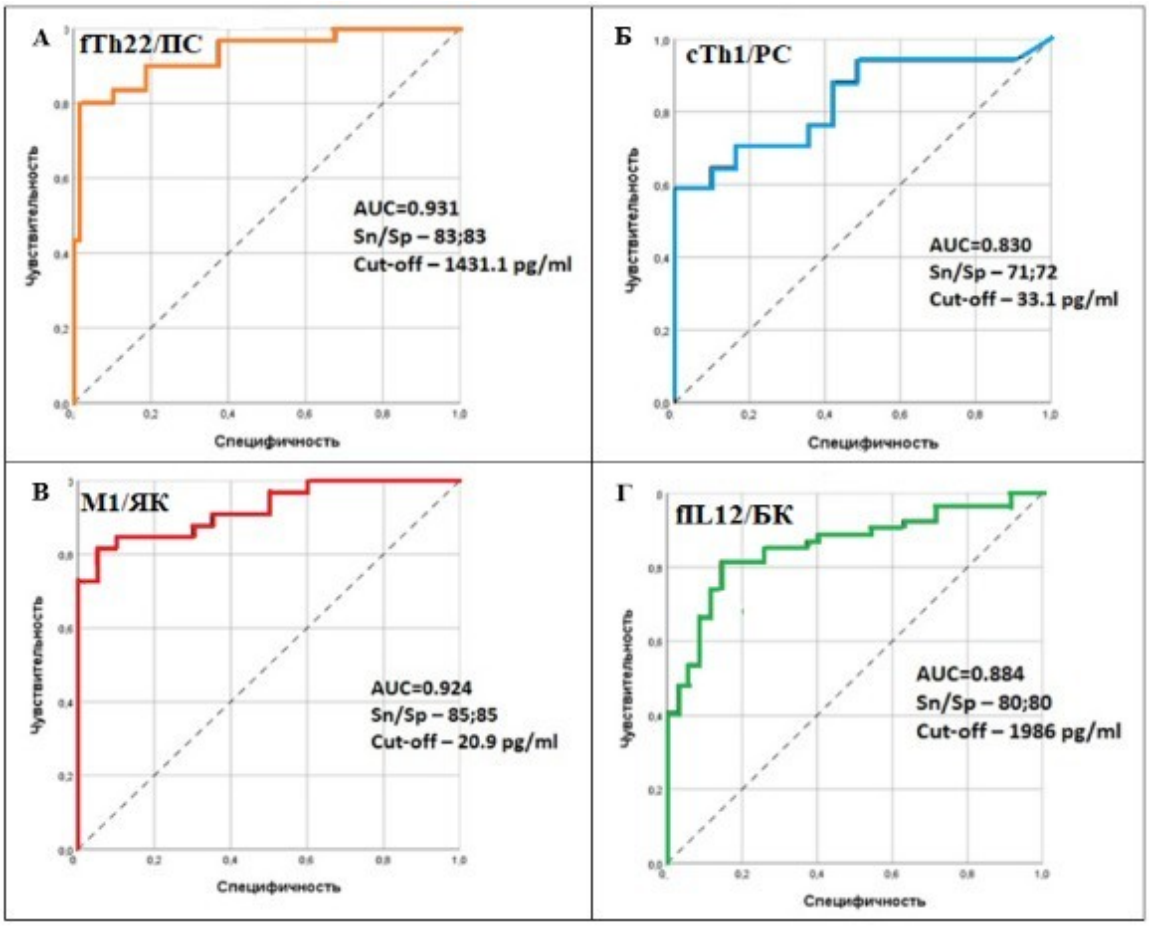


Рисунок 3.108 – ROC-кривые для цитокиновых комплексов у детей с ПС (А), РС (Б), ЯК (В) и БК (Г)

У пациентов с БК в обострении заболевания в сравнении с другими патологиями наблюдались наибольшие пороговые значения для ЦКК.

Таким образом:

1) уровни ЦКК при обострении БК, ЯК и ПС достоверно выше, чем при ремиссии заболевания;

2) получены значимые различия по уровню ЦКК между патологиями как при обострении, так и в ремиссии заболеваний;

3) у пациентов с РС при обострении заболевания выявлены существенно более низкие уровни cTh17, cTh2, fIL12, fTh17, fTh22 по сравнению с ПС, ЯК и БК;

4) для пациентов с ИЗЗ определены пороговые значения ЦКК, выше которых можно прогнозировать развитие обострения заболевания: для БК – fTh22 (1340 пг/мл), cTh17 (2531 пг/мл); для ЯК – fTh22 (1132 пг/мл), M1 (21 пг/мл), cTh17 (2213

пг/мл), fIL12 (1538 пг/мл); для ПС – fIL12 (1891 пг/мл), cTh17 (2140 пг/мл), fTh22 (1431 пг/мл); для РС – cTh1 (33 пг/мл).

На следующем этапе работы были проанализированы уровни отдельных ЦК и ЦКК у пациентов с ИЗЗ в зависимости от эффективности ГИБП к году терапии.

3.3.2. Уровень цитокинов и цитокиновых комплексов у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями при разной эффективности ГИБП

У пациентов с ВЗК проанализирован уровень цитокинов и цитокиновых комплексов в образцах сывороток в группе с эффективностью ГИБП (Эф) и в группе с недостаточно эффективным лечением (НЭ) после индукционного курса и к году терапии (Таблица 3.85).

Таблица 3.85 – Уровень цитокинов у пациентов с ВЗК с разной эффективностью ГИБП

Цитокин, пг/мл	Период ГИБП	БК		ЯК	
		НЭ	Эф	НЭ	Эф
CCL20/ MIP3a	Индукция	43,3 (33,1 - 70,2)	31,9 (30,7 - 42,2)	41,1 (29,4 - 66,3) *	21,7 (20,0 - 52,0) *
	52 недели	35,2 (29,1 - 69,1)	29,4 (13,9 - 42,2)*	43,3 (36,6 - 57,7)	36,6 (29,4 - 36,6) *
GM-CSF	Индукция	276 (234 - 337)	317 (234 - 451)	234 (191 - 296)	234 (101 - 620)
	52 недели	286 (266 - 599)	253,6 (79 - 296) *	234 (212 - 307)	191 (146 - 234) **
IL-10	Индукция	3,4 (3,4 - 6,4)	3,4 (3,2 - 4,8)	4,8 (3,9 - 14,4)	3,4 (2,5 - 6,8) *
	52 недели	3,9 (2,9 - 7,6)	3,2 (1,7 - 4,5)	3,4 (3,2 - 4,8)	2,9 (2,9 - 3,4) *
IL-12p70	Индукция	2,7 (2,4 - 4,2)	2,6 (2,4 - 3,3)	2,6 (2,0 - 3,1)	2,2 (1,7 - 3,9)
	52 недели	3,1 (2,4 - 4,3)	2,7 (1,6 - 3,5) *	2,4 (2,2 - 2,9)	2,2 (1,9 - 2,2) *
IL-15	Индукция	8,8 (5,1 - 16,6)	8,4 (5,5 - 19,2)	7,1 (5,1 - 8,4)	6,3 (4,3 - 23,0)
	52 недели	9,1 (8,1 - 15,6)	7,7 (3,9 - 10,8) *	6,3 (5,5 - 8,4)	6,3 (4,7 - 10,8)
IL-17A	Индукция	3,0 (0,7 - 7,1)	0,9 (0,5 - 3,2)	1,3 (0,7 - 4,6)	0,4 (0,1 - 0,9) **
	52 недели	1,2 (0,8 - 7,3)	1,2 (0,7 - 5,0)	0,8 (0,7 - 3,7)	0,8 (0,2 - 6,0)

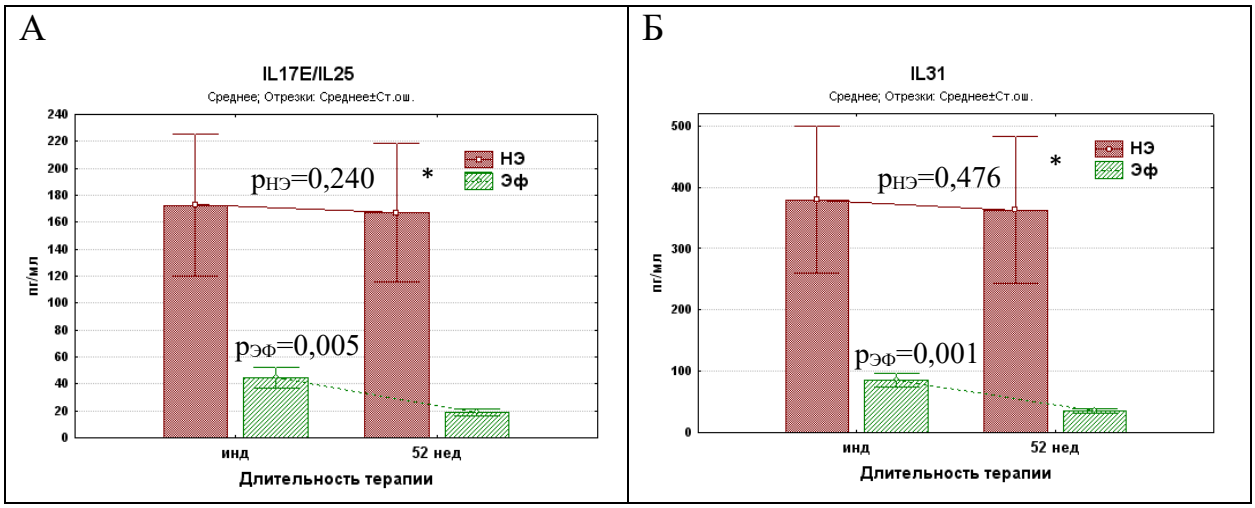
Продолжение таблицы 3.85

Цитокин, пг/мл	Период ГИБП	БК		ЯК	
		НЭ	Эф	НЭ	Эф
IL-17E/ IL-25	Индукция	53 (22 - 178)	23,4 (15,7 - 78,1)	22,2 (16,3 - 32,8)	23,2 (16,3 - 111,6)
	52 недели	70 (28 - 135)	15,8** (6,9 - 26,9)	32,8 (17,5 - 44,6)	23,2 (12,8 - 62,4)
IL-17F	Индукция	51 (30 - 142)	57,5 (17,8 - 97,2)	27,9 (19,9 - 34,6)	84,9 (12,5 - 95,5)
	52 недели	94 (55 - 151)	33,5** (16,6 - 55,3)	39,6 (26,8 - 70,2)	27,9 (17,7 - 68,1)
IL-2	Индукция	6,7 (4,0 - 25,6)	6,7 (5,3 - 16,3)	5,3 (4,0 - 6,7)	4,7 (4,7 - 32,0)
	52 недели	13,1 (6,7 - 13,1)	7,0 (4,0 - 8,8) *	5,6 (4,0 - 9,9)	4,7 (4,7 - 5,6)
IL-21	Индукция	10,8 (8,8 - 24,2)	10,8 (8,1 - 15,6)	7,4 (6,0 - 10,2)	7,4 (5,3 - 9,9)
	52 недели	12,9 (9,4 - 22,3)	10,5* (7,4 - 12,2)	10,2 (7,4 - 12,9)	7,4 (6,0 - 7,4)
IL-22	Индукция	1444 (789 - 1780)	1482 (628 - 1879)	1012 (869 - 1141)	1051 (655 - 2515)
	52 недели	1989 (1051-3338)	655** (175 - 973)	1076 (763 - 1557)	1051 (601 - 1718)
IL-23	Индукция	2496 (1407-5882)	1694 (833 - 2496)	1120 (833 - 1535)	1120 (769 - 4251)
	52 недели	3044 (1407-7319)	738** (326 - 1216)	1343 (897 - 1982)	1120 (642 - 3661)
IL-27	Индукция	888 (611 - 1606)	438 (308 - 1082)	438 (373 - 743)	585 (287 - 1393)
	52 недели	1098 (600 - 1880)	416** (299 - 513)	438 (362 - 622)	437 (351 - 666)
IL-28A	Индукция	435 (255 - 723)	669 (231 - 2267)	302 (255 - 392)	1230* (700 – 2443)
	52 недели	512 (290 – 1175)	255 (82 - 348) *	476 (255 - 1633)	255* (182 - 279)
IL-31	Индукция	114 (57 - 374)	63,9 (33,9 - 156)	50,5 (39,4 - 63,9)	50,5 (35,1 - 227,2)
	52 недели	139 (57 - 300)	36,1** (15,6 - 50,5)	66,3 (43,8 - 103,6)	50,5 (29,6 - 125,4)
IL-33	Индукция	49 (28 - 123)	22,1* (16,7 - 52,9)	23,9 (18,5 - 38,9)	24,6 (16,7 - 98,8)
	52 недели	61 (28 - 132)	15,5** (7,6 - 24,6)	36,5 (24,6 - 67,6)	24,6 (24,6 - 64,6)
IL-4	Индукция	105 (95 - 239)	95,2 (76,1 - 216,8)	86 (71 - 105)	138** (115,0 - 155,0)
	52 недели	107 (90 - 168)	90,4 (52,5 - 187,5)	115 (95 - 359)	85,6** (66,6 - 95,2)

Продолжение таблицы 3.85

Цитокин, пг/мл	Период ГИБП	БК		ЯК	
		НЭ	Эф	НЭ	Эф
IL-5	Индукция	6,3 (5,7 - 14,5)	5,3 (4,5 - 12,7)	5,3 (5,3 - 7,6)	5,3 (3,3 - 62,6)
	52 недели	6,5 (5,5 - 11,2)	4,9* (2,9 - 6,5)	6,5 (5,3 - 15,9)	5,3* (4,3 - 5,3)
IL-6	Индукция	8,9 (7,5 - 18,9)	9,7 (6,2 - 81,4)	6,8 (5,8 - 11,5)	14,1* (3,8 - 423,1)
	52 недели	19,1 (8,1 - 51,7)	6,9** (2,5 - 8,9)	8,1 (5,8 - 67,7)	6,2* (4,2 - 6,2)
IL-9	Индукция	11,8 (11,8 - 30,6)	13,9 (6,9 - 47,9)	8,5 (4,5 - 16,0)	7,2 (4,4 - 20,9)
	52 недели	13,1 (8,1 - 40,6)	6,5* (1,7 - 13,5)	9,3 (5,3 - 53,7)	4,9* (3,7 - 7,2)
TNF-a	Индукция	17,9 (12,1 - 47,2)	17,9 (12,1 - 17,9)	15,6 (9,7 - 25,9)	6,2* (4,9 - 14,0)
	52 недели	20,4 (13,9 - 31,7)	17,9 (15,0 - 23,3)	19,3 (11,8 - 51,4)	14,4* (9,1 - 14,4)
TNF-β	Индукция	28,7 (7,9 - 55,7)	34,2 (14,3 - 488,2)	29,8 (16,5 - 32,0)	107,8* (8,0 - 635,0)
	52 недели	66 (21 - 191)	17,9* (4,3 -29,8)	25 (10 - 285)	7,9* (7,0 - 20,9)
Примечание: * – достоверность различий между группами с НЭ и Эф с p <0,05; ** – достоверность различий между группами НЭ и Эф с p <0,001					

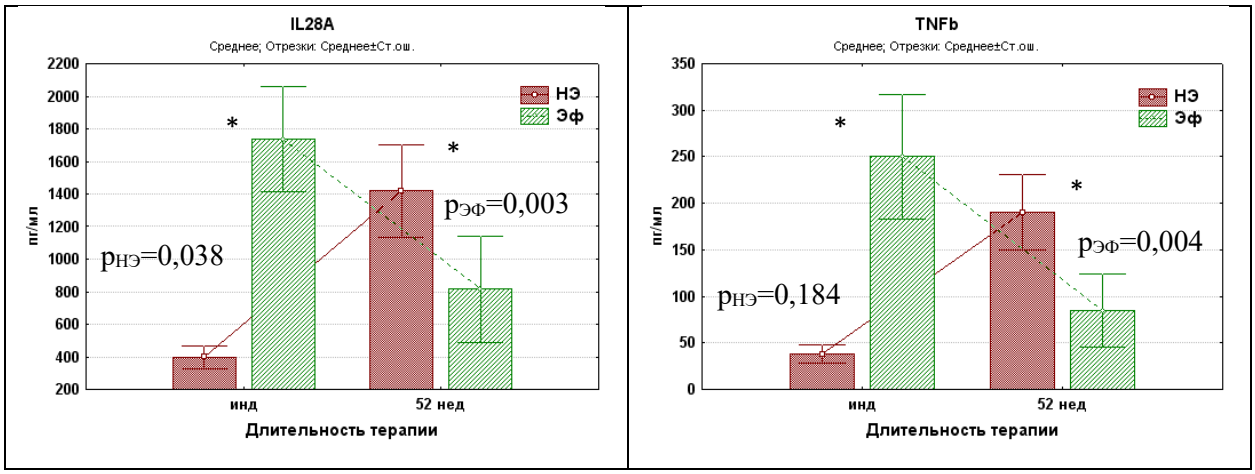
Значимые различия в группах пациентов с разной эффективностью при БК выявлены на 52 неделе терапии ГИБП для следующих ЦК: IL-17E/IL-25, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IL-33 и IL-6 (Таблица 3.85). Обращает внимание тот факт, что в группе пациентов с НЭ к году терапии ГИБП уровень большинства провоспалительных ЦК был значимо более высоким, чем в группе с хорошим эффектом (Рисунок 3.109). Причём, в группах с НЭ, как это показано для IL-17E/IL-25 (Рисунок 3.109А) и для IL-31(Рисунок 3.109Б), уровень ЦК достоверно не менялся между периодами лечения, а в группе с эффективностью терапии значимо снижался к году терапии.



Примечание: $p_{ЭФ}$, $p_{НЭ}$ – достоверность различий в группах с разной эффективностью ГИБП между индукционным курсом и к году терапии

Рисунок 3.109 – Динамика уровня IL-17E/IL-25 (А) и уровня IL-31 (Б) в группах пациентов с БК с разной эффективностью ГИБП

У пациентов с ЯК в группе с НЭ к году терапии наблюдались более высокие показатели ЦК: CCL20/MIP3a, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-28A, TNF-a, TNF-β по сравнению с группой пациентов с эффективностью лечения (Таблица 3.85). Анализ показал, что уровень IL-4, IL-6, IL-28A (Рисунок 3.110А) и TNF-β (Рисунок 3.110Б) в группе пациентов с НЭ после индукционного курса были достоверно ниже в сравнении с группой с хорошим эффектом, а к году терапии, наоборот, значимо выше.



Примечание: $p_{ЭФ}$, $p_{НЭ}$ – достоверность различий в группах с разной эффективностью ГИБП между индукционным курсом и к году терапии; * – достоверность различий между группами с разной эффективностью с $p < 0,05$

Рисунок 3.110 – Динамика уровня IL-28A (А) и уровня TNF-β (Б) в группах пациентов с ЯК с разной эффективностью ГИБП

Проведенный анализ ЦКК у пациентов с ВЗК к году терапии ГИБП показал, что при БК все изученные ЦКК, кроме fTh2, а при ЯК - комплексы M1 и cTh1 были значимо выше в группе с НЭ терапии (Таблица 3.86). При этом, в группе с НЭ терапии уровень ЦКК к году терапии оставался на высоком уровне, по сравнению с индукционным периодом, либо повышался. В группе пациентов с эффективностью терапии уровень большинства ЦКК значимо снижался к году терапии.

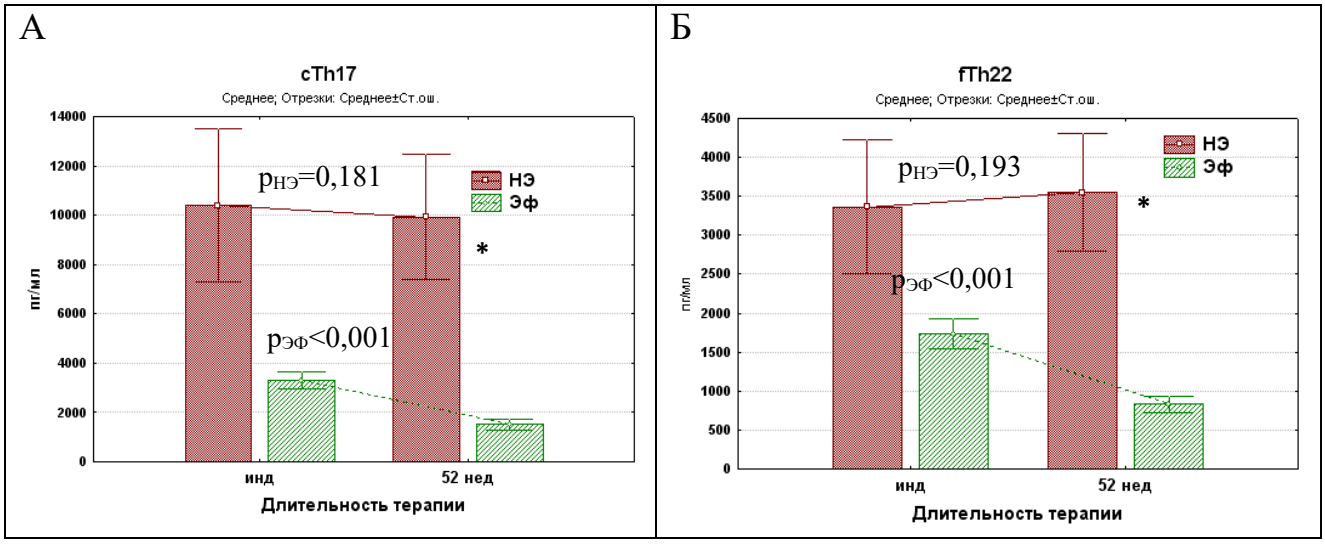
Таблица 3.86 – Уровень цитокиновых комплексов у пациентов с ВЗК с разной эффективностью ГИБП

Цитокин, пг/мл	Период ГИБП	БК		ЯК	
		НЭ	Эф	НЭ	Эф
M1	Индукция	38,8 (21,9 - 67,1)	28,4 (18,4 - 99,5)	22,6 (16,7 - 32,1)	40,1 (10,1 - 147,0)
	52 недели	48 (29 - 104)	26,1** (21,2 - 35,6)	59,1 (22,5 - 133,5)	19,0** (14,1 - 22,6)
cTh1	Индукция	84 (26 - 186)	58,1 (25,1 - 511,4)	41,9 (29,5 - 47,1)	148* (18 - 645)
	52 недели	92 (34 - 206)	38,1* (19,3 - 45,6)	39,8 (23,0 - 375,4)	18,1** (16,9 - 31,1)
cTh2	Индукция	60 (420 - 1623)	387 (291 - 831)	254 (204 - 330)	687 (188 - 1119)
	52 недели	568 (440 - 836)	375* (224 - 519)	329 (252 - 1003)	278 (255 - 431)
cTh17	Индукция	4381 (1715-8068)	3709 (1493-4257)	2212 (1711-2591)	2691 (1447-6886)
	52 недели	5449 (2628-10235)	1448** (578 - 2129)	2695 (1635-3813)	2220 (1274-5513)
fTh17	Индукция	58,1 (33,4 - 143,2)	60,7 (18,5 - 98,9)	28,6 (24,1 - 38,4)	86,1 (12,7 - 95,9)
	52 недели	94,7 (61,5 - 151,2)	36,1** (17,7 - 58,8)	41,7 (27,6 - 72,9)	33,7 (18,0 - 74,9)
fIL12	Индукция	3109 (2127 - 7933)	1984 (1178-3634)	1515 (1429-1976)	1707 (1058-5648)
	52 недели	3828 (2104 - 9413)	1210** (786 - 1643)	1771 (1414-2705)	1559 (942 - 4331)
Th22	Индукция	1708 (829 - 2416)	1730 (828 - 2369)	1112 (936 - 1211)	1962 (709 - 2826)
	52 недели	2465 (1519 - 3505)	771** (382 - 1151)	1564 (982 - 2026)	1330 (774 - 2017)

ПродолжениеТаблицы 3.86

Цитокин, пг/мл	Период ГИБП	БК		ЯК	
		НЭ	Эф	НЭ	Эф
fTh22_mast	Индукция	618 (406 - 1630)	390 (287 - 831)	252 (205 - 336)	697 (188 - 1119)
	52 недели	566 (442 - 848)	356** (223 - 503)	1564 (982 - 2026)	284 (251 - 430)
fTh2	Индукция	461 (290 - 902)	291 (247 - 715)	184 (158 - 220)	470* (153 - 1068)
	52 недели	367 (237 - 608)	306 (196 - 449)	259 (201 - 815)	215 (205 - 380)
Примечание: * – достоверность различий между группами с НЭ и Эф с p <0,05; ** – достоверность различий между группами НЭ и Эф с p <0,001					

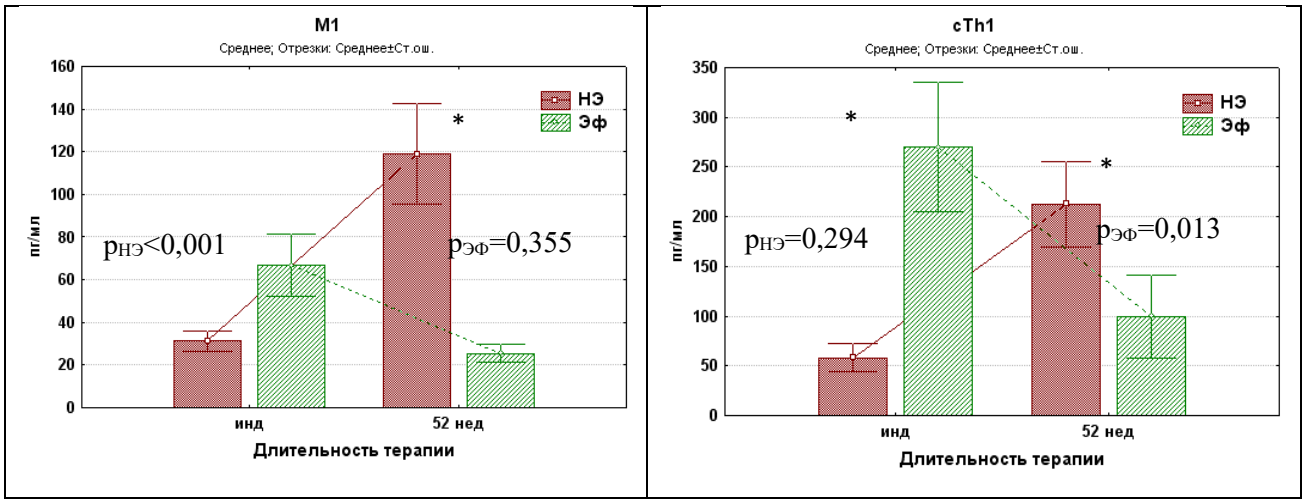
Для пациентов с БК в группе с хорошим эффектом показано снижение уровня комплексов cTh1 и fTh22 к году терапии ГИБП, а в группе с НЭ показатели этих комплексов оставались повышенными (Рисунок 3.111*)*.



Примечание: $p_{ЭФ}$, $p_{НЭ}$ – достоверность различий между показателями в период индукционного курса и к году терапии в группах пациентов с разной эффективностью IFX/ADA; * – достоверность различий между группами с разной эффективностью

Рисунок 3.111 – Динамика уровня цитокиновых комплексов cTh17 (А) и уровня fTh22 (Б) в группах пациентов с БК с разной эффективностью ГИБП

Для пациентов с ЯК показано, что в группе пациентов с НЭ уровень комплексов M1 (Рисунок 3.112А) и cTh1 (Рисунок 3.112Б) был достоверно выше к году терапии при сравнении с индукционным курсом и относительно группы пациентов с хорошим эффектом. В группе с хорошим эффектом наблюдалось значимое снижение комплексов M1 и cTh1 к году терапии.



Примечание: $p_{ЭФ}$, $p_{НЭ}$ – достоверность различий в группах с разной эффективностью ГИБП между индукционным курсом и к году терапии; * – достоверность различий между группами с разной эффективностью с p<0,05; M1 (IL-1+IL-6+TNF-α); cTh1(IFN-γ+IL-12p70+TNF-β+IL-2)

Рисунок 3.112 – Динамика уровня цитокиновых комплексов M1 (А) и уровня cTh1 (Б) в группах пациентов с ЯК с разной эффективностью ГИБП

Для разделительной модели «эффективность-неэффективность» проведен ROC-анализ по уровню ЦК и ЦКК у детей с БК, который показал очень хорошее и отличное качество для некоторых ЦК и ЦКК (Таблица 3.87). Получены пороговые значения для ЦК и ЦКК, выше которых можно прогнозировать ускользание эффекта от терапии ГИБП.

Таблица 3.87 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность-неэффективность» по ЦК и ЦКК у детей с БК к году терапии ГИБП

Цитокин, пг/мл	AUC (95% довер. инт)	Cut-off, пг/мл	Se; Sp
IL-6	0,804 (0,688 - 0,919)	9,8	68; 85
IL-17E/IL-25	0,903 (0,824 - 0,982)	28	86; 85
IL-17F	0,859 (0,761 - 0,957)	66	71; 92
IL-22	0,870 (0,770 - 0,970)	1012	86; 81
IL-23	0,909 (0,830 - 0,989)	1359	93; 81
IL-27	0,868 (0,769 - 0,967)	540	82; 77
IL-31	0,906 (0,829 - 0,983)	56	86; 85
IL-33	0,885 (0,799 - 0,971)	27	82; 85
cTh17	0,911 (0,830 - 0,992)	2410	86; 85

Продолжение таблицы 3.87

Цитокин, пг/мл	AUC (95% довер. инт)	Cut-off, пг/мл	Se; Sp
fTh17	0,864 (0,769 - 0,959)	59	82; 85
fIL12	0,912 (0,838 - 0,986)	1813	89; 81
fTh22	0,887 (0,791 - 0,984)	1195	86; 81
Примечание: AUC – площадь под кривой; Se – чувствительность; Sp – специфичность			

Представлены ROC-кривые по цитокинам (Рисунок 3.113А) и ЦКК (Рисунок 3.113Б) у пациентов с БК с высокими значения AUC (Таблица 3.87).

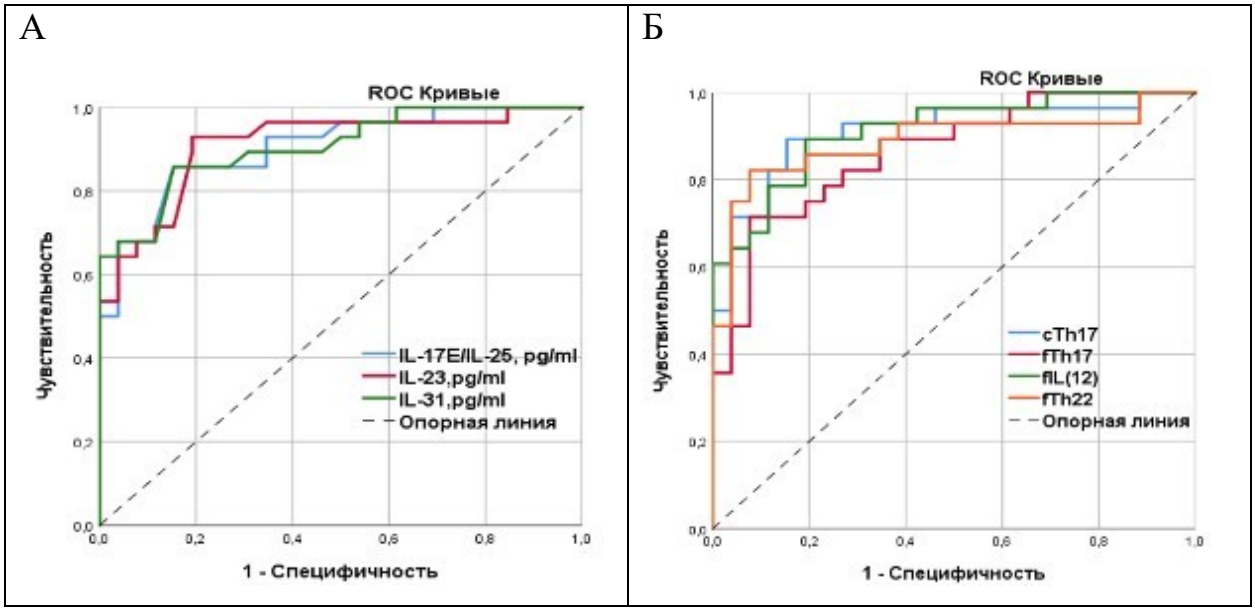


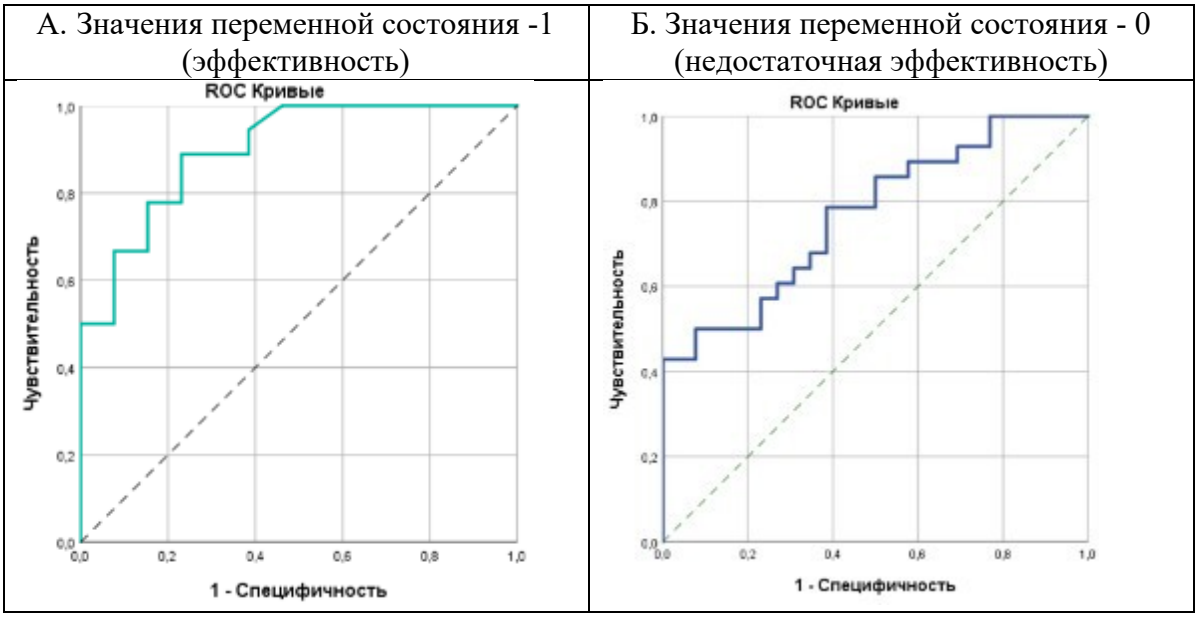
Рисунок 3.113 – ROC-кривые модели «эффективность-неэффективность» у детей с БК по цитокинам (А) и цитокиновым комплексам (Б) к году терапии ГИБП

У пациентов с ЯК также был проведен ROC-анализ в разделительной модели «эффективность-неэффективность» и получено отличное (после индукционного курса) и очень хорошее качество (к году терапии) разделительной модели для цитокина IL-4 с высокими показателями чувствительности и специфичности (Рисунок 3.114А, Таблица 3.88). В период после индукционного курса получены пороговые значения для концентрации IL-4, ниже которых, и для концентрации IL17A, TNFα, выше которых можно прогнозировать развитие неэффективности к году терапии. Также получены пороговые значения для IL-4, GM-CSF и комплекса

М1, выше которых высока вероятность потери эффекта к году терапии (Таблица 3.88, Рисунок 3.114Б).

Таблица 3.88 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность-неэффективность» по ЦК и ЦКК у детей с ЯК при разной длительности ГИБП

Цитокины/ЦКК	AUC (95% довер. инт)	Cut-off, пг/мл	Se; Sp
Индукция			
IL-4	0,900 (0,812 - 0,987)	105	89; 77
IL-17A	0,821 (0,695 - 0,946)	0,66	69;67
TNF-α	0,765 (0,614 - 0,916)	14	69;78
52 недели			
IL-4	0,807 (0,678 - 0,935)	100	62; 78
GM-CSF	0,772 (0,634 - 0,911)	223	71;71
M1	0,770 (0,644 - 0,892)	30	64;65
Примечание: AUC – площадь под кривой; Se – чувствительность; Sp – специфичность			



Примечание: А - IL-4 (после индукционного курса ГИБП), Б – М1 комплекс (52 неделя)

Рисунок 3.114 – ROC-кривые в разделительной модели «эффективность-неэффективность» у детей с ЯК

Уровень циркулирующих цитокинов и цитокиновых комплексов у детей с ПС с разной эффективностью блокаторов TNF

Проведенный анализ концентрации ЦК у пациентов с ПС с разной эффективностью терапии показал, что в группе пациентов с недостаточной эффективностью уровень провоспалительных цитокинов (IFN-γ, IL-13, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31, IL-33) к году терапии был выше, чем у пациентов с хорошим эффектом терапии (Таблица 3.89).

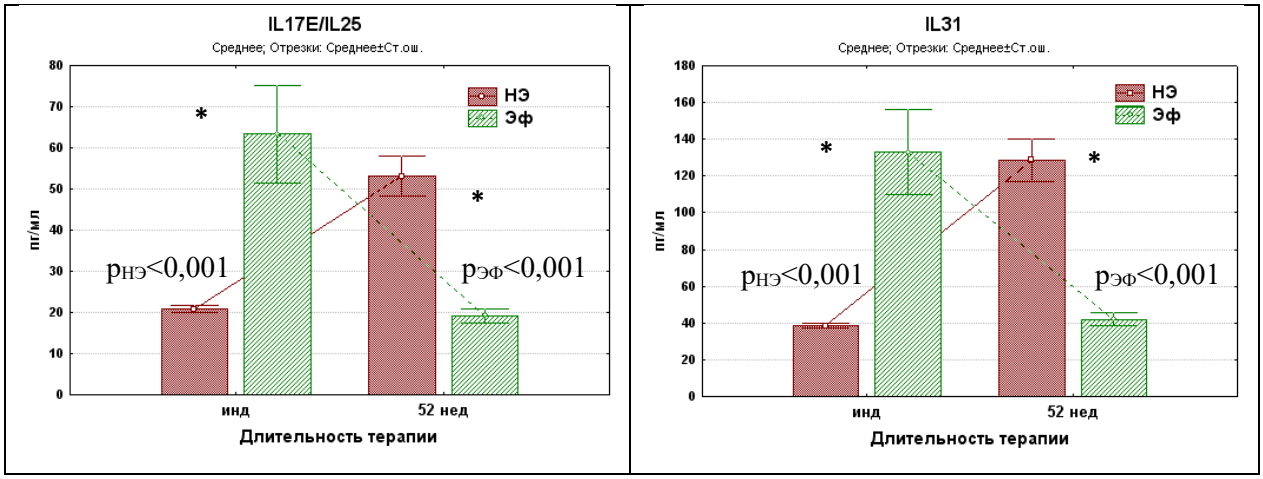
Таблица 3.89 – Уровень цитокинов у пациентов с ПС при терапии ADA

Цитокин, пг/мл	Период ADA	ПС	
		НЭ	Эф
CCL20/MIP3a	Индукция	35,4 (31,8 - 39,2)	39,3 (32,5 - 61,8)
	52 недели	33,1 (23,6 - 56,1)	26,2 (24,2 - 37,2)*
GM-CSF	Индукция	272,0 (233,9 - 319,0)	317,3 (212,4 - 394,8) *
	52 недели	296,4 (190,6 - 385,3)	275,9 (233,9 - 275,9)
IFN-γ	Индукция	3,4 (2,9 - 3,7)	3,8 (3,2 - 6,2) *
	52 недели	3,7 (3,1 - 3,8)	3,2 (2,6 - 3,6) *
IL-10	Индукция	3,4 (2,9 - 3,7)	4,1 (3,3 - 5,7) *
	52 недели	4,1 (3,3- 5,7)	3,6 (3,2 - 3,9)
IL-12p70	Индукция	2,4 (2,2 - 2,8)	3,5 (2,7 - 3,9) *
	52 недели	2,4 (2,3 - 2,6)	2,6 (2,5 - 2,7)
IL-13	Индукция	216,6 (97,1 - 368,2)	261,0 (151,9 - 527,5)
	52 недели	196,9 (77,5 - 208,1)	239,6 (171,6 - 415,5) *
IL-15	Индукция	7,5 (7,1 - 8,3)	7,9 (7,1 - 9,4)*
	52 недели	7,1 (4,9 - 8,2)	6,9 (6,7 - 9,2)
IL-17E/IL-25	Индукция	21,0 (16,0 - 25,1)	27,7 (16,8 - 97,8) *
	52 недели	61,2 (21,0 - 75,7)	18,4 (11,6 - 23,4)**
IL-17F	Индукция	34,6 (23,7 - 39,6)	42,3 (24,8 - 96,6) *
	52 недели	60,7 (25,6 - 86,8)	35,7 (22,8 - 40,1) *
IL-1β	Индукция	0,3 (0,2 - 0,4)	0,5 (0,4 - 0,7) *
	52 недели	0,4 (0,1 - 0,9)	0,6 (0,4 - 0,6)
IL-21	Индукция	8,1 (6,7 - 12,0)	11,2 (7,9 - 16,4) **
	52 недели	8,8 (7,8 - 10,2)	8,1 (7,4 - 10,8)
IL-22	Индукция	968,0 (919,0 - 981,0)	1121,5 (695,8 - 2369,0) *
	52 недели	1805,0 (933,5 - 2246,5)	907,6 (655,3 - 1102,0) **
IL-23	Индукция	999,0 (831,0 - 1025,0)	1347,5 (865,5 - 4515,0) **
	52 недели	2367,0 (1168,1 - 3304,0)	897,1 (769,7 - 960,8) **
IL-27	Индукция	592,5 (502,5 - 618,0)	809,7 (551,6 - 1110,0) **
	52 недели	743,1 (649,7 - 776,3)	589,4 (491,6 - 820,9) *

Продолжение таблицы 3.89

Цитокин, пг/мл	Период ADA	ПС	
		НЭ	Эф
IL-28A	Индукция	228,0 (182,5 - 301,0)	293,6 (208,6 - 309,5) *
	52 недели	434,6 (206,7 - 506,9)	182,0 (182,0 - 231,1) **
IL-31	Индукция	39,2 (32,7 - 41,6)	52,5 (39,2 - 238,3) **
	52 недели	141,6 (49,9 - 165,7)	40,5 (26,4 - 50,5) **
IL-33	Индукция	20,7 (14,9 - 22,0)	30,8 (19,1 - 97,7) **
	52 недели	54,1 (24,5 - 73,8)	17,6 (13,6 - 20,9) **
IL-6	Индукция	6,6 (5,3 - 8,5)	7,4 (4,7 - 9,4)
	52 недели	7,7 (5,4 - 12,3)	4,8 (4,6 - 4,9) **
IL-9	Индукция	5,9 (4,6 - 12,6)	8,5 (5,7 - 9,1)
	52 недели	12,3 (4,1 - 15,2)	5,9 (5,3 - 6,9) *
TNF-a	Индукция	17,6 (15,0 - 22,5)	23,3 (19,7 - 60,4) **
	52 недели	15,6 (9,4 - 19,0)	17,0 (15,6 - 20,2)
TNF-β	Индукция	8,0 (7,9 - 31,5)	15,5 (10,0 - 27,8)
	52 недели	33,9 (16,5 - 66,1)	8,1 (6,0 - 11,1) **
Примечание: * – достоверность различий между группами с НЭ и Эф с p <0,05; ** – достоверность различий между группами НЭ и Эф с p <0,001			

У пациентов с ПС после индукционного курса выявлен более высокий уровень ЦК в группе с хорошим эффектом при сравнении с группой с НЭ для: IFN-γ, IL-17E/IL-25 (Рисунок 3.115А), IL-17F, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31 (Рисунок 3.114Б), IL-33 (Таблица 3.89).



Примечание: $p_{ЭФ}$, $p_{НЭ}$ – достоверность различий в группах с разной эффективностью ГИБП между индукционным курсом и к году терапии; * – достоверность различий между группами с разной эффективностью с p <0,05

Рисунок 3.115 – Динамика уровня IL-17E/IL25 (А) и IL-31 (Б) в группах пациентов с ПС с разной эффективностью ГИБП

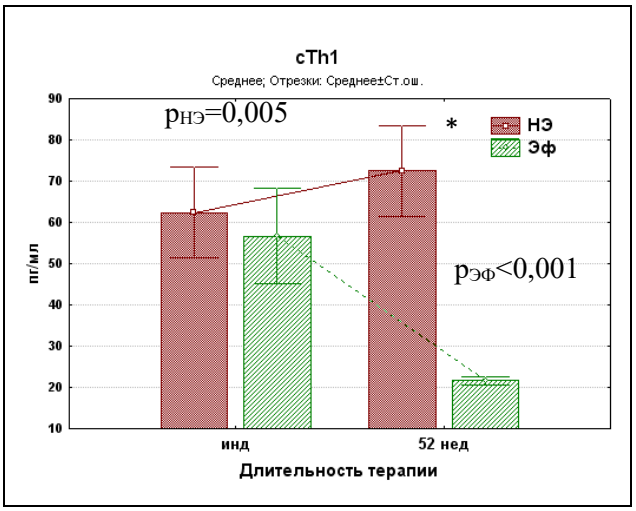
К году терапии в группе с хорошим эффектом уровень всех вышеперечисленных ЦК стал достоверно ниже, чем после индукционного курса и ниже показателей в группе с НЭ ГИБП (Таблица 3.89).

Оценка уровня ЦКК у пациентов с ПС показала, что уровень ЦКК: cTh1, cTh17, fIL12, fTh17, fTh22 к году терапии был достоверно ниже в группе с хорошим эффектом ГИБП относительно группы с НЭ (Таблица 3.90).

Таблица 3.90 – Уровень цитокиновых комплексов у пациентов с ПС при терапии ADA

Цитокин, пг/мл	Период ГИБП	ПС	
		НЭ	Эф
M1	Индукция	23,8 (19,4 - 39,9)	33,0 (24,8 - 69,9)*
	52 недели	21,2 (16,4 - 31,7)	22,9 (21,0 - 26,7)
cTh1	Индукция	22,1 (19,9 - 42,3)	33,7 (24,7 - 43,5)
	52 недели	46,7 (25,4 - 84,0)	19,5 (16,5 - 23,1)**
cTh2	Индукция	353,0 (279,2 - 493,4)	456,0 (295,0 - 1152,3)*
	52 недели	424,0 (305,3 - 518,2)	363,7 (325,1 - 521,9)
cTh17	Индукция	1986,3 (1861,5 - 2114,1)	2347,0 (1598,9 - 6999,8)*
	52 недели	4247,6 (2144,7 - 5691,7)	1887,1 (1457,4 - 2055,3)**
fTh2+mast	Индукция	355,2 (273,9 - 492,8)	455,8 (292,0 - 1148,1)*
	52 недели	437,2 (301,5 - 539,2)	369,5 (320,4 - 524,6)
fIL12	Индукция	1563,5 (1366,5 - 1628,9)	2016,8 (1419,9 - 5623,5)**
	52 недели	3112,5 (1820,3 - 4073,7)	1489,2 (1209,9 - 2022,4)**
fTh17	Индукция	35,1 (23,9 - 39,9)	42,9 (25,0 - 97,2)*
	52 недели	60,8 (26,8 - 89,5)	36,3 (23,3 - 40,5)*
fTh22	Индукция	1228,0 (1033,0 - 1493,2)	1445,5 (990,5 - 2623,2)*
	52 недели	2001,9 (1061,0 - 2612,4)	1127,3 (887,1 - 1490,6)**
Примечание: * – достоверность различий между группами с НЭ и Эф с $p < 0,05$; ** – достоверность различий между группами НЭ и Эф с $p < 0,001$			

Так, например, в группе с хорошим эффектом уровень комплекса cTh1 к году терапии стал значимо ниже относительно периода индукции и относительно группы с НЭ терапии, при этом в группе с НЭ к году терапии уровень комплекса cTh1 значимо увеличился (Рисунок 3.116, Таблица 3.90*)*.



Примечание: $p_{ЭФ}$, $p_{НЭ}$ – достоверность различий в группах с разной эффективностью ГИБП между индукционным курсом и к году терапии; * – достоверность различий между группами с разной эффективностью с p <0,05; cTh1(IFN-γ+IL-12p70+TNF-β+IL-2)

Рисунок 3.116 – Динамика уровня cTh1 в группах пациентов с ПС с разной эффективностью ГИБП

Проведённый ROC-анализ выявил очень хорошее (IL-17E/IL-25, IL-12p70) и отличное качество (IL-31, TNF-β, cTh1) для разделительной модели «эффективность-неэффективность» по отдельным ЦК и ЦКК при разной длительности терапии (Таблица 3.91).

Таблица 3.91 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность-неэффективность» по уровню цитокинов и цитокиновым комплексам у детей с ПС при разной длительности терапии

Цитокин, пг/мл	AUC (95% довер. инт)	Cut-off, пг/мл	Se; Sp
Индукция			
IL-12p70	0,805 (0,695 - 0,894)	2,7	72/73
52 недели			
IL-17E/IL25	0,844 (0,751 - 0,938)	24,6	75; 90
IL-31	0,903 (0,832 - 0,974)	51,3	83; 90
TNF-β	0,957 (0,909 - 0,996)	14,3	89; 90
cTh1	0,917 (0,852 - 0,982)	25,2	89; 83
Примечание: AUC – площадь под кривой; Se – чувствительность; Sp – специфичность			

У пациентов с ПС получены пороговые уровни для ЦК и ЦКК, выше которых можно прогнозировать неэффективность терапии ГИБП (Таблица 3.91, Рисунок 3.117).

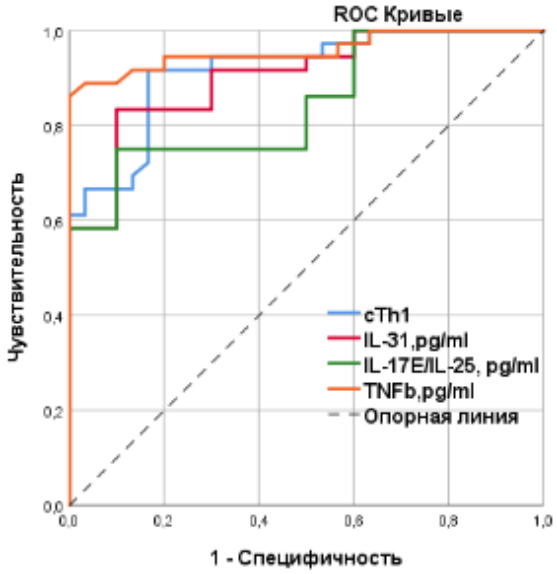


Рисунок 3.117 – ROC-кривые в разделительной модели «эффективность-неэффективность» у детей с ПС по уровням цитокинов и цитокиновым комплексам к году терапии

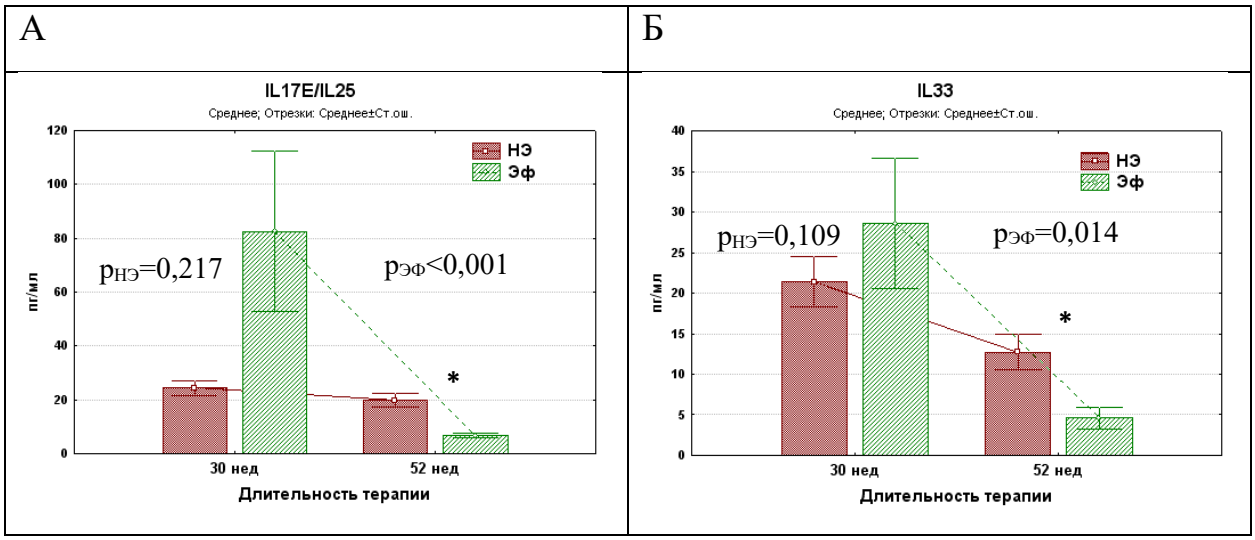
Уровень циркулирующих цитокинов и цитокиновых комплексов у детей с РС с разной эффективностью IFNβ1α

Анализ уровня отдельных цитокинов у пациентов с РС показал, что на начальном этапе лечения уровень ЦК GM-CSF, IL-13, IL-9, IL-2, IL-21, IL-4, IL-28A, TNF-β был значимо выше в группе с НЭ ГИБП, чем в группе с эффективностью лечения (Таблица 3.92). К году терапии уровень 7-ми ЦК (IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-21, IL-5, IL-27, IL-31, IL-33, TNF-β) из 25 исследованных в группе с эффективностью терапии был достоверно ниже, чем в группе с НЭ (Таблица 3.92).

Таблица 3.92 – Уровень цитокинов у пациентов с РС при терапии INFβ-1a

Цитокин, пг/мл	Период ГИБП	РС	
		НЭ	Эф
GM-CSF	Индукция	233,9 (22,8 - 336,6)	95,7 (2,2 - 168,5)*
	52 недели	116,8 (3,7 - 212,4)	63,3 (2,8 - 123,7)
IFN-Tγ	Индукция	3,8 (2,2 - 3,8)	5,6 (2,5 - 8,4) *
	52 недели	3,0 (1,9 - 14,8)	3,8 (3,3 - 8,5)
IL-13	Индукция	198,2 (191,3 - 263,2)	152,3 (87,2 - 231,3) *
	52 недели	98,2 (68,9 - 411,2)	168,6 (70,4 - 261,9)
IL-17E/IL-25	Индукция	18,1 (10,5 - 42,2)	22,5 (9,9 - 147,1)
	52 недели	22,1 (4,9 - 33,4)	5,3 (2,8 - 12,2)**
IL-9	Индукция	26,7 (0,4 - 34,5)	1,4 (0,3 - 2,6) *
	52 недели	1,8 (0,3 - 5,3)	2,0 (0,2 - 3,7)
IL-17F	Индукция	30,4 (18,9 - 73,4)	23,7 (18,9 - 140,5)
	52 недели	45,6 (7,9 - 55,9)	13,1 (0,9 - 14,6)**
IL-2	Индукция	7,4 (5,3 - 9,5)	2,8 (2,5 - 6,5) *
	52 недели	6,1 (4,3 - 12,3)	4,4 (3,7 - 5,2)
IL-21	Индукция	7,4 (5,4 - 12,9)	5,8 (4,7 - 6,7) *
	52 недели	6,9 (1,5 - 8,8)	3,1 (0,5 - 5,4)
IL-4	Индукция	129,0 (95,2 - 187,5)	90,4 (67,6 - 127,8) *
	52 недели	28,1 (5,9 - 85,6)	5,9 (4,2 - 163,1)
IL-22	Индукция	709,3 (37,0 - 1675,0)	670,6 (303,7 - 939,4)
	52 недели	34,7 (33,4 - 1444,0)	39,7 (34,5 - 545,9)
IL-5	Индукция	7,2 (0,3 - 7,6)	3,6 (2,6 - 6,4)
	52 недели	4,5 (0,7 - 5,3)	1,9 (0,2 – 3,9) *
IL-6	Индукция	30,2 (0,6 - 42,9)	4,0 (2,3 – 10,8) *
	52 недели	4,2 (0,7 - 14,4)	1,6 (0,4 – 2,7)
IL-27	Индукция	580,3 (394,5 - 654,9)	554,1 (432,2 - 1274,8)
	52 недели	571,7 (518,7 - 745,5)	347,9 (216,6 - 505,6)**
IL-28A	Индукция	808,9 (59,4 - 1000,0)	157,0 (50,9 - 255,1) *
	52 недели	157,1 (54,1 - 255,1)	53,8 (46,0 - 266,9)
IL-31	Индукция	35,1 (18,2 - 87,0)	39,5 (15,6 - 235,7)
	52 недели	16,3 (2,6 - 66,3)	2,2 (1,5 - 28,5) *
IL-33	Индукция	20,9 (4,3 - 44,8)	17,9 (6,8 - 42,2)
	52 недели	12,9 (1,5 - 24,6)	0,2 (0,1 - 13,6) *
TNF-β	Индукция	149,0 (5,4 - 190,2)	4,2 (4,2 - 4,6)**
	52 недели	9,9 (5,3 – 20,3)	5,1 (3,8 – 5,3) *
Примечание: * – достоверность различий между группами с НЭ и Эф с p <0,05; ** – достоверность различий между группами НЭ и Эф с p <0,001			

Уровни IL-17E/IL-25 и IL-33 после индукционного курса в группах с разной эффективностью терапии не отличались, к году терапии достоверно снизились в группе с хорошим эффектом, а в группе с НЭ не изменились (Рисунок 3.118).



Примечание: $p_{ЭФ}$, $p_{НЭ}$ – достоверность различий в группах с разной эффективностью ГИБП между индукционным курсом и к году терапии; * – достоверность различий между группами с разной эффективностью с p <0,05

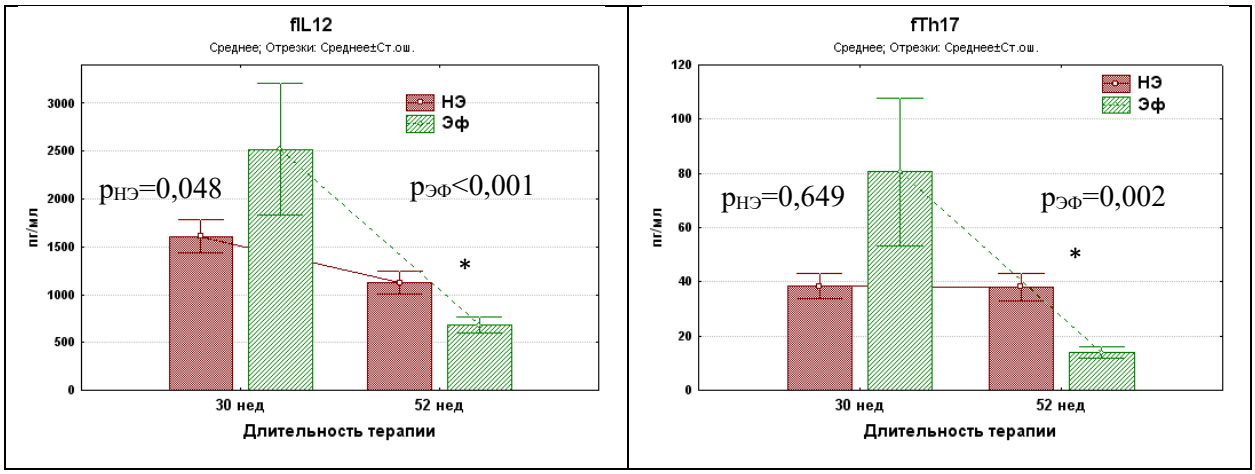
Рисунок 3.118 – Динамика уровня IL-17E/IL-25 (А) и IL-33 (Б) в группах пациентов с РС с разной эффективностью ГИБП

Оценка ЦКК у пациентов с РС после индукционного курса показала более высокий уровень комплексов M1, cTh1, cTh2, fTh2 в группе с НЭ терапии относительно группы с эффективностью (Таблица 3.93). Выявлены более низкие уровни провоспалительных ЦКК (cTh1, fTh17, fIL12) у пациентов с эффективностью терапии, чем у пациентов с НЭ к 52 неделе терапии INFβ-1a (Таблица 3.93).

Таблица 3.93 – Уровень цитокиновых комплексов у пациентов с РС при терапии INFβ-1a

Цитокин, пг/мл	Период ГИБП	РС	
		НЭ	Эф
M1	Индукция	47,9 (32,5 - 58,2)	13,9 (12,8 - 43,1)*
	52 недели	27,5 (15,5 - 54,2)	29,1 (11,9 - 57,9)
cTh1	Индукция	165,0 (33,6 - 201,9)	14,9 (11,8 - 28,6)**
	52 недели	20,8 (19,2 - 40,3)	13,8 (12,9 - 14,7)*
cTh2	Индукция	429,4 (359,9 - 500,1)	298,5 (224,8 - 488,3)*
	52 недели	219,7 (179,7 - 490,5)	265,5 (199,5 - 290,4)
fTh17	Индукция	30,8 (19,2 - 73,9)	24,1 (18,9 - 140,9)
	52 недели	46,3 (8,5 - 56,3)	13,3 (5,4 - 14,8)*
fIL12	Индукция	1326,0 (947,2 - 3024,7)	1268,1 (994,7 - 3050,5)
	52 недели	934,3 (667,8 - 1863,6)	628,7 (496,3 - 734,4)**
fTh2	Индукция	334,8 (321,9 - 457,9)	248,6 (181,1 - 331,6)*
	52 недели	159,1 (146,2 - 466,1)	237,1 (194,7 - 278,4)
Примечание: * – достоверность различий между группами с НЭ и Эф с p <0,05; ** – достоверность различий между группами НЭ и Эф с p <0,001			

Средний уровень ЦКК fIL12 и fTh17 после индукционного курса между группами пациентов с разной эффективностью не отличался, но к году терапии наблюдалось достоверное снижение в группе с эффективностью терапии, что приводило к достоверному различию между показателями в группах (Рисунок 3.119).



Примечание: $p_{ЭФ}$, $p_{НЭ}$ – достоверность различий в группах с разной эффективностью ГИБП между индукционным курсом и к году терапии; * – достоверность различий между группами с разной эффективностью с p <0,05; fIL12 (IL-12+ IL-23+ IL-27); fTh17 (IL-17A+IL-17F)

Рисунок 3.119 – Динамика уровня fIL12 (А) и fTh17 (Б) в группах пациентов с РС с разной эффективностью

ROC-анализ для разделительной модели «эффективность-неэффективность» по ЦК и ЦКК у детей с РС после индукционного курса INFβ-1a выявил очень

хорошее качество (AUC>0,8) разделительной модели для TNF-β и cTh1 (Таблица 3.94).

Таблица 3.94 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность-неэффективность» по цитокинам и цитокиновым комплексам у детей с РС после индукционного курса INFβ-1a

Цитокин, пг/мл	AUC (95% довер. инт)	Cut-off, пг/мл	Se; Sp
IL-9	0,768 (0,623 - 0,913)	2,6	71;75
TNF-β	0,893 (0,790 - 0,996)	5,1	86; 88
IL-28A	0,777 (0,640 - 0,914)	313	71;88
M1	0,768 (0,593 - 0,943)	37	64;63
cTh1	0,875 (0,766 - 0,984)	29,9	79; 75
Примечание: AUC – площадь под кривой; Se – чувствительность; Sp – специфичность			

Получены пороговые значения для ЦК и ЦКК, выше которых можно прогнозировать недостаточную эффективность после индукционного курса INFβ-1a (Таблица 3.94).

Проведённый ROC-анализ для разделительной модели «эффективность-неэффективность» по ЦК у детей с РС к году терапии INFβ-1a выявил очень хорошее качество (AUC>0,8) разделительной модели для IL-17F и IL-27 (Таблица 3.95, Рисунок 3.120*)*.

Таблица 3.95 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «эффективность-неэффективность» по цитокинам и цитокиновым комплексам у детей с РС к году терапии INFβ-1a

Цитокин, пг/мл	AUC (95% довер. инт)	Cut-off, пг/мл	Se; Sp
IL-17F	0,800 (0,680 - 0,933)	13,9	75; 67
IL-27	0,806 (0,656 - 0,955)	512	92; 83
fIL12	0,778 (0,644 - 0,912)	745	75;83
Примечание: AUC – площадь под кривой; Se – чувствительность; Sp – специфичность			

Получены пороговые значения для ЦК, выше которых можно прогнозировать недостаточную эффективность к году терапии INFβ-1a (Таблица 3.95).

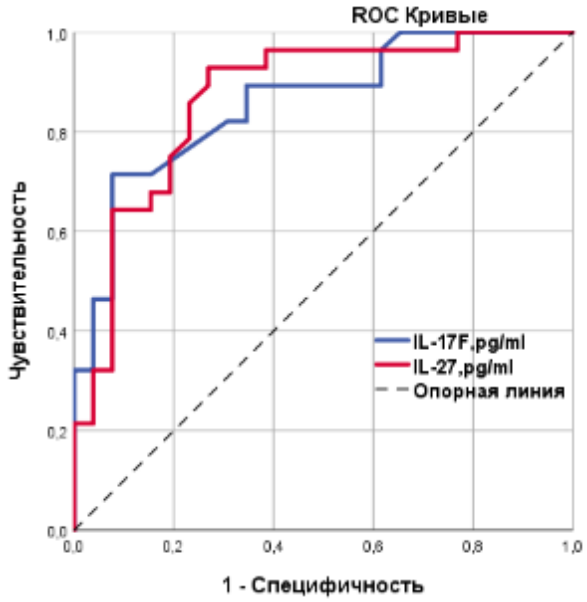


Рисунок 3.120 – ROC-кривые в разделительной модели «эффективность-неэффективность» по IL-17F и IL-27 у детей с РС на 52 неделе лечения INFβ-1a

Таким образом:

1) у пациентов с БК, ЯК, ПС и РС уровень большинства провоспалительных цитокинов и ЦКК к году терапии в группе с недостаточным эффектом выше, чем в группе с хорошим эффектом ГИБП;

2) после индукционного курса ГИБП: у пациентов с ЯК при снижении IL-4 ниже 105 пг/мл и увеличение TNF-α выше 14 пг/мл можно прогнозировать снижение эффекта от терапии блокаторами TNF к году лечения; у пациентов с РС повышение TNF-β выше 5 пг/мл и комплекса cTh1 выше 30 пг/мл позволяет ожидать снижение эффективности терапии INFβ-1a;

3) для пациентов с БК, ЯК, ПС и РС получены пороговые значения для ЦК и ЦКК к году терапии ГИБП, выше которых можно прогнозировать ускользание эффекта от терапии: IL-17E/IL-25 – при БК (28 пг/мл), при ПС (24,6 пг/мл); IL-31 – при БК (56 пг/мл), при ПС (51,3 пг/мл); IL-17F – при БК (66 пг/мл), при РС (13,9 пг/мл); IL-23 – при БК (1359 пг/мл); fIL12 – при БК (1813 пг/мл); IL-4 – при ЯК (100 пг/мл); TNFβ – при ПС (14,3 пг/мл); cTh1 – при ПС (25,2 пг/мл); IL-27 – при РС (512 пг/мл).

3.3.3. Взаимосвязь циркулирующих цитокинов и метаболизма популяций лимфоцитов у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями

Проведена оценка активности митохондриальных дегидрогеназ в зависимости от уровня циркулирующих цитокинов. Известно, что ЦК в очаге воспаления при ИЗЗ воздействуют на популяции лимфоцитов, приводя к трансформации их метаболизма, в том числе к усилению аэробного гликолиза. Известно, что повышение уровня ЦК (IL-6, IL-17, IL-22, IL-12 и др.) у пациентов с ИЗЗ приводит к интенсификации процессов гликолиза и способствует дифференцировке Т-клеток с провоспалительным фенотипом.

Пациенты с ИЗЗ были разделены на группы в зависимости от активности процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза по соотношению СДГ/ГФДГ: 1 группа (Me=1,16 (1,09-1,18) при СДГ Me=179 (173-190) усл.ед / ГФДГ Me=160 (147-168) усл.ед.) – соотношение СДГ/ГФДГ в пределах диапазона значений группы сравнения (Me=1,13 (1,07-1,26) при СДГ Me=185 (174-194) усл.ед / ГФДГ Me=169 (156-179) усл.ед.); 2 группа – ниже нижней границы диапазона значений группы сравнения при снижении активности СДГ и увеличении активности ГФДГ (Me=0,96 (0,89-0,99) при СДГ Me=155 (146-160) усл.ед / ГФДГ Me=162 (160-167) усл.ед.) (Таблица 3.96).

Таблица 3.96 – Соотношение СДГ/ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов в группах пациентов с ИЗЗ

СДГ/ГФДГ в лимфоцитах	Группа 1	Группа 2	p
CD3	1,21 (1,17-1,34)	0,97 (0,93-0,98)	<0,001
CD19	1,02 (0,97-1,16)	0,82 (0,78-0,895)	<0,001
NK	1,03 (0,94-1,15)	0,87 (0,85-0,92)	<0,001
Примечание: p – достоверности различий между пациентами 1 и 2 группами			

Значения соотношения СДГ/ГФДГ в популяциях лимфоцитов у пациентов с ИЗЗ во 2-ой группе в $CD3^+$ Т-клетках, В-лимфоцитах и NK-клетках были достоверно меньше, чем в группе 1, что свидетельствует об интенсификации процессов гликолиза во второй группе (Таблица 3.96).

Анализ циркулирующих ЦК в группах показал достоверно большие значения в группе 2, чем в группе 1 для: IL-1β IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN-γ, TNF-α, CCL20/MIP3α (Таблица 3.97). Все цитокины, достоверно отличающиеся между группами 1 и 2, относятся к провоспалительным ЦК.

Таблица 3.97 – Уровни циркулирующих цитокинов в зависимости от соотношения СДГ/ГФДГ в лимфоцитах у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями

Цитокины, пг/мл	Группа 1	Группа 2	p
IL-1β	0,55 (0,24-1,46)	1,24 (0,71-2,25)	0,025
IL-12p70	2,2 (2-2,8)	2,7 (2,4-5,9)	0,039
IL-13	100,1 (68,9-170,9)	200,8 (91,5-270,6)	0,011
IL-17A	0,49 (0,21-0,84)	0,85 (0,41-7,1)	0,005
IFN-γ	3,19 (3,0-4,6)	4,3 (3,1-12,9)	0,045
TNF-α	12,2 (9,7-20,2)	20,2 (15,6-74,7)	0,013
CCL20/MIP3a	31,7 (25,6-50,7)	62,5 (33,1-73,2)	0,010

Таким образом, в группах пациентов с ИЗЗ со сниженным соотношением СДГ/ГФДГ (интенсификацией процессов гликолиза) повышены уровни основных патогенетически значимых провоспалительных цитокинов.

Резюме.

1. Пациенты с ИЗЗ в обострении заболевания имеют более высокий уровень для большинства изученных ЦК и ЦКК в сравнении с пациентами в ремиссии.

2. У пациентов с РС отмечен наименьший уровень циркулирующих цитокинов и ЦКК по сравнению с БК, ЯК и ПС как в обострении, так и в ремиссии заболевания.

3. Определены пороговые значения ЦКК, выше которых можно прогнозировать развитие обострения заболевания: для БК – fTh22 (1340 пг/мл); для ЯК – fTh22 (1132 пг/мл) и M1 (20,9 пг/мл); для ПС – fIL12 (1891 пг/мл); для РС – cTh1 (33,1 пг/мл).

4. У пациентов с БК, ЯК, ПС и РС уровень большинства провоспалительных цитокинов и ЦКК к году терапии в группе с недостаточным эффектом выше, чем в группе с хорошим эффектом ГИБП.

5. Получены пороговые значения ЦК и ЦКК, выше которых можно прогнозировать ускользание эффекта от терапии для пациентов с: БК в год терапии – IL-17E/IL-25 (28 пг/мл), IL-23 (1359 пг/мл), IL31 (56 пг/мл), cTh17 (2410 пг/мл), fIL12 (1813 пг/мл); ЯК после индукции – IL-4 (105 пг/мл); ЯК в год терапии – IL-4 (100 пг/мл); ПС после индукции – IL-12p70 (2,7пг/мл); ПС в год терапии – TNF-β (5,1 пг/мл), IL-31 (51 пг/мл), IL-17E/IL-25 (25 пг/мл), cTh1 (25 пг/мл); РС после индукции – IL-9 (2,6 пг/мл), TNF-β (5,1 пг/мл), IL-28A (313 пг/мл); M1 (37 пг/мл), cTh1 (30 пг/мл); РС к году терапии – IL-17F (14 пг/мл); IL-27 (512 пг/мл), fIL12 (745 пг/мл).

6. У пациентов с ИЗЗ со сниженным соотношением СДГ/ГФДГ (интенсификацией процессов гликолиза) повышены уровни провоспалительных патогенетически значимых цитокинов: IL-1β, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN-γ, TNF-α, CCL20/MIP-3α.

Материалы, изложенные в разделе 3.3 опубликованы [40, 43, 64, 72, 74, 75].

3.4. Содержание клеток с транслокацией фактора транскрипции NF-κB у детей с иммунозависимыми заболеваниями

Ядерный фактор транскрипции κB (NF-κB) регулирует функции врожденного и адаптивного иммунитета, контролирует течение воспалительных реакций (см. раздел 1.9). В отсутствии специфических сигналов белки NF-κB связаны с ингибирующим комплексом (IκB) и находятся в цитоплазме в неактивном состоянии. Под действием стимулирующего агента происходит высвобождение NF-κB от IκB и транслокация его в ядро клетки, где NF-κB активирует транскрипцию контролируемых генов. Важную роль в развитии иммунных заболеваний (ревматоидного артрита, ВЗК, рассеянного склероза и др.) играет дисрегуляция NF-κB, которая может запускаться опосредованно через изменение метаболизма лимфоцитов. Для лечения ИЗЗ используются препараты, модулирующие активацию NF-κB: глюкокортикостероиды, нестероидные противовоспалительные препараты, а также ГИБП. Целью данного раздела

состояла в оценке информативности содержания клеток с транслокацией NF-κB у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями (ВЗК, ПС, РС) для мониторинга активности воспалительного процесса и эффективности ГИБП.

Для выполнения поставленной задачи обследовано 124 пациента с ВЗК (при лечении IFX/ADA) в возрасте 12,6 (8,3-16,1) лет, 72 ребенка с ремиттирующим РС (при лечении INFβ-1a) (РС) в возрасте 17,0 (15,7-17,8) лет, 83 пациента – с вульгарным псориазом (при лечении ADA) в возрасте 12,1 (7,8-15,8) лет, а также группа сравнения – 30 детей (12,1 (14,5–17,1) лет)). Количество клеток с транслокацией NF-κB (% клеток с транслокацией NF-κB из цитоплазмы в ядро) оценивали в основных (Т-лимфоциты, В-лимфоциты, NK-клетки) и малых популяциях лимфоцитов (Treg, Thact, Th17-клетках, Tc17).

Проведено сравнение содержания клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК, ПС, РС с показателями группы сравнения.

Активность фактора транскрипции NF-κB в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК, РС, ПС и в группе сравнения

Проведенный анализ показал, что в группе сравнения наибольший уровень клеток с транслокацией NF-κB наблюдался в В-лимфоцитах и значимо превышал этот показатель в популяции NK-клеток ($p<0,001$) и в $CD3^+$Т-лимфоцитах ($p<0,001$) (Рисунок 3.121).

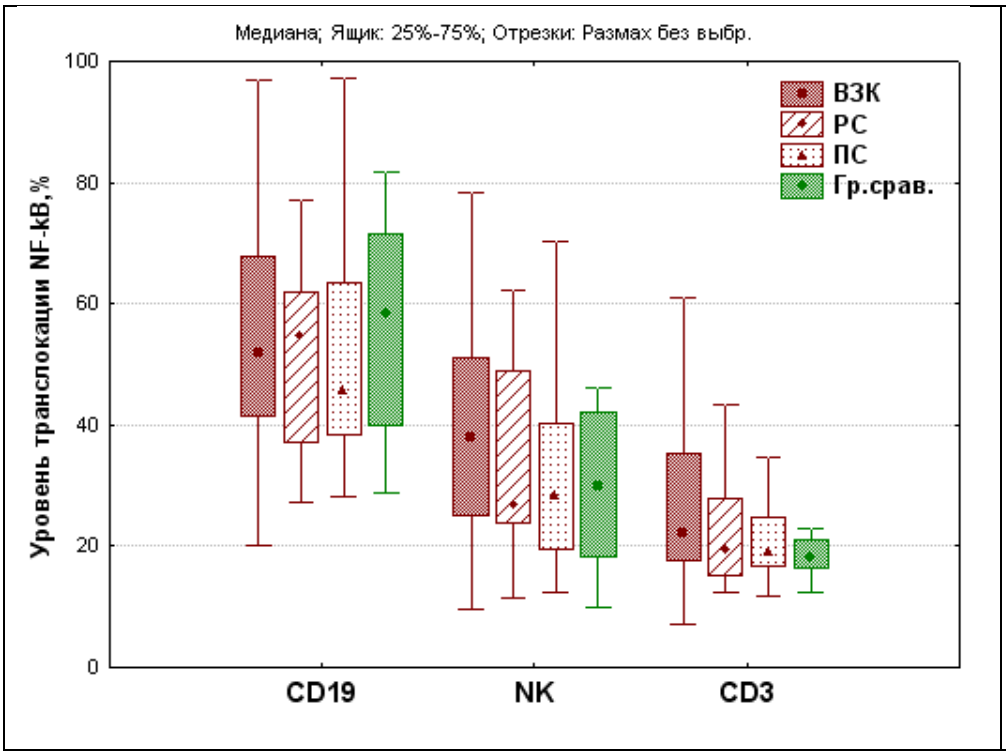


Рисунок 3.121 – Уровень транслокации NF-κB в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК, РС, ПС и в группе сравнения

Между количеством клеток с транслокацией NF-κB в NK-клетках и в $CD3^+$ Т-лимфоцитах также выявлены значимые отличия с наименьшими значениями уровня транслокации NF-κB в Т-лимфоцитах ($p < 0,001$) (Рисунок 3.121).

У обследованных групп пациентов также наибольшее количество клеток с транслокацией NF-κB выявлено в популяции В-лимфоцитов по сравнению с NK-клетками и $CD3^+$ Т-лимфоцитами ($p_{CD19_NK}<0,001$, $p_{CD19_CD3}<0,001$), а наименьшее в $CD3^+$ Т-лимфоцитах ($p_{NK_CD3}<0,001$) независимо от активности и формы заболевания (Рисунок 3.121). Анализ полученных данных выявил большой разброс показателей у детей всех исследованных патологий.

Активность фактора транскрипции NF-κB в основных и малых популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК, РС и ПС при обострении и ремиссии заболеваний и в группе сравнения

Проведенный анализ показал отличие состояний «обострение – ремиссия» по активности NF-κB в лимфоцитах у пациентов с ИЗЗ (Таблица 3.98).

Таблица 3.98 – Содержание клеток с транслокацией NF-κB в лимфоцитах (основные, минорные популяции) у пациентов с ИЗЗ в обострении и ремиссии заболевания и в группе сравнения

Заб-ние / Состояние	ВЗК	ПС	РС	Группа сравнения
CD4, %				
Обострение	28,5 ** (18,9-41,2)	22,8 ** (18,9-34,4)	23,0 * (16,9-30,0)	18,4 (14,0-19,7)
Ремиссия	19,8* (16,6-25,9)	18,1 (16,1-19,9)	19,1 (15,8-22,9)	
$p_{об_рем}$	p=0,001	p<0,001	p=0,188	
CD8, %				
Обострение	24,8 * (16,7-35,6)	22,3 * (17,9-27,8)	25,6 * (15,5-28,7)	17,2 (15,6-23,5)
Ремиссия	17,9 (14,4-21,9)	15,4 (13,4-17,1)	16,2 (13,2-20,6)	
$p_{об_рем}$	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
CD19, %				
Обострение	60,3 (44,7-73,1)	54,5 (42,9-74,0)	56,2 (41,9-61,0)	58,4 (40,1-71,6)
Ремиссия	46,3 (37,4-56,6)	41,1* (35,9-51,3)	50,2 (36,5-64,8)	
$p_{об_рем}$	p=0,001	p=0,010	p=0,958	
NK, %				
Обострение	46,4** (33,8-57,6)	36,5* (28,7-47,6)	38,5 (24,6-49,9)	29,9 (18,3-42,1)
Ремиссия	25,4 (21,7-34,9)	19,1* (16,5-21,9)	25,7* (15,9-28,1)	
$p_{об_рем}$	p<0,001	p<0,001	p=0,003	
Treg, %				
Обострение	28,4* (19,7-42,6)	28,9* (21,3-36,1)	21,6 * (17,0-40,2)	20,3 (15,9-26,1)
Ремиссия	23,6 (19,2-28,1)	20,6 (17,9-25,2)	22,6 (20,1-27,3)	
$p_{об_рем}$	p=0,036	p=0,002	p=0,343	
Thact, %				
Обострение	25,9** (18,0-39,0)	20,9* (16,3-31,2)	18,9 (14,6-25,5)	15,2 (14,5-17,7)
Ремиссия	18,8 (12,9-26,5)	17,6 (14,0-19,7)	16,1 (13,5-22,5)	
$p_{об_рем}$	p=0,002	p=0,007	p=0,182	

Продолжение таблицы 3.98

Заб-ние / Состояние	ВЗК	ПС	РС	Группа сравнения
Th17, %				
Обострение	29,3 ** (20,7-38,2)	22,9 * (20,9-31,7)	20,9 (15,1-30,6)	19,6 (16,9-22,7)
Ремиссия	20,6 (15,9-25,7)	18,3 (16,9-19,1)	21,4 (14,0-28,8)	
$p_{об_рем}$	p<0,001	p<0,001	p=0,860	
Tc17, %				
Обострение	32,8 ** (23,1-43,7)	32,6 ** (25,0-36,9)	31,9 ** (18,6-41,5)	20,8 (15,9-26,2)
Ремиссия	24,0 (14,0-31,1)	16,4 (14,1-17,5)	22,9 (14,9-26,5)	
$p_{об_рем}$	p<0,001	p<0,001	p=0,020	
Примечание: * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения с p <0,05; ** – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения с p <0,001				

Уровень транслокации фактора κB в состоянии обострения заболевания у пациентов с ВЗК, ПС был выше во всех изученных популяциях лимфоцитов, кроме В-лимфоцитов, относительно группы сравнения (Таблица 3.98). У пациентов с РС в состоянии обострения заболевания содержание клеток с транслокацией NF-κB было выше в популяциях $CD4^+$- и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, в Treg и Tc17 клетках (Таблица 3.98). Количество В-лимфоцитов с транслокацией NF-κB у пациентов в обострении заболевания при всех обследованных патологиях не отличалось от группы сравнения (Таблица 3.98). Наибольшее количество клеток с транслокацией NF-κB в обострении заболевания обследованных пациентов было выявлено в популяции В-лимфоцитов и в NK-клетках. Уровень транслокации ядерного фактора κB в этих популяциях достоверно было выше, чем в Т-хелперах, цитотоксических Т-лимфоцитах, Treg, Thact и Th17-лимфоцитах (p< 0,001).

У детей с ВЗК в состоянии ремиссии содержание клеток с транслокацией NF-κB не отличалось от группы сравнения во всех изученных популяциях, кроме сохраняющегося повышения в популяции $CD4^+$ Т-лимфоцитах. У детей с РС в состоянии ремиссии содержание клеток с транслокацией NF-κB не отличалось от группы сравнения во всех изученных популяциях. У детей с ПС в состоянии ремиссии содержание клеток с транслокацией NF-κB не отличалось от группы

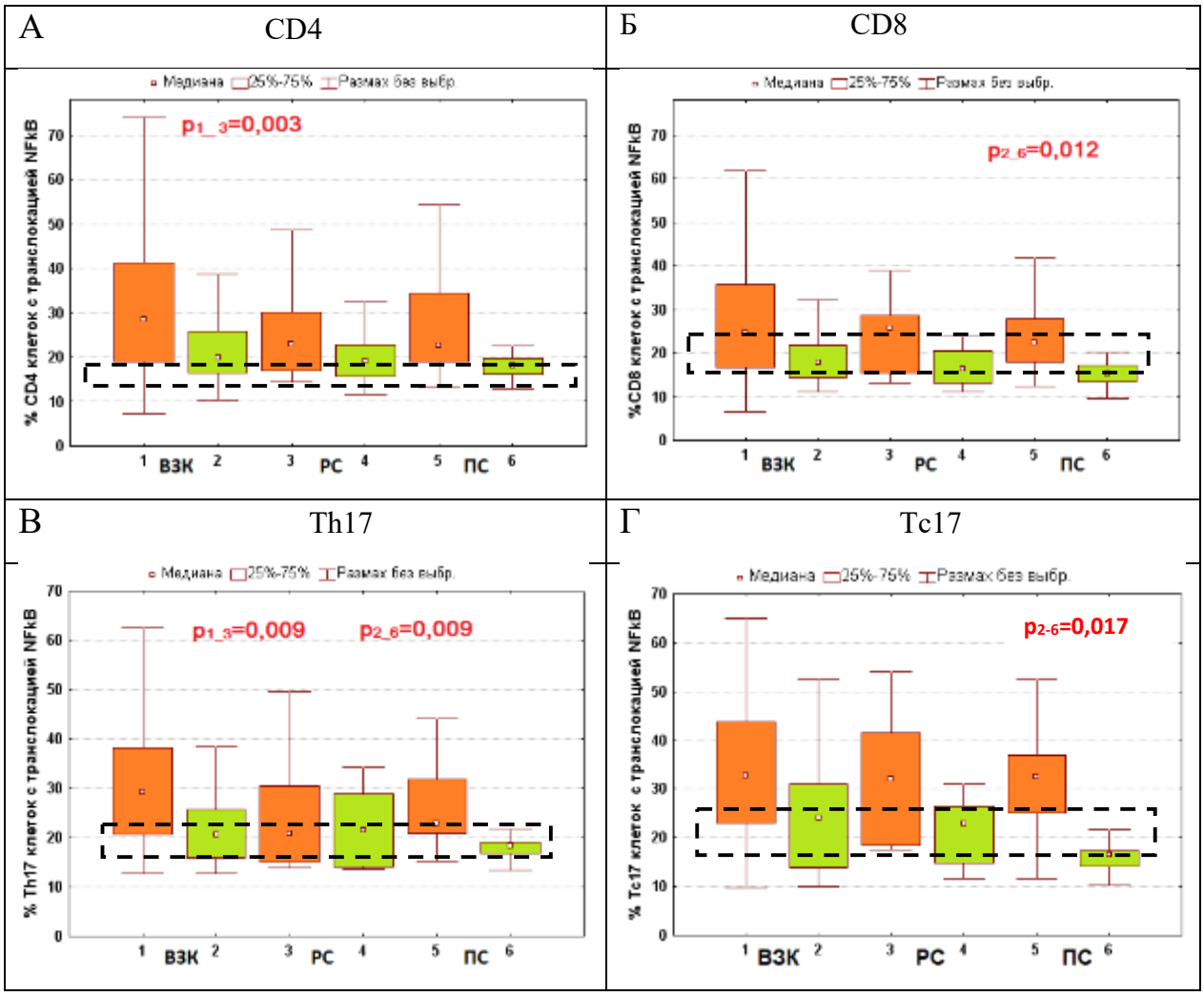
сравнения в популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитах (Treg, Thact, Th17), а в В-лимфоцитах, $CD8^+$ Т-лимфоцитах, NK-клетках и Tc17 было значимо ниже, чем в группе сравнения (Таблица 3.98).

В состоянии ремиссии при всех формах патологий в В-лимфоцитах, также как и при обострении заболевания, процент клеток с транслокацией NF-κB был достоверно выше относительно других изученных популяций клеток ($p<0,001$).

Сравнение состояний обострения и ремиссии показало достоверно более высокие значения уровня транслокации NF-κB во всех изученных популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК и ПС (Таблица 3.98). У пациентов с РС в стадии обострения значимо более высокие показатели выявлены в популяциях $CD8^+$ Т-лимфоцитов, в NK-клетках и в Tc17 лимфоцитах (Таблица 3.98).

Сравнение количества клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов между пациентами с разными заболеваниями выявило более высокие показатели NF-κB в NK-клетках у пациентов с ВЗК в обострении заболевания, чем у пациентов с ПС ($p=0,042$) и РС ($p=0,012$). У пациентов с ВЗК в обострении заболевания выявлен более высокий уровень транслокации NF-κB, чем у пациентов с РС в популяциях: $CD4^+$ Т-клеток (Рисунок 3.121А), Th17-лимфоцитов (Рисунок 3.121В), Thact ($p=0,041$). У пациентов с ПС и РС в стадии обострения достоверных отличий по активности NF-κB в популяциях лимфоцитов не выявлено.

Получены достоверно более высокие значения транслокации NF-κB у пациентов с ВЗК в состоянии ремиссии в сравнении с пациентами с ПС в $CD8^+$-клетках (Рисунок 3.122Б), Th17-лимфоцитах (Рисунок 3.122В) и в Tc17 (Рисунок 3.121Г). Достоверных различий по активности NF-κB в популяциях лимфоцитов между пациентами с РС и ПС в стадии ремиссии также не выявлено (Рисунок 3.122).



Примечание: 1, 3, 5 – группы пациентов в обострении, 2, 4, 6 – группы пациентов в ремиссии; пунктиром показаны показатели группы сравнения (Q_{25}-Q_{75}) для количества клеток с транслокацией NF-κB

Рисунок 3.122 – Относительное количество Т-хелперов (А), цитотоксических Т-лимфоцитов (Б), Th17 (В) и Tc17 (Г) с транслокацией NF-κB при обострении и ремиссии у детей с ИЗЗ при лечении биологическими препаратами

Проведенный ROC-анализ по количеству NK-клеток с транслокацией NF-κB для детей всех обследованных патологий показал очень хорошее качество разделительной модели для состояний «обострение-ремиссия» (Таблица 3.99, Рисунок 3.123). Наибольшее пороговое значение уровня транслокации NF-κB, выше которого можно прогнозировать развитие обострения заболевания, выявлено для пациентов с ВЗК (Таблица 3.99).

Таблица 3.99 – Показатели ROC-анализа для разделительной модели «обострение – ремиссия» по количеству NK-клеток с транслокацией NF-κB у пациентов с ИЗЗ

	AUC	cut-off (Se; Sp)
ВЗК	0,834	36% (72; 80)
ПС	0,949	29% (77; 96)
РС	0, 872	27% (75; 75)
Примечание: AUC – площадь под кривой; Se – чувствительность; Sp – специфичность		

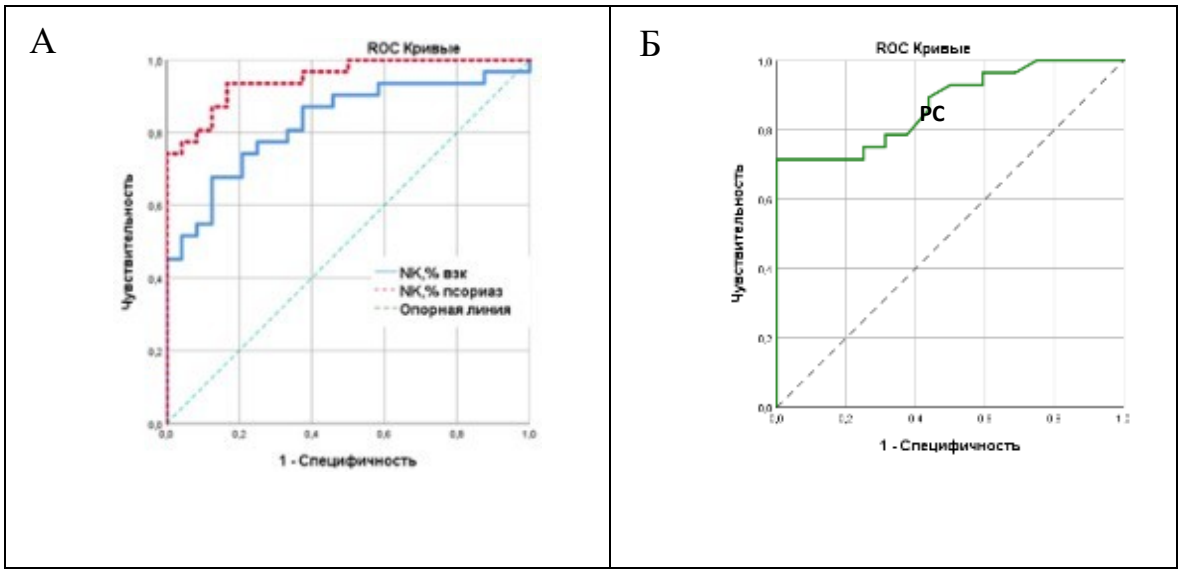


Рисунок 3.123 – ROC-кривые для разделения состояний «обострение-ремиссия» по количеству NK-клеток с транслокацией NF-κB для детей с ВЗК и ПС (А), РС (Б)

Для детей с РС было выявлено очень хорошее качество разделительной модели состояний «обострение-ремиссия» по уровняю транслокации NF-κB для цитотоксических Т-лимфоцитов (AUC=0,854) и популяции цитотоксических Th17-лимфоцитов (Tc17) (AUC= 0,896). Уровень cut-off, выше которого можно прогнозировать развитие обострения заболевания для CD8-клеток составил 25,3% (Se=75; Sp=95), для Tc17 – 28,6% (Se=80,2; Sp=94,7).

Таким образом, у пациентов с ИЗЗ обострение заболевания характеризуется более высоким содержанием клеток с транслокацией NF-κB, степень повышения зависела от популяции клеток. При всех ИЗЗ в ремиссии заболевания уровень

транслокации NF-κB был ниже, чем в обострении заболевания в $CD8^+$ Т-клетках, NK-клетках, Tc17 лимфоцитах.

Зависимость уровня транслокации NF-κB от возраста, длительности заболевания и длительности терапии у пациентов с ВЗК, РС и ПС

Корреляционный анализ количества клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов от возраста пациентов показал слабую прямую зависимость у пациентов с ВЗК и псориазом для NK-клеток ($r_{взк}$=0,17, $p_{взк}$=0,026; $r_{пс}$=0,22, $p_{пс}$=0,009). Зависимости NF-κB от возраста для пациентов с РС получено не было. У пациентов с ПС с увеличением длительности заболевания наблюдалось повышение транслокации NF-κB в Th17-клетках (r=0,25; p=0,012). У пациентов с ВЗК и РС зависимости активности NF-κB от длительности заболевания получено не было ни для одной исследованной популяции клеток из-за большого разброса показателей. Также, у пациентов с ИЗЗ всех обследованных патологий не выявлено достоверных зависимостей от длительности лечения ГИБП.

Корреляционные зависимости уровня транслокации NF-κB от активности митохондриальных дегидрогеназ в популяциях лимфоцитов у детей с иммунозависимыми заболеваниями

Для оценки взаимосвязи активности фактора транскрипции NF-κB и интенсивности метаболизма в популяциях лимфоцитов на следующем этапе работы был проведен корреляционный анализ между уровнем транслокации NF-κB и активностью дегидрогеназ СДГ и ГФДГ в общей популяции лимфоцитов и в отдельных популяциях. Наибольший % транслокации NF-κB зависит от популяции лимфоцитов – наиболее высокий в В-лимфоцитах, наименее – в Т-лимфоцитах. В тоже время описано, что в группе сравнения и у пациентов с ИЗЗ наименьшая активность СДГ определяется в В-лимфоцитах, а наибольшая – в Т-лимфоцитах (Рисунок 3.124) [46].

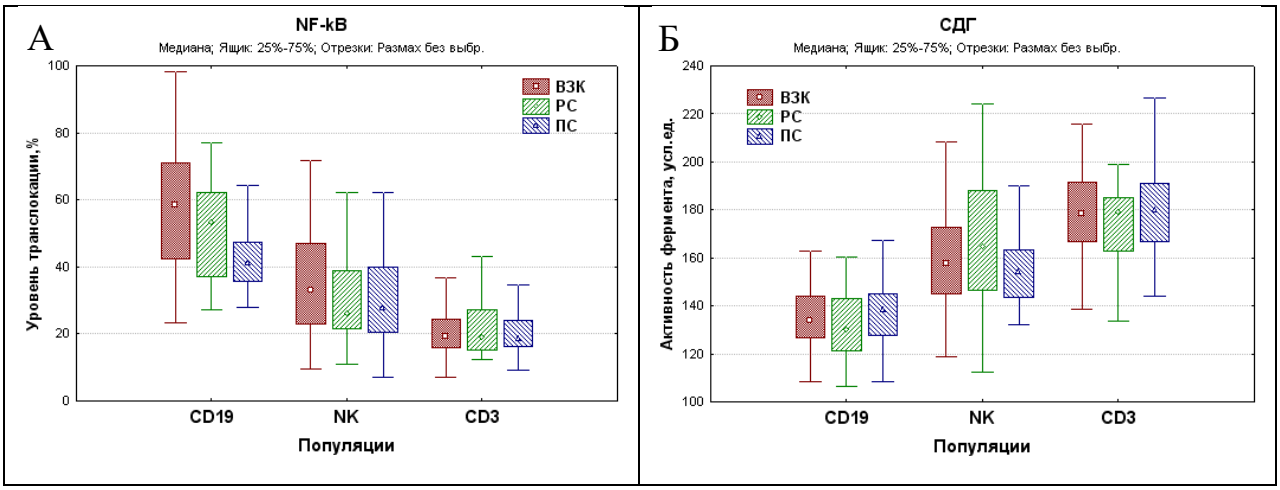


Рисунок 3.124 – Уровень транслокации NF-κB (А) и активность СДГ(Б) в основных популяциях лимфоцитов у детей с ИЗЗ

Анализ уровня транслокации NF-κB и активности СДГ в лимфоцитах показал обратную корреляционную зависимость для детей всех обследованных патологий: ВЗК ($r = -0{,}56$; $p<0{,}001$); РС ($r = -0{,}65$; $p<0{,}001$), ПС ($r = -0{,}57$; $p<0{,}001$) (Рисунок 3.124). Корреляционные зависимости между уровнем транслокации NF-κB и активностью ГФДГ были менее выражены, но имели ту же направленность: ВЗК ($r = -0{,}36$; $p<0{,}001$); РС ($r = -0{,}25$; $p=0{,}004$), ПС ($r = -0{,}23$; $p=0{,}004$). Таким образом, чем больше содержание лимфоцитов с транслокацией NF-κB, тем ниже активность ферментов (митохондриальных дегидрогеназ). Полученная корреляционная зависимость между количеством клеток с транслокацией NF-κB и активностью митохондриальных ферментов ($p<0{,}001$) была аналогична и в группе сравнения: СДГ ($r = -0{,}52$) и ГФДГ ($r = -0{,}31$) (Рисунок 3.125).

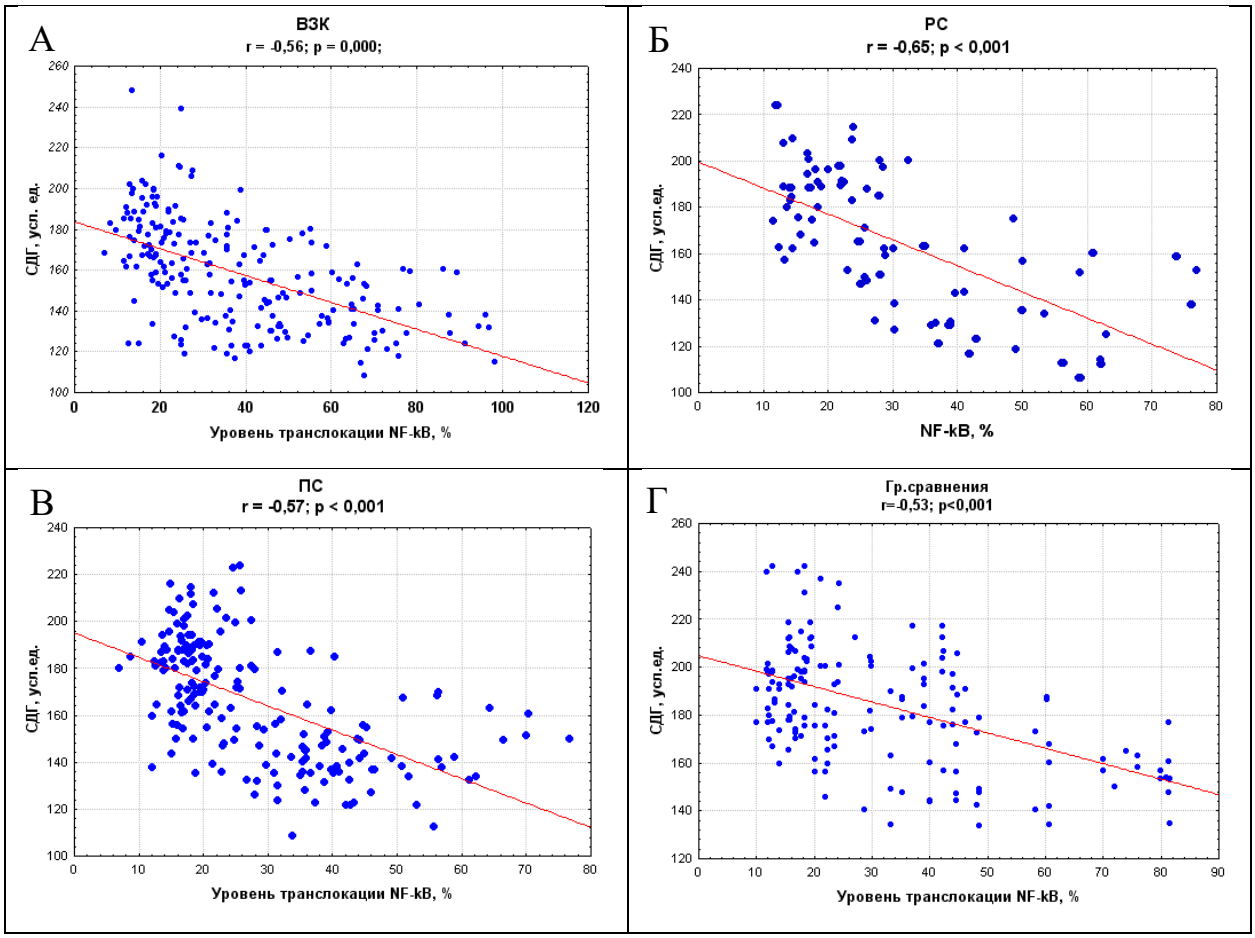


Рисунок 3.125 – Зависимость активности СДГ и уровня транслокации NF-κB в лимфоцитах у детей с ВЗК (А), РС (Б), ПС (В), здоровых детей (Г)

Анализ транслокации NF-κB и активности СДГ в отдельных популяциях лимфоцитов показал наличие значимых корреляционных зависимостей для NK-клеток: у пациентов с ВЗК - r=-0,22, p =0,033; у пациентов с РС - r=-0,58, p <0,001; у пациентов с ПС – r=-0,51, p<0,001. Также, значимые корреляционные зависимости транслокации NF-κB и активности СДГ были определены для Т-лимфоцитов: у пациентов с ВЗК - r=-0,24, p =0,018; у пациентов с РС – r=-0,51, p <0,001; у пациентов с ПС – r=-0,31, p=0,039. Кроме того, у детей с ВЗК корреляционная зависимость между транслокацией NF-κB и активностью СДГ определена для Treg (r =-0,22; p=0,04), Thact (r =-0,25; p=0,017); у пациентов с РС выявлена зависимость для Т-хелперов (r=-0,33; p=0,01), для $CD8^+$ Т-лимфоцитов (r =-0,5; p<0,001).

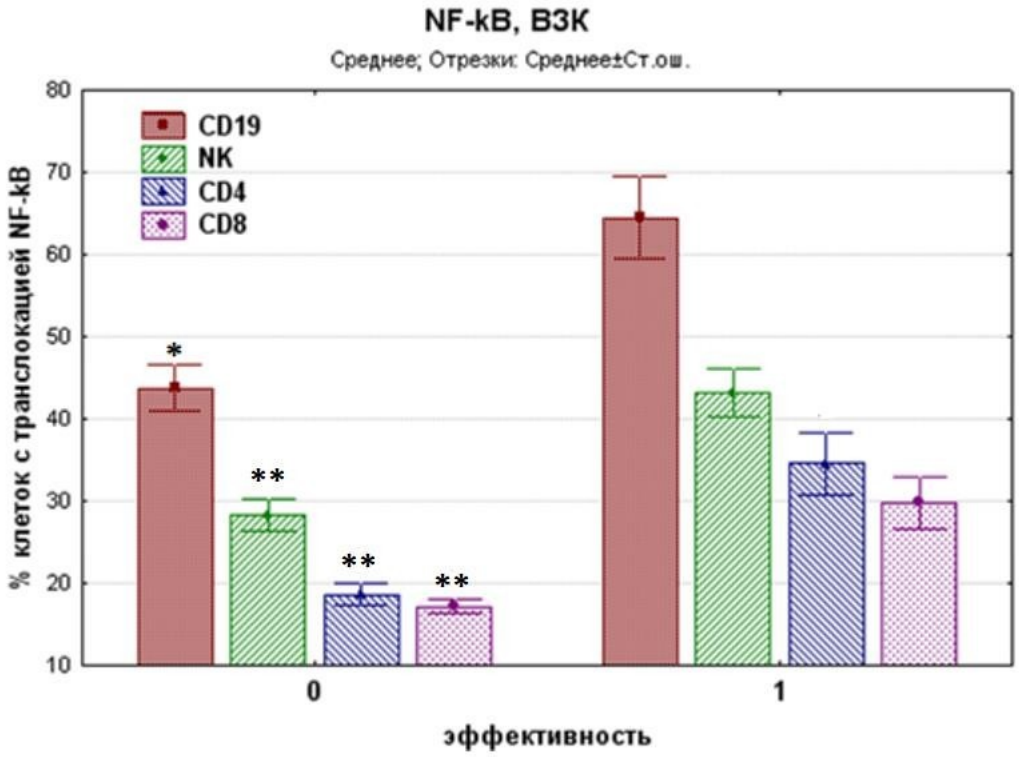
Анализ транслокации NF-κB и активности ГФДГ в отдельных популяциях клеток показал наличие значимых корреляционных зависимостей у пациентов с

ВЗК для $CD8^+$ Т-лимфоцитов (r =-0,42; p<0,001), для NK-клеток (r =-0,33; p=0,001); у пациентов с РС – для NK-клеток (r =-0,34; p=0,02) и Thact (r =-0,49; p=0,004); у пациентов с ПС – для $CD4^+$ Т-лимфоцитов (r =-0,56; p=0,016), $CD8^+$ Т-лимфоцитов (r =-0,69; p=0,002) и Thact (r =-0,57; p=0,013). Таким образом, у пациентов с ИЗЗ получено увеличение транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов ассоциировано со снижением митохондриальных ферментов СДГ и ГФДГ.

В следующем разделе работы оценивали динамику транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов в ответ на введение ГИБП (до и через сутки) у пациентов с ВЗК и ПС при разной эффективности терапии.

Изменение количества клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов в ответ на введение ГИБП у пациентов с ВЗК при разной эффективности терапии

У пациентов с ВЗК анализ доли клеток с транслокацией NF-κB в популяциях В-лимфоцитов, NK-клеток, $CD4^+$- и $CD8^+$ Т-клетках до начала терапии ГИБП показал, что в группе пациентов с достаточной эффективностью терапии показатели NF-κB были достоверно выше, чем в группе с недостаточной эффективностью терапии (НЭ) (Рисунок 3.126).



Примечание: 0 – группа пациентов с недостаточной эффективностью терапии; 1 - группа пациентов с эффективностью терапии; * – достоверность различий между группами пациентов с p <0,05; ** – достоверность различий между группами пациентов с p <0,001

Рисунок 3.126 – Доля клеток с транслокацией NF-κB в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК с разной эффективностью терапии до начала терапии ГИБП

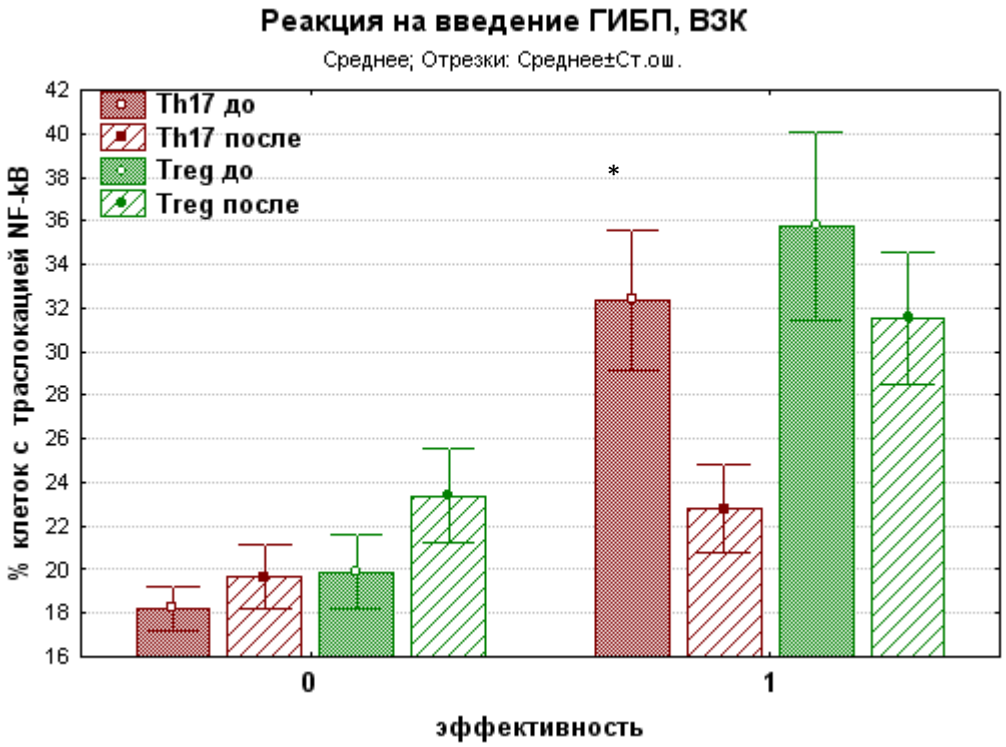
Сравнение доли клеток с транслокацией NF-κB у пациентов во время поддерживающего курса до и через сутки введения ГИБП показало достоверное снижение в группе с эффективностью терапии во всех исследованных популяциях (Таблица 3.100). В группе с НЭ различий в показателях NF-κB в популяциях до и после введения препарата выявлено не было.

Таблица 3.100 – Уровень транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов до и после введения блокаторов TNF у пациентов с ВЗК

Популяции		НЭ Группа1(n=18)	Эффект. Группа 2(n=16)	p
CD3, %	До	17,9 (16,0 - 20,5)	31,0 (22,4 - 42,7)	<0,001
	После	20,1 (14,9 - 23,7)	18,8 (15,7 - 28,5)	0,621
		$p_{до_после}$=0,349	$p_{до_после}$=0,001	
CD4, %	До	16,9 (15,0 - 22,6)	30,8 (21,6 - 43,4)	<0,001
	После	19,6 (16,1 - 24,1)	20,9 (18,2 - 32,3)	0,175
		$p_{до_после}$=0,145	$p_{до_после}$=0,029	
CD8, %	До	16,2 (14,8 - 18,1)	24,6 (21,2 - 37,1)	<0,001
	После	18,4 (13,3 - 20,3)	16,3 (13,2 - 21,1)	0,986
		$p_{до_после}$=0,744	$p_{до_после}$<0,001	
CD19, %	До	45,4 (34,2 - 49,4)	60,1 (47,7 - 84,1)	0,002
	После	37,4 (29,9 - 47,9)	43,9 (31,5 - 49,6)	0,573
		$p_{до_после}$=0,372	$p_{до_после}$<0,001	
NK, %	До	27,4 (22,8 - 31,9)	42,2 (35,8 - 46,6)	<0,001
	После	23,8 (20,0 - 34,7)	22,0 (18,9 - 39,1)	0,528
		$p_{до_после}$=0,586	$p_{до_после}$<0,001	
TNK, %	До	22,3 (18,5 - 27,2)	37,4 (22,9 - 45,6)	0,008
	После	20,4 (16,7 - 25,7)	18,0 (15,3 - 24,7)	0,508
		$p_{до_после}$=0,975	$p_{до_после}$=0,002	
Th17, %	До	17,5 (15,6 - 19,5)	31,9 (22,6 - 36,6)	<0,001
	После	19,2 (14,0 - 21,5)	21,2 (18,1 - 25,1)	0,144
		$p_{до_после}$=0,446	$p_{до_после}$=0,002	
Treg, %	До	17,9 (15,1 - 21,5)	34,7 (20,8 - 47,9)	0,003
	После	21,5 (17,1 - 27,9)	32,3 (19,9 - 41,8)	0,049
		$p_{до_после}$=0,122	$p_{до_после}$=0,352	
Thact, %	До	13,3 (12,1 - 19,5)	27,5 (19,9 - 39,7)	<0,001
	После	18,1 (13,5 - 26,2)	19,9 (14,9 - 26,9)	0,463
		$p_{до_после}$=0,071	$p_{до_после}$=0,019	
Tc17, %	До	22,3 (14,9 - 26,0)	26,4 (23,3 - 35,4)	0,015
	После	17,7 (15,8 - 26,3)	18,4 (14,5 - 20,8)	0,506
		$p_{до_после}$=0,845	$p_{до_после}$=0,002	
Примечание: Группа 1 – пациенты с недостаточной эффективностью ГИБП (НЭ), Группа 2 – пациенты с эффективностью ГИБП (Эффект.); p – достоверность различий между группами 1 и 2				

В патогенетически важной популяции - Th17-лимфоцитах до введения ГИБП NF-κB в группе с эффективным лечением был выше, чем в группе с НЭ. После введения ГИБП в группе с эффективностью терапии наблюдалось достоверное снижение транслокации NF-κB в этой популяции, в то время как в группе с НЭ

достоверной разницы до и после введения препарата не выявлялось (Рисунок 3.127).



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

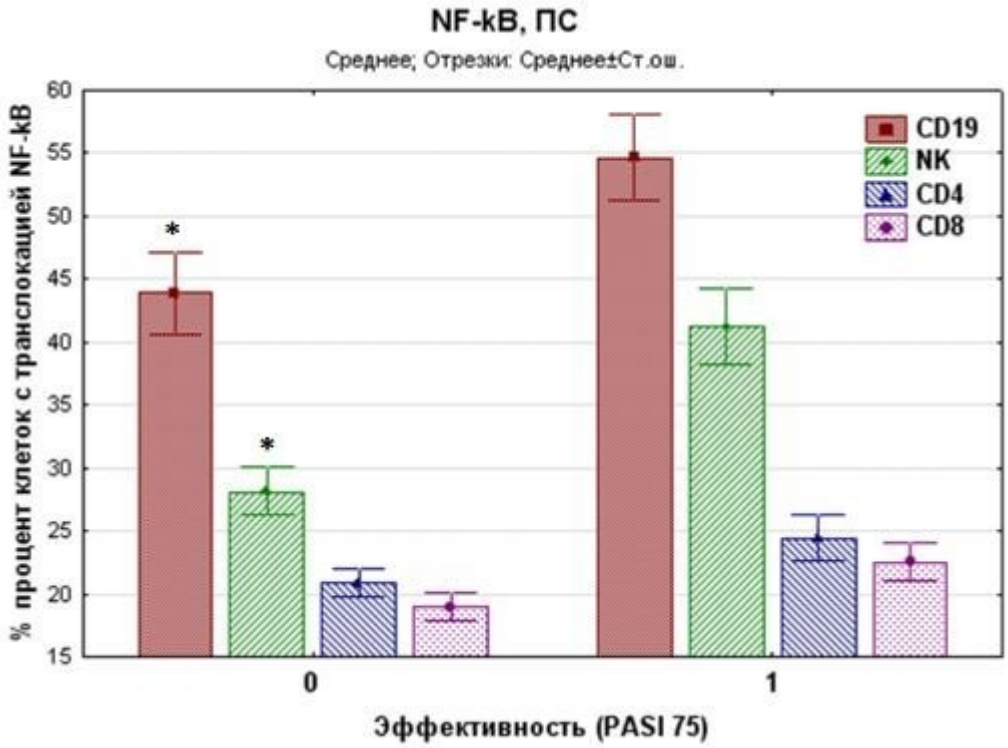
Рисунок 3.127 – Доля клеток с транслокацией NF-κB в Th17 и Treg лимфоцитах у пациентов с ВЗК с разной эффективностью до и после введения блокаторов TNF

В то же время в популяции Treg достоверной разницы в транслокации NF-κB до и после введения ГИБП не наблюдалось как в группе 1, так и в группе 2 (Таблица 3.94, Рисунок 3.127). При этом показатели активности NF-κB в Treg в группе с эффективностью терапии были выше, чем в группе с НЭ до и после введения препарата.

Изменение активности фактора транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов в ответ на введение ГИБП у пациентов с ПС при разной эффективности терапии

При анализе NF-κB в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с ПС до начала терапии ГИБП получены достоверно более высокие значения данного показателя для В-лимфоцитов, NK-клеток и TNK клеток в группе с

эффективностью терапии по сравнению с группой с НЭ также, как и у пациентов с ВЗК (Рисунок 3.128).



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

Рисунок 3.128 – Доля клеток с транслокацией NF-κB в основных популяциях лимфоцитов у пациентов с ПС с разной эффективностью терапии до начала терапии ГИБП

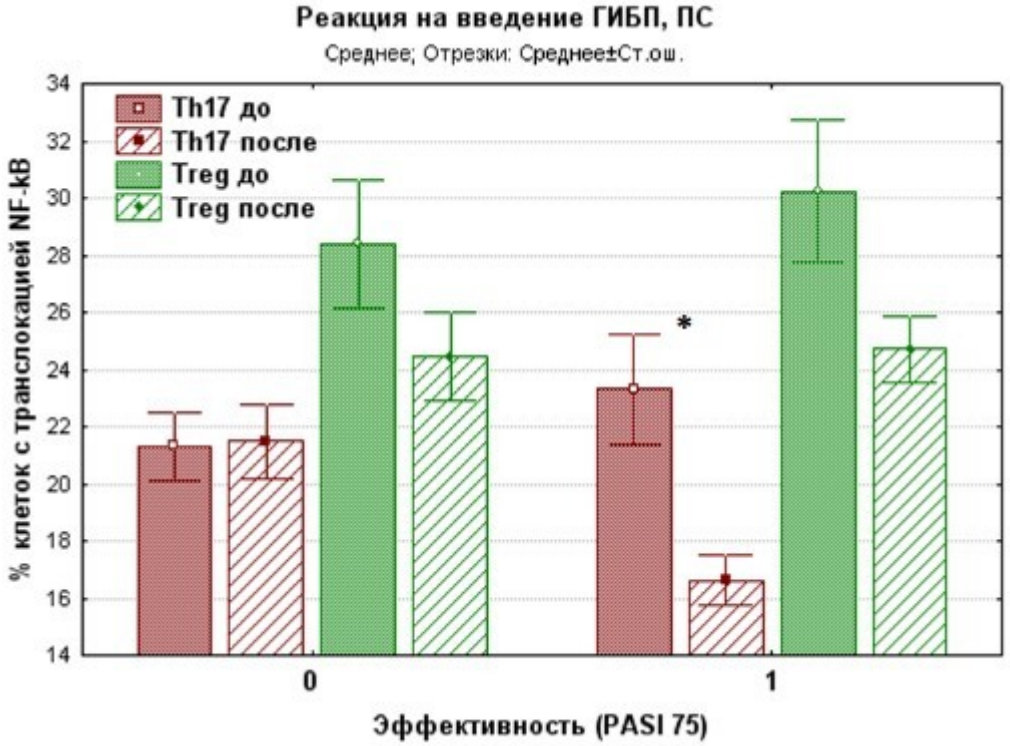
Доля клеток с транслокацией NF-κB в группе пациентов с ПС при эффективном лечении в ответ на введение ГИБП значимо снижалась во всех изученных популяциях лимфоцитов, кроме Treg.

В группе НЭ у пациентов с ПС достоверной разницы по содержанию NF-κB в популяциях лимфоцитов до и после введения ГИБП не выявлялось (Таблица 3.101).

Таблица 3.101 – Содержание клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов до и после введения ADA у пациентов с ПС с разной эффективностью

Популяции		НЭ Группа1 (n=28)	Эффект. Группа 2 (n=24)	p
CD3, %	До	17,5 (16,9 - 24,9)	24,9 (17,9 - 32,3)	0,036
	После	19,9 (16,6 - 24,9)	18,1 (14,5 - 22,4)	0,126
		$p_{до_после}$=0,476	$p_{до_после}$=0,013	
CD4, %	До	19,5 (16,1 - 24,7)	23,7 (18,4 - 33,2)	0,123
	После	18,7 (16,9 - 23,7)	19,7 (14,9 - 25,1)	0,669
		$p_{до_после}$=0,843	$p_{до_после}$=0,102	
CD8, %	До	17,8 (15,3 - 20,9)	23,9 (16,9 - 27,5)	0,063
	После	17,7 (15,6 - 24,9)	15,6 (13,6 - 17,8)	0,027
		$p_{до_после}$=0,637	$p_{до_после}$=0,002	
CD19, %	До	33,9 (32,1 – 53,3)	51,4 (39,4 - 67,5)	0,006
	После	52,5 (40,6 - 60,6)	43,9 (31,5 - 49,6)	<0,001
		$p_{до_после}$=0,053	$p_{до_после}$<0,001	
NK, %	До	28,3 (18,8 - 36,5)	38,2 (31,2 - 42,8)	0,002
	После	35,7 (24,3 - 44,1)	23,7 (17,8 - 29,0)	0,018
		$p_{до_после}$=0,073	$p_{до_после}$<0,001	
TNK, %	До	17,7 (14,8 - 26,9)	29,3 (22,7 - 37,9)	0,009
	После	24,6 (16,5 - 30,7)	17,1 (14,3 - 23,6)	0,068
		$p_{до_после}$=0,339	$p_{до_после}$<0,001	
Th17, %	До	19,0 (17,6 - 27,1)	22,2 (16,9 - 25,9)	0,446
	После	23,5 (17,2 - 27,2)	16,8 (13,5 - 19,4)	0,004
		$p_{до_после}$=0,637	$p_{до_после}$=0,003	
Treg, %	До	25,2 (19,7 - 36,3)	31,9 (19,2 - 40,6)	0,765
	После	21,5 (19,5 - 32,5)	24,8 (19,8 - 29,6)	0,834
		$p_{до_после}$=0,339	$p_{до_после}$=0,120	
Thact, %	До	19,7 (14,9 - 25,3)	20,9 (16,5 - 30,6)	0,284
	После	19,4 (15,2 - 24,1)	15,4 (12,5 - 23,7)	0,167
		$p_{до_после}$=0,843	$p_{до_после}$=0,026	
Tc17, %	До	25,0 (15,2 - 32,6)	31,2 (21,3 - 36,6)	0,035
	После	31,8 (22,6 - 35,3)	15,6 (14,4 - 22,9)	<0,001
		$p_{до_после}$=0,080	$p_{до_после}$<0,001	
Примечание: Группа 1 – пациенты с недостаточной эффективностью ГИБП (НЭ), Группа 2 – пациенты с эффективностью ГИБП (Эффект.); p – достоверность различий между группами 1 и 2				

Анализ уровня транслокации NF-κB в малых популяциях лимфоцитов показал, что в группе 2 после введения ГИБП наблюдались достоверно более низкие показатели NF-κB в патогенетически значимых популяциях – Th17-лимфоцитов, Thact и Tc17 (Таблица 3.101, Рисунок 3.129).



Примечание: 0 – группа пациентов с недостаточной эффективностью терапии; 1 – группа пациентов с эффективностью терапии; * – достоверность различий между группами пациентов до и после введения препарата с p <0,05

Рисунок 3.129 – Доля клеток с транслокацией NF-κB в Th17 и Treg лимфоцитах у пациентов с ПС с разной эффективностью ГИБП до и после введения блокаторов TNF

Изменения активности NF-κB в популяциях лимфоцитов у пациентов с ПС были аналогичны ранее описанным у пациентов с ВЗК.

Наиболее наглядно действие биологической терапии на NF-κB в популяциях лимфоцитов продемонстрировано в клинических примерах.

Клинические примеры оценки содержания клеток с транслокацией NF-κB в основных популяциях лимфоцитов (T, B, NK) у пациентов с ИЗЗ до начала терапии и к году терапии ГИБП

Клинический пример №1.

Ребенок З

Возраст – 15 лет 1 месяц
Диагноз – Болезнь Крона, воспалительная и свищевая форма, умеренная степень активности, непрерывно-рецидивирующее течение, обострение
Длительность заболевания – 2,1 года
Препарат – адалимумаб (40мг/0.4мл в/м 1 раз в 14 дней)
PCDAI – 35 балла (на начало терапии ADA)

Анамнез:

С начала 2019 года у ребенка были выявлены абсцессы в перианальной области, включая: пилонидальная киста 02.2019 (вскрытие, дренирование), эпителиально-копчиковая киста в июне 2019 года (иссечение). С начала июня 2020 года отмечались периодические подъемы температуры до 37.5 - 39,0°С, рецидивирующий стоматит, периодически разжижжение стула. В середине июня 2020 года проходил лечение по месту жительства с диагнозом: Экстрасфинктерный параректальный свищ, хронический парапроктит. Выписка без положительной динамики, сохранялось серозно-гнойное отделяемое из свищевого отверстия. Госпитализирован в отделение гастроэнтерологии НМИЦ здоровья детей в августе 2020 года.

При эндоскопическом обследовании в госпитализацию выявлена отечная терминальная часть подвздошной кишки с псевдополипами и с множественными язвенными дефектами на гиперемированном фоне в стадии заживления. По данным МР-энтерографии МР признаки терминального илеита, баугинита. Лабораторно повышен фибриноген до 5 г/л. С целью предотвращения развития грозных хирургических осложнений и индукции ремиссии Болезни Крона начата антицитокиновая терапия рекомбинантными моноклональными антителами к TNF – адалимумаб (Хумира®). Первая инъекция 80мг адалимумаба (2 шприц ручки) проведена 06 августа 2020 года. В дальнейшем ребенок получал плановую терапию по месту жительства.

Через 52 недели ГИБП:
Клиническая и эндоскопическая ремиссия
PCDAI – 10 баллов
Колоноскопия – Патологических изменений не выявлено. Повышено петлеобразование сигмовидной кишки

Проведена оценка содержания клеток с транслокацией NF-κB у пациента до введения адалимумаба в основных популяциях лимфоцитов. Показатели активности NF-κB были достоверно выше относительно значений группы сравнения во всех исследованных популяциях (Рисунок 3.130).

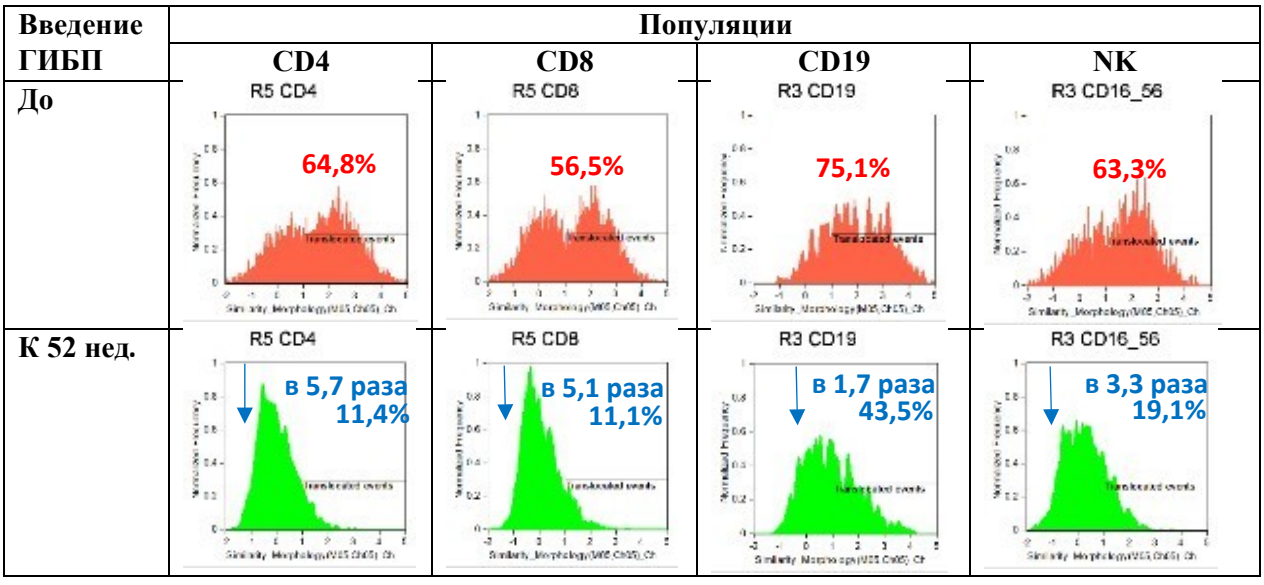


Рисунок 3.130 – Доля клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов у пациента с ВЗК до и через год терапии адалимумабом

У пациента с БК через год терапии адалимумабом на фоне снижения клинической и эндоскопической активности заболевания NF-κB снизился до показателей группы сравнения в В-лимфоцитах, в популяциях Т-клеток $CD4^+$ (в 5,7 раза) и $CD8^+$ (в 11,1 раза), а в NK-клетках (в 3,3 раза) (Рисунок 3.130).

Клинический пример №2.

Ребенок З

Возраст – 17 лет 5 месяцев
Диагноз – Рассеянный склероз, ремиттирующее течение, EDSS 1,0
Длительность заболевания (на начало терапии ПИТРС) – 4 месяца
Препарат – INFβ-1a (30 мкг в/м по 1 дозе 1 раз в 7 дней)
Анамнез:

Перинатальный анамнез не отягощен. Росла и развивалась по возрасту. Наблюдается у офтальмолога с диагнозом "Миопия средней степени обоих глаз". В декабре 2019 года онемела щека, лоб. Обратились к неврологу по месту жительства, было рекомендовано проведение МРТ головного мозга. МРТ головного мозга от декабря 2019 г.: МР-картина множественных очаговых изменений вещества головного мозга, более вероятно демиелинизирующего характера, с признаками активности процесса. Проведено исследование ЗВП (зрительные вызванные потенциалы) от 30.01.19 г.: признаки выраженного снижения проводимости по зрительным нервам и рассинхронизации проводимости. Лат. Р100 слева 117:178, справа 115:177, амплитуда Р100 в норме.

В феврале 2020 года девочка консультирована неврологом по месту жительства, выставлен диагноз "Рассеянный склероз, церебральная форма, ремиттирующий тип течения, зрительные нарушения, левосторонняя пирамидная недостаточность". Компьютерная периметрия - границы в норме, парацентральные точечные скотомы, больше справа. МРТ шейного отделения позвоночника от 06.02.2020 г.: без патологии. МРТ головного мозга с контрастным усилением от 06.02.2020 г.: картина множественного очагового поражения вещества головного мозга демиелинизирующего характера. При сравнении с результатами от декабря 2019 г.: отрицательная динамика - появление новых очагов с признаками активности процесса в правой теменной доли со слабым накоплением контраста. В НМИЦ здоровья детей

проведена инициация ПИТРС: интерферон бета-1-альфа (СинноВекс) 15 мкг в/м х 1 раз в неделю - введение 19.03.2020 г. и 26.03.2020 г. Далее рекомендовано продолжить в дозе 30 мкг в/м по 1 дозе 1 раз в неделю.

Через 52 недели ГИБП:
Клиническая ремиссия
МРТ – без отрицательной динамики

Проведена оценка NF-κB до введения INFβ-1a. Фактор транскрипции NF-κB в $CD4^+$-, $CD8^+$ Т-лимфоцитах и NK-клетках был выше относительно показателей группы сравнения, а в В-лимфоцитах в пределах возрастного диапазона (Рисунок 3.131).

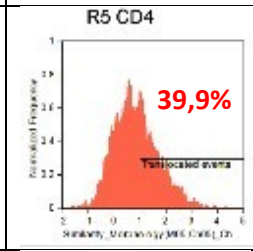
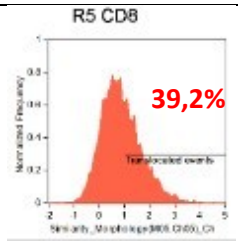
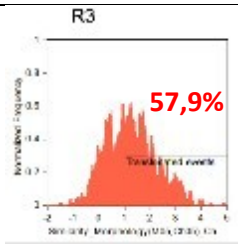
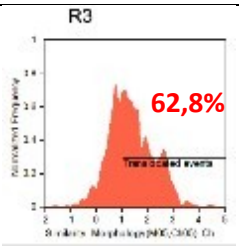
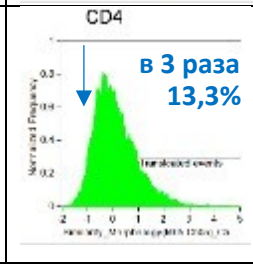
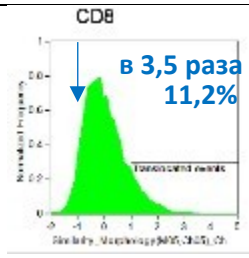
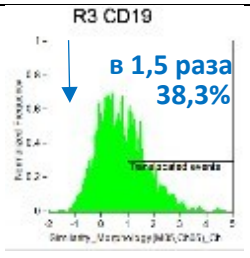
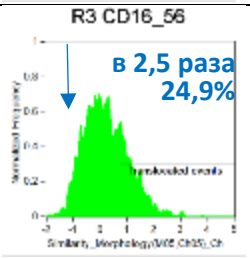
Введение ГИБП	Популяции			
	CD4	CD8	CD19	NK
До				
52 нед.				

Рисунок 3.131 – Доля клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов у пациента с РС до и через год терапии INFβ-1a

У пациента с РС к году терапии INFβ-1a на фоне клинической ремиссии и отсутствия МРТ содержание клеток с транслокацией фактора транскрипции NF-κB снизилось во всех популяциях (CD4 – в 3 раза; CD8 – в 3,5 раза; NK – в 2,5 раза) включая В-лимфоциты (в 1,5 раза).

Клинический пример №3.

Ребенок Т

Возраст – 14 лет 1 месяц
Диагноз – Распространенный псориаз, тяжелое течение, осложненный пустулизацией
PASI -25, BSA -30
Длительность заболевания – 5,5 лет
Препарат – адалимумаб в дозе 40мг/0.4мл каждые 14 дней
Анамнез:

В 2016 г. выставлен диагноз псориаз. С 2016 г. процесс имеет непрерывно-рецидивирующее течение, 3 - 4 раза в год получает лечение в стационаре. В 2016 г. получала супрессивную терапию циклоспорином в суточной дозе 100 мг в течение года. С 2017 г. получает лечение метотрексатом по схеме 10 -7,5 мг в неделю. В течение 2018 г. назначен неотигазон по схеме 25 мг через день. С 12.12.2018 г. по 26.12.2018 г. находилась на обследовании и лечении в клинике Санкт-Петербургского Педиатрического Медицинского Университета, где была проведена инициация препаратом адалимумаб (Хумира®) - 40 мг, который получает до настоящего времени.

Проведена оценка активности фактора транскрипции NF-κB до введения адалимумаба. Уровень транслокации фактора транскрипции NF-κB в $CD4^+$-, $CD8^+$

Т-лимфоцитах и в NK-клетках был выше показателей группы сравнения (Рисунок 3.132).

Через 52 недели ГИБП:
Клиническая ремиссия
PASI -5, BSA -8

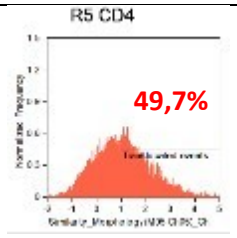
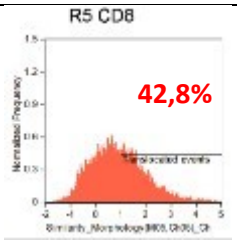
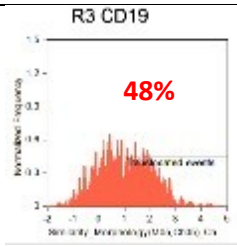
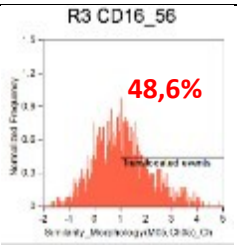
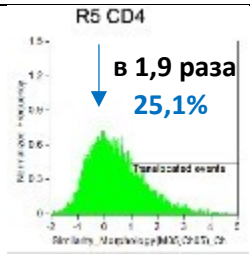
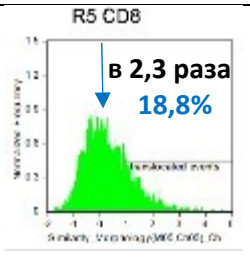
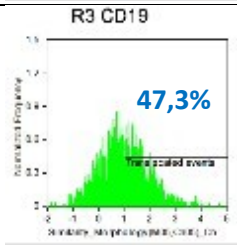
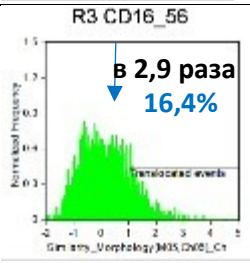
Введение ГИБП	Популяции			
	CD4	CD8	CD19	NK
До ГИБП				
К году ГИБП				

Рисунок 3.132 – Доля клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов у пациента с ПС до и через год терапии адалимумабом

К году терапии у пациента с ПС активность NF-κB снизилась до референсных значений в $CD8^+$ Т-лимфоцитах (в 2,3 раза) и NK-клетках (в 2,9 раза), в $CD4^+$ Т-клетках была выше верхней границы референсного диапазона, в В-лимфоцитах оставалась в референсном интервале как до, так и после введения ГИБП (Рисунок 3.132).

На основании клинических примеров выявлено, что у пациентов всех обследованных патологий при эффективном лечении к году терапии снижение клинической активности заболевания сопровождалось нормализацией NF-kB в популяциях CD4, CD8 и NK-клеток.

Резюме.

1. Выявлены аналогичные соотношения между популяциями лимфоцитов по содержанию клеток с транслокацией NF-κB в группе сравнения и у пациентов с ВЗК, РС и ПС независимо от активности заболевания – наибольший уровень

транслокациии ядерного фактора κB выявлен в популяции В-лимфоцитов, а наименьшее в $CD3^+$ Т-лимфоцитах.

2. Проведенное исследование показало информативность оценки фактора транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов для детей с ИЗЗ для оценки тяжести состояния пациентов и прогноза эффективности биологической терапии. Для состояния обострения характерно более высокое содержание клеток с транслокацией NF-κB в популяциях, играющих непосредственную роль в развитии воспаления при ИЗЗ, а именно в Т-хелперах и Treg – при всех патологиях, а Th17-лимфоцитах – при ВЗК и ПС.

3. Для всех обследованных патологий получены пороговые значения для разделительной модели «обострение-ремиссия» по количеству NK-клеток с транслокацией NF-κB (для ВЗК – 36%, для РС – 27%, для ПС – 29%), превышение которых позволяет прогнозировать развитие обострения заболевания. У детей с РС, помимо NK-клеток, получены пороговые значения для цитотоксических Т-лимфоцитов (25%) и популяции Tc17 клеток (29%).

4. Для пациентов с ВЗК, РС и ПС выявлены обратные корреляционные зависимости между содержанием клеток с транслокацией NF-κB и активностью митохондриальных ферментов СДГ и ГФДГ для NK-клеток и Т-лимфоцитов. Аналогичная зависимость выявлена у пациентов с РС для Т-хелперов, Т-цитотоксических, а у детей с ВЗК - для Treg и Thact.

5. У пациентов с ВЗК и ПС до начала терапии ГИБП в группе с эффективным лечением количество клеток с транслокацией NF-κB в $CD19^+$-, NK- и TNK-клетках было достоверно выше, чем в группе с недостаточно эффективным лечением.

6. В группах с эффективным лечением ГИБП уровень транслокацией ядерного фактора κB достоверно снижался через сутки после введения блокаторов TNF в основных и малых популяциях лимфоцитов (Th17, Thact, Tc17).

Материалы, изложенные в разделе 3.4 опубликованы [47, 62].

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

Несмотря на доказанную эффективность ингибиторов TNF, 20-40% пациентов, участвовавших в клинических исследованиях, не отвечают на индукционную терапию, а у 10-30% пациентов наблюдается потеря эффекта к году терапии ГИБП. В последние годы активно используется терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) ингибиторов TNF. ТЛМ – определение остаточного уровня биологических препаратов, а также антител к ним в сыворотках крови пациентов. Показано, что использование ТЛМ у взрослых пациентов с ВЗК и ПС улучшает клинические результаты. Используются 2 вида ТЛМ: проактивный – в отсутствии признаков активности заболевания после индукционного курса и в период поддерживающего курса ГИБП; реактивный – при активном воспалительном процессе, подтвержденном анализами крови и функциональными методами на любом этапе лечения (эндоскопическое исследование при ВЗК).

Сравнительный анализ методов определения концентрации блокаторов TNF в сыворотках крови у пациентов с ВЗК

В нашем исследовании проведена оценка остаточного уровня блокаторов TNF и антител к ним в период индукционного и поддерживающего курсов. Проведено сравнение определения остаточного уровня блокаторов TNF (адалимумаб, инфликсимаб) в сыворотках пациентов с ВЗК с помощью двух методов ИФА: методом накопления сывороток (одномоментное определение 40 образцов в дублях) и экспресс-тестом, позволяющим определять концентрацию в одном образце (Рисунок 3.133).

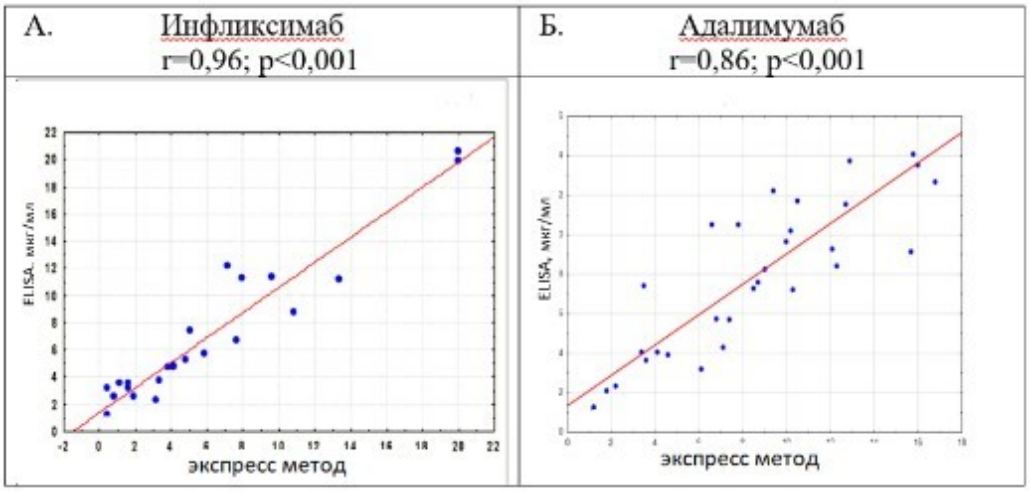


Рисунок 3.133 - Корреляционные зависимости между классическим ИФА и экспресс-методом для определения концентрации инфликсимаба (А) и адалимумаба (Б) в сыворотках крови пациентов с ВЗК

Сопоставление результатов определения концентрации IFX/ADA двух методов выявило высокую достоверную корреляцию между показателями как для инфликсимаба – r=0,96 (Рисунок 3.133А), так и для адалимумаба – r=0,86 (Рисунок 3.133Б). Полученные результаты, после согласования с ЛЭК, позволили ввести экспресс-тест по определению остаточного уровня блокаторов TNF в клиническую практику Центра воспалительных заболеваний кишечника у детей ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», что существенно ускорило диагностику наличия антител и остаточного уровня и позволило врачам-гастроэнтерологам объективно принимать решение по дальнейшему ведению пациента и своевременной коррекции дозы, кратности ГИБП.

Оценка остаточного уровня IFX и ADA после индукционного курса у пациентов с ВЗК

Остаточный уровень IFX по окончанию индукционного курса и в период поддерживающего курса у детей с БК (n=139) составил 4,73 (1,28;7,0) мкг/мл, у детей с ЯК (n=88) - 2,01 (1,0;9,39) мкг/мл, при этом достоверной разницы между пациентами с БК и ЯК выявлено не было (p<0,526). У детей с БК (n=158) остаточный уровень ADA составил 14,9 (5,7;15,2) мкг/мл, у детей с ЯК (n=101) 12,7 (4,7;19) мкг/мл, при этом достоверной разницы также выявлено не было.

Оценка остаточного уровня IFX и ADA у пациентов с ВЗК в период поддерживающего курса.

Во время поддерживающего курса у детей с ВЗК выявлено, что остаточный уровень IFX и ADA в состоянии ремиссии достоверно превышал уровень препаратов в крови детей в состоянии обострения заболевания (Таблица 3.102).

Таблица 3.102 – Остаточный уровень блокаторов TNF в период поддерживающего курса у детей с ВЗК в зависимости от состояния обострение/ремиссия

Состояние / Препарат	Клиническое обострение	Клиническая ремиссия	Уровень достоверности (p)
IFX, мкг/мл	0,67 (0,36;2,54)	3,07 (1,05;5,78)	0,002
ADA, мкг/мл	5,85 (3,39;9,7)	13,25 (10,3;15,7)	<0,001

Анализ показателей остаточного уровня IFX и ADA у детей с ВЗК показал, что недостаточный терапевтический уровень IFX (менее 3 мкг/мл) был выявлен у 64% пациентов, а недостаточный терапевтический уровень ADA (менее 5 мкг/мл) в 46% случаев (Рисунок 3.134).

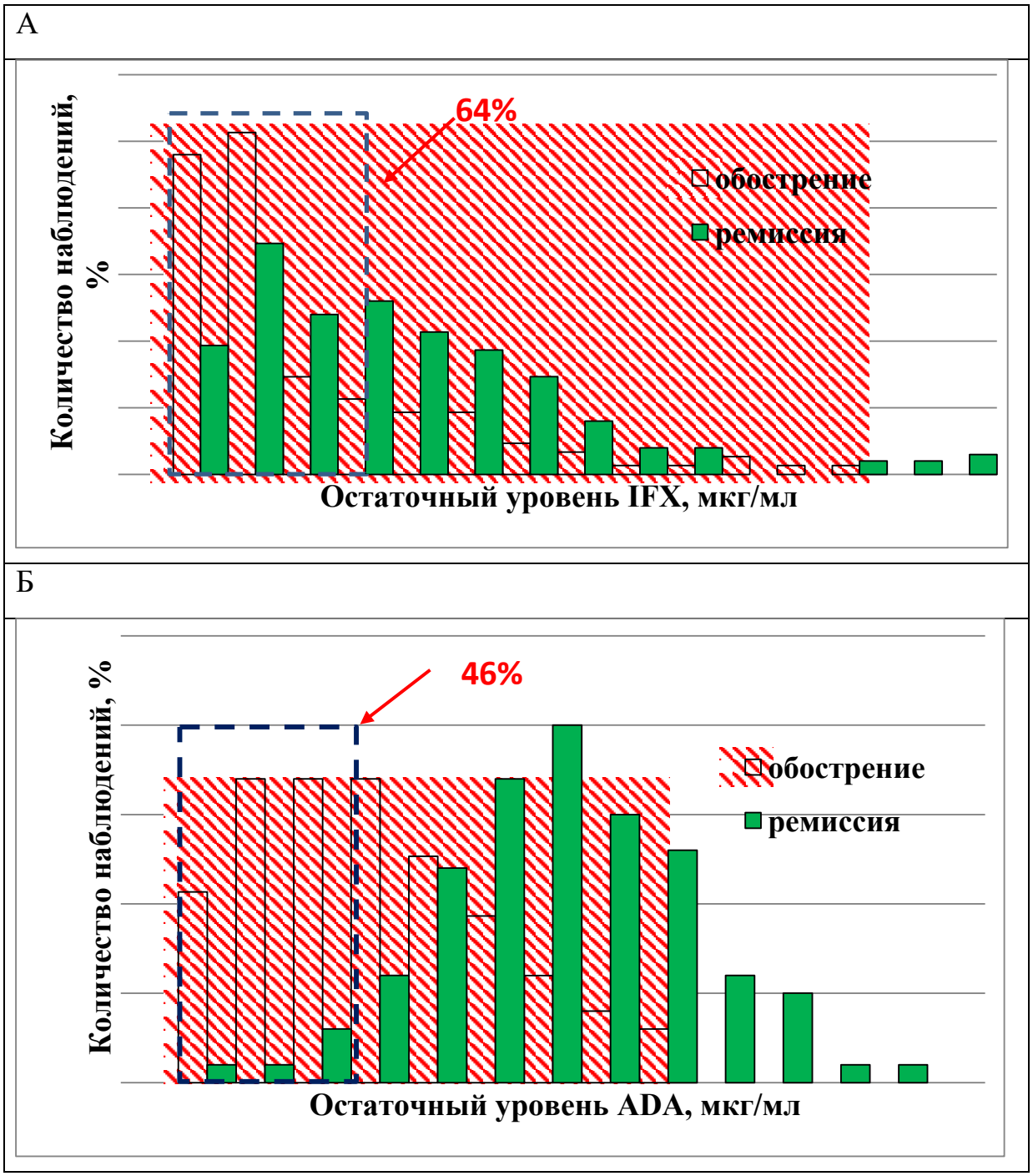
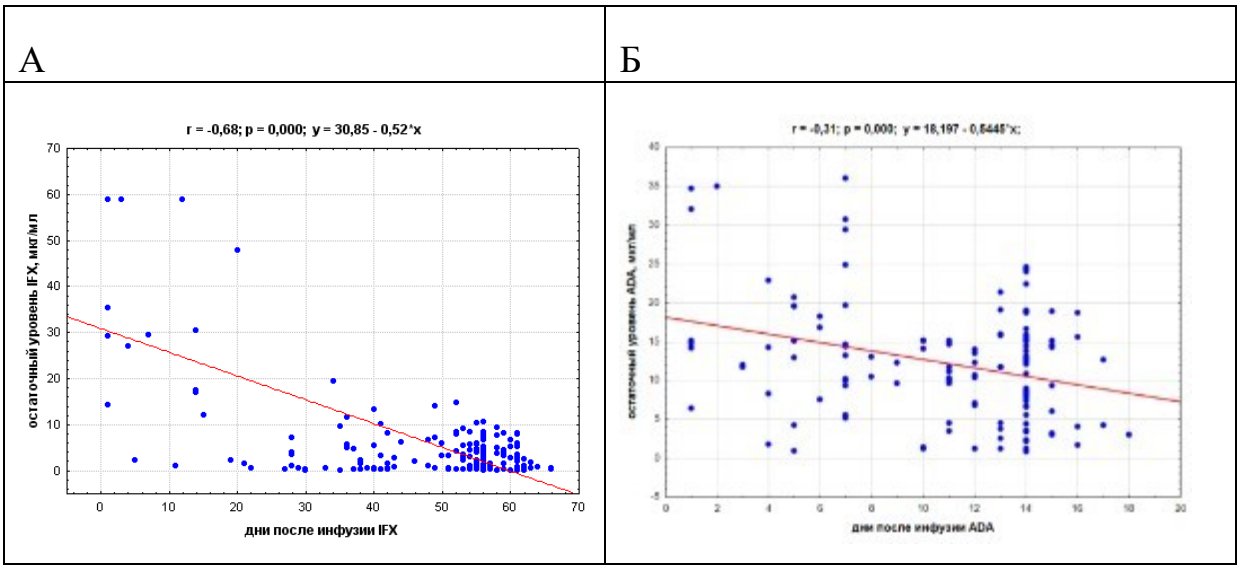


Рисунок 3.134 – Распределение уровня концентрации остаточного уровня инфликсимаба (А) и адалимумаба (Б) у пациентов с ВЗК в состоянии обострения/ремиссии в сыворотках крови

В состоянии обострения низкий остаточный уровень наблюдался у 77% детей при лечении IFX и у 40% детей на ADA. При этом, частота встречаемости низкого остаточного уровня препаратов у пациентов в обострении была выше, чем у

пациентов в состоянии ремиссии как для IFX (48% пациентов), так и ADA (3% пациентов).

Сравнение остаточного уровня IFX во время поддерживающего курса у пациентов с ВЗК показало, что у пациентов с БК уровень IFX достоверно превышал уровень данного показателя у детей с ЯК (3,75 (1,83;6,08) мкг/мл против 2,36 (0,4;5,20) мкг/мл, p=0,045) соответственно. В то же время, остаточный уровень ADA во время поддерживающего курса достоверно не отличался у пациентов с БК и ЯК и составлял соответственно: 11,2 (5,6; 15,2) мкг/мл против 11,7 (7,1; 15,2) мкг/мл, p=0,678. Выявлена обратная зависимость между остаточным уровнем препарата и количеством дней после его введения как для IFX, так и для ADA (r=-0,68, p<0,001; r=-0,31, p<0,001) соответственно (Рисунок 3.135). В связи с этим, необходимо строго соблюдать сроки введения блокаторов TNF, и определять остаточный уровень препаратов непосредственно перед введением.



Примечание: А – для инфликсимаба; Б – для адалимумаба

Рисунок 3.135 – Зависимость концентрации блокаторов TNF в сыворотке крови детей с ВЗК от количества дней после введения препаратов

Оценка уровня антител к блокаторам TNF у пациентов с ВЗК

Антилекарственные антитела (АЛА) к IFX были обнаружены в 28% случаях у пациентов с ВЗК, при этом остаточный уровень препарата у этих пациентов был низким и составлял – 0,53 (0,25; 2,44) мкг/мл. Антитела к IFX были обнаружены в группах пациентов с обострением и с ремиссией заболевания: 27,3%±0,68 (18 пациентов) против 5,8%±0,45 (3 пациента), p <0,001, но частота встречаемости

АЛА при обострении заболевания была выше (Таблица 3.103).

Таблица 3.103 – Антилекарственные антитела и остаточный уровень блокаторов TNF (инфликсимаб, адалимумаб) у пациентов с ВЗК

Препарат / Показатель	IFX		ADA	
	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия
Кол-во пациентов с АЛА	27,3%	5,8%	12,5%	-
анти-TNF, мкг/мл	0,39	7,1	2,57	13,2

Остаточный уровень IFX у пациентов с АЛА в состоянии ремиссии был выше 7 мкг/мл, в то время как в группе детей в состоянии обострения был ниже терапевтического уровня и составлял 0,39 (0,12; 2,04) мкг/мл. Антитела к ADA у детей с ВЗК были обнаружены в 12,5% случаев в состоянии обострения с низким остаточным уровнем препарата – 2,57±0,45 мкг/мл. У пациентов с ВЗК, при лечении ADA, в состоянии ремиссии АЛА не выявлены (Таблица 3.103).

Оценка уровня остаточного уровня IFX/ADA и антител к блокаторам TNF при использовании комбинированной терапии

Комбинированную терапию IFX с дополнительным препаратом для иммуносупрессии - азатиоприном (AZA) получали: 82% детей с БК, 74% детей с ЯК. Комбинированную терапию ADA и AZA получали: 37% детей с БК, 63% детей с ЯК. В группах пациентов с БК на комбинированной терапии (IFX+AZA) и группах пациентов с БК и ЯК на комбинированной терапии (ADA+AZA) не было получено достоверной разницы по остаточному уровню блокаторов TNF в сыворотке крови с группами детей на монотерапии IFX или ADA. У пациентов с ЯК на комбинированной терапии (IFX + AZA) остаточный уровень препарата был 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. Анализ антител к IFX показал, что в группе с комбинированной терапией антитела к препарату выявлялись в меньшем проценте случаев (11%), чем при монотерапии IFX (в 67% случаев); p=0,003.

Определение пороговых значений для остаточного уровня IFX у пациентов с ВЗК, необходимого для достижения клинической ремиссии

ROC-анализ выявил хорошее качество разделительной модели состояний «обострение-ремиссия» (AUC=0,86) для остаточного уровня IFX у пациентов с ВЗК после проведения индукционного курса (перед первой поддерживающей инфузией). Получен пороговый уровень 3 мкг/мл, ниже которого можно прогнозировать развитие обострения заболевания и потери эффекта от терапии (Se – 75%, Sp – 79%). Также с помощью ROC-анализа получено хорошее качество в модели «достижение/ недостижение клинической ремиссии к году терапии» по остаточному уровню IFX перед первой поддерживающей инфузией (AUC=0,83). Показатель “cut-off” остаточного уровня IFX на 14 неделе, ассоциированный с наличием клинической ремиссии через 1 год терапии составил 4,7 мкг/мл.

В результате проведенного ROC анализа остаточного уровня IFX у пациентов с БК и ЯК в период поддерживающего курса было получено хорошее качество разделительной модели для состояний обострение-ремиссия, как для детей с БК (AUC=0,812), так и у детей с ЯК (AUC=0,851) (Рисунок 3.136).

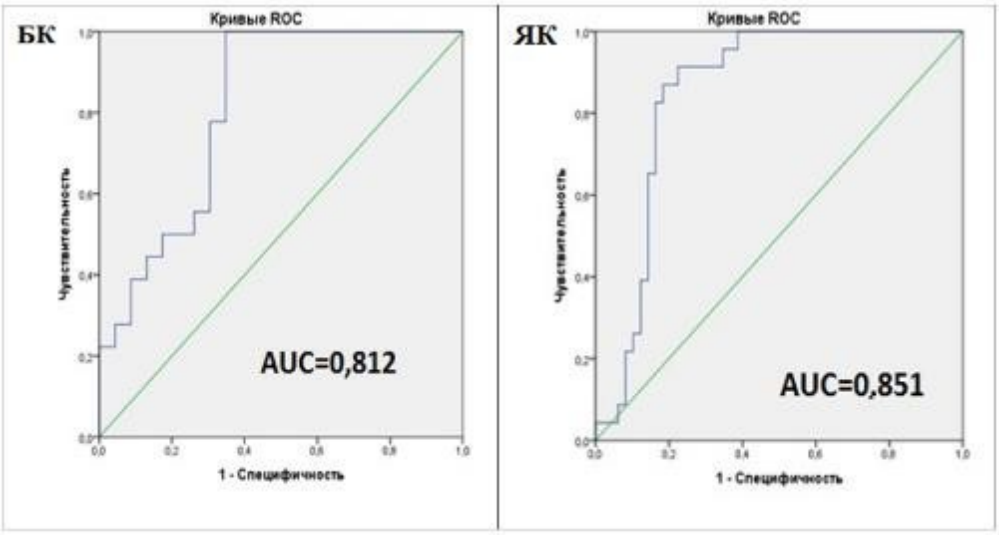


Рисунок 3.136 – ROC-кривые остаточного уровня IFX для пациентов с БК и ЯК в период поддерживающего курса для состояний обострения и ремиссии

Уровень “cut-off” при БК для остаточного уровня IFX составил 3,7 мкг/мл (Se – 72%, Sp – 70%). При уровне ниже 2,8 мкг/мл (Se – 100%, Sp – 65%) наиболее

вероятным является клиническое обострение заболевания, а при уровне выше 4,9 мкг/мл (Se – 54%, Sp – 83%) можно прогнозировать клиническую ремиссию.

Пороговый уровень остаточного IFX у пациентов с ЯК при оптимальном соотношении чувствительности и специфичности составил 3,4 мкг/мл (Se – 83%, Sp – 82%). При остаточном уровне IFX ниже 2,9 мкг/мл (Se – 91%, Sp – 78%) можно прогнозировать обострение заболевания, а при уровне выше 4,5 мкг/мл (Se – 65%, Sp - 86%) - состояние клинической ремиссии.

Определение пороговых значений для остаточного уровня ADA у пациентов с ВЗК

Для пациентов, находящихся при лечении ADA, оценивали состояние не только клинической, но и эндоскопической ремиссии. При проведении ROC анализа получено хорошее качество разделительной модели состояний “обострение – ремиссия” у детей с БК (AUC=0,890) и ЯК (AUC=0,845), а также для эндоскопической ремиссии у пациентов с БК (AUC=0,871) и ЯК (AUC=0,821). Определение уровней «cut-off» остаточной концентрации ADA выявило более высокие значения для достижения эндоскопической ремиссии, чем для клинической ремиссии у детей с БК и ЯК (Таблица 3.104).

Таблица 3.104 – Пороговые значения ADA в сыворотки крови у детей с БК и ЯК при клинической и эндоскопической ремиссии

Состояние, патология, масса тела	«cut-off» ADA, мкг/мл	Se, %	Sp, %
БК			
Клиническая ремиссия у детей с массой тела ≥40 кг	8,1	100	76
Клиническая ремиссия у детей с массой тела <40 кг	13,1	86	75
Эндоскопическая ремиссия у детей с массой тела ≥40 кг	10,5	100	67
Эндоскопическая ремиссия у детей с массой тела <40 кг	14,2	75	71
ЯК			
Клиническая ремиссия у детей у детей с массой тела ≥40 кг	11,1	75	71
Клиническая ремиссия у детей с массой тела <40 кг	11,8	86	80
Эндоскопическая ремиссия у детей у детей с массой тела ≥40 кг	11,9	83	69
Эндоскопическая ремиссия у детей с массой тела <40 кг	13,1	100	100

Кроме того, у детей с ЯК значения остаточного уровня ADA превышали уровни показателей при БК. При этом, для детей с массой тела менее 40 кг уровни «cut-off» были выше для клинической и эндоскопической ремиссии, как для БК, так и ЯК (Таблица 3.98).

Применение терапевтического лекарственного мониторинга IFX для оптимизации терапии у детей с ВЗК

Проактивный терапевтический мониторинг IFX сразу после индукционного курса терапии выявил низкий остаточный уровень препарата у 23% детей с отсутствием эффекта от терапии, которым в последующем была проведена замена на другой биологический препарат. Анализ показателей остаточного уровня у пациентов с ВЗК (72 ребенка) на поддерживающей терапии IFX показал, что 56% пациентам (40 детей) потребовалась коррекция терапии (Таблица 3.105).

Таблица 3.105 – Коррекция терапии у пациентов с ВЗК в период поддерживающего курса IFX

Причина коррекции	Количество пациентов	Коррекция
Отсутствие ремиссии (низкий остаточный уровень IFX при отсутствии антител к IFX)	5 (12,5 %)	Сокращен интервал введения IFX
	4 (10 %)	Эскалация дозы IFX
	7 (17,5 %)	Эскалации дозы IFX и сокращение интервала введения препарата
	6 (15 %)	Эскалация доза IFX и сокращение интервала без эффекта с последующим «переключением» на другой биологический препарат
Отсутствие ремиссии (нормальный остаточный уровень IFX)	3 (7,5 %)	Добавлены глюкокортикостероиды (ГКС) и/или AZA
Отсутствие ремиссии (низкий остаточный уровень IFX и наличие антител к IFX)	6 (15 %)	Эскалация дозы IFX с положительным эффектом
	5 (12,5 %)	Эскалация дозы IFX без эффекта с последующим «переключение» на другой биологический препарат
Ремиссия (высокий остаточный уровень IFX)	4 (10 %)	Расширение интервала введения IFX и/или снижение дозы препарата

В 55 % случаев причиной коррекции был недостаточный уровень блокатора TNF без наличия антител к IFX в сыворотке крови, а в 28 % случаев – низкий уровень IFX с АЛА У большинства пациентов увеличение дозы препарата,

изменение интервала введения привело к положительному эффекту. В 28 % случаев потребовалась смена препарата (Таблица 3.99).

Проактивный мониторинг во время поддерживающего курса проводился 50 пациентам при лечении IFX. При этом недостаточная эффективность терапии выявлена у 14 (58%) пациентов, а у 10 (42%) пациентов была достигнута и сохранялась ремиссия на фоне лечения IFX.

Реактивный ТЛМ (при обострении заболевания) проводился у 22 пациентов, получавших IFX: 17 пациентам (75%) потребовалась смена терапии в связи с неэффективностью, а у 5 пациентов (25%) была проведена коррекции дозы IFX с достижением в последующем ремиссии заболевания.

Применение терапевтического лекарственного мониторинга ADA для оптимизации терапии у детей с ВЗК

Проактивный мониторинг был проведен у 65 пациентов, получавших ADA. При этом неэффективность терапии отмечалась в 46% случаев, а в 54% случаев была достигнута стойкая ремиссия.

Реактивный ТЛМ был проведен у 9 детей, получавших ADA, 7 пациентам (78%) потребовалось «переключение» на другой биологический препарат в связи с неэффективностью. Только у 2 пациентов (22%) удалось достичь ремиссии заболевания после эскалации дозы ADA.

У 22 обследованных детей (30%), получавших ADA, потребовалась коррекция лечения на основании ТЛМ (Таблица 3.106).

Таблица 3.106 – Коррекция терапии у пациентов с ВЗК в период поддерживающего курса ADA

Причина коррекции	Количество пациентов	Коррекция
Отсутствие ремиссии (нормальный остаточный уровень ADA)	3 (13,6 %)	Добавлены глюкокортикостероиды (ГКС) и/или AZA
Отсутствие ремиссии (низкий остаточный уровень ADA) при отсутствии антител к ADA	10 (45,5 %)	Сокращение интервала введения ADA с достижением терапевтического уровня препарата и состояния ремиссии
	3 (13,6 %)	«Переключение» на другой биологический препарат
Отсутствие ремиссии (низкий остаточный уровень ADA) и наличие антител к ADA	4 (18,2 %)	«Переключение» на другой биологический препарат
Ремиссия (высокий остаточный уровень ADA)	2 (9,1 %)	Расширение интервала введения ADA или снижение дозы ADA

При эмпирическом подборе дозы IFX и ADA у пациентов был выявлен достоверно более низкий остаточный уровень по сравнению с детьми, у которых коррекция дозы проводилась с учетом ТЛМ (Таблица 3.107).

Таблица 3.107 – Остаточный уровень IFX/ADA у пациентов с ВЗК при терапии IFX при эмпирическом подборе дозы и с помощью ТЛМ в период поддерживающего курса

Препарат	Эмпирический подбор	На основании ТЛМ
IFX, мкг/мл	1,9 (0; 3,4)	3,1 (0,4; 5,8)*
ADA, мкг/мл	4,1 (3,1; 15,0)	13,6 (7,6; 15,27)*
Примечание: * – $p<0,05$ между эмпирическим подбором и ТЛМ для IFX и ADA		

В большинстве случаев у пациентов с ВЗК на основании ТЛМ проведенная коррекция терапии позволила достичь состояния ремиссии: у 72 % при лечении IFX, у 63 % пациентов при лечении ADA. В то же время, анализ эффективности у пациентов без ТЛМ выявил достижение ремиссии к году терапии на IFX только в 21%, а на ADA – в 37% случаев.

Таким образом, использование проактивного и реактивного ТЛМ позволяет оптимизировать терапию у пациентов с ВЗК, а именно, провести коррекцию дозы

при низких концентрациях блокатора TNF или смену препарата ввиду другого патогенетического механизма (высокий остаточный уровень препарата в крови при наличии высокой степени активности по клинико-лабораторным и эндоскопическим данным).

Распределение пациентов с ПС по остаточному уровню ADA в сыворотке крови

У пациентов с ПС (n=39), находящихся при лечении ADA, в период поддерживающего курса терапии было проанализировано распределение по остаточному уровню ADA (Рисунок 3.137).

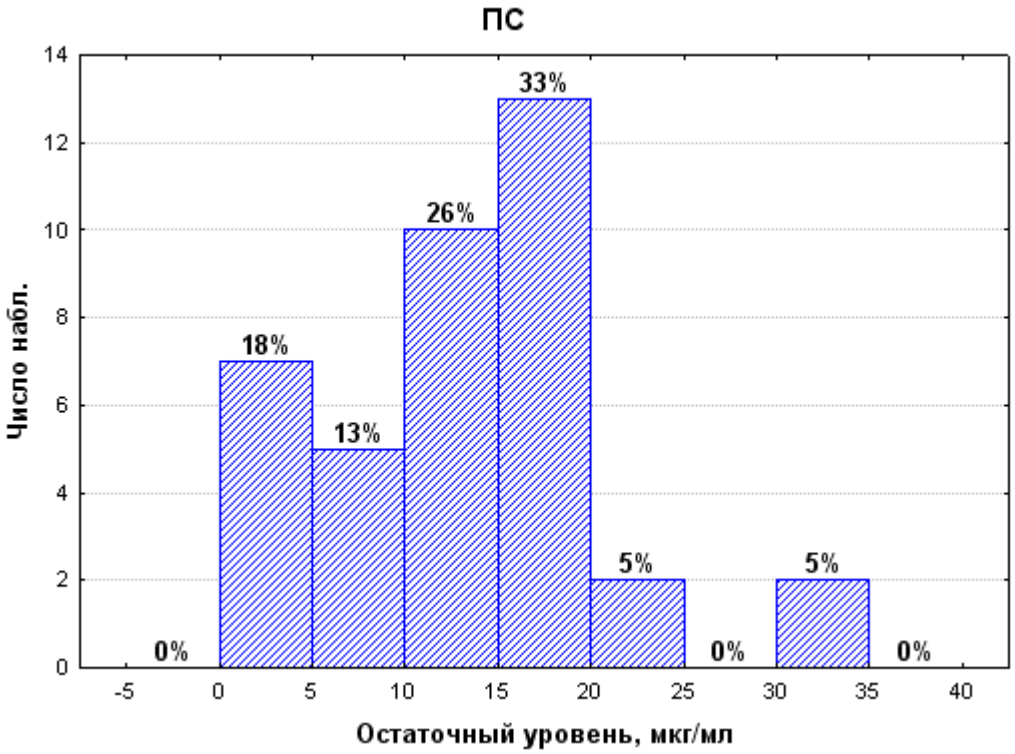


Рисунок 3.137 – Распределение пациентов с ПС по остаточному уровню адалимумаба

У 31% пациентов с псориазом остаточный уровень ADA был менее 10 мкг/мл. При этом антилекарственные антитела были выявлены только у 1 пациента. Так как, в национальных клинических рекомендациях по лечению псориаза у детей нет указаний на необходимый терапевтический уровень препарата в сыворотке крови, то дальнейший анализ данных основывался на достижении и недостижение PASI75 к году терапии.

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 – Me – 13,2 (5,1-16,3) мкг/мл против 18,2 (1,24-20,6) мкг/мл, p=0,015 соответственно (Рисунок 3.138).

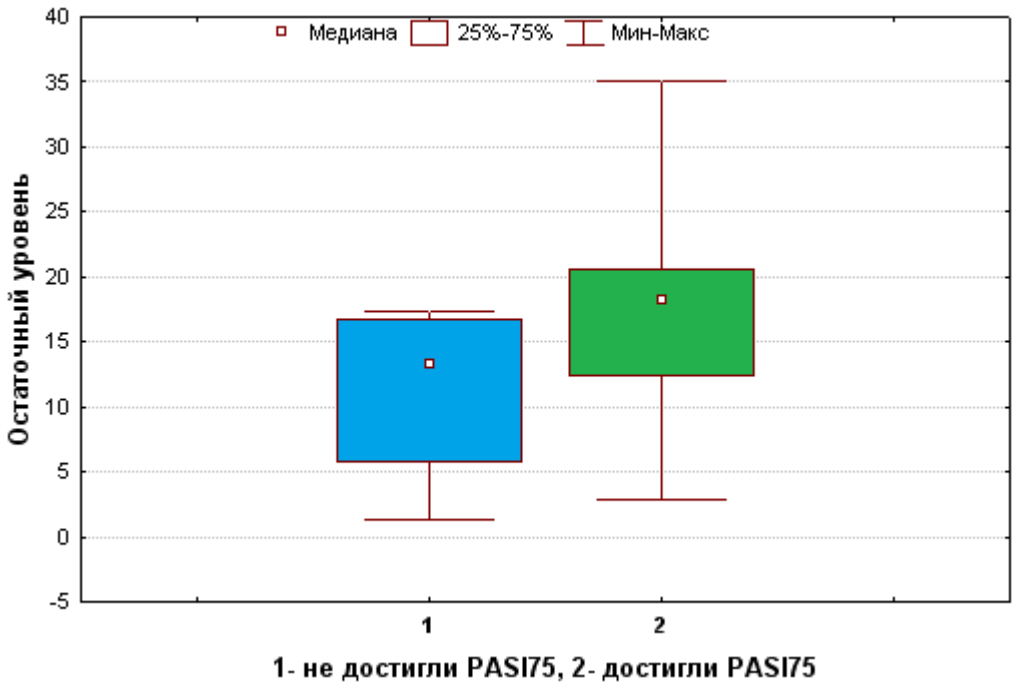


Рисунок 3.138 – Остаточный уровень адалимумаба у пациентов с ПС в зависимости от достижения PASI 75

Частотное распределение в группах по остаточному уровню ADA также показало, что кривая группы с достижением PASI 75 сдвинута в сторону большего уровня препарата относительно группы с недостижением PASI 75 (Рисунок 3.139).

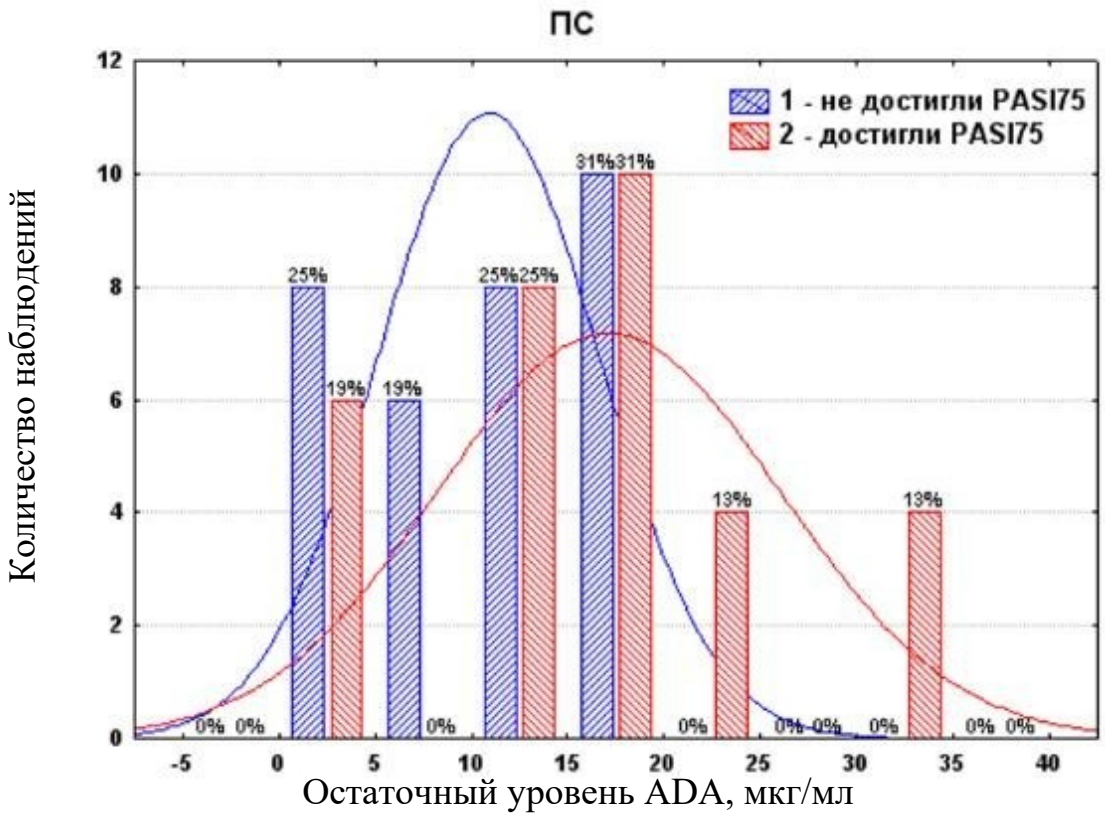


Рисунок 3.139 – Распределение пациентов с ПС в зависимости от концентрации остаточного уровня инфликсимаба (А) и адалимумаба (Б) в сыворотках крови

Таким образом, в группе пациентов с ПС с достижением PASI 75 остаточный уровень ADA в сыворотках крови был выше, чем в группе пациентов, у которых не было достижения PASI 75.

Резюме.

1. Получена высокая корреляционная зависимость между классическим ИФА тестом и экспресс-тестом для определения остаточного уровня блокаторов TNF (инфликсимаб/адалимумаб).

2. Экспресс-тест для определения остаточного уровня блокаторов TNF (инфликсимаб/адалимумаб) внедрен в клиническую практику для оценки состояния пациентов с ВЗК.

3. Остаточный уровень IFX и ADA в состоянии ремиссии у детей с БК и ЯК достоверно выше, чем при обострении заболевания.

4. Остаточный уровень IFX во время поддерживающего курса у пациентов с БК достоверно выше, чем у детей с ЯК.

5. Во время поддерживающего курса получена обратная зависимость между остаточным уровнем IFX/ADA и количеством дней после введения препарата, в связи с этим необходимо строго придерживаться сроков введения биологических препаратов и оценивать остаточный уровень до очередного введения ГИБП.

6. Антилекарственные антитела к IFX обнаруживаются в 28% случаях, а к ADA у 12% пациентов в обострении ВЗК.

7. вероятность образования антилекарственных антител при комбинированной терапии (IFX и азатиоприн) ниже, чем при монотерапии IFX.

8. Для пациентов с БК и ЯК получены пороговые уровни IFX, ниже которых можно прогнозировать развитие клинического обострения: для БК – 2,8 мкг/мл, для пациентов с ЯК – 2,9 мкг/мл.

9. В состоянии клинической ремиссии пациенты с ЯК имеют достоверно более высокие значения остаточного уровня ADA, чем пациенты с БК.

10. У пациентов с БК и ЯК для достижения эндоскопической ремиссии требуются значимо более высокие уровни остаточного уровня ADA, чем для достижения клинической ремиссии.

11. У детей с БК и ЯК с массой тела менее 40 кг пороговые значения для остаточного уровня ADA для достижения клинической и эндоскопической ремиссии значимо выше, чем для детей с массой тела более 40 кг.

12. При эмпирическом подборе дозы IFX/ADA у пациентов выявлен достоверно более низкий остаточный уровень препарата, чем у детей с коррекцией дозы препарата с учетом терапевтического лекарственного мониторинга.

13. В группе пациентов ПС не достигших PASI75 к году терапии остаточный уровень ADA в период поддерживающего курса достоверно ниже, чем в группе пациентов, достигших PASI75.

Материалы, изложенные в разделе 3.5 опубликованы [21, 22, 64, 65].

3.6. Выживаемость биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями

Накопленный опыт применения ГИБП у детей с ИЗЗ позволяет сделать вывод об успешности этого вида терапии. Однако, потеря эффекта у части пациентов, а также вторичная неотвечаемость (потеря эффекта во время поддерживающего курса ГИБП) инициируют исследования по оценке эффективности и выживаемости биологической терапии. Выживаемость биологической терапии (ВБТ) – отрезок времени от момента начала применения генно-инженерных биологических препаратов до отмены или смены класса ГИБП по каким-либо причинам. Показатель ВБТ отражает эффективность терапии и приемлемость для пациента и врача.

Основная цель данной главы - анализ выживаемости ГИБП у пациентов с ВЗК, ПС и РС в зависимости от используемого препарата, от наличия комбинированной терапии, возраста пациентов и иммунологических показателей. Клинико-анамнестические данные обследованных пациентов представлены в Таблице 3.108.

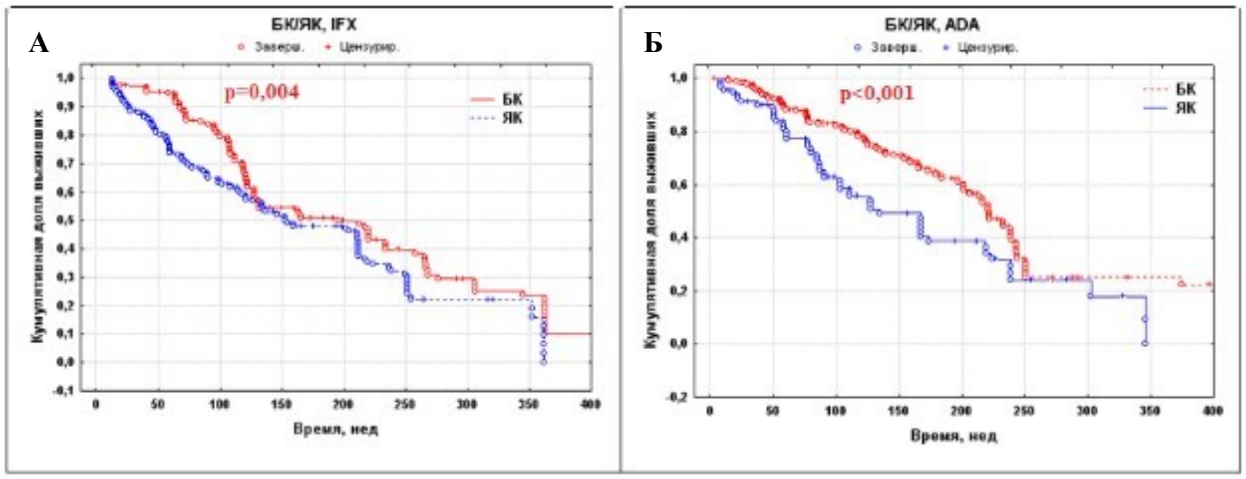
Таблица 3.108 – Клинико-анамнестические данные пациентов с ИЗЗ при исследовании выживаемости ГИБП

Патология	БК	ЯК	ПС	РС
Количество пациентов	117	83	87	96
Количество наблюдений	583	334	210	269
Возраст, лет Me (Q_{25}–Q_{75})	14 10,8 – 15,8	12,1 7,1-15,5	10,8 7,7-14,3	15,9 14,7-17,2
ГИБП	IFX/ ADA		ADA	INFβ-1a
Длительность заболевания, лет	IFX		5 (3-8)	1,7 (0,9-3,4)
	3,8 (2,6 – 5,7)	3,5 (1,9-6,5)		
	ADA			
	4 (2,3 – 6,4)	3,9 (2,5-6,0)		
Длительность терапии, нед	IFX		44 (14-92)	59 (21-129)
	44 (7 - 93)	36 (14-80)		
	ADA			
	53 (26 – 112)	38 (19-95)		

3.6.1. Выживаемость блокаторов TNF у детей с ВЗК

Сравнение кривых выживаемости ГИБП у пациентов с БК и ЯК

На первом этапе были проанализированы кривые выживаемости Каплана-Майера у пациентов с БК и ЯК в группах, получавших IFX (Рисунок 3.140А). Аналогичный анализ был сделан для пациентов с БК и ЯК при лечении ADA (Рисунок 3.140Б).



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

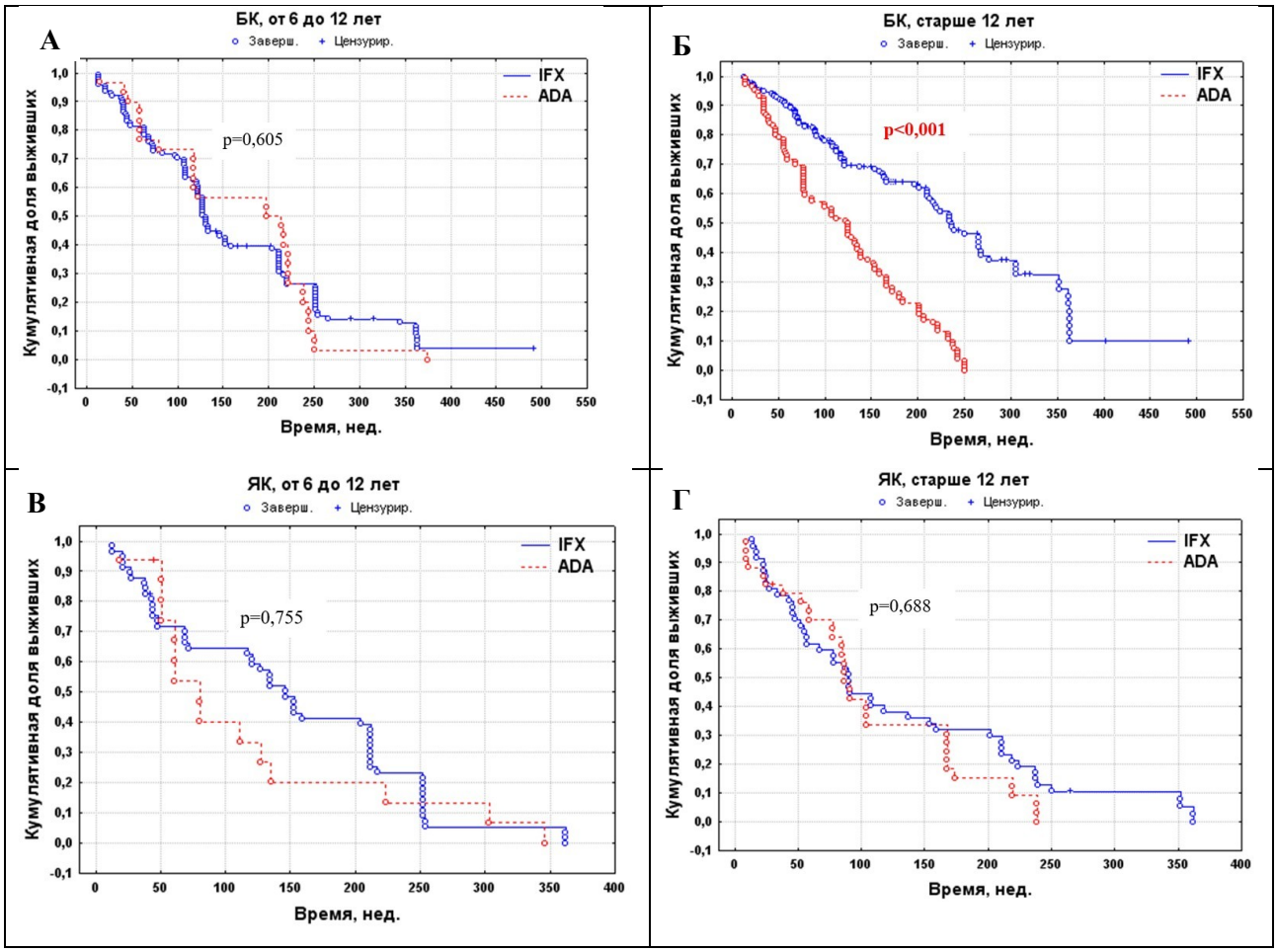
Рисунок 3.140 – Кривые выживаемости Каплана-Майера у пациентов БК и ЯК, получавших блокаторы IFX (А) и ADA (Б)

Выявлены достоверные различия между ВБТ у пациентов с БК и ЯК при лечении IFX и терапии ADA (Рисунок 3.140*)*. Средняя выживаемость при лечении IFX у пациентов с БК и ЯК составила соответственно: 161,0±7,4 недель и 135,0±6,7 недель (Рисунок 3.140А). Средняя выживаемость при лечении ADA у пациентов с БК и ЯК составила: 134,0±4,5 недель и 117,7 ±9,1 недель соответственно (Рисунок 3.140Б).

Таким образом, было получено, что средняя ВБТ у детей с БК значимо больше, чем у детей с ЯК и составляет в среднем при лечении IFX 26 недель, а при лечении ADA – 17 недель.

Сравнение кривых выживаемости при лечении IFX и ADA

Как для детей с БК, так и с ЯК в возрастной группе от 6 до 12 лет достоверных различий ВБТ между IFX и ADA выявлено не было (Рисунок 3.141А, Рисунок 3.141В).



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

Рисунок 3.141 – Кривые выживаемости Каплана-Майера IFX и ADA у пациентов с БК в группе от 6 до 12 лет (А), старше 12 лет (Б) и ЯК в группе от 6 до 12 лет (В), старше 12 лет (Г)

У пациентов с БК в группе детей старше 12 лет получены достоверно большие значения ВБТ при лечении IFX по сравнению с ADA: средняя ВБТ на IFX на 36 недель больше, чем при лечении ADA (Рисунок 3.141Б). Сравнение кривых выживаемости IFX и ADA для ЯК в этом возрастном диапазоне различий не выявило (Рисунок 3.141Г, Таблица 3.109).

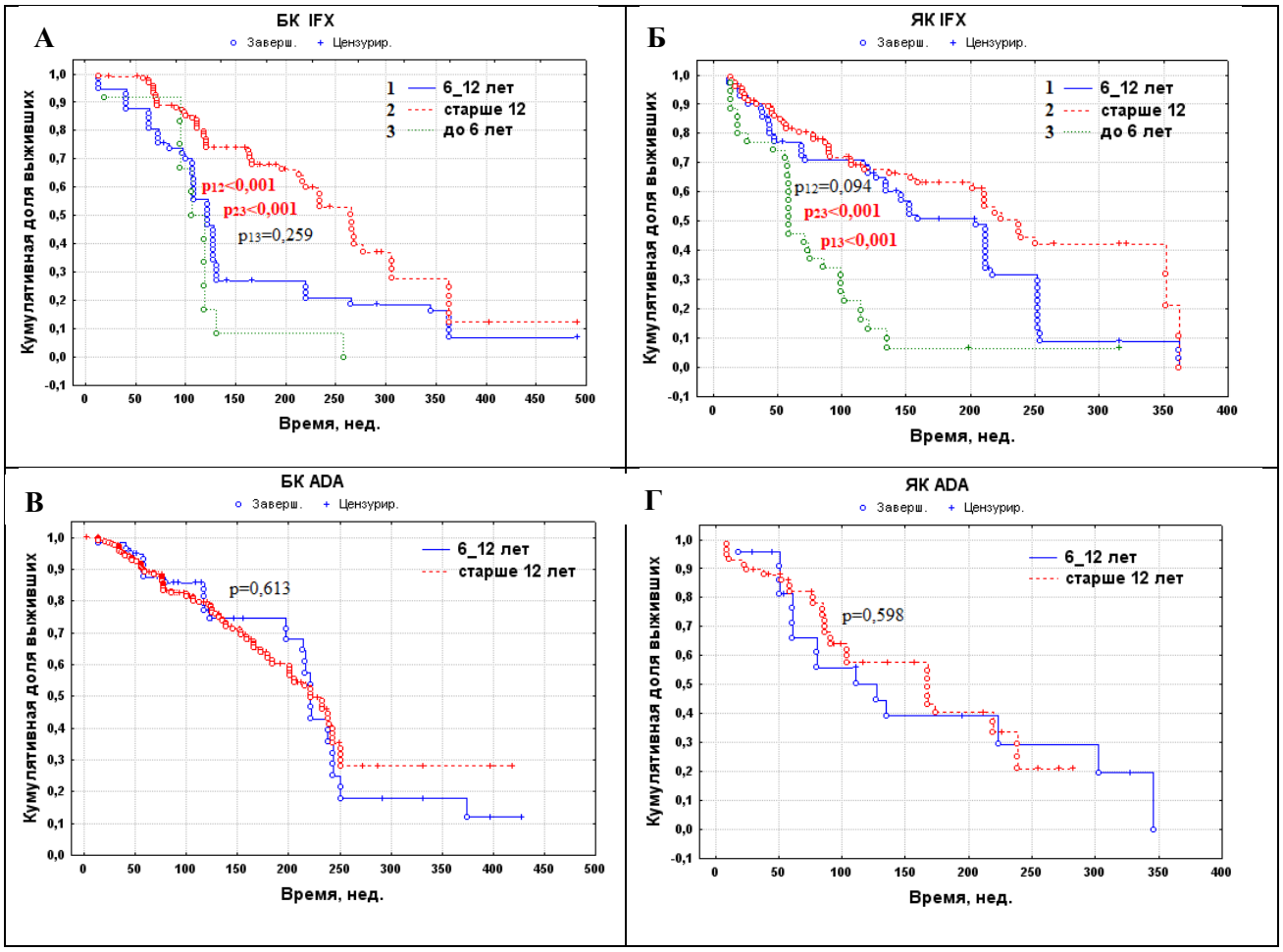
Таблица 3.109 – Средняя выживаемость при терапии (IFX/ADA) у пациентов с БК и ЯК в разных возрастных группах (M±m)

Группы/Возраст	IFX	ADA
БК		
6 12 лет	154,1±9,5 n=125	167,3±16,1 n=36
Старше 12 лет	158,7±7 n=211	123,2±7,1 n=106
ЯК		
6-12 лет	146,9±13 n=57	112,9±19 n=26
Старше 12 лет	127,9±15,2 n=47	104,9±12,5 n=34
Примечание: M – среднее значение; m – ошибка среднего		

Таким образом, при сравнении кривых выживаемости между IFX и ADA у детей с БК и ЯК выявлена разница только для детей с БК старше 12 лет. Для детей от 6 до 12 лет как с БК, так и ЯК достоверной разницы между препаратами по ВБТ выявлено не было.

Сравнение кривых выживаемости при лечении IFX и ADA в разных возрастных группах

Сравнение ВБТ у пациентов с БК при лечении IFX показало достоверные отличия между группами пациентов в возрасте от 6-12 лет и старше 12 лет, а также между группой старше 12 лет и пациентами младше 6 лет (Рисунок 3.142А).



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

Рисунок 3.142 - Кривые выживаемости Каплана- Майера у детей с БК (А) и ЯК (Б) при терапии IFX, у детей с БК (В) и ЯК (Г) при терапии ADA в разных возрастных группах

При этом, наибольшая выживаемость IFX наблюдалась у пациентов старше 12 лет (среднее значение – 169,1 недель), а наименьшая - в группе младше 6 лет (среднее значение – 115,1 недель) (Таблица 3.110).

Таблица 3.110 – Выживаемость терапии IFX/ADA у пациентов с БК и ЯК в разных возрастных группах (M±m)

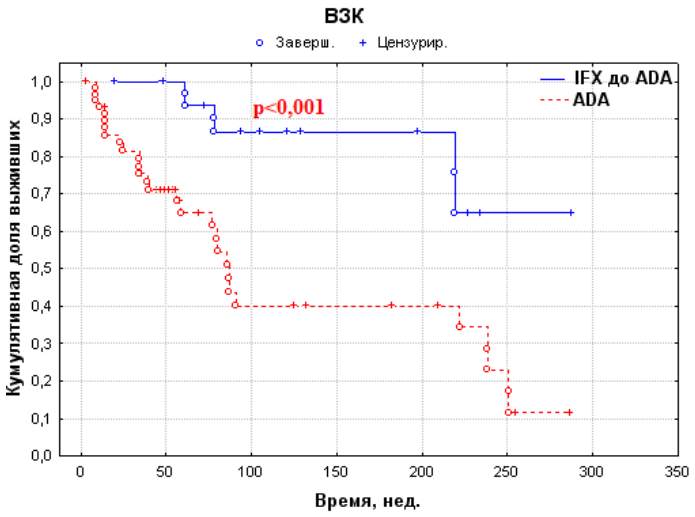
Группы/Возраст	ВБТ IFX, недель		ВБТ ADA, недель	
	БК	ЯК	БК	ЯК
Младше 6 лет	115,1±15,4 n=12	77,6±10 n=35	-	-
6-12 лет	153±15,9 n=57	152,1±11,2 n=70	161,6±12 n=58	126±20,4 n=23
Старше 12 лет	169,1±8,7 n=124	142,9±10 n=103	128,8±4,7 n=303	124,4±10,6 n=58
Примечание: ВБТ – выживаемость биологической терапии				

При сравнении кривых выживаемости при лечении IFX для пациентов с ЯК получены достоверные отличия между группами старше 12 лет и младше 6 лет, а также между группами детей от 6-12 лет и младше 6 лет (Рисунок 3.142Б, Таблица 3.110). Наибольшая продолжительность ВБТ в группе старше 12 лет составила в среднем 142,9 недель, а наименьшая в группе детей младше 6 лет – 77,6 недель (Таблица 3.104). При сравнительном анализе выживаемости при лечении ADA у пациентов с БК и ЯК между группами старше 12 лет и 6-12 лет достоверных отличий выявлено не было (Рисунок 3.142В, Рисунок 3.142Г). Группа младше 6 лет при лечении ADA в анализ не включалась в связи с малой численностью.

Сравнение кривых выживаемости при лечении ADA в зависимости от предшествующей терапии IFX

Проведен анализ ВБТ у пациентов, для которых ADA был препаратом 1-ой линии терапии и у пациентов, для которых ADA был препаратом 2-ой линии после предшествующей терапии IFX (1-ая линия).

Анализ выявил, что показатели ВБТ у пациентов с предшествующей терапией IFX были достоверно выше, чем в группе пациентов, получавших только терапию ADA в качестве препарата 1-ой линии (Рисунок 3.143).



Примечание: синяя кривая – группа пациентов при терапии ADA с предшествующей терапией IFX, красная кривая – ADA (первый препарат); p– достоверность различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

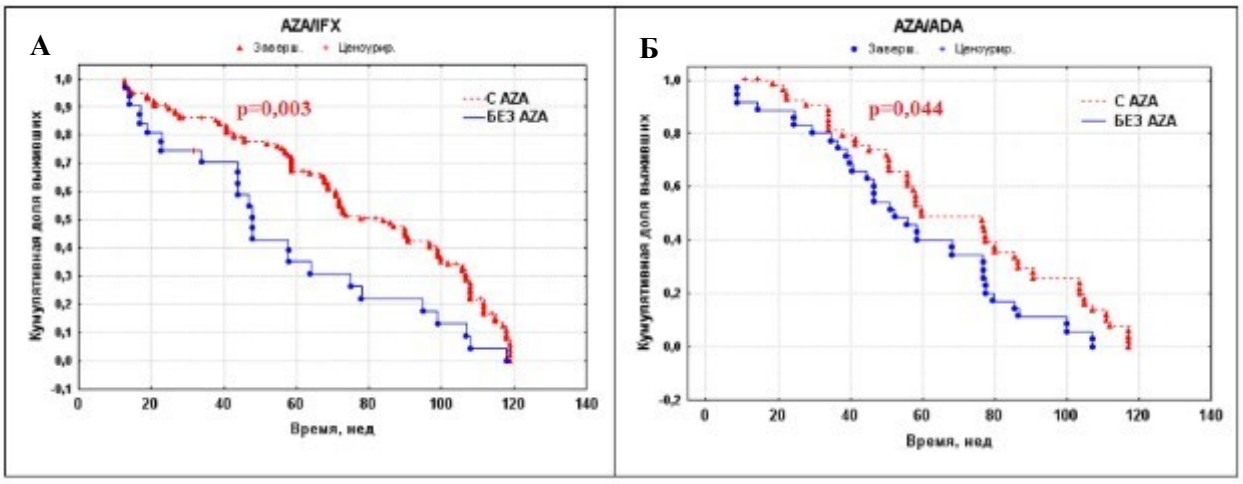
Рисунок 3.143 – Кривые выживаемости Каплана- Майера для пациентов с ВЗК при терапии ADA (1-я линия терапии) и пациентов с предшествующей терапией IFX (ADA – 2-я линия терапии)

Средняя продолжительность выживаемости у пациентов при лечении ADA с предшествующей терапией IFX составила 127,6 ±12,2 недель. При этом, в группе пациентов, где ADA являлся первым препаратом – 76,4 ± 9,9 недель. Таким образом, у пациентов при лечении ADA показатели ВБТ были существенно выше (на 51 неделю), если ADA был препаратом 2-ой линии терапии после предшествующей терапии IFX.

Влияние сопутствующей терапии на выживаемость блокаторов TNF

При лечении детей с ВЗК часто, наряду с ГИБП, назначали дополнительные иммуносупрессанты. Одним из таких препаратов является азатиоприн. В обследованной группе пациентов азатиоприн получали 80 % детей при лечении IFX и 46 % детей при лечении ADA.

Анализ кривых выживаемости Каплана-Майера в группах пациентов с ВЗК, получавших блокаторы TNF в комбинации с азатиоприном и в группе пациентов, получавших только блокаторы TNF, показал значимое преимущество комбинированной терапии в течении первых 2-х лет применения. Так, наибольшие показатели ВБТ наблюдались у пациентов с ВЗК при лечении ГИБП с азатиоприном как для IFX, так и для ADA (Рисунок 3.144А, Рисунок 3.144Б).



Примечание: красная кривая – блокаторы TNF с азатиоприном, синяя кривая – блокаторы TNF без азатиоприна; p – достоверность различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

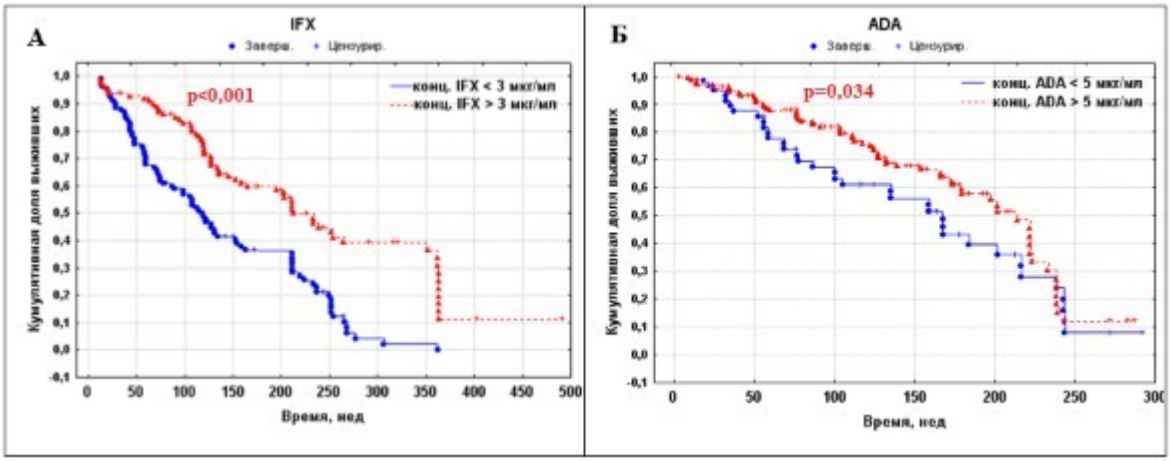
Рисунок 3.144 – Кривые выживаемости Каплана-Майера для пациентов с ВЗК, получавших IFX в комбинации или без азатиоприна (А), и у пациентов, получавших ADA, в комбинации или без азатиоприна (Б)

Средние значения ВБТ составили: IFX с AZA – 70,5±2,8 недель, без AZA - 48,7±5,4 недель; для ADA с AZA – 65,4±4,3 недель, без AZA - 56,1±4,7 недель. После 2-х лет применения IFX в комбинации с AZA у пациентов с ВЗК разницы между кривыми выживаемости не выявлено.

Таким образом, применение азатиоприна у детей с ВЗК увеличивает выживаемость блокаторов TNF в течении первых 2-х лет применения.

Сравнение кривых выживаемости блокаторов TNF в зависимости от остаточного уровня блокаторов TNF

Сравнительный анализ показателей ВБТ показал достоверные отличия между пациентами, у которых остаточный уровень IFX в сыворотке крови (остIFX) был выше или равен нижней границе терапевтического диапазона (3-7 мкг/мл), и между пациентами, у которых остаточный уровень IFX в сыворотке крови был ниже терапевтического интервала (меньше 3 мкг/мл) (Рисунок 3.1454А).



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

Рисунок 3.145 – Кривые выживаемости Каплана-Майера для пациентов с ВЗК, получавших блокаторы IFX (А) и ADA (Б), в зависимости от остаточного уровня препарата в сыворотке крови

Получено, что среднее значение ВБТ для пациентов с остIFX меньше 3 мкг/мл составило 123,7±8,3 недель, для пациентов остIFX больше 3 мкг/мл – 177,6±10,9 недель.

Достоверные отличия по показателям ВБТ получены также между пациентами, у которых остаточный уровень ADA в сыворотке крови (остADA) был выше или равен нижней границе терапевтического диапазона (5-12 мкг/мл), и

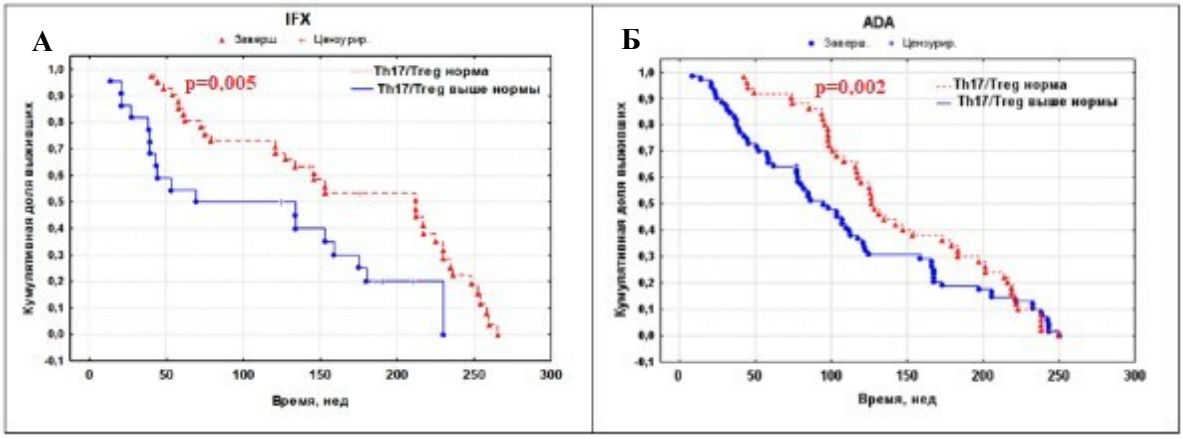
между пациентами, у которых остаточный уровень ADA в сыворотке крови был меньше 5 мкг/мл (Рисунок 3.145Б). Средние значения ВБТ для пациентов с остADA меньше 5 мкг/мл и ≥ 5 мкг/мл составили – 115,9±9,9 недель и 130,3±7,7 недель соответственно.

Таким образом, у пациентов с ВЗК снижение остаточного уровня IFX ниже 3 мкг/мл и ADA меньше 5 мкг/мл приводило к уменьшению ВБТ на IFX на 54 недели, а на ADA – на 14 недель.

Сравнение кривых выживаемости блокаторов TNF в зависимости от показателей клеточного иммунитетеа

На следующем этапе работы оценивали влияние наиболее информативных иммунологических показателей, описанных в предыдущих разделах (раздел 3.1, раздел 3.2), на показатели выживаемости ГИБП.

Анализ выживаемости ГИБП у пациентов с ВЗК в зависимости от соотношения эффекторных Th17 и регуляторных клеток (Treg) выявил достоверные различия ВБТ между группами пациентов с соотношением Th17/Treg ниже и выше возрастных пороговых значений показателей, для условно – здоровых детей разных возрастов: Me (Q_{25}-Q_{75}): до 6 лет – 1,25 (1,0-1,44); от 6 до 12 лет – 1,86(1,33-2,29); старше 12 лет 2,26 (1,87-2,62) (Рисунок 3.146).



Примечание: группа Th17/Treg норма – группа пациентов с соотношением Th17/Treg ниже возрастных пороговых значений; Th17/Treg выше нормы – группа пациентов с соотношением Th17/Treg выше возрастных пороговых значений; p – достоверность различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

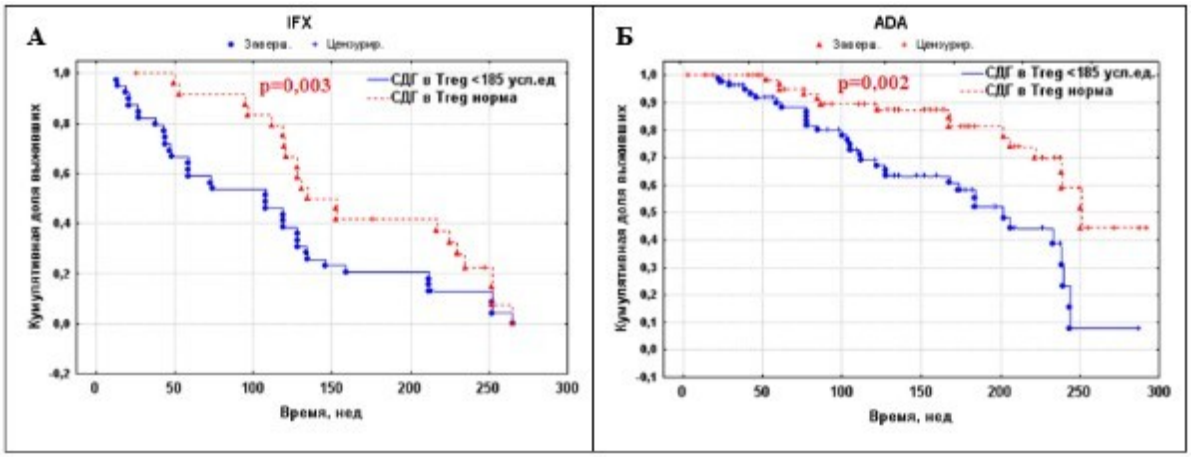
Рисунок 3.146 – Кривые выживаемости Каплана-Майера для пациентов с ВЗК, получавших IFX (А) и ADA (Б), в зависимости от соотношения Th17/Treg

Наибольшее среднее значение ВБТ у пациентов с ВЗК, получавших терапию IFX, наблюдалось при индексе Th17/Treg ниже возрастного порогового значения и составило 159,3±4,6 недель (Рисунок 3.146А). У пациентов с ВЗК, получавших терапию IFX, и при соотношении Th17/Treg выше возрастного порогового значения показатель ВБТ составлял 103,8±15,5 недель (Рисунок 3.146А).

У пациентов с ВЗК при лечении ADA также наилучшие показатели ВБТ получены в группе, где соотношение Th17/Treg было ниже возрастного порогового значения – 145,7±8,5 недель (Рисунок 3.146Б). Средние значения ВБТ в группе пациентов с соотношением Th17/Treg выше возрастного порогового значения составили 108,9±8,7 недель (Рисунок 3.146Б). Достоверность различий показателей ВБТ у пациентов с ВЗК при лечении IFX и ADA сохранялась на протяжении не менее 4-х лет терапии.

Таким образом, увеличение соотношения Th17/Treg выше верхних значений возрастного диапазона сопровождалось снижением ВБТ у детей с ВЗК, получавших терапию IFX на 55 недель, а у детей с ВЗК, получавших терапию ADA, на 37 недель.

В связи с тем, что у детей с ВЗК развитие воспалительной реакции в значительной степени связано с функциональной активностью Treg, была проведена оценка кривых выживаемости в зависимости от активности СДГ в популяции Treg (Рисунок 3.147). Пороговые значения для активности СДГ в Treg были определены ранее (раздел 3.2, Таблица 3.49).



Примечание: группа СДГ в Treg норма – СДГ>185 усл.ед.; p – достоверность различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

Рисунок 3.147 – Кривые выживаемости Каплана-Майера для пациентов с ВЗК, получавших IFX (А) и ADA (Б), в зависимости от активности СДГ в Treg

Выявлены достоверные отличия ВБТ между пациентами с ВЗК на IFX, у которых активность СДГ в Treg была больше или равна 185 усл.ед. и группой пациентов с активностью СДГ в Treg меньше 185 усл.ед. Средние значения ВБТ у пациентов со сниженной активностью СДГ в Treg составляли 107,7±12,1 недель, в группе пациентов с активностью СДГ в Treg соответствующей норме – 158,0±14,1 недель (Рисунок 3.147А). Достоверные отличия между группами сохранялись в течении 5 лет терапии IFX.

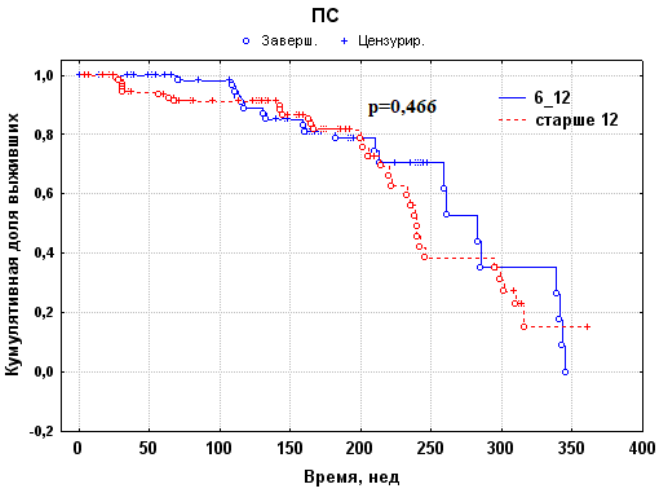
У пациентов с ВЗК, получавших ADA, также были получены достоверные отличия показателей ВБТ между группами пациентов с низкой и нормальной активностью СДГ в Treg (Рисунок 3.147Б). Различия в показателях ВБТ между группами сохранялись и более 5-ти лет применения ADA. В группе пациентов со сниженной активностью СДГ в Treg значения ВБТ составляли 120,1±8,2 недель, в группе пациентов с нормальной активностью СДГ в Treg – 146,7±9,9 недель.

Таким образом, у пациентов с ВЗК при лечении IFX/ADA выявлено уменьшение показателей ВБТ в группах при снижении функциональной активности Treg при терапии IFX в среднем на 50 недель, а при терапии ADA на 27 недель.

3.6.2. Выживаемость адалимумаба у детей с вульгарным псориазом

Сравнение кривых выживаемости ADA в зависимости от возраста

У пациентов с ПС, получавших ADA, проведен сравнительный анализ кривых выживаемости Каплана –Майера между группами детей старше 12 лет (34 детей) и от 6 до 12 лет (53 ребёнка) (Рисунок 3.148).



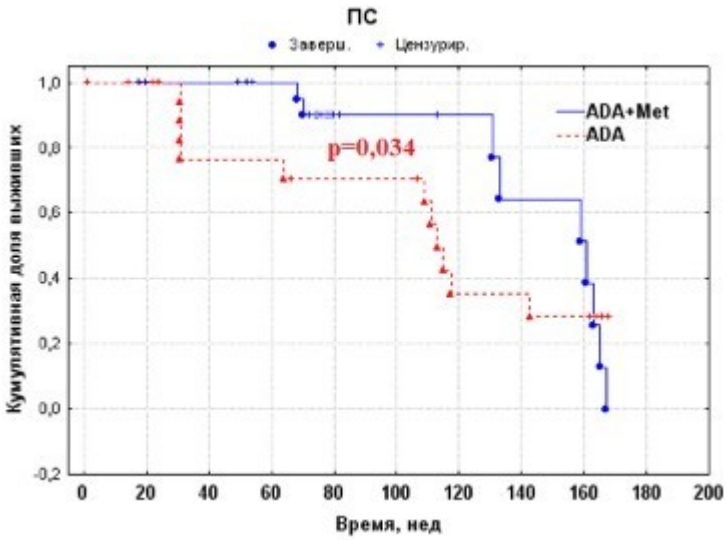
Примечание: p – достоверность различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

Рисунок 3.148 – Кривые выживаемости Каплана-Майера у пациентов с псориазом, получавших ADA, в зависимости от возраста

Достоверных отличий между ВБТ этих возрастных групп пациентов получено не было. Средние значения ВБТ у пациентов старше 12 лет составили – 169,1±18,3 недель, для группы от 6 до 12 лет – 171,1±11,1недель.

Влияние сопутствующей терапии на выживаемость ADA

Анализ кривых выживаемости Каплана-Майера в группах пациентов с ПС, получавших ADA в комбинации с метотрексатом и в группе пациентов, получавших только ADA, показал достоверное преимущество комбинированной терапии в течении первых 3-х лет применения (Рисунок 3.149).



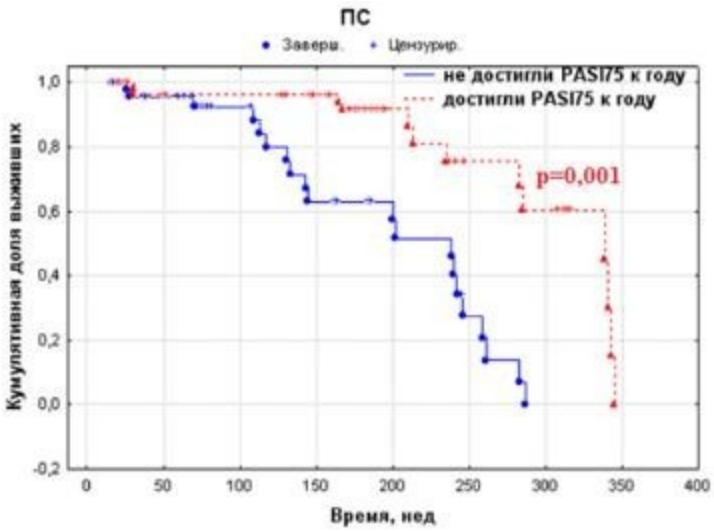
Примечание: ADA+Met – комбинация адалимумаба с метотрексатом; p – достоверность различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

Рисунок 3.149 – Кривые выживаемости Каплана-Майера для пациентов с ПС, получавших ADA в комбинации или без метотрексата

Среднее значение ВБТ у пациентов с ПС, получавших ADA в комбинации с МТ, составило 91,9±9,1 недель, а в группе пациентов, получавших только ADA – 81,4±12,8 недель.

Сравнение кривых выживаемости в зависимости от эффективности терапии ADA

Проведен сравнительный анализ ВБТ у пациентов с ПС на протяжении 350 недель в группах с эффективностью терапии и недостаточной эффективностью к году терапии (Рисунок 3.150). Пациенты были разделены на группы в зависимости от достижения к году: достижение PASI75 к году – эффективность терапии, не достижение PASI75 к году – недостаточная эффективность терапии.



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

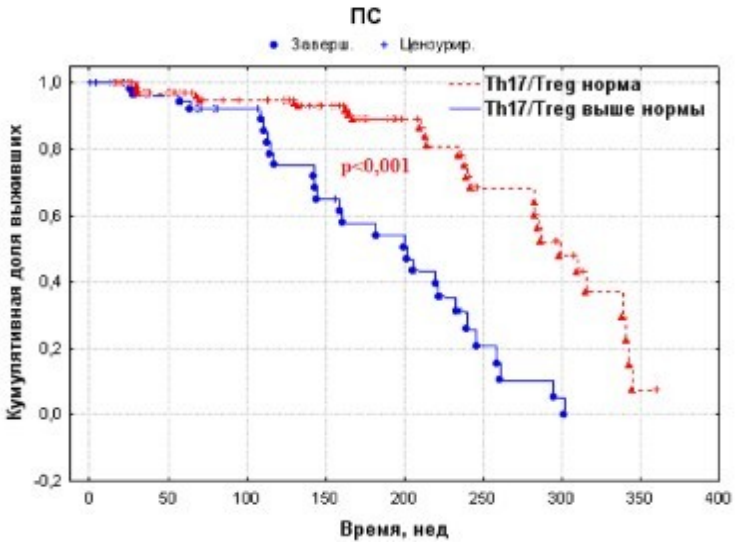
Рисунок 3.150 – Кривые выживаемости Каплана – Майера у пациентов с псориазом в группах с эффективностью и с недостаточной эффективностью лечения к году терапии

Получены достоверные отличия показателей ВБТ между группами пациентов с эффективностью терапии ADA и с недостаточной эффективностью к году терапии (Рисунок 3.150). Средние значения ВБТ для группы с эффективным лечением составили 187,4±11,3 недель, для группы с недостаточно эффективным лечением – 115,6±11,5 недель.

Таким образом, в группе пациентов с ПС на ADA при достижении PASI75 к году терапии можно прогнозировать более длительную выживаемость биологической терапии (в среднем на 72 недели).

Сравнение кривых выживаемости у пациентов с псориазом при лечении ADA в зависимости от иммунологических показателей

Проведен сравнительный анализ показателей ВБТ у пациентов с ПС в зависимости от соотношения Th17/Treg (Рисунок 3.151).



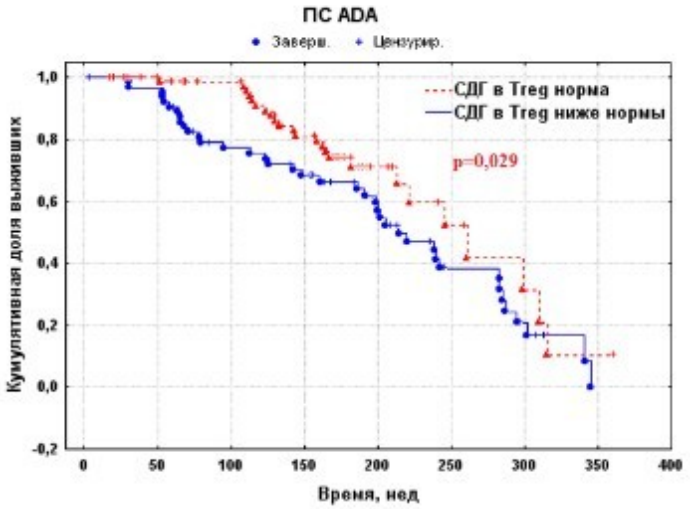
Примечание: группа Th17/Treg норма – группа пациентов с соотношением Th17/Treg ниже возрастных пороговых значений; Th17/Treg выше нормы – группа пациентов с соотношением Th17/Treg выше возрастных пороговых значений; p – достоверность различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

Рисунок 3.151 – Кривые выживаемости Каплана – Майера у пациентов с псориазом в зависимости от соотношения Th17/Treg

Получены значимые отличия показателей ВБТ между группами пациентов, причем наибольшие средние значения ВБТ выявлены для пациентов при соотношении Th17/Treg меньше верхней границы возрастной нормы - 168,4±7,4 недель. Средние значения ВБТ в группе пациентов с Th17/Treg больше верхней границы возрастного диапаазона составили 106,9±10,3 недель.

Таким образом, у пациентов с ПС при лечении ADA наблюдалось уменьшение показателей ВБТ при увеличении соотношения Th17/Treg выше референсного диапазона в среднем на 62 недели.

Сравнительный анализ кривых выживаемости у пациентов с ПС при лечении ADA выявил достоверные отличия ВБТ в зависимости от активности СДГ в Treg:
в группе пациентов с низкой активностью СДГ в Treg: среднее значение ВБТ – 145,21±8,2 недель и активностью СДГ в Treg в референсном диапазоне – 162,5±11,2 недель (Рисунок 3.152).



Примечание: группа СДГ в Treg норма – >185 усл.ед.; группа СДГ в Treg ниже нормы – <185 усл.ед; p – достоверности различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

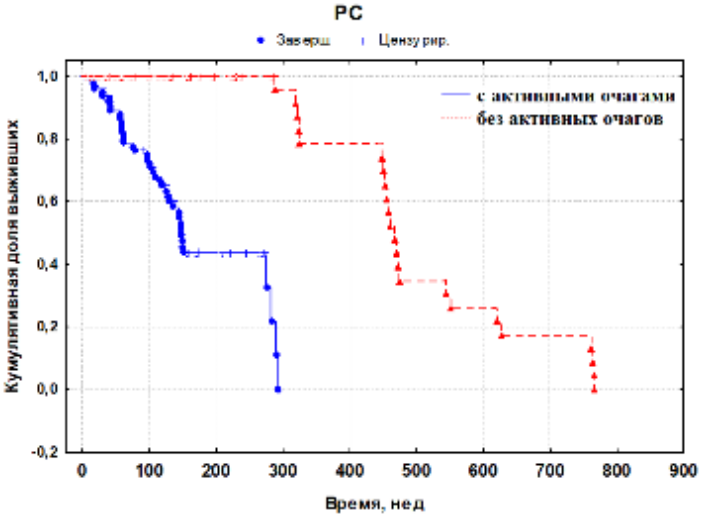
Рисунок 3.152 – Кривые выживаемости Каплана– Майера у пациентов с псориазом в группах в зависимости от активности СДГ в Treg

В группе пациентов с ПС при лечении ADA при снижении функциональной активности Treg наблюдалось снижение показателей ВБТ в среднем на 17 недель.

Таким образом, у пациентов с ПС выживаемость терапии ADA в изученной возрастной группе от 6 до 18 лет не зависела от возраста, показатели ВБТ были выше в группе пациентов при достижении PASI75 к году терапии на 72 недели, а также в группе пациентов с соотношение Th17/Treg, соответствующим возрастным значениям, в среднем на 62 недели и в группе с активностью СДГ в Treg соответствующей референсному диапазону – на 17 недель.

3.6.3. Выживаемость интерферона β-1α у детей с рассеянным склерозом

Проведено сравнение показателей ВБТ у детей (старше 12 лет) с РС в зависимости от наличия активных очагов демиелинизации по МРТ (Рисунок 3.153).



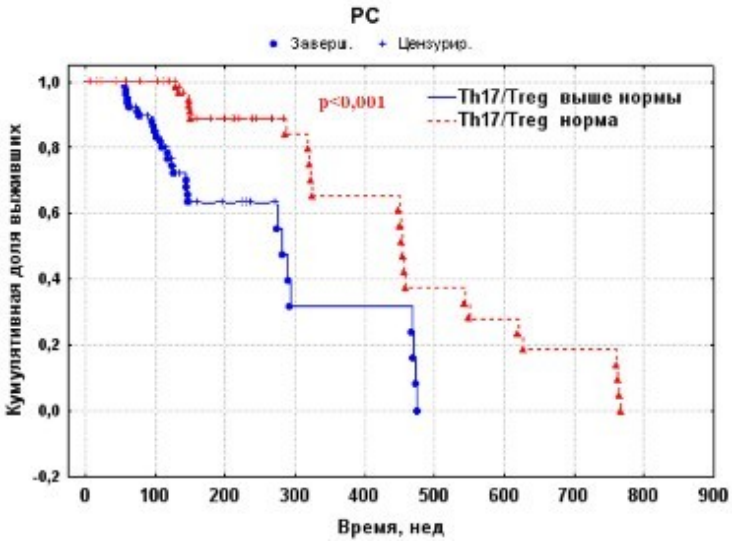
Примечание: p – достоверность различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

Рисунок 3.153 – Кривые выживаемости Каплана – Майера у пациентов с рассеянным склерозом в зависимости от наличия активных очагов по МРТ

Наибольшее значение ВБТ выявлено у пациентов без наличия активных очагов по МРТ и составило 167,5±14,9 недель. Среднее значение ВБТ у пациентов с РС в группе с активными очагами составило 101,6±7,6 недель.

Таким образом, у пациентов с РС выживаемость терапии INFβ-1a была выше в среднем на 66 недель в группе пациентов без активных очагов по МРТ.

Проведено сравнение показателей ВБТ у детей (старше 12 лет) с РС референсным диапас по соотношения Th17/Treg (Рисунок 3.154).



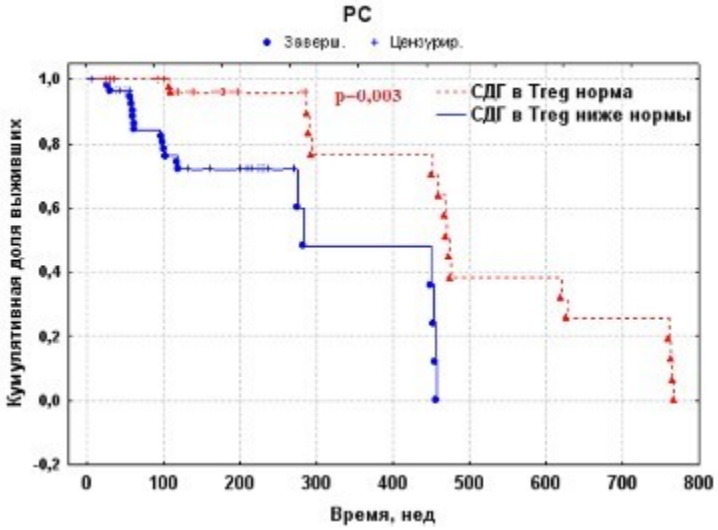
Примечание: группа Th17/Treg норма – группа пациентов с соотношением Th17/Treg ниже возрастных пороговых значений; Th17/Treg выше нормы – группа пациентов с соотношением Th17/Treg выше возрастных пороговых значений; p - достоверность различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

Рисунок 3.154 – Кривые выживаемости Каплана – Майера у пациентов с рассеянным склерозом в зависимости от соотношения Th17/Treg

Наибольшее значение ВБТ выявлено у пациентов при соотношении Th17/Treg меньше верхней границы референсного диапазона и составило 159,3±14,7 недель. Среднее значение ВБТ у пациентов с РС в группе с Th17/Treg больше верхней границы возрастного диапазона составило 113±9,5 недель.

Таким образом, у пациентов с РС выживаемость терапии INFβ-1a была выше на 46 недель в группе пациентов с соотношение Th17/Treg ниже верхнего порогового значения.

Сравнительный анализ кривых выживаемости у пациентов с РС в зависимости от активности СДГ в Treg показал, что достоверно большие показатели ВБТ у пациентов с активностью СДГ в Treg >185 усл.ед. относительно группы пациентов с активностью СДГ в Treg <185 усл.ед. (Рисунок 3.155).



Примечание: группа СДГ в Treg норма – >195 усл.ед.; группа СДГ в Treg ниже нормы – <195 усл.ед.; p – достоверности различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

Рисунок 3.155 – Кривые выживаемости Каплана – Майера у пациентов с рассеянным склерозом в зависимости от активности СДГ в Treg

Среднее значение ВБТ в группе пациентов со сниженной активностью СДГ в Treg составило 107,7±12,1 недель, в группе пациентов с нормальной активностью СДГ в Treg -158,0±14,1 недель.

Таким образом, у пациентов с РС выживаемость INFβ-1a зависела от соотношения Th17/Treg: показатели ВБТ были выше на 46 недель в группе с соотношением Th17/Treg ниже 2,62 активности СДГ в Treg и была выше на 50 недель в группе с активностью больше 185 усл.ед.

Резюме.

У пациентов с иммунозависимыми заболеваниями (ВЗК, ПС, РС) выживаемость ГИБП была выше в группах:

1) с соотношением Th17/Treg ниже порогового возрастного уровня;

2) с нормальной функциональной активностью Treg;

3) с более высоким остаточным уровнем (для ВЗК и ПС);

4) с комбинированной терапией (азатиоприн – при ВЗК, метотрексат – при ПС);

5) без активных очагов демиелинизации (у пациентов с РС).

Кроме того, наблюдались различия ВБТ между патологиями. Так у пациентов с БК выживаемость как на IFX/ADA выше, чем у ЯК. Также на выживаемость ADA

у пациентов с ВЗК влияет предшествующая терапия IFX. У пациентов с БК в возрастной группе старше 12 лет предпочтительнее было назначение IFX при сравнении с ADA. У пациентов с ПС выживаемость не зависела от возраста и была выше в группе с эффективностью терапии ADA.

Материалы, изложенные в разделе 3.6 опубликованы [70].

3.7. Проверка прогностической ценности иммунологических маркеров при лечении биологическими препаратами у детей с ИЗЗ

Большое внимание в современной медицине уделяется прогностическим моделям, позволяющим оценивать ответ на терапию в ранние и отдалённые сроки лечения. Рассчитывается, как правило, вероятность или риск наступления определенного события, которые могут быть выражены от 0 до 100 %.

В данном разделе приведены вероятности прогноза хорошего (эффективность –Эф) и недостаточного эффекта (НЭ) у пациентов с ИЗЗ в зависимости от иммунологических показателей для которых выявлены наилучшие результаты ROC-анализа (AUC>0,8). Вероятность прогноза эффекта терапии у пациентов считали высокой при частоте правильных прогнозов ≥ 70 %. Показатели с высокой вероятностью прогноза эффекта ГИБП использовали для создания алгоритма иммунологического обследования у пациентов с ИЗЗ на разных этапах лечения (до начала терапии, во время поддерживающего курса).

Проверка прогностической информативности иммунологических маркеров проведена на 2-х внутренних и 1-ой внешней выборке. Внутреннюю проверочную выборку формировали по общей базе пациентов, выделяя каждого 3-го пациента с известным эффектом терапии к году (ВЗК – 744 наблюдения, РС – 89 наблюдений). Внешнюю проверочную выборку составили 37 пациентов с вульгарным псориазом старше 12 лет в динамике терапии (97 наблюдений) устекинумабом (UST - анти IL-12/23) с известным эффектом терапии к году лечения. Устекинумаб вводили согласно рекомендованным схемам лечения (подкожно на 0 и 4 неделе в

дозе 0,75 мг/кг веса, при массе тела ребенка от 60 до 100 кг препарат вводился в дозе 45 мг и далее каждые 12 недель).

Вероятность прогноза эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений индекса Th17/Treg у пациентов с ИЗЗ

Проведённая оценка вероятности эффекта терапии на проверочных выборках на основании соотношения Th17/Treg показала, что использование пороговых значений (Раздел 3.1, Таблица 3.14) предсказывает недостаточную эффективность у пациентов с ВЗК при лечении IFX и ADA с высокой степенью вероятности во все периоды лечения (до, после индукционного курса, 52 неделя) как в возрастной группе от 6 до 12 лет (кроме детей на ADA к году лечения), так и в группе старше 12 лет (Таблица 3.111).

Таблица 3.111 – Вероятность прогноза (%) эффекта IFX/ADA в зависимости от индекса Th17/Treg при разной длительности лечения и в разных возрастных группах у детей с ВЗК

Th17/Treg (6-12 лет)				
Препарат / Периоды	IFX		ADA	
	Cut-off			
	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.
	≥1,92	<1,92	≥1,8	<1,8
До	100	100	80	56
Индукция	100	58	88	50
52 неделя	81	45	67	82
Th17/Treg (старше 12 лет)				
Препарат / Периоды	IFX		ADA	
	Cut-off			
	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.
	≥2,04	<2,04	≥2,21	<2,21
До	78	48	88	38
Индукция	78	64	86	50
52 неделя	73	49	75	50
Примечание: НЭ – недостаточная эффективность, Эф – эффективность; cut-off – пороговые значения				

Высокая вероятность прогноза хорошего эффекта по пороговым значениям индекса Th17/Treg у пациентов с ВЗК получена только в возрастной группе от 6 до 12 лет до начала лечения при лечении IFX и к 52 неделе при лечении ADA (Таблица 3.111).

Высокий процент правильных прогнозов недостаточного эффекта ГИБП на основании пороговых значений индекса Th17/Treg (Раздел 3.1, Таблица 3.19) получен у пациентов с ПС при лечении UST до назначения биологического препарата и после индукционного курса (Таблица 3.112). В то же время, высокий % вероятности прогноза хорошего эффекта у пациентов с ПС отмечался также до начала лечения UST и к 52 неделе (Таблица 3.112).

Таблица 3.112 – Вероятность прогноза (%) эффекта ГИБП в зависимости от индекса Th17/Treg при разной длительности лечения у детей с ПС и РС

Патология / Периоды	ПС (UST)		РС (INFβ1α)	
	Cut-off			
	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.
	≥2,48	<2,48	≥2,75	<2,75
До	78	86	63	80
Индукция	82	67	63	47
52 неделя	60	83	44	64
Примечание: НЭ – недостаточная эффективность, Эф – эффективность; cut-off – пороговые значения				

У пациентов с РС высокая вероятность прогноза по пороговым значениям соотношения Th17/Treg получена для хорошего эффекта INFβ1α до начала лечения (Таблица 3.112*).*

Вероятность прогноза эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений активности СДГ в Treg и сочетания СДГ в Treg с индексом Th17/Treg у пациентов с ИЗЗ

Пороговое значение активности СДГ в Treg среди всех исследованных форм патологий было наименьшим у пациентов с псориазом – 182 усл.ед. (Таблица 3.58). Это значение взяли для проверки вероятности прогнозирования при всех исследованных патологиях (ВЗК, ПС и РС).

Проведённый анализ вероятности прогноза эффекта ГИБП у пациентов с ВЗК при лечении IFX/ADA для всех возрастных групп в зависимости от активности сукцинатдегидрогеназы в популяции Treg показал, что с вероятностью 74% данный показатель прогнозирует ускользание эффекта терапии независимо от периода наблюдения (Таблица 3.113).

Таблица 3.113 – Вероятность прогноза (%) эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений СДГ в Treg и индекса Th17/Treg у детей с ВЗК

Cut-off Показатель	НЭ	Эф.
СДГ в Treg	<182 усл.ед	≥182 усл.ед
	74	43
	ВЗК (IFX/ADA) 6-12 лет	
СДГ в Treg+Th17/Treg	<182 усл.ед + ≥1,86	≥182 усл.ед + <1,86
	90	58
старше 12 лет		
	НЭ	Эф.
	<182 усл.ед + ≥2,16	≥182 усл.ед + <2,16
СДГ в Treg+Th17/Treg	84	58
Примечание: НЭ – недостаточная эффективность, Эф – эффективность; cut-off – пороговые значения		

Оценка вероятности прогноза эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений 2-х показателей установила, что при снижении активности СДГ в Treg ниже 182 усл. ед. и при увеличении индекса Th17/Treg выше соответствующего возрастного порогового значения (Th17/Treg: 6-12 лет – ≥1,86, старше 12 лет – ≥2,16**)** увеличивается риск развития недостаточного эффекта терапии в обеих возрастных группах (Таблица 3.113).

У пациентов с ПС при лечении UST в исследованной выборке показана высокая вероятность прогноза достижения PASI75 к году лечения (в 80% случаев) при активности СДГ в Treg **≥**182 усл.ед. на протяжении года терапии (Таблица 3.114).

Таблица 3.114 – Вероятность прогноза (%) эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений СДГ в Treg и индекса Th17/Treg у детей с ПС

Cut-off / Показатель	НЭ	Эф.
СДГ в Treg	<182 усл.ед	≥182 усл.ед
	45	80
СДГ в Treg+Th17/Treg	<182 усл.ед + ≥2,48	≥182 усл.ед + <2,48
	89	88
Примечание: НЭ – недостаточная эффективность, Эф – эффективность; cut-off – пороговые значения		

Получена высокая вероятность прогноза как хорошего, так и недостаточного эффекта UST при сочетании показателей активности СДГ в Treg и индекса

Th17/Treg. Так, у пациентов с ПС снижение активности СДГ в Treg ниже 182 усл.ед. и превышении возрастного (старше 12 лет) порогового соотношения Th17/Treg ≥2,48 с высокой вероятностью прогнозирует недостижение PASI75 к году терапии UST, а повышение активности СДГ в Treg выше 182 усл.ед. со снижением индекса Th17/Treg <2,48 – достижение PASI75 к году лечения (Таблица 3.114).

У пациентов с РС получена высокая вероятность прогноза хорошего эффекта терапии INFβ-1a (70 %) при совместном использовании пороговых значений активности СДГ в Treg (182 усл.ед.) и индекса Th17/Treg (Таблица 3.115).

Таблица 3.115 – Вероятность прогноза (%) эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений СДГ в Treg и индекса Th17/Treg у детей с РС

Cut-off / Показатель	НЭ	Эф.
СДГ в Treg	<182 усл.ед	≥182 усл.ед
	61	60
СДГ в Treg+Th17/Treg	<182 усл.ед + ≥2,75	≥182 усл.ед + <2,75
	67	70
Примечание: НЭ – недостаточная эффективность, Эф – эффективность; cut-off – пороговые значения		

Вероятность прогноза эффекта ГИБП в зависимости от абсолютного значения MDSCs и Treg у пациентов с ИЗЗ

Анализ вероятности прогноза эффекта ГИБП в зависимости от абсолютного количества регуляторных клеток (MDSCs+Treg**)** у пациентов с ИЗЗ показал высокий процент правильных прогнозов НЭ терапии у пациентов с ВЗК до начала лечения блокаторами TNF и после индукционного курса (Таблица 3.116).

Таблица 3.116 – Вероятность прогноза (%) эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений MDSCs+Treg при разной длительности лечения у детей с ИЗЗ

Патология / Периоды	ВЗК (IFX/ADA)		ПС (UST)		РС (INFβ)	
	Cut-off, кл/мкл					
	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.
	<213	≥213	<145	≥145	<117	≥117
До	92	27	67	43	35	91
Индукция	78	44	25	50	25	50
52 неделя	40	58	40	100	33	100
Примечание: НЭ – недостаточная эффективность, Эф – эффективность; cut-off – пороговые значения						

В то же время, высокая вероятность достижения хорошего эффекта ГИБП продемонстрирована у пациентов с ПС к году лечения UST, а у пациентов с РС – до начала и к году терапии INFβ1α (Таблица 3.116*)*.

Вероятность прогноза эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений относительного содержания популяций клеток памяти у пациентов с ИЗЗ

Проверка прогноза эффекта терапии в зависимости от относительного содержания популяций Т-клеток памяти у пациентов с ИЗЗ после индукционного курса показала высокую вероятность прогноза недостаточной эффективности ГИБП у пациентов с ВЗК на основании содержания субпопуляций наивных и центральных $CD4^+$ Т-клеток памяти, у пациентов с ПС – субпопуляций наивных и эффекторных $CD4^+$ Т-клеток памяти, а у пациентов с РС - субпопуляций эффекторных $CD4^+$ Т-клеток памяти и субпопуляций наивных $CD8^+$ Т-клеток памяти (Таблица 3.117).

Таблица 3.117 – Вероятность прогноза (%) эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений субпопуляций Т-клеток памяти у детей с ИЗЗ

Патология / Популяции	ВЗК (IFX/ADA) (после индукции)		ПС(UST) (после индукции)		РС(INFβ) (после индукции)	
	Cut-off					
	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.
TNAIVE, % от CD4	<58,1	≥58,1	<58,9	≥58,9	-	-
	76	63	75	88		
TCM, % от CD4	≥23,2	<23,2	≥22,2	<22,2	-	-
	76	34	65	71		
TEM, % от CD4	-	-	≥12,9	<12,9	≥19,5	<19,5
			75	100	80	32
TcytNAIVE, % от CD8	<53,1	≥53,1	-	-	<42,4	≥42,4
	41	67			90	82
TcytEMRA, % от CD8	≥17,1	<17,1	-	-	≥21,5	<21,5
	68	50			65	90
Примечание: НЭ – недостаточная эффективность, Эф – эффективность; cut-off – пороговые значения						

Также показана высокая вероятность прогноза хорошего эффекта ГИБП у пациентов с ПС на основании пороговых значений содержания субпопуляций наивных, центральных и эффекторных $CD4^+$ Т-клеток памяти, а у пациентов с РС

на основании пороговых значений содержания субпопуляций наивных и терминально-дифференцированных $CD8^+$ Т-клеток памяти (Таблица 3.117).

Вероятность прогноза эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений относительного содержания эктонуклеотидазы CD39 в популяциях Treg и Th17 лимфоцитов у пациентов с ИЗЗ

Проведённая проверка показала высокую вероятность прогноза недостаточного эффекта ГИБП у пациентов с ВЗК на основании пороговых значений относительного содержания популяций Treg и Th17-клеток с экспрессией CD39. У пациентов с РС также показана высокая вероятность прогноза НЭ на основании пороговых значений CD39Treg и CD39Th17, а также пороговых значений содержания популяции Th17 с экспрессией CD73 (Таблица 3.118*).*

Таблица 3.118 – Вероятность прогноза (%) эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений относительного содержания популяциях Treg и Th17 лимфоцитов с экспрессией CD39/CD73 у детей с ИЗЗ

Патология / Популяции	ВЗК (IFX/ADA) (после индукции)		ПС (UST) (после индукции)		РС (INFβ) (после индукции)	
	Cut-off					
	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.
CD39Treg, % от Treg	<34,4	≥34,4	<22,4	≥22,4	<32,2	≥32,2
	83	43	61	83	88	94
CD39Th17, % от Th17	<15,1	≥15,1	<7,3	≥7,3	<5,6	≥5,6
	76	33	67	81	78	89
CD73Th17, % от Th17	–	–	–	–	<14,2	≥14,2
	–	–	–	–	80	81
Примечание: НЭ – недостаточная эффективность, Эф – эффективность; cut-off – пороговые значения						

У пациентов с ПС и РС установлена высокая вероятность прогноза эффективности ГИБП в зависимости от пороговых значений относительного содержания CD39Treg и CD39Th17, а также у пациентов с РС - для относительного содержания популяции CD73Th17 (Таблица 3.118).

Вероятность прогноза эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений относительного содержания популяций лимфоцитов с транслокацией NF-κB у пациентов с ИЗЗ

Получена высокая вероятность прогноза активации воспалительного процесса на основании относительного содержания NK-клеток с транслокацией NF-κB для пациентов с ИЗЗ независимо от формы патологии. У пациентов с РС также возможно прогнозирование активности патологического процесса на основании относительного содержания популяции цитотоксических Th17-клеток с транслокацией NF-κB (Таблица 3.119). Прогнозирование хорошего эффекта ГИБП получено с высокой вероятностью только у пациентов с РС для относительного содержания как NK-клеток, так и Tc17 с транслокацией NF-κB (Таблица 3.119).

Таблица 3.119 – Вероятность прогноза эффекта ГИБП в зависимости от пороговых значений относительного содержания клеток с транслокацией NF-κB у детей с ИЗЗ

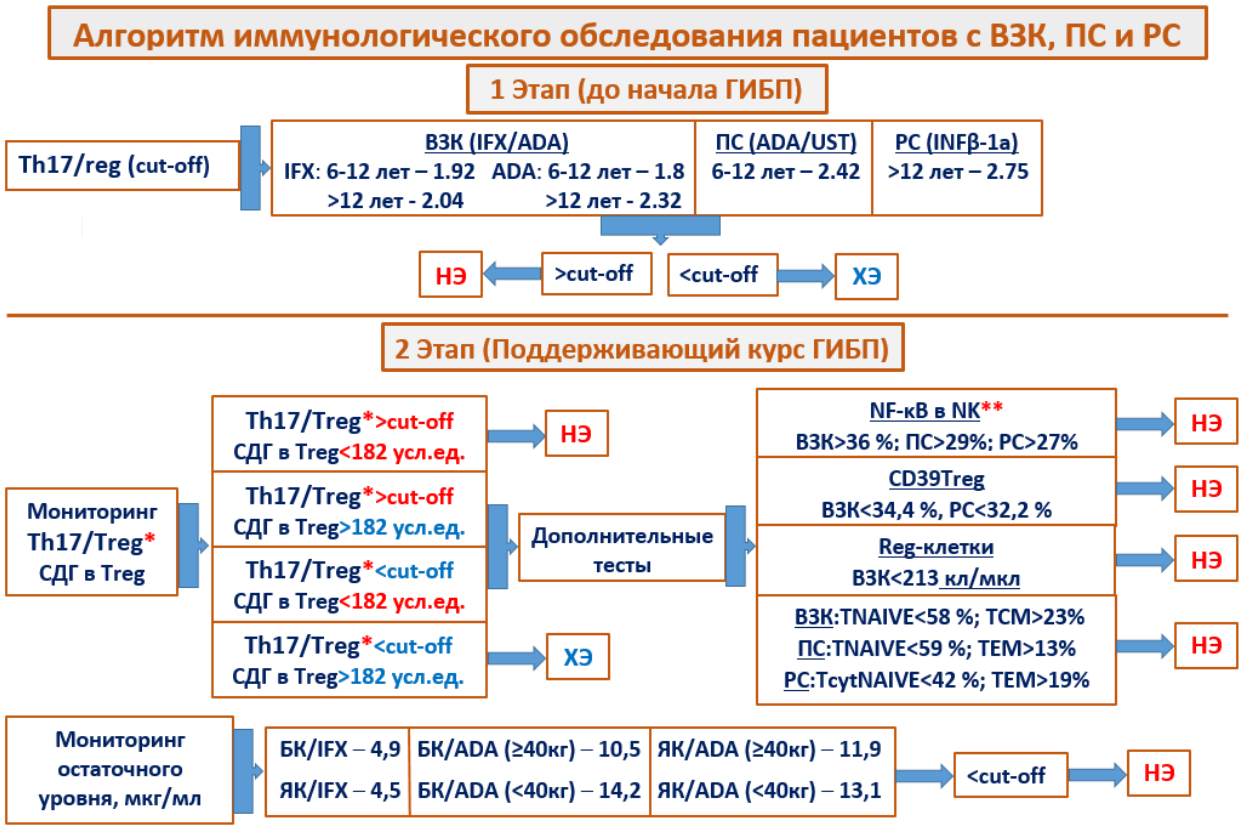
Патология / Популяции	ВЗК (IFX/ADA)		ПС (UST)		РС (INFβ)	
	Cut-off					
	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.	НЭ	Эф.
NK-клетки	≥36	<36	≥29	<29	≥2	<27
	86	63	94	74	72	77
Tc17	-	-	-	-	≥25,3	<5,6
					83	70
Примечание: НЭ – недостаточная эффективность, Эф – эффективность; cut-off – пороговые значения						

Таким образом, высокая вероятность прогноза недостаточного эффекта от терапии ГИБП у пациентов с ИЗЗ для следующих иммунологических показателей выявлена: соотношения Th17/Treg и абсолютного содержания регуляторных клеток 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 ПС; субпопуляций Т-клеток памяти – при всех ИЗЗ; относительного содержания Treg и Th17 с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73 после индукционного курса – при ВЗК и РС. У пациентов с ПС и РС вероятность прогноза хорошего эффекта ГИБП показана для иммунологических показателей - соотношения Th17/Treg, абсолютного содержания регуляторных клеток,

активности СДГ в Treg в сочетании с индексом Th17/Treg, относительного содержания субпопуляций Т-клеток памяти, относительного содержания Treg и Th17 с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73. Также, при получении значений показателей выше пороговых для относительного содержания NK-клеток с транслокацией NF-κB можно прогнозировать активацию воспалительного процесса на фоне терапии при всех изученных ИЗЗ.

3.7.1. Алгоритм иммунологического обследования пациентов с ВЗК, ПС и РС

На основании полученных информативных иммунологических показателей, которые с высокой вероятностью позволяют прогнозировать ускользание эффекта биологической терапии и эффективность проводимой терапии, был разработан алгоритм иммунологического обследования пациентов с ИЗЗ (Рисунок 3.156).



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

Рисунок 3.156 – Алгоритм иммунологического обследования пациентов с ИЗЗ для оценки эффективности терапии ГИБП

Алгоритм иммунологического обследования для оценки эффективности применения ГИБП у пациентов с ИЗЗ включает минимальный набор наиболее информативных тестов, которые показали высокую вероятность прогноза на основных и проверочных выборках пациентов (Рисунок 3.156). 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 во время плановой госпитализации показано проведение иммуноцитохимического исследования, включающего оценку индекса Th17/Treg и активности СДГ в Treg, которые могут прогнозировать эффект терапии:

1) при получении показателей, превышающих возрастные пороговые значения для соотношения Th17/Treg и активности СДГ в Treg ниже 182 усл. ед., можно прогнозировать неэффективность ГИБП;

2) при получении показателей, не превышающих возрастные пороговые значения для соотношения Th17/Treg и активности СДГ в Treg ≥182 усл. ед., можно прогнозировать эффективность ГИБП;

3) при получении сомнительных результатов (Th17/Treg > пороговых значений при СДГ в Treg ≥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 – TNAIVE<58 % и/или TCM≥23,2 %, MDSCs+Treg<213 кл/мкл; при ПС - TEM≥12,9; при РС - TEM≥19,5 и TcytNAIVE<42,4.

При получении в одном из дополнительных тестов результатов в пределах референсного диапазона и наличия клинического обострения рекомендуется назначение теста по оценке содержания NK-клеток с транслокацией NF-κB при всех ИЗЗ (при РС дополнительно в Tc17 клетках), показывающего активность воспалительного процесса в данный момент.

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, проведённое исследование позволило выявить и проверить информативность исследуемых иммунологических показателей, а также разработать алгоритм иммунологического обследования у пациентов с ИЗЗ при назначении ГИБП.

Материалы, изложенные в разделе 3.7 опубликованы [77].

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Заболеваемость ИЗЗ неуклонно растет. В 2023 году Conrad C. с соав. опубликовали результаты исследования с участием 22 миллионов взрослых людей и было показано наличие аутоиммунного заболевания у каждого 10-го человека [208]. ИЗЗ дебютируют в детском возрасте приблизительно у 30 – 50 % пациентов с псориазом, у 15 - 20% пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), у 4-5 % пациентов с рассеянным склерозом (РС) [6, 16, 89]. Этиопатогенез иммунозависимых заболеваний не до конца установлен. Однако, считается, что ИЗЗ возникают под действием ряда факторов: генетической предрасположенности, особенностей микробиоты кишечника и/или кожи, иммунной дисфункции и неблагоприятных факторов внешней среды [233, 212]. Рассматриваемые в данной работе патологии, а именно, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), вульгарный псориаз (ПС), рассеянный склероз (РС) у детей являются хроническими, иммуноопосредованными заболеваниями, приводящими к инвалидизации.

Каждая из рассматриваемых патологий имеет свои разработанные алгоритмы лечения. В последние десятилетия широко и успешно применяются биологические препараты, полученные с помощью генно-инженерных технологий – генно-инженерные биологические препараты (ГИБП). ГИБП представляют собой белки, пептиды или их производные (цитокины, рецепторы цитокинов, антагонисты рецепторов, моноклональные антитела и др.) [58].

ГИБП используются при среднетяжелом и тяжелом течении ВЗК и ПС, а также при РС. Действие ГИБП направлено на ингибирование пролиферации, а также миграции эффекторных Т-клеток, блокировании цитокинов, в частности TNF, IL-17, IL-12 и IL-23, интегринов и др. [26, 27, 28, 29, 48]. Несмотря на доказанную эффективность блокаторов TNF, известно, что у части пациентов с ВЗК (от 30 до 50% пациентов) возможна первичная неотвечаемость на терапию, которая может быть объяснена вовлечением альтернативных, не зависящих от TNF, механизмов иммунопатогенеза [405]. У части пациентов развивается потеря

эффекта (вторичная неотвечаемость) в результате выработки антилекарственных антител к препарату, а также снижения остаточного уровня ГИБП у пациентов в сыворотке крови из-за индивидуальных фармакокинетических особенностей [35, 238, 340, 379, 472, 549]. ГИБП относятся к дорогостоящим препаратам, так, например, ежегодно в России только на лечение пациентов с ВЗК государством тратится около 73 мрд. рублей [10]. Понимание патогенетических путей развития ИЗЗ, раннее выявление пациентов с неотвечаемостью, прогнозирование риска потери ответа на ГИБП позволит вовремя скорректировать терапию и снизить затраты государства на дорогостоящее лечение.

В связи с этим, целью данной работы являлась разработка прогностических критериев эффективности применения генно-инженерных биологических препаратов у детей с иммунозависимыми заболеваниями. Для выполнения поставленной цели обследовано 915 детей в возрасте от 3,5 до 18 лет в динамике лечения: 486 ребенка с ВЗК (297 – БК; 189 – ЯК), 182 ребенка с ПС, 147 детей с РС, 100 детей группы сравнения. Пациенты, включенные в исследование, получали следующие ГИБП: пациенты с ВЗК –инфликсимаб (IFX), адалимумаб (ADA); пациенты с псориазом – ADA; пациенты с рассеянным склерозом – интерферон β-1a (INFβ-1a). Все пациенты получали терапию согласно рекомендованным схемам лечения [26, 27, 28, 29]. Часть пациентов с ВЗК получали комбинированную терапию с азатиоприном: 80 % пациентов при лечении IFX, 46 % пациентов при лечении ADA. Пациенты с ПС в качестве дополнительной иммуносупрессивной терапии получали метотрексат в 45% случаев.

Клиническая активность заболевания у пациентов оценивалась с использованием индексов: PCDAI при БК (от 0 до 60 баллов), PUCAI при ЯК (от 0 до 80 баллов), PASI (от 0 до 68 баллов) и BSA (от 0 до 100%) при ПС, а также EDSS (от 1до 4,5 баллов) при РС. На основе индексов, клинико-лабораторных данных, результатов функциональных исследований (эндоскопия – при ВЗК, МРТ – при РС) пациенты были разделены на группы –обострение, ремиссия. В обострении ИЗЗ обследовано детей: с БК – 159, с ЯК – 111, с ПС – 92, с РС – 51. В ремиссии ИЗЗ обследовано пациентов: с БК – 138, с ЯК – 78, с ПС – 90, с РС – 96.

Эффективность терапии ГИБП у пациентов оценивалась через 52 недели. Пациенты были стратифицированы на группы по ответу в зависимости от достижения клинических и инструментальных критериев ремиссии для каждого заболевания.

Пациенты с ВЗК (БК/ЯК) были отнесены к группе с хорошим эффектом (эффективностью) при достижении клинико-эндоскопической ремиссии (индекс активности PCDAI/PUCAI $\leq$ 10, отсутствие признаков воспаления при эндоскопии). В группу с недостаточным эффектом (неэффективность – НЭ) вошли пациенты с сохранением клинической (PCDAI/PUCAI > 10) и эндоскопической активности.

У пациентов с псориазом группы были сформированы на основании улучшения PASI на 75% или выше к 12 месяцам терапии ADA – эффективность или отсутствия улучшения на 75% – неэффективность. Для пациентов с РС группа с хорошим эффектом (эффективность) определялась как отсутствие клинических обострений и активных очагов по данным МРТ, а группа с неэффективностью – наличие клинического обострения и/или новых активных очагов по МРТ.

Состояние пациентов, а также все исследованные показатели оценивались при разной длительности биологической терапии: до начала лечения, после индукционного курса, в год терапии, 1-3 года.

Анализ динамики изменения PCDAI и PUCAI у пациентов с БК и ЯК при лечении инфликсимабом и адалимумабом показал достоверно более высокие значения в группе с недостаточной эффективностью (НЭ) терапии по сравнению с группой с хорошим эффектом на терапию до ГИБП, после индукционного курса, к году терапии и в период 1-3 лет. У пациентов с ПС до назначения биологической терапии не было выявлено отличий между группами по индексу PASI в группах. В то же время, начиная с 16 недели терапии, у пациентов с ПС PASI значимо снижался в группе с эффективностью терапии. У пациентов с РС индекс инвалидизации EDSS>1: в группе с НЭ – 42% до назначения терапии, 48% в период поддерживающего курса; в группе с эффективностью терапии - 31% до назначения терапии, 31% в период поддерживающего курса. При этом, в поддерживающий

период терапии INFβ-1a только у 28% пациентов с эффективностью выявлялись активные очаги на МРТ, а в группе с неэффективностью терапии – у 80%.

У пациентов с ИЗЗ для выявления информативных иммунологических критериев в прогнозе эффективности ГИБП проведена динамическая оценка и сравнительный анализ между патологиями следующих показателей и параметров: количества лимфоцитов (Т-, В-, NK-клеток, активированных Т-хелперов, регуляторных Т-клеток, Th17-лимфоцитов); содержания и активности по экспрессия аргиназы 1 (Arg-1) клеток-супрессоров миелоидного происхождения; наивных Т-клеток и субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти (центральных, эффекторных, терминально-димфференцированных); содержания малых популяций Т-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73; активность митохондриальных дегидрогеназ (сукцинатдегидрогеназы, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы) в основных и малых популяциях лимфоцитов; уровня циркулирующих цитокинов (ЦК) и комплексов цитокинов (ЦКК) в сыворотке крови; относительного содержания популяций лимфоцитов (Т-, В-, NK-клеток, Т-регуляторных лимфоцитов, активированных Т-хелперов, Th17-клеток, цитотоксических Th17-клеток – Тс17) с транслокацией ядерного фактора транскрипции NF-κB; остаточного уровня IFX/ADA и антител к ним в сыворотке крови. На основании полученных результатов проанализированы кривые выживаемости биологической терапии Каплана-Майера в зависимости от возраста, формы патологии, применяемого препарата, использования комбинированной терапии, изменения иммунологических показателей, остаточного уровня биологического препарата в сыворотке крови пациентов. Наилучшие показатели, полученные в результате исследования, вошли в алгоритм иммунологического обследования с помощью которого можно прогнозировать ответ на ГИБП у пациентов с ИЗЗ.

4.1. Показатели клеточного иммунитета у пациентов с ИЗЗ в зависимости от клинического состояния и ответа при лечении ГИБП

В иммунопатогенезе ИЗЗ показано совместное участие клеток врожденной и адаптивной иммунной системы [194, 207, 220, 234].

В нашей работе показано увеличение популяции $CD4^+$ Т-клеток при эффективном лечении у пациентов с ВЗК (независимо от применяемого препарата - IFX/ADA), ПС и РС. Популяция $CD4^+$ Т-клеток неоднородна и включает различные популяции как эффекторных, так и регуляторных клеток [307, 313, 355]. Как показано Zapata-Cobo P. и соавт. повышение популяции $CD4^+$ Т-клеток у пациентов с ВЗК может происходить за счет увеличения количества Th1-клеток и связано это, как полагают исследователи, с перераспределением этой субпопуляции из воспалённых тканей на периферию после снижения активности местного воспаления в результате лечения [621]. Увеличение регуляторных Т-клеток приводит к подавлению воспалительного ответа при экспериментальном колите у мышей [355].

В нашем исследовании у пациентов с ВЗК и ПС в группах с эффективным лечением по сравнению с группами с недостаточной эффективностью во все периоды наблюдения установлено снижение NK-клеток, которое может быть расценено как хороший эффект в ответ на лечение. Поскольку, NK-клетки, как это ранее было показано, усиливают активацию воспалительного процесса за счёт усиления экспрессии активационных маркеров у пациентов с ВЗК и продукции провоспалительных цитокинов у пациентов с ПС [187, 368]. В группах пациентов с ВЗК, получавших инфликсимаб, наблюдалось снижение В-лимфоцитов, что согласуются с данными полученными El-Hodhod M. и соавт. у детей с ВЗК к году терапии IFX [239]. Такое снижение может быть объяснено, во-первых, повышенным синтезом высокоактивных хемоаттрактантов, привлекающих клетки в очаг воспаления и снижающих их количество в циркуляции [423] и, во-вторых, локальным синтезом индукторов апоптоза в ответ на химерную часть в составе IFX [239]. У пациентов с ВЗК, а также у пациентов с ПС, находящихся при лечении

адалимумабом, снижения содержания В-лимфоцитов не отмечалось. У пациентов с РС в группе с хорошим эффектом по сравнению с пациентами с недостаточной эффективностью ГИБП отмечено более высокое содержание популяции $CD4^+$ Т-клеток при более низком содержании $CD8^+$ Т-лимфоцитов, оказывающих прямое повреждающее действие на аксоны нейронов, а также повышение NK-клеток до назначения терапии и через 6 месяцев лечения. В литературе показано, что NK-клетки при РС помимо цитотоксической функции выполняют ещё регуляторную функцию и их увеличение может являться хорошим прогностическим критерием [115, 617].

В связи с тем, что для содержания основных и малых популяций лимфоцитов характерна возрастная динамика, в том числе для относительного содержания Th17-лимфоцитов (увеличение с возрастом), в нашей работе анализировались не истинные показатели, а отклонения от референсных значений для пациентов с ВЗК и ПС [80]. Для пациентов с РС проводили оценку истинных значений (в исследование были включены дети в возрастной группе старше 12 лет). В группах пациентов с эффективным лечением у пациентов с ВЗК (независимо от блокатора TNF), ПС и РС во все периоды наблюдения (до, после индукционного курса, год терапии) соотношение Th17/Treg было в пределах возрастного диапазона. При этом, в группах с недостаточной эффективностью у пациентов всех обследованных патологий данное соотношение было выше на протяжении всего периода наблюдений, чем у пациентов в группах с хорошим эффектом и группой сравнения. Полученные данные согласуются с данными литературы о значимости определения Th17-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток и их соотношения для оценки тяжести патологического процесса и эффективности биологической терапии при иммунозависимых заболеваниях, включая ВЗК, ПС и РС [60, 260, 298, 316]. Нами установлены пороговые значения для соотношения Th17/Treg в разделительной модели «эффективность-неэффективность» в разных возрастных группах во время поддерживающего курса у пациентов с ИЗЗ, выше которых можно 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 индекс Th17/Tregсоставлял: 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 индекс Th17/Treg составлял: 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 индекс Th17/Treg в группе старше 12 лет составлял 2,75 (0,881; 66/94). Наибольшее соотношение Th17/Treg, выше которого 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.

В последнее десятилетие активно изучаются миелоидные клетки – супрессоры, которые образуются после стимуляции TLR, DAMPs, PAMPs и играющие немаловажную роль при ИЗЗ [421]. Среди MDSCs различают 2 основные субпопуляции: моноцитарную (M-MDSCs - $LIN^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD14^{+}$) и гранулоцитарную (G-MDSCs - $LIN^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}$) [255]. MDSCs осуществляют супрессорную функцию за счет прямого цитотоксического контакта с клетками, а также за счёт истощения содержания аминокислот в микроокружении Т-клеток, необходимых для осуществления их эффекторных функций. Кроме того, активация MDSCs приводит к увеличению синтеза различных медиаторов (аргиназы-1, индуцибельной синтазы оксида азота, индоламиндиоксигеназы), приводя, с одной стороны, к ингибированию синтеза ζ-цепи Т клеточного рецептора и активации апоптоза Т-лимфоцитов, а с другой стороны, к стимуляции увеличения количества Treg [18, 496, 606].

У пациентов всех обследованных патологий независимо от состояния тяжести (обострение/ремиссия) установлено более высокое относительное и абсолютное содержание общей популяции MDSCs относительно группы сравнения. Среди пациентов с ВЗК, ПС и РС наибольшие значения абсолютного содержания MDSCs отмечались у пациентов в обострении ВЗК (104 кл/мкл), а наибольшие значения относительного содержания MDSCs - у пациентов в обострении РС (3,5% от мононуклеров (МНК)). Анализ отдельных популяций по относительному содержанию MDSCs показал, что в обострении заболевания у

детей с ВЗК относительно группы сравнения наблюдалось повышение моноцитарной субпопуляции MDSCs, у пациентов с РС – гранулоцитарной субпопуляции MDSCs. Полученные данные согласуются с работой, проведенной у взрослых пациентов с ВЗК, продемонстрировавшей корреляцию между активностью заболевания и увеличением моноцитарной субпопуляции MDSCs [604]. При этом показано, что у взрослых пациентов с ремиттирующим РС увеличение общей популяции MDSCs ассоциировано с активностью заболевания [304], а у пациентов с ПС – с тяжестью и длительностью заболевания [175; 209; 421].

В нашей работе у пациентов с ПС выявлена прямая корреляционная зависимость между популяциями MDSCs и Treg: абсолютным содержанием популяции MDSCs и Treg, (r=0,33); относительным содержанием незрелых миелоидных клеток супрессоров (M^-G^-MDSCs) и Treg (r=0,42); абсолютным содержанием M^-G^--MDSCs и Treg (r=0,43). У пациентов с РС установлена прямая корреляционная зависимость между абсолютным содержанием M^-G^-MDSCs и Treg (r=0,33), а также обратная с Th17/Treg (r=-0,32).

Полученные результаты согласуются с данными литературы о влиянии MDSCs на процессы дифференцировки и пролиферации регуляторных Т-клеток и регуляции баланса Th17 и Treg [606].

В нашей работе помимо содержания MDSCs оценивалась их функциональная активность по уровню аргиназы-1, действие которой, как уже упоминалось, приводит к уменьшению концентрации L-аргинина и подавлению экспрессии CD3 ζ-цепи, приводящее к ингибированию пролиферации и эффекторных функций Т-клеток. В эксперименте на мышах при СКВ продемонстрировано участие MDSCs в дифференцировке Th17-клеток под действием аргиназы-1 и IL-1[602, 605]. Нами выявлены более высокие значения активности аргиназы-1 при более низких показателях содержания MDSCs у пациентов с ВЗК, ПС и РС в ремиссии заболевания в сравнении с обострением заболевания. Полученные результаты согласуются с данными о том, что делеция аргиназы-1 в миелоидных клетках приводила к прогрессированию колита у экспериментальных животных [391].

Нами установлено, что наименьшая активность аргиназы-1 среди всех обследованных патологий отмечалась у пациентов с РС в стадии обострения заболевания при наибольшем содержании общей популяции MDSCs. Таким образом, увеличение содержания MDSCs, вероятно, является компенсаторной реакцией на дисфункциональность клеток, что подтверждается и согласуется с данными литературы о снижение активности MDSCs при РС и ПС [173, 449].

Роль MDSCs при иммунозависимых патологиях, по всей видимости, связана со стадией заболевания и формой патологии. В зависимости от микроокружения MDSCs могут выполнять как провоспалительные, так и противоспалительные функции. При ВЗК показано, что микроокружение может влиять на функционирование как гранулоцитарной субпопуляции MDSCs, так и моноцитарной [635]. В нашем исследовании также получены результаты, подтверждающие двоякую роль субпопуляций MDSCs: так у пациентов с ВЗК выявлено снижение абсолютного содержания MDSCs в группе с хорошим эффектом ГИБП к году терапии, а у пациентов с РС и ПС наоборот – увеличение.

Можно было предположить, что содержание MDSCs и других регуляторных клеток (Treg, регуляторных В-лимфоцитов) взаимосвязано. Мы оценили суммарное содержание миелоидных клеток супрессоров и Т-регуляторных клеток (Reg - сумма MDSCs и Treg) у пациентов с ВЗК, ПС и РС. Было установлено, что до начала лечения ГИБП абсолютное содержание Reg клеток у пациентов в группах с хорошим эффектом терапии значимо превышало показатели в группах с недостаточной эффективностью при всех изученных формах патологии. Нами 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 ВЗК, РС и ПС. 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).

Немаловажную роль в иммунопатогенезе различных иммунозависимых заболеваний отводится клеткам памяти [479, 572]. Иммунная память представляет собой ключевой инструмент адаптивного иммунитета, который обеспечивает быстрый и эффективный ответ Т-клеток при повторном контакте с антигеном. Баланс между популяциями Т-клеток памяти и регуляторными клетками имеет ключевое значение при различных физиологических и патологических состояниях, включая вакцинацию, инфекции, аутоиммунные процессы и рак [479, 572]. Нерециркулирующие тканевые резидентные клетки памяти (TRM - $CD69^{+}CD103^{-/+}$) контролируют локальный гомеостаз, участвуя в иммунных реакциях [618]. TRM могут поддерживать хроническое воспаление, продуцируя провоспалительные цитокины, в том числе IFN-γ, IL-17A и IL-22 [345, 362]. При РС показана противоречивая роль TRM. С одной стороны, резидентные Т-клетки памяти, дифференцирующиеся в очагах РС, могут обеспечивать локальную защиту от вируса Эпштейн-Барр, а с другой стороны эти клетки, не ограничивают реактивацию вируса и способствуют прогрессированию заболевания [323, 515]. У пациентов с ВЗК в слизистой оболочке кишечника продемонстрирована роль TRM в поддержании хронического воспаления [390]. У пациентов с псориазом показано, что плотность инфильтрирующих $CD8^{+}$ резидентных клеток памяти коррелировала с толщиной эпидермиса [347]. Помимо TRM выделяют 3 основные популяции клеток памяти с экспрессией соответствующих поверхностных маркеров: центральные – $CD45R0^{+}CCR7^{+}$ (CM), эффекторные – $CD45R0^{+}CCR7^{-}$ (EM), терминально-дифференцированные эффекторные – $CD45R0^{-}CCR7^{-}$ (EMRA) [186, 422]. Клетки центральной памяти циркулируют во вторичных лимфоидных тканях, более долгоживущие и обладают большей пролиферативной способностью, чем клетки эффекторной памяти. Т-клетки эффекторной памяти циркулируют в периферических нелимфоидных тканях и обеспечивают немедленные эффекторные функции, продуцируя больше цитокинов, чем Т-клетки центральной памяти [130]. Клетки памяти EMRA несут более высокие уровни цитотоксических генов по сравнению с клетками EM, показано их участие в патогенезе аутоиммунных заболеваний [461].

В нашем исследовании у пациентов с ВЗК, ПС и РС проведена оценка популяций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти: CM, EM, EMRA и наивных Т-клеток ($CD45R0^-CD197(CCR7^+)$). При анализе клеток памяти у детей с иммунозависимыми заболеваниями важно учитывать зависимость их популяционного состава от возраста. В физиологических условиях количество $CD4^+$NAIVE (TNAIVE) и $CD8^+$ NAIVE (TcytNAIVE) с возрастом уменьшается, содержание $CD4^+$CM (TCM) и $CD4^+$EM (TEM) увеличивается, а количество $CD4^+$EMRA (TEMRA) существенно не меняется [81; 153; 500]. Содержание $CD8^+$ популяций Т-клеток памяти EM и EMRA (TcytEM и TcytEMRA) увеличивается с возрастом, уровень CM (TcytCM) изменяется незначительно [500]. В нашей работе установлено, что у всех обследованных больных наблюдалось уменьшение популяции TNAIVE (ВЗК и РС – умеренная корреляция, ПС – слабая корреляция) и увеличение TCM (ВЗК и РС – умеренная корреляция, ПС – слабая корреляция) с возрастом, что согласуется с исследованием Pappa A. и соавт., проведённым у детей с ВЗК [456].

Оценка зависимости содержания клеток памяти от индексов клинической активности показала, что у детей с ВЗК выявлено уменьшение количества популяции TNAIVE и увеличение популяций TCM и TEM при повышении индексов активности PCDAI/PUCAI. Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что у детей при обострении ВЗК увеличивалось количество циркулирующих популяций $CD4^+$ Т-клеток памяти [456]. У пациентов с ПС также выявлено снижение содержания популяции TNAIVE и повышение популяции TCM при увеличении индекса PASI. У пациентов с РС при обострении заболевания (наличие активных очагов демиелинизации по МРТ), в отличие от детей с ВЗК и ПС, снижалось содержание популяции TcytNAIVE и увеличивалось TcytEM, что согласуется с данными полученными у взрослых пациентов с РС [130].

В нашей работе показано, что у пациентов обследованных патологий соотношение клеток памяти в популяциях $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитах отличаются: в $CD4^+$ наибольшая доля приходилась на центральные клетки, а $CD8^+$ – на терминально-дифференцированные.

В нашей работе установлено, что у больных с ИЗЗ 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 $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клеток при снижении доли популяции центральных $CD4^+$ и эффекторных CD8+ Т-клеток памяти, а у пациентов с РС снижение доли популяции наивных $CD8^+$ Т-клеток при снижении $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток эффекторной памяти. Эти результаты согласуются с исследованиями Bose T. и соавт., которые показали, что у взрослых больных РС применение INFβ-1a приводило к снижению содержания Т-клеток центральной памяти и увеличению количества наивных клеток [141].

У пациентов с ВЗК, ПС и РС во время поддерживающего курса ГИБП мы получили пороговые значения для наивных Т-клеток, выше которых можно прогнозировать эффективность проводимой биологической терапии, а также определили пороговые значения для клеток центральной, эффекторной и терминально-дифференцированной памяти, выше которых можно ожидать неэффективность терапии. Пороговые значения для пациентов с ВЗК составили (cut-off, % от $CD4^+$ Т-клеток (AUC, Se/Sp %)): TNAIVE – 58,1 % (0,807, 70/83); TcytNAIVE – 53,1 % (0,873, 82/ 81); 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). 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 $CD4^+$ Т-клетки памяти, а для пациентов с РС – $CD8^+$ Т-клетки памяти.

Таким образом, у пациентов с ВЗК, ПС и РС выявлены иммунологические показатели, позволяющие прогнозировать эффективность биологической терапии на разных этапах лечения.

Соотношение Th17/Treg у пациентов с хорошим эффектом терапии независимо от формы патологии, применяемого препарата и длительности терапии не превышало возрастного референсного диапазона. Получены пороговые значения для соотношения Th17/Treg при всех обследованных патологиях в возрастных группах от 6 до 12 лет и старше 12 лет, выше которых можно ожидать снижение эффективности ГИБП.

Выявлены показатели, характерные для определенной патологии – при эффективности терапии у пациентов с ВЗК и ПС хорошим прогностическим критерием является снижение содержания NK-клеток, а при РС увеличение содержания этой популяции, что объясняется особенностями иммунопатогенеза заболевания.

У пациентов с ИЗЗ независимо от клинического состояния (обострения/ремиссии) содержание миелоидных клеток-супрессоров выше референсного диапазона, при этом показано снижение фукциональнальной активности MDSCs (снижение активности аргиназы-1) у пациентов в обострении заболевания независимо от патологии. Получены пороговые значения для абсолютного содержания общей популяции миелоидных клеток-супрессоров и Treg клеток (сумма MDSCs и Treg) до назначения ГИБП, ниже которых можно прогнозировать неэффективность проводимой биологической терапии.

У пациентов с ИЗЗ (ВЗК, ПС, РС) в группах с эффективным лечением ГИБП независимо от патологии установлено уменьшение эффекторных популяций клеток-памяти и увеличение наивных Т-клеток. Получены пороговые значения для наивных Т-клеток и Т-клеток памяти, позволяющие прогнозировать эффективность ГИБП у пациентов с ИЗЗ.

4.2. Метаболизм лимфоцитов у детей с иммунозависимыми заболеваниями в зависимости от клинического состояния и эффективности лечения ГИБП

Для образования лимфоцитов с определенным фенотипом необходимо взаимодействие соответствующих сигнальных, транскрипционных и метаболических путей при всех типах иммунных реакций. Дисбаланс эффекторных и регуляторных клеток, вызванный метаболическими изменениями (гликолиз, липогенез), приводит к активации воспалительных процессов [118]. Иммунный ответ лимфоцитов сопровождается изменением их метаболизма [198, 252, 259]. При антигенной стимуляции в покоящихся клетках (превалирует окислительное фосфорилирование – OXPHOS) происходит изменение энергетических потребностей с активацией аэробного гликолиза. В процессе аэробного гликолиза образуется меньше АТФ на 1 молекулу глюкозы в сравнении с OXPHOS. Однако, реакции аэробного гликолиза проходят в 10-100 раз быстрее, чем реакции OXPHOS, что позволяет генерировать больше молекул АТФ за единицу времени [106]. Кроме того, в результате 10 ферментативных стадий гликолиза глюкоза превращается в пируват и образуются макромолекулы для синтеза нуклеиновых кислот, липидов и аминокислот необходимые для пролиферации Т-клеток [106].

Метаболический профиль клеток эффекторов и регуляторных клеток отличается. Так Th1-, Th2- для получения энергии используют в большей степени гликолиз, чем OXPHOS, а в Th17-лимфоцитах помимо гликолиза активируются процессы синтеза жирных кислот. В то же время, метаболизм Treg основан на OXPHOS и на окислении жирных кислот, и в меньшей степени на гликолизе [527; 557]. Показана пластичность популяций Th17 и Treg, которая контролируется цитокинами и метаболическими процессами [628]. В ряде исследований показано, что при различных иммунозависимых заболеваниях обнаружена связь с нарушением метаболических путей. Установлены гены, связанные с OXPHOS, дефекты в которых приводят к дисфункции клеток Панета при ВЗК [616]. У пациентов с псориазом показано, что неконтролируемая пролиферация Т-клеток

связана с повышенным уровнем экспрессии переносчика глюкозы-1 (GLUT-1) [454]. В работах Yang W. и соавт. показано, что блокирование ключевого регулятора клеточного метаболизма mTOR (mammalian target of rapamycin – мишень рапамицина у млекопитающих) с помощью рапамицина снижало проявления колита у мышей за счёт восстановления баланса между клетками Th17 и Treg в кишечнике [616]. В эксперименте показана возможность снижения воспаления при ревматоидном артрите ингибированием гликолиза в Т-лимфоцитах с помощью 2-дезоксиглюкозы [135].

В ходе работы оценивали активность митохондриальных дегидрогеназ – сукцинатдегидрогеназы (СДГ, комплекс II) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) в лимфоцитах периферической крови у детей с ИЗЗ с различным ответом при лечении ГИБП.

СДГ представляет собой гетеротетрамерный мембранно-протеиновый комплекс, расположенный во внутренней мембране митохондрий. СДГ окисляет сукцинат до фумарата в цикле трикарбоновых кислот, а также участвует в переносе электронов, восстанавливая убихинон и являясь II белковым комплексом OXPHOS [431]. ГФДГ обеспечивает перенос восстановительных эквивалентов из цитоплазмы в дыхательную цепь и восстановление коферментов NAD^+ и FAD^+ (в цикле Кребса), являющимися субстратами для окислительного фосфорилирования. Также ГФДГ катализирует реакцию окисления глицерол-3-фосфата до дигидроксиацетонфосфата (предшественника синтеза фосфолипидов) [147, 447, 634].

Таким образом, определение активности СДГ позволяет оценить функциональное состояние митохондрий и уровень окислительного фосфорилирования, а активность ГФДГ - сопряжённость гликолиза с окислительным фосфорилированием.

В нашем исследовании мы оценили активность СДГ и ГФДГ в основных (Т-, В-, NK-клетках) и малых популяциях лимфоцитов (Thact, Treg, Th17) иммуноцитохимическим методом [78] у 46 человек группы сравнения и у 330 пациентов с ИЗЗ (до назначения, после индукционного курса, на 52 неделе, в 1-3

года ГИБП): 177 пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника при лечении IFX/ADA (группа с недостаточной эффективность – 86, группа с хорошим эффектом – 91); 76 пациентов с вульгарным псориазом при лечении ADA (группа с недостаточной эффективность – 27, группа с хорошим эффектом – 49); 77 пациентов с РС (группа с недостаточной эффективность – 40, группа с хорошим эффектом – 37).

Анализ показал значимо более низкую активность СДГ в лимфоцитах (Т-, В-, NK-клетках, Thact, Treg, Th17) до назначения ГИБП у пациентов с ПС и РС в группе с недостаточной эффективностью относительно группы сравнения и группы с хорошим эффектом (у пациентов с РС отличий не было по СДГ в В-лимфоцитах). Установлены различия по активности СДГ в период до начала лечения у пациентов с ВЗК в группах с недостаточной эффективностью (НЭ) при лечении IFX и ADA относительно группы сравнения и группы с хорошим эффектом: у пациентов группы ВЗК IFX – более низкие показатели в популяциях Т-, В-лимфоцитах, Th17 и Treg; у пациентов группы ВЗК ADA – более низкие показатели в Т-лимфоцитах и Treg. Также нами показано снижение активности ГФДГ у пациентов в группе НЭ относительно группы сравнения и группы с хорошим эффектом в основных и малых популяциях лимфоцитов у пациентов с ПС и РС. Установлено, что у пациентов с НЭ в группах с ВЗК IFX и ВЗК ADA наблюдались более низкие значения ГФДГ относительно группы сравнения во всех исследованных популяциях, за исключением популяции Th17 у пациентов группы ВЗК ADA. В то же время показатели активности ГФДГ у пациентов с ВЗК в группе с НЭ при лечении IFX были ниже по сравнению с группой с хорошим эффектом терапии в популяциях $CD4^+$ Т-клетках, Treg и Th17-лимфоцитах, а пациентов при лечении ADA – не отличались.

У пациентов с ИЗЗ в группах с недостаточной эффективностью в сравнении с группой с эффективным лечением выявлена достоверно более низкая активность СДГ в патогенетически значимых популяциях лимфоцитов - Treg и Th17-лимфоцитах во все периоды введения ГИБП, за исключением отсутствия достоверного снижения у пациентов с РС после индукционного курса INFβ-1a.

Полученные результаты о значениях СДГ в Treg у детей с ИЗЗ согласуются с данными, полученными исследователями в экспериментальных моделях. Показано, что дефицит СДГ активирует провоспалительные гены в Т-клетках, способствуя их дифференцировке в Th1- и Th17-клетки [191]. При экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (модель РС) показано снижение процессов OXPHOS в Treg [275].

Пороговые значения СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов, ниже которых можно прогнозировать недостаточную эффективность от проводимой терапии ГИБП, определялись формой патологии и периодом лечения. Признаком недостаточного ответа на биологическую терапию является снижение активности СДГ у пациентов с ИЗЗ до назначения терапии ГИБП (cut-off (AUC, Se/Sp)): группы ВЗК IFX в Treg ниже 185 усл.ед (0,812, 82/67), в Th17-лимфоцитах ниже 186 усл.ед. (0,798, 74/74); у пациентов группы ВЗК ADA в Treg ниже 186 усл.ед (0,794, 82/67); у пациентов с ПС в популяциях CD4 Т-лимфоцитах ниже 193 усл.ед.(0,984, 86/89), в Treg ниже 193 усл.ед. (0,810, 71/67); у пациентов с РС в NK-клетках ниже 181 усл.ед. (0,866, 88/91), в Treg ниже 187 усл.ед.(0,878, 75/77) является. Также в нашем исследовании у пациентов с РС до назначения INFβ-1a получены пороговые значения по активности ГФДГ в популяциях лимфоцитов, ниже которых можно прогнозировать недостаточную эффективность терапии к году лечения: в популяции NK-клеток ниже 173 усл.ед. (0,852, 75/91), в Treg – 168 усл.ед. (0,761, 75/91).

Определены пороговые значения активности СДГ у пациентов с ПС после индукционного курса, ниже которых можно прогнозировать недостаточную эффективность к году терапии: в популяциях CD4 Т-лимфоцитах – 188 усл.ед. (0,897, 83/86), в Treg - 182 усл.ед. (0,874, 83/93).

Установлены пороговые значения активности СДГ на 52 неделе ГИБП у пациентов с ИЗЗ, ниже которых можно прогнозировать неэффективность проводимой терапии: у пациентов с ВЗК на IFX в Treg – 188 усл.ед (0,824, 76/68), в Th17-лимфоцитах - 179 усл.ед. (0,806, 74/68); у пациентов с ВЗК на ADA в Treg -

189 усл.ед (0,810, 71/70); у пациентов с ПС - в популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитах - 186 усл.ед. (0,817, 79/75), в Treg - 184 усл.ед. (0,841, 91/75).

Таким образом, анализ активности митохондриальных дегидрогеназ в популяциях лимфоцитов показал, что при всех изученных патологиях значение СДГ в Treg ниже 182 усл. ед. является прогностически неблагоприятным признаком потери эффекта ГИБП.

Для более глубокого понимания изменений метаболизма лимфоцитов у пациентов с ИЗЗ мы оценили содержание комплексов белков окислительного фосфорилирования (НАД*Н - убихинон оксидоредуктаза, сукцинат убихинон оксидоредуктаза, убихинон цитохром С оксидоредуктаза, цитохром С оксидаза, АТФ синтаза и никотинамид нуклеотид трансгидрогеназа) и гликолиза (енолаза 1, глюкозо-6-фосфат изомераза, гипоксия-индуцируемый фактор 1-альфа, α цепь L-лактат дегидрогеназы, β цепь L-лактат дегидрогеназы, М2 изоформа пируваткиназы, транскетолаза).

Количественный анализ белков окислительного фосфорилирования и гликолиза в лизатах лимфоцитов проведён у пациентов в обострении ИЗЗ (30 детей с вульгарным псориазом, 36 детей с ВЗК) и у 32 детей группы сравнения с помощью мультиплексного анализа. Выявлено у пациентов в обострении ИЗЗ по сравнению с группой сравнения 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 51% и транскетолазы – на 29%). Таким образом, в состоянии обострения у пациентов с ИЗЗ установлено снижение белков первых трёх комплексов OXPHOS и увеличение белков гликолиза - глюкозо-6-фосфат изомеразы, транскетолазы (активация пентозофосфатного цикла), а также снижение М2 изоформы пируваткиназы на конечном этапе гликолиза. Выявленные закономерности согласуются с изменением метаболических процессов, описанных при активации лимфоцитов [252, 259]. Наблюдаемое увеличение гипоксия-индуцируемого

фактора 1-α у пациентов с ИЗЗ в стадии обострения активизирует процессы гликолиза в клетках**,** способствуя тем самым развитию Т-лимфоцитов с провоспалительным фенотипом [198]**.** Повышение HIF-1a у взрослых пациентов с ВЗК, как показано, приводит к повреждению тканей слизистой кишечника [607]. У пациентов с псориазом гипоксия-индуцируемый фактор 1-α рассматривается в качестве потенциальной мишени для эффективного контроля за заболеванием [641].

Анализ показал, что у пациентов в обострении ИЗЗ наибольшее снижение среди комплекса белков OXPHOS выявлено для белка II комплекса дыхательной цепи, что согласуется с полученными ранее данными о снижении активности СДГ у детей с БК в состоянии обострения [54]. Получено хорошее соответствие показателей (r=0,68, p=0,004) между активностью СДГ, измеренной иммуноцитохимическим методом, и количеством белка II комплекса OXPHOS по результатам мультиплексного анализа. Полученные результаты позволяют для объективной оценки процессов OXPHOS у пациентов с ИЗЗ использовать менее дорогой и трудозатратный иммуноцитохимический метод определения активности СДГ.

Таким образом, в обострении ИЗЗ наблюдается снижение содержания белков I – III комплексов окислительного фосфорилирования, повышение белков начальных стадий гликолиза и их активаторов (HIF-1α), что подтверждает теорию метаболического перепрограммирования при активации клеток.

Внеклеточная аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) является DAMPs сигналом, который активирует дифференцировку Th17-лимфоцитов [585]. Основным источником АТФ являются поврежденные клетки, которые образуются, в том числе, при воспалении. При адекватном иммунном ответе внеклеточная АТФ может быть быстро метаболизирована до аденозина путем последовательного дефосфорилирования с участием поверхностных ферментов CD39 и CD73 [227]. Эктонуклеотидазы CD39 и CD73 экспрессируются на поверхности различных клеток, в том числе в Treg и Th17-клетках [622]. Показана роль эктонуклеотидаз в регуляции воспаления при разных заболеваниях. Например, высокая экспрессия

CD39 в циркулирующих Treg коррелировала с состоянием ремиссии у взрослых пациентов с ВЗК [586]. Известно, что функция Treg зависит от экспрессирующихся на поверхности маркеров, в том числе от CD39. Так, клетки с фенотипом $CD4^{+}CD25^{high}CD39^{+}$ ингибируют продукцию IL-17, в то время как, $CD4^{+}CD25^{high}CD39^{-}$ продуцируют IL-17 [244].Популяция Th17-клеток неоднородна по экспрессии CD39. Th-17-лимфоциты с высокой экспрессией CD39 (supTh17) выполняют регулирующую функция, участвуя в превращении АТФ до аденозина [242, 378]. Показана регулирующая роль supTh17 в тканях собственной пластинки кишечника у здоровых людей [378].

Нами проведена оценка содержания поверхностных эктонуклеотидаз CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 - E-NTPDase1) и CD73 (ecto-5'-nucleotidase - Ecto5'NTase) в малых популяциях лимфоцитов. Для исследования содержания популяций Treg, Thact, Th17-лимфоцитов с экспрессией CD39 и CD73 проведено обследование детей в возрасте от 3,4 до 18 лет в следующих группах: 213 пациентов в обострении ИЗЗ (БК – 52, ЯК – 46, ПС – 67, РС – 48), 188 пациентов в ремиссии заболевания (БК – 48, ЯК – 28, ПС – 44, РС – 68), 124 пациента с неэффективностью ГИБП (ВЗК - 56, ПС – 38, РС – 30), 125 пациентов с эффективностью лечения (ВЗК - 60, ПС – 24, РС – 41). Показатели CD39 и CD73 в группах пациентов с ИЗЗ с разной эффективностью к году терапии ГИБП оценивали до назначения терапии, после индукционного курса и на 52 неделе лечения.

Установлено, что содержание клеток с экспрессией эктонуклеотидаз зависит от возраста. С возрастом увеличивалось относительное содержание CD73Th17 у пациентов с ВЗК ($r=0,43$, $p<0,001$) и пациентов с ПС ($r=0,46$, $p<0,001$) также, как и в группе сравнения ($r=0,29$, $p<0,001$). В группе пациентов с РС таких закономерностей получено не было, вероятно, из-за того, что обследовались дети подростковой группы (старше 14 лет).

У взрослых здоровых доноров показано, что содержание Treg с экспрессией CD39 варьирует в диапазоне от 2 до 60% от Treg [140]. Ранее нами также было показано, что у здоровых детей содержание клеток с экспрессией CD39 в Treg

колебалось от 19–49% [68]. В нашем исследовании установлено, что наибольшее относительное содержание лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидазы CD39 выявлялось 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. Полученные нами результаты согласуются с данными авторов, которые описали экспрессию эктонуклеотидаз в Treg у взрослых пациентов с ВЗК [263, 510].

Наибольшее содержание лимфоцитов с экспрессией CD73 получено в активированных Т-хелперах: у пациентов с ВЗК – 21,8 (16,4-28,9) % от Thact; у пациентов с ПС – 19,2 (15,2-24,1) % от Thact; у пациентов с РС - 13,9 (9,4-21,1) % от Thact. У пациентов с ИЗЗ соотношение клеток с экспрессией CD39 и CD73 в популяциях Treg (содержание клеток с экспрессией CD39 выше, чем экспрессия CD73) и Thact (содержание клеток с экспрессией CD39 ниже, чем экспрессия CD73) было аналогично таковым в группе сравнения. В популяции Th17-лимфоцитов соотношение клеток с экспрессией CD39 и CD73 у пациентов с ВЗК не отличалось и было аналогично группе сравнения. В то же время у пациентов с ПС и РС в Th17-лимфоцитах доля клеток с экспрессией CD39 была выше, чем CD73Таким образом выявлено, что количество клеток с экспрессией CD39 и CD73 зависит от популяции лимфоцитов, наибольшее относительное количество клеток с экспрессией CD39 выявлено в Treg, а CD73 – в активированных Т-хелперах, что согласуется с результатами, полученными у взрослых пациентов [37, 95].

У пациентов с БК и РС в обострении заболевания нами были выявлены более низкие значения клеток с экспрессией CD39 в популяциях Treg и Th17-лимфоцитов по сравнению с группой сравнения и с ремиссией заболевания. Наши результаты согласуются с данными о том, что у взрослых пациентов с БК количество supTh17 значительно снижено в периферической крови по сравнению со здоровыми людьми [378], а также о том, что у взрослых пациентов с ВЗК после лечения блокаторами TNF увеличивалось содержание Treg с экспрессией CD39 [263]. Сообщалось, что у пациентов с РС препараты, такие как INFβ-1a, финголимод, алемтузумаб и глюкокортикоиды увеличивают частоту появления CD39Treg-клеток и

способность этих клеток к гидролизу АТФ [97]. Полученные нами результаты подчеркивают регулирующую значимость экспрессии эктонуклеотидазы CD39.

У пациентов с ПС в обострении и ремиссии заболевания содержание supTh17 популяции не отличалось от группы сравнения, что согласуется с данными полученными Han L. и соавт. у взрослых пациентов с псориазом относительно здоровых доноров [287].

Несмотря на то, что при некоторых формах патологии (БК и РС) выявлено снижение содержания Treg с экспрессией CD39, анализ распределения содержания CD39Treg показал, что как в обострении, так и в ремиссии заболевания наблюдались пациенты с высоким (более 20%) содержанием CD39: у пациентов с БК – в 22% случаев в обострении против 82% в ремиссии заболевания; у пациентов с ЯК – в 67% случаев в обострении против 100% в ремиссии заболевания; у пациентов с ПС – в 66% случаев в обострении против 90% в ремиссии заболевания; у пациентов с РС – в 78% случаев в обострении против 85% в ремиссии заболевания. У Grant Ch. и соавт. показано, что у пациентов с аутоиммунным гепатитом происходит снижение гидролазной активности CD39 в Treg [274].

Нами была выдвинута гипотеза о том, что увеличение содержания CD39 в Treg у пациентов в обострении ИЗЗ является компенсаторной реакцией на дисфункцию эктонуклеотидазы. С помощью люциферин-люциферазного теста у 40 пациентов в обострении ВЗК и у 28 детей в ремиссии ВЗК была проведена оценка каталитической активности эктонуклеотидазы CD39 по снижению экзогенно добавленного АТФ к выделенным на сортере регуляторным Т-клетках с экспрессией CD39. В экспериментах in vitro получено, что клетки от пациентов в ремиссии ВЗК обладали большей гидролазной активностью, чем в обострении заболевания. АТФ через 5 минут реакции снижалась на 45% в образцах клеток от пациентов в ремиссии ВЗК и на 33% - в обострении. Причём, образцы с меньшим количеством клеток показали более высокую активность эктонуклеотидазы CD39. Таким образом, мы предполагаем, что увеличение содержания Treg с экспрессией CD39 при обострении заболевания является компенсаторной реакцией на дисфункцию CD39, что согласуется с данными Grant Ch. и соавт. о снижение

функциональной активности эктонуклеотидазы CD39 при аутоиммунном гепатите [274].

Нами установлено, что у пациентов всех обследованных патологий (ВЗК, ПС, РС) в группах с эффективным лечением ГИБП к году терапии содержание клеток с экспрессией CD39 в Т-регуляторных и Th17-лимфоцитах было достоверно выше, чем в группах с недостаточной эффективностью. Получены пороговые значения относительного содержания малых популяций, ниже которых можно прогнозировать недостаточную эффективность ГИБП к году терапии: у пациентов с ВЗК для популяции CD39Treg – 34 % от Treg (0,885, 84/81) и популяции CD39Th17 –15 % от Th17 (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 (0,925, 80/88), для CD73Th17 – 14,2 % от Th17 (0,848, 85/75).

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о том, что независимо от формы патологии активация воспалительного процесса (обострение заболевания) сопровождается снижением комплексов белков (I-III) окислительного фосфорилирования, повышением белков гликолиза и его активатора (HIF-1α). При этом, снижение активности СДГ (митохондриальная дегидрогеназа) в Treg ниже 182 усл. ед. - прогностически неблагоприятный признак потери эффекта ГИБП.

Уровень экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у обследованных детей зависит от популяции клеток и не зависит от нозологии. Максимальная доля CD39-позитивных клеток была характерна для Treg, тогда как CD73 – для активированных Т-хелперов. Соотношение CD39 и CD73 в Treg и Thact аналогично при всех ИЗЗ: в популяции Treg доля клеток с экспрессией CD39 выше, чем с экспрессией CD73, в Thact наоборот- доля клеток с экспрессией CD39 ниже, чем с экспрессией CD73. Повышение содержания Т-регуляторных клеток с экспрессией CD39 у части пациентов с ИЗЗ в обострении заболевания более 20% может быть компенсаторной реакцией на снижение каталитической активности эктонуклотидазы CD39. В группах с хорошим эффектом ГИБП к году терапии

содержание CD39 в Т-регуляторных и Th17-лимфоцитах (supTh17) выше, чем в группах с недостаточной эффективностью. Получены пороговые значения относительного содержания CD39Treg от Treg и CD39Th17 от Th17, ниже которых можно ожидать неэффективность ГИБП к году терапии.

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

Цитокины (ЦК) являются медиаторами, которые осуществляют контроль и регулируют иммунные и воспалительные реакции в различных тканях и органах через сеть взаимодействий [24, 79]. Для цитокинов характерна плейотропность и синергизм. Отдельные цитокины, например, IL-27 и IL-33 могут выполнять как провоспалительные, так и регулирующие свойства в зависимости от микроокружения [219, 413, 430, 619, 640]. Баланс между эффекторными и регуляторными иммунными клетками, помимо метаболических сигнальных путей, регулируется цитокиновым микроокружением [628]. Наивные $CD4^+$ Т-клетки дифференцируются в эффекторные субпопуляции (Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, фолликулярные Т-хелперы) и регуляторные Т-клетки при участии различных цитокинов [318, 527]. Наивным Т-лимфоцитам необходимо присутствие цитокина IL-2 для дифференцировки в Th1-популяцию, IL-2 и TGF-β для дифференцировки в Treg, а IL-6, IL-21, IL-23, IL-1β и TGF-β для дифференцировки в Th17-лимфоциты [318, 601]. При различных формах ИЗЗ показана корреляция уровня цитокинов со стадиями заболевания. У взрослых пациентов в ранней фазе язвенного колита в циркуляции наблюдаются высокие концентрации TNF-α, IL-1β и IL-6, которые вырабатываются клетками врождённого иммунитета. В поздней же фазе при язвенном колите доминируют цитокины, продуцируемые Th1- и Th2-лимфоцитами. Th17-ассоциированные цитокины (IL-17A, IL-17F), как предполагают, участвуют в обеих фазах заболевания [472]. Описано, что воспаление, обусловленное определёнными цитокинами (GM-CSF, IFN-β, IFN-γ,

TNF-α, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23) является ключевым процессом при аутоиммунной атаке у пациентов с РС [116].

В работе проведена оценка информативности определения цитокинов (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL25, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31, IL-33, GM-CSF, IFN-γ, CCL20/MIP3α, TNF-a, TNF-β) у детей с ИЗЗ в зависимости от стадии заболевания (обострение/ремиссия) и эффективности ГИБП при разной длительности лечения. Концентрацию ЦК определяли с помощью мультиплексного анализа. Исследование проведено у детей с ИЗЗ в следующих группах: 145 пациентов в обострении ИЗЗ (БК – 48 пациентов, возраст – 15,7 (12,2-16,9) лет; ЯК – 33 пациента, возраст – 14, 8 (13,9 – 16,0) лет; ПС – 30 пациентов, возраст – 8,34 (6,9-12,1) лет; РС – 34 пациента, возраст – 15,9 (15,1-17,2) лет), 143 пациента в ремиссии заболеваний (БК – 32 пациента , возраст –15,7 (14,1-16,7) лет; ЯК – 20 пациентов, возраст - 15,1 (14,8-16,8) лет; ПС – 59 пациентов, возраст – 9,7(7,7-3,5) лет; РС – 32 пациента, возраст – 16,2 (14,6-17,5) лет; 109 пациентов с недостаточной эффективностью ГИБП к году терапии (БК – 26 пациентов, возраст – 15,5 (12,2-16,9) лет); ЯК – 26 пациентов, возраст – 13,9 (11,1-14,2) лет; ПС – 29 пациентов, возраст – 8,4 (7,1-13,1) лет; РС – 28 пациентов, возраст – 15,9 (15,1-16,4) лет); 108 пациентов с эффективным лечением ГИБП к году терапии (БК – 22 пациента, возраст – 16,1 (13,6-17,0) лет; ЯК – 18 пациентов, возраст – 14,6(11,9-14,9) лет; ПС – 44 пациента, возраст – 10,2(8,3-13,9) лет; РС – 24 пациента, возраст – 16,1(14,6-17,9) лет).

Анализировали уровень отдельных ЦК и цитокиновых комплексов (ЦКК), которые формировали в зависимости от клеток-продуцентов и функций цитокинов [179]. Исходя из цитокинов, которые продуцируют клетки и которые необходимы для дифференцировки клеток, оценивали следующие комплексы: M1 (IL-1+IL-6+TNF-α), cTh1 (IFN-γ+IL-12p70+TNF-β+IL-2), cTh2 (IL-4+IL-5+ IL-13+IL-17E/IL25+IL-33), cTh17 (IL-1β+IL-6+IL-17A+IL-17F+IL-21+IL-22+IL-23), fTh2 (IL-4+IL-5+IL-13), fTh2+mast (IL-4+IL-5+IL-31+IL-13); fIL12 (IL-12 + IL-23+ IL-27); fTh17 (IL-17A+IL-17F); fTh22 (IL-13+IL-22). Комплекс M1 ассоциирован с

M1 макрофагами, которые вырабатывают цитокины IL-1, IL-6 и TNF-α [179, 545]. Комплекс cTh1 ассоциирован с Th1-клетками, продуцирующими IFN-γ, TNF-β, IL-2, а входящий в комплекс цитокин IL-12 необходим для дифференцировки наивных Т-клеток в Th1-лимфоциты [318]. Комплекс cTh2 ассоциирован с Th2 клетками, которые образуются из наивных Т-клеток под действием IL17E/IL-25 и IL33 и продуцируют IL-4, IL-5 и IL-13 [179, 318, 336]. Комплекс cTh17 состоит из ЦК, которые необходимы для дифференцировки Th17-клеток (IL-1β, IL-6, IL-21 и IL-23) и ЦК, которые они продуцируют – IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-2 [636]. Функциональные комплексы ассоциированы с клетками, продуцирующими определенные ЦК: комплекс fTh2 (IL-4+IL-5+IL-13) – цитокины, продуцируемые Th2 лимфоцитами [318, 336]; комплекс fTh2+mast включал ЦК, продуцируемые Th2-клетками и тучными клетками (IL-4+IL-5+IL-31+IL-13) [318, 336, 369]; комплекс fIL12 (IL-12 + IL-23+ IL-27) [24, 619, 413]; комплекс fTh17 (IL-17A+IL-17F) - основные ЦК, продуцируемые Th17-клетками [636]; комплекс fTh22 (IL-13+IL-22) – цитокины, продуцируемые Th22 клетками [318].

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 ЦК не было отличий между состояниями обострения и ремиссии у детей с ВЗК только по уровню IL-17A и IL-1β, Наши результаты совпадают с данными, полученными с Krawiec P. и соавт. о том, что у детей с БК не было получено значимой разницы между уровнями цитокина IL-17A в обострении и ремиссии заболевания [342]. Известно, что в иммунопатогенезе БК ключевая роль отводится Th1 и Th17-клеткам, тогда как при ЯК - Th2-клеткам [271]. В нашем исследовании у детей в обострении и БК и ЯК получено увеличение уровней цитокинов, продуцируемых как Th1 и Th17-лимфоцитами, так и Th2-клетками.

В нашем исследовании у пациентов с ПС в обострении заболевания было получено значимое увеличение уровня изученных цитокинов, за исключением, CCL20/MIP3a, IL-15, IL-1β. Наши данные согласуются с результатами Wang Q. и соавт., за исключением цитокина IL-1β, для которого у взрослых пациентов в

обострении ПС показано его увеличение относительно ремиссии заболевания [593].

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-β, GM-CSF. Цитокин IL-9 продуцируется популяцией Th9 клеток и при РС выполняет регулирующую роль, конкурируя с IL-17. [492]. Возможно, что повышение IL-9 при обострении заболевания, как показано в нашей работе, является компенсаторной реакцией на повышение цитокина IL-17E/IL-25.

Выявлено, что у пациентов с РС при наличии активных очагов на МРТ относительно пациентов без активных очагов достоверно увеличен профиль цитокинов, синтезируемых Th22 клетками. Известно, что в зависимости от микроокружения Th22 лимфоциты могут дифференцироваться в Th1- или Th2 клетки. Кроме того, IL-22 может играть синергетическую роль с IL-17, усиливая эффекты последнего, повреждая целостность гематоэнцефалического барьера и усугубляя воспаление [190].

Наибольшие значения при обострении и ремиссии заболевания у пациентов всех патологий наблюдались для уровня IL-23 (Me, обострение/ремиссия, пг/мл): при БК- 1639/669, при ЯК - 1205/709, при ПС – 1805/935, при РС – 709/36. Наименьшие концентрации ЦК при ИЗЗ выявлялись для IL-1β (Me, обострение/ремиссия, пг/мл) и не отличались между стадиями заболевания: при БК- 0,9 /0,8, при ЯК - 0,5 /0,5, при ПС – 0,4 /0,4, при РС – 1,7 /1,7. Показано, что IL-23 играет важную роль в патогенезе БК, ЯК, ПС и болезни Бехтерева. Большие полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) выявили варианты гена *IL23R*, кодирующего специфический рецептор IL-23, которые изменяют восприимчивость к этим заболеваниям [517]. Известно об успешности применения моноклональных антител против разных субъединиц IL-23 (p40 – устекинумаб, p19 – бразикумаб) в клинических исследованиях у взрослых пациентов с ВЗК [517], а также у детей с ПС (устекинумаб) [27]. Нами показано, что наименьший уровень большинства цитокинов как при обострении, так и в ремиссии заболевания наблюдался у пациентов с РС среди всех обследованных патологий.

В нашем исследовании корреляционный анализ Спирмена не выявил зависимостей уровней ЦК от возраста у пациентов с ИЗЗ. Полученные результаты согласуются с данными об отсутствии существенного влияния возраста на уровень цитокинов в сыворотке крови у детей с псориазом [179]. Анализ корреляций ЦК от длительности заболевания показал у пациентов с ПС обратную корреляционную зависимость для цитокина IL-31 (r=-0,52), у пациентов с ЯК и РС - слабые обратные корреляции для отдельных цитокинов (r от -0,25 до -0,41), а у пациентов с БК - зависимостей не выявлено. У взрослых пациентов с псориазом Florian T. с соавт. также продемонстрировали отсутствие статистически значимых корреляционных зависимостей между цитокинами TNF-α, IL-23, IL-17A, IL-17F и продолжительностью заболевания [245].

Проведенный нами анализ ЦКК, ассоциированных с клетками и функциями цитокинов, показал значимую разницу между состояниями обострения и ремиссии у пациентов с ВЗК и ПС по всем изученным комплексам, а у пациентов с РС – по комплексам cTh1, M1, fTh22 и fTh2. Повышение комплекса cTh1 при обострении заболеваний подтверждает значимость Th1-клеток в патогенезе при ВЗК, ПС и РС. Cataldi, C. с соавт. показали, что у взрослых пациентов с ПС в обострении заболевания также наблюдается повышение комплекса cTh1 (IL-2, IL-12, IFN-γ) [179]. У детей с РС в состоянии клинического обострения Cala C с соавт. продемонстрировали достоверное повышение IL-12p70 и IFN-γ – цитокинов, необходимых для дифференцировки Th1 из наивных CD4+ Т-клеток [171]. Известно, что Болезнь Крона рассматривается как заболевание, обусловленное воспалительным процессом типа 1, характеризующееся активацией Th1 и Th17-лимфоцитов с повышенной продукцией основных цитокинов: IL-12, IL-23, IFN-γ и IL-17. А язвенный колит определяется как воспаление типа 2, обусловленное участием клеток Th2 и Th9 и увеличением секреции таких цитокинов, как IL-13, IL-5 и IL-9 [271]. В нашем исследовании в обострении заболевания не было выявлено значимой разницы по ЦКК с участием Th1, Th17, Th2 и Th9 между пациентами с ЯК и БК. В то же время, в ремиссии этих заболеваний у пациентов с БК по сравнению с ЯК отмечались достоверно более высокие профили M1, cTh1,

cTh2. Нами выявлено, что у пациентов с РС как в обострении заболевания, так и в ремиссии заболевания, значения комплекса cTh17 были достоверно ниже, чем при ПС, ЯК и БК. Большинство цитокиновых комплексов как при обострении, так и при ремиссии были наибольшими у пациентов с БК, а наименьшими – у больных РС, что может быть связано с площадью поражения тканей.

ROC-анализом получены пороговые значения цитокинов и цитокиновых комплексов, выше 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 ПС – комплекс fIL12 (1891 пг/мл (0,932, 80/80); для РС – комплекс cTh1 (33,1 пг/мл (0,804, 71/72).

Анализ показал, что уровень большинства провоспалительных цитокинов и ЦКК к году терапии в группе с недостаточным эффектом значимо выше, чем в группе с хорошим эффектом ГИБП при всех обследованных патологиях. Имеются отдельные исследования уровня цитокинов у детей при разной эффективности ГИБП. Так, у детей с эффективным лечением ВЗК после 6 недель терапии инфликсимабом Zapata-Cobo P. с соав. показали достоверное снижение IFN-γ преимущественно у детей с БК по сравнению с ЯК [621]. Также, у пациентов с РС после 2-х лет лечения INFβ-1a выявлено снижение IFN-γ, коррелирующее со снижением EDSS [559].

В нашем исследовании установлена информативность ЦК и ЦКК после индукционного курса в прогнозе эффективности ГИБП к году лечения. Получено хорошее и очень хорошее качество разделительной модели (AUC>0,8) и установлены пороговые значения ЦК и ЦКК, выше которых можно прогнозировать ускользание эффекта от ГИБП у пациентов с ИЗЗ. Необходимо отметить, что для каждой формы патологии определен специфический набор ЦК и ЦКК. При БК пороговые значения 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-β - 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-β 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).

Известно, что баланс соотношения Th17/Treg регулируется цитокиновым микроокружением и активацией сигнальных путей в клетках и интенсивностью метаболических процессов [628, 629].Циркулирующие цитокины контролируют метаболизм лимфоцитов. Так, например, цитокин IL-2 в Th1 клетках активирует передачу сигналов от STAT5 через сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR, усиливая анаболический метаболизм, необходимый для поддержания функций Т-лимфоцитов [487]. Показано, что замедление прогрессирования аутоиммунных заболеваний возможно при снижении уровня гликолиза в $CD4^+$ Т-клетках и увеличении продукции IL-10 и TGF-β в циркуляции [374].

Нами проведена оценка уровня цитокинов у пациентов с ИЗЗ в зависимости от активности процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза, которую оценивали по соотношению СДГ/ГФДГ в общей популяции лимфоцитов: 1 группа (Me=1,16 (1,09-1,18) при СДГ Me=179 (173-190) усл.ед / ГФДГ Me=160 (147-168) усл.ед.) – соотношение СДГ/ГФДГ в пределах диапазона значений группы сравнения (Me=1,13 (1,07-1,26) при СДГ Me=185 (174-194) усл.ед / ГФДГ Me=169 (156-179) усл.ед.); 2 группа – соотношение СДГ/ГФДГ ниже нижней границы диапазона значений группы сравнения при снижении активности СДГ и увеличении активности ГФДГ (Me=0,96 (0,89-0,99) при СДГ Me=155 (146-160) усл.ед / ГФДГ Me=162 (160-167) усл.ед.). Установлено, что у пациентов с ИЗЗ при снижении процессов окислительного фосфорилирования и интенсификации процессов гликолиза ниже показателей группы сравнения (соотношение СДГ/ГФДГ) определялись более высокие концентрации патогенетически значимых цитокинов - IL-1β, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN-γ, TNF-α, CCL20/MIP-3α относительно группы. Полученные результаты подтверждают, что повышение процессов гликолиза при снижении окислительного фосфорилирования в

лимфоцитах у пациентов с ИЗЗ при активации воспалительного процесса сопровождается увеличением концентрации основных провоспалительных цитокинов и подтверждают сопряженность метаболизма лимфоцитов и уровня циркулирующих цитокинов [628].

Таким образом, проведённые исследования показали, что концентрация большинства цитокинов у пациентов с ИЗЗ выше в обострении, чем в ремиссии заболевания. Уровень цитокиновых комплексов зависел от формы патологии. Существенно более низкие уровни комплексов cTh17, cTh2, fIL12, fTh17, fTh22 выявлены в обострении заболевания у пациентов с РС по сравнению с ВЗК и ПС. Определены пороговые значения ЦКК, выше которых можно прогнозировать развитие обострения заболевания на фоне терапии ГИБП. Выявлены специфические пороговые значения ЦК и ЦКК для ВЗК, ПС и РС, позволяющие прогнозировать эффективность ГИБП после индукционного курса терапии.

В настоящий момент, в связи с необходимостью наличия специального оборудования для исследования панели цитокинов и отсутствия наборов, позволяющих определять ЦК индивидуально для каждого пациента невозможно рекомендовать определение ЦК и ЦКК у детей с ИЗЗ для использования в рутинной клинической практике. Однако, в будущем при появлении возможности получения панели определенных цитокинов и проведения экспресс исследования для отдельного пациента, можно будет рекомендовать исследование ЦК и ЦКК для прогноза эффективности биологической терапии.

4.4. Информативность оценки ядерного фактора транскрипции кВ в популяциях лимфоцитов у детей с ИЗЗ в зависимости от формы патологии, тяжести состояния и эффективности ГИБП

В современном понимании NF-κB (ядерный фактор транскрипции κB) является молекулярным «переключателем». При активации которого запускается транскрипционные программы, затрагивающие воспаление, иммунные реакции, клеточный цикл [283, 488, 520].

Фактор транскрипции NF-κB, первоначально описанный в зрелых B-лимфоцитах, также был обнаружен в клетках врожденного и адаптивного иммунитета – в Т-лимфоцитах, нейтрофилах, макрофагах, дендритных клетках и др. [103, 120]. NF-κB представляет собой комплексы белковых субъединиц (p52, p65, p50, c-Rel, RelB), связанных с ингибирующими белками IκB. В покоящихся клетках транскрипционный фактор NF-κB находится в цитоплазме в неактивной форме в комплексе с ингибирующими белками IκB. В ответ на стимуляцию сигнальный каскад приводит к деградации IκB и транспорту NF-κB в ядро, где он активирует транскрипцию целевых генов [569, 620]. Стимуляция NF-κB в клетке происходит двумя путями: каноническим и неканоноческим. Канонический сигнальный путь NK-κB может индуцироваться различными стимулами, включающими провоспалительные цитокины, лиганды Toll-подобных рецепторов, антигены разной природы. Активация канонического пути занимает всего несколько минут и опосредует широкий спектр биологических функций [546]. Активация неканонического сигнального пути NF-κB происходит под действием определенных факторов (фактор активации B-клеток, лимфотоксин β, CD40 лиганд, рецептор-активатор NF-κB) и занимает гораздо более длительный период времени, приводя к специфическим реакциям [638].

Фактор транскрипции NF-κB играет важную роль в иммунной регуляции адаптивного иммунитета, участвуя в регуляции иммунной толерантности. В физиологических условиях большинство Т-клеток находятся в состоянии покоя. При стимуляции как Т- так и B-лимфоцитов NF-κB активируется и проникает в

ядро клетки, активируя транскрипцию специфических генов и инициируя процессы пролиферации и дифференцировки клеток [569, 620]. Помимо этого, NF-κB активирует и индуцирует синтез провоспалительных цитокинов, таких как TNF-α, IL-1β, IL-6. NF-κB участвует в регуляции переключения классов антител и созревания аффинности в В-клетках. Эти процессы имеют решающее значение для формирования специфических антител и образования клеток памяти в организме. Показано, что регуляторные Т-клетки могут ингибировать активность других иммунных клеток, активируя путь NF-κB, поддерживая тем самым иммунный баланс и аутотолерантность [283].

Роль NF-κB показана при широком спектре заболеваний (метаболические нарушения, воспалительные, онкологические, сердечно-сосудистые заболевания), включая аутовоспалительные и аутоиммунные [520]. Описано, что нарушения в кишечной микробиоте приводят к активации NF-κB при ВЗК, вызывая хроническое воспаление [620]. В экспериментальных работах подтверждено, что нарушение регуляции сигнальных путей NF-κB играет роль в патогенезе псориаза [469, 548]. Аберрантная активация NF-κB усиливает локальное воспаление в ЦНС за счет активации выработки провоспалительных медиаторов. У пациентов с РС найдены гены (*NFKBIZ* и *RELA*), ассоциированные с риском развития заболевания, регулирующие путь активации NF-κB [126, 282, 424].

Известно, что использование различных препаратов может модулировать активность NF-κB. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов, глюкокортикоидов, блокаторов TNF, метотрексата, такролимуса и др. приводит к снижению уровня NF-κB и уменьшению активности воспалительного процесса [103, 120].

Современные технологии позволяют оценивать активность NF-κB в различных популяциях лимфоцитов, в том числе с использованием проточной цитометрии с визуализацией [123].

В нашем исследовании проведена оценка информативности определения NF-κB в основных (Т-лимфоциты, В-лимфоциты, NK-клетки) и малых популяциях лимфоцитов (Treg, Thact, Th17-клетках, Tc17) у пациентов с ИЗЗ на разных стадиях

заболевания (обострение/ ремиссия) и при разной эффективности биологической терапии: у 124 пациента с ВЗК (возраст – 12,6 (8,3-16,1) лет), у 83 детей с ПС (возраст – 12,1 (7,8-15,8) лет), у 72 детей с РС (возраст -17,0 (15,7-17,8) лет), у 30 детей группы сравнения в возрасте 12,1 (14,5-17,1) лет. Активность NF-κB оценивали по относительному содержанию клеток с транслокацией NF-κB из цитоплазмы в ядро на проточном цитометре с визуализацией. Уровень транслокации NF-κB определяли с помощью коэффициента Similarity (подобие), который отражает степень колокализации NF-κB и флуоресцентного красителя 7-аминоактиномицина D.

В нашем исследовании показано, что активность NF-κB зависит от популяции клеток: наибольшее количество клеток с транслокацией NF-κB выявлено у пациентов в популяции В-лимфоцитов по сравнению с NK-клетками и $CD3^+$ Т-лимфоцитами ($p_{CD19_NK}<0,001$, $p_{CD19_CD3}<0,001$), а наименьшее в $CD3^+$ Т-лимфоцитах ($p_{NK_CD3}<0,001$) независимо от активности и формы заболевания, а также в группе сравнения.

Выявлены значимо более высокие показатели NF-κB у пациентов с ВЗК в обострении заболевания в популяции NK-клеток в сравнении с пациентами с РС и с ПС; в $CD4^+$ Т-клетках, Th17-лимфоцитах, Tc17 и Thact в сравнении с пациентами с РС.

Сравнение пациентов с ИЗЗ относительно группы сравнения показало, что активность NF-kB в обострении заболевания зависела от популяции лимфоцитов и формы патологии: у пациентов с ВЗК и ПС выявлено повышение уровня транслокации NF-κB во всех изученных популяциях лимфоцитов, кроме В-лимфоцитов, а у пациентов с РС – в $CD4^+$- и в $CD8^+$ Т-лимфоцитах, Treg и Tc17 клетках. В состоянии ремиссии у детей с ВЗК и РС активность NF-κB не отличалась от группы сравнения во всех изученных популяциях, кроме сохраняющегося повышения в популяции $CD4^+$ Т-лимфоцитах при ВЗК. В состоянии ремиссии у детей с ПС содержание клеток с транслокацией NF-κB в популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитах, в Treg, в Thact и в Th17 не отличалось от группы сравнения, а в

популяции В-лимфоцитов, $CD8^+$ Т-лимфоцитов, NK-клетках и Тс17 было даже значимо ниже, чем в группе сравнения.

Таким образом, достижение ремиссии у детей с ИЗЗ на фоне биологической терапии сопряжено со снижением активности фактора транскрипции NF-κB, что согласуются с данными литературы о снижении активности NF-κB под действием блокаторов TNF [103, 120]. Так, например, показано, что у детей с ВЗК в ремиссии заболевания при лечении инфликсимабом наблюдалось увеличение ингибиторных белков IκBα и IκBγ и подавление активности NF-κB в биоптатах толстой кишки [620].

Анализ активности фактора транскрипции NF-κB на разных стадиях заболевания у пациентов с ИЗЗ показал различия между обострением и ремиссией с более высокими показателями в состоянии обострения во всех изученных популяциях при ВЗК и ПС, а у пациентов с РС – в популяциях $CD8^+$ Т-лимфоцитов, NK-клетках, Тс17 лимфоцитах. Результаты, полученные нами у пациентов с РС, согласуются с данными Zhou Y и соавт., которые при анализе транскриптома $CD3^+$ Т-клеток выявили аберрантную регуляцию экспрессии генов NF-κB при обострении РС [638].

Проведённый ROC-анализ выявил, что наиболее информативным показателем для разделения состояний обострение/ремиссия являлся 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 (0,949, 77/96); у пациентов с РС (0,872, 75/75). Кроме того, у детей с РС нами выявлены также пороговые значения для цитотоксических Т-лимфоцитов - 25,3% (0,854, 75/95) и Тс17 – 28,6% (0,896, 80/95).

В последние годы появились исследования о взаимосвязи метаболизма лимфоцитов и активности ядерного фактора транскрипции κB [176, 326]. NF-κB рассматривается в качестве основного сенсора метаболического дисбаланса, показана его роль в регулировании ферментов окислительного фосфорилирования

и гликолиза [176, 326]. Анализ активности митохондриальных ферментов (СДГ, ГФДГ) и NF-κB в популяциях лимфоцитах 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). Корреляционные зависимости между уровнем транслокации NF-κB и активностью ГФДГ имели аналогичную для СДГ направленность, но были менее выражены и составляли: при ВЗК – r =-0,36 (p<0,001); при РС – r =-0,25 (p=0,004); при ПС – r =-0,23 (p=0,004).

Сравнение популяций клеток показало, что у детей с ИЗЗ наибольшее содержание клеток с транслокацией NF-κB при наименьшей активности СДГ определялось в В-лимфоцитах. В то же время, наименьшее содержание клеток с транслокацией NF-κB при наибольшей активности СДГ наблюдалось в Т-лимфоцитах. Аналогичные показатели были характерны и для группы сравнения.

Анализ уровня транслокации NF-κB и активности митохондриальных дегидрогеназ в отдельных популяциях лимфоцитов у пациентов с ИЗЗ также показал аналогичные отрицательные зависимости. Вероятно, NF-κB осуществляет контроль баланса между гликолизом и окислительным фосфорилированием при аутоиммунных заболеваниях также, как это было показано для клеток карциномы толстой кишки [409].

Согласно данным литературы NF-κB является ключевым регулятором экспрессии переносчиков глюкозы и гликолиза, необходимых Т-клеткам для метаболического перепрограммирования и выполнения эффекторных функций [176, 524]. В нашем исследовании у пациентов с ИЗЗ продемонстрировано повышение активности сигнального пути ядерного фактора κB ассоциированное со снижением митохондриальных дегидрогеназ и, соответственно, с уменьшением процессов окислительного фосфорилирования в популяциях лимфоцитов.

Проведенный анализ уровня транслокации NF-κB у пациентов с ИЗЗ при разной эффективности ГИБП показал, что у пациентов с разными формами

патологии при хорошем ответе на лечение наблюдалось существенное снижение активности NF-κB к году терапии ГИБП. Так, например, у пациента А. в возрасте 15 лет 1 месяц (на начало лечения) с болезнью Крона (диагноз: воспалительная и свищевая форма, умеренная степень активности, непрерывно-рецидивирующее течение, обострение, PCDAI - 35 баллов, длительностью заболевания 2,1 лет) проведено исследование содержания Т-, В-лимфоцитов, NK-клеток до начала лечения адалимумабом (40мг/0,4мл, 1 раз в 14 дней) и через год терапии. Содержание клеток с транслокацией NF-κB у пациента А. в основных популяциях лимфоцитов до введения ГИБП было выше показателей группы сравнения во всех исследованных популяциях. К году терапии у пациента А. на фоне клинической и эндоскопической ремиссии активность NF-κB снизилась до показателей группы сравнения в В-лимфоцитах, в популяции $CD4^+$ Т-клетах – в 5,7 раз, в $CD8^+$ Т-клетках - в 11,1 раза, а в NK-клетках - в 3,3 раза. Индивидуальный анализ уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов у пациентов при ПС и РС показал аналогичные результаты при эффективном лечении и достижении клинической ремиссии, что согласуются с данными литературы [103, 120].

Ядерный фактор транскрипции κB является быстродействующим фактором транскрипции [546]. В связи с этим, в нашей работе проведено исследование активности NF-κB в популяциях лимфоцитов перед инфузией/инъекцией IFX/ADA (при ВЗК) и ADA (при ПС) и на следующий день (через 24 часа). У пациентов с ВЗК и ПС до введения блокаторов TNF в группе с эффективным лечением выявлено значимо более высокое содержание популяций $CD4^+$-, $CD8^+$ 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. В то же время, в группах пациентов с недостаточной эффективностью ГИБП показатели активности NF-κB через сутки после введения препаратов не изменялись. Таким образом, тест по оценке относительного содержания лимфоцитов с транслокацией NF-κB может быть

использован для мониторинга ответной реакции и прогноза эффективности ГИБП у пациентов с ИЗЗ.

Таким образом, уровень активности NF-κB зависел от популяции клеток (наибольшее значение в В-лимфоцитах), от формы патологии (активность выше в отдельных популяциях лимфоцитов у пациентов с ВЗК в сравнении с ПС и РС), от активности заболевания (в обострении превалируют более высокие показатели), от активности митохондриальных дегидрогеназ (обратная зависимость), от эффекта терапии (у пациентов с хорошим эффектом ГИБП активность NF-κB снижается в ответ на введение препарата). Ядерный фактор κB является информативным показателем мониторинга эффективности терапии ГИБП у пациентов с ВЗК, ПС и РС. Получены пороговые значения содержания лимфоцитов с транслокацией NF-κB (в NK-клетках при ВЗК, ПС и РС; в $CD8^+$ Т-клетках и Tc17 при РС), при превышении которых можно прогнозировать снижение эффективности проводимой терапии. В клинических исследованиях при невозможности использования теста по измерению активности NF-κB в популяциях лимфоцитов у пациентов с ИЗЗ можно проводить менее дорогостоящее исследование по оценке активности СДГ в популяциях лимфоцитов и при снижении этого показателя прогнозировать ускользание эффекта терапии и активацию воспалительного процесса.

4.5. Информативность определения концентрации блокаторов TNF в сыворотке крови у пациентов с ВЗК и ПС

Применение биологических препаратов, направленных против патогенетически значимых цитокинов, в том числе против TNF, позволило достичь хороших результатов в лечении детей с ИЗЗ. Однако, как уже упоминалось, у части пациентов возникает первичная или вторичная неотвечаемость к ГИБП [379, 472, 534]. Также, известно о случаях резистентности к терапии ГИБП у детей с псориазом [230, 270, 295]. Показано, что применение терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) позволяет улучшить клинические результаты

применения ингибиторов TNF у взрослых пациентов с ВЗК и ПС [177, 319, 357, 418, 551, 566]. Существует 2 вида ТЛМ: проактивный и реактивный [544]. Проактивный ТЛМ проводят у пациентов после индукционного курса и в период поддерживающего курса перед следующей инфузией ГИБП в отсутствии признаков активности заболевания и реактивный ТЛМ – при активном воспалительном процессе [544].

Минимальная концентрация IFX рекомендованная Европейскими организациями ECCO и ESPGHAN, для краткосрочного заживления слизистой на 6-й неделе терапии у детей с ВЗК составляет 15 мкг/мл, при дальнейшем лечении концентрация не менее 5 мкг/мл считается достаточной для поддержания клинико-эндоскопической ремиссии [531, 563, 574]. В Российских клинических рекомендациях прописано, что у пациентов с ВЗК необходимо поддерживать по возможности остаточный уровень для IFX не менее 5 мкг/мл, а для ADA - 7,5 мкг/мл [29]. Оптимальные сроки использования ТЛМ при лечении анти-TNF агентами у пациентов с ВЗК, особенно у детей, все еще остаются дискутабельными [26, 29, 248]. Рекомендаций по остаточному уровню ГИБП в сыворотке у пациентов с псориазом нет.

У пациентов с ИЗЗ лечение с применением биологических препаратов может приводить к образованию антилекарственных антител (АЛА), приводящих к снижению уровня препарата в сыворотке крови и обострению заболевания [516, 547, 563].

Для выявления информативности проведения ТЛМ у детей нашем исследовании была проведена оценка остаточного уровня блокаторов TNF и антител к ним в период поддерживающего курсов у детей с БК и ЯК при лечении IFX (249 тестов) и ADA (321 тестов), у пациентов с ПС при лечении ADA (82 теста). Кроме того, проведено сравнение определения остаточного уровня блокаторов TNF (IFX, ADA) в сыворотках пациентов с ВЗК с помощью классического ИФА метода (одномоментное определение 40 образцов в дублях) и экспресс-теста, позволяющего определять концентрацию препарата для одного пациента в течении 30 минут. Сопоставление результатов двух методов выявило высокую достоверную

корреляцию между показателями как для инфликсимаба (r=0,96), так и для адалимумаба (r=0,86). После согласования с ЛЭК (протокол №6 от 11.06.19 г.) нами был введен экспресс-тест по определению остаточного уровня блокаторов TNF (IFX, ADA) в клиническую практику Центра воспалительных заболеваний кишечника у детей и НИИ детской дерматологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей». Введение экспресс-теста существенно ускорило диагностику наличия антител и остаточного уровня препаратов, что позволило объективно принимать решения по дальнейшему ведению пациентов, коррекции дозы, а также кратности введения ГИБП. Выявлено, что у детей с ВЗК во время поддерживающего курса концентрация остаточного уровня IFX (3,1 мкг/мл) и ADA (13,3 мкг/мл) в состоянии клинической ремиссии достоверно выше, чем у детей в состоянии клинического обострения заболевания (IFX (0,7 мкг/мл), ADA (5,9 мкг/мл) и согласуется с данными разных авторов о том, что более высокий остаточный уровень ГИБП ассоциирован с ремиссией ВЗК у взрослых пациентов [388, 482].

Выявлена обратная зависимость между остаточным уровнем препарата и количеством дней после введения IFX и ADA (r=-0,68, p <0,001; r=-0,31, p <0,001, соответственно). В связи с этим, было сделано заключение о необходимости строгого соблюдения сроков введения IFX/ADA и измерения остаточной концентрации препарата в сыворотке пациента непосредственно перед очередной инфузией.

В нашем исследовании у 28% пациентов с ВЗК были обнаружены антилекарственные антитела (АЛА) к IFX как в обострении (в 27,3% случаев), так и в ремиссии заболевания (в 5,8% случаев). Наши данные согласуются с данными о более высокой иммуногенности IFX перед ADA [614]. Остаточный уровень IFX у пациентов с наличием АЛА в состоянии ремиссии был выше 7 мкг/мл, в то время как в группе детей в состоянии обострения был ниже терапевтического уровня и составлял от 0,12 до 2,04 мкг/мл. Наши данные согласуются с результатами Alghamdi A. и соавт. показашими, что в 63% случаев высокие уровни АЛА коррелируют (p<0,001) с низким остаточным уровнем блокаторов TNF [94].

Нами установлено, что 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 на комбинированной терапии (IFX и AZA) АЛА к IFX выявлялись в 11% случаев, а в группе пациентов только при лечении IFX в 67% случаев. Наши данные согласуются с результатами исследования, в котором было показано, что частота потери ответа из-за АЛА была выше у взрослых пациентов с ВЗК на монотерапии IFX/ADA по сравнению с комбинированной терапией [483].

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, что согласуется с данными зарубежных исследователей [196]. Кроме того, выявлено, что 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. Получены пороговые значения для остаточного уровня ADA у пациентов с БК, выше которых можно прогнозировать достижение ремиссии заболевания (cut-off, мкг/мл, (AUC, Se/Sp)): пациенты с клинической ремиссией ≥40 кг – 8,1 мкг/мл (0,890, 100/76); пациенты с клинической ремиссией <40 кг – 13,1 (0,890, 86/75); пациенты с эндоскопической ремиссией ≥40 кг – 10,5

(0,871,100/67); пациенты с эндоскопической ремиссией <40 кг – 14,2 мкг/мл (0,871, 75/71). Пороговые значения остаточного уровня ADA у пациентов с ЯК составили (cut-off, мкг/мл, (Se/Sp)**)**: пациенты с клинической ремиссией ≥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 ≥40 кг – 11,9 мкг/мл (0,821, 83/69); пациенты с эндоскопической ремиссией <40 кг – 13,1 мкг/мл (0,821, 100/100).

В нашем исследовании установлено, что применение проактивного и реактивного ТЛМ у пациентов с ВЗК при лечении IFX и ADA после индукционного курса позволяет достичь хороших результатов. Коррекция терапии после проактивного ТЛМ проведена у 54% пациентов на IFX и у 46% на ADA. В 55 % случаев у пациентов на IFX и 59% случаев на ADA причиной коррекции был недостаточный уровень блокаторов TNF (без наличия антилекарственных антител). Увеличение дозы препарата, изменение интервала введения привело 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 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. В то же время, анализ эффективности у пациентов без ТЛМ показал, что достижение ремиссии к году терапии на IFX составил 21%, а на ADA – в 37% случаев. Наши результаты согласуются с данными Strik. A. и соавт. об успешности применения ТЛМ для достижения стойкой ремиссии у взрослых пациентов с ВЗК [544]. Нами показано, что при эмпирическом подборе дозы IFX/ADA у пациентов остаточный уровень препарата ниже (Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$) мкг/мл) с $p<0,05$ – IFX – 1,9 (0-3,4), ADA – 4,1 (3,1-15,0), чем у детей с коррекцией дозы препарата с учетом терапевтического лекарственного мониторинга – IFX – 3,1 (0,4-5,8), ADA – 13,6 (7,6-15,3).

Использование как проактивного ТЛМ, так и реактивного лекарственного мониторинга снижает вероятность недостаточного ответа на терапию и позволяет повысить эффективность лечения у пациентов с ВЗК. Полученные результаты согласуются с выводами зарубежных авторов, полученными у взрослых пациентов с ВЗК о необходимости мониторинга остаточного уровня блокаторов TNF для улучшения эффективности лечения [197]. Так как, в настоящий момент отсутствуют рекомендации по необходимому терапевтическому уровню ADA для пациентов с ПС, то ТЛМ проводился в группе пациентов с ПС (n=39) без последующей коррекции дозы препарата. В нашем исследовании было продемонстрировано, что пациентам с ПС для достижения PASI75 к году терапии необходим более высокий остаточный уровень ADA Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$) - 18,2 (1,24-20,6) мкг/мл, чем пациентам с недостаточным эффектом терапии 13,2 (5,1-16,3) мкг/мл. В работах, проведённых у взрослых пациентов с вульгарным псориазом остаточный уровень ADA для достижения PASI75 с вероятностью 81% был ниже и составлял 7 мкг/мл, но оценка достижения PASI75 проводилась по окончании 6 месяцев лечения [598]. В исследовании, проведенном Kearney N. и соавт. у взрослых пациентов с вульгарным псориазом показано, что АЛА к ADA выявлялись в 31,8 % случаев и 70% из которых были нейтрализующими [325]. В нашем исследовании антилекарственные нейтрализующие антитела были выявлены только у одного ребенка с ПС (на монотерапии ADA) из 39 (в 2,6 % случаев). Низкий уровень АЛА у пациентов с ПС при лечении ADA, возможно, можно объяснить применением комбинированной терапии у части детей (40% детей получали метотрексат), что согласуется с данными у взрослых о снижении уровня АЛА в группе пациентов на комбинированной терапии с метотрексатом по сравнению с пациентами на монотерапии ADA [325].

Методов измерения остаточного уровня INFβ-1a у пациентов с РС не существует. Возможно определение уровней нейтрализующих антител, которые могут выявляться у пациентов с РС уже через 3-6 месяцев после начала введения INFβ-1a [8, 571]. Уровень нейтрализующих антител оценивается с помощью чувствительной клеточной линии к INFβ-1a (иммуноблотинг, иммуноферментный

анализ) и по данным отечественных авторов составляет около 60 % [48, 57]. Однако, данные методы трудоемки и не стандартизированы и требуют дальнейшего исследования для клинического использования [114].

Таким образом, анализ данных терапевтического лекарственного мониторинга у пациентов с ВЗК выявил, что на достаточный терапевтический остаточный уровень ГИБП ассоциированный с ремиссией заболевания влияют разные факторы – форма патологии (у пациентов с БК более высокие уровни ГИБП, чем при ЯК), масса тела ребенка (детям с массой менее 40 кг требуются большие дозы IFX/ADA), применение азатиоприна в комбинации с ADA у пациентов с ЯК ассоциировано с более высоким остаточным уровнем. Достижение эндоскопической ремиссии требует больших доз IFX/ADA, чем достижение клинической ремиссии для пациентов с БК и ЯК. Антилекарственные антитела обнаружены у детей с ВЗК при лечении ADA в меньшем проценте случаев, чем при лечении IFX. Проведение ТЛМ остаточного уровня ГИБП и антилекарственных антител у пациентов с ВЗК можно рекомендовать непосредственно перед инфузией ГИБП во время поддерживающего курса, а также при обострении заболевания для объективного подхода к коррекции лечения (увеличение/уменьшение дозы препарата и/или интервала введения, смена препарата при достаточном уровне препарата и отсутствии клинико-эндоскопической ремиссии) и достижении эффекта терапии в большем проценте случаев.

4.6. Влияние клинико-анамнестических факторов и иммунологических показателей на выживаемость биологической терапии у пациентов с ИЗЗ

Более двух десятилетий для лечения иммунозависимых заболеваний применяются биологические препараты. Накоплены сведения об их эффективности, побочных эффектах, приемлемости для пациентов. Все больше исследований посвящены сравнению использования препаратов разных линий терапии при иммунозависимых заболеваниях, в том числе при ВЗК, ПС и РС [1, 321, 462]. Широкий выбор биологических препаратов позволит в будущем

использовать персонализированный подход в лечении детей с иммунозависимыми заболеваниями. Необходимы объективные критерии и показатели для оценки эффективности проводимой терапии. Одним из таких показателей является выживаемость биологической терапии (ВБТ). ВБТ это отрезок времени от инициации ГИБП до прекращения лечения по любым причинам [50]. Данный показатель позволяет сравнивать разные препараты по эффективности. Так, например, результаты 10-летнего наблюдения пациентов с БК продемонстрировали преимущество использования в качестве препарата 1-й линии IFX перед ADA [321]. Наибольший показатель ВБТ у детей с псориазом показан для устекинумаба (блокатор IL-12/23) по сравнению с этанерцептом (конкурентный ингибитор связывания TNF с его рецепторами на поверхности клетки) и адалимумабом [19].

ВЗК, ПС и РС относятся к хроническим иммунозависимым заболеваниям, поэтому лечение пациентов проводится зачастую пожизненно. Список биологических препаратов для детей с ИЗЗ содержит меньше рекомендованных препаратов по сравнению со взрослыми пациентами. В России для лечения детей с ВЗК разрешёнными к применению препаратами являются IFX (с 6 лет), ADA (БК – с 6 лет, ЯК - с 5 лет), возможно селективное использование блокаторов JAK-киназ (упадацитиниб – с 8 лет при БК и ЯК) [26, 29]. При отсутствии эффекта от лечения анти-TNF препаратами возможно назначение «off-label» блокаторов IL-12/23 (устекинумаб) или блокаторов интегриновых молекул (ведолизумаб) [26, 29]. У детей с РС разрешен к применению INFβ-1a в качестве препарата 1-ой линии (с 12 лет) и финголимод – препарат 2-ой линии (с 10 лет) [1]. В России для лечения детей с ПС разрешены к применению анти-TNF препараты (ADA – с 4-х лет, этанерцепт – с 6 лет), ингибиторы IL-12/23 (устекинумаб – с 6 лет), анти-IL-17A (секукинумаб – с 6 лет, иксекизумаб – с 12 лет) [27, 266].

Нами проведено исследование кривых выживаемости Каплана-Майера у 383 пациентов с ИЗЗ (БК – 117, ЯК – 83, ПС – 87, РС – 96). Установлено, что ВБТ для IFX при ВЗК зависит от формы патологии. Наилучшие показатели выживаемости при лечении IFX выявлены у пациентов с БК и составили (M±m) 161,0±7,4 недель

(у пациентов с ЯК – 135,0±6,7 недель, p=0,004). При этом, показатели средней выживаемости при лечении ADA у пациентов с БК -134,0±4,5 недель и ЯК – 117,7±9,1 недель (p<0,001). Полученные результаты согласуются с данными авторов, показавших, что у взрослых пациентов с ЯК наблюдается более высокий риск потери ответа от ГИБП, чем у пациентов с БК [136].

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

При сравнении кривых выживаемости у детей с разными формами ВЗК при лечении IFX и ADA не установлено различий по выживаемости между кривыми у детей с ЯК при лечении IFX с кривыми выживаемости при лечении ADA. В то же время, у детей с БК старше 12 лет отмечены лучшие показатели выживаемости IFX (химерное моноклональное антитело – МАТ) при сравнении с ADA (гуманизированное МАТ) – 158,7±7 против 123,2±7,1 (p<0,001) соответственно. Наши данные согласуются с результатами других авторов, полученных у взрослых пациентов о лучшей выживаемости IFX в сравнении с ADA [321].

Показано, что выживаемость терапии зависит от последовательности применения препаратов ГИБП. Так, Gisbert J. и соавт. описали пациентов с ВЗК, которые достигли ремиссии заболевания на 6-8-й неделе IFX, повторно назначенного (3-й препарат) после потери эффекта от ADA (2-ой препарат) и IFX (1-й препарат) [265]. Эффективность анти-TNF препарата, как полагают, у пациентов с БК зависела от причины смены терапии. Так, частота ремиссии на 2-м анти-TNF препарате у пациентов была выше (в 61% случаев) при отмене 1-го анти-TNF-препарата из-за его непереносимости и ниже при первичной (30%) и вторичной (45%) потере эффекта [265, 266]. В работе Kapizioni C. и соавт. у пациентов с ВЗК с неэффективностью анти-TNF препарата продемонстрированы

лучшие результаты при смене терапии на другой класс ГИБП, а не на другой блокатор TNF [321]. Нами также установлено, что у пациентов при лечении ADA (2-й препарат) с предшествующей терапией IFX (1-й препарат) выживаемость была выше (127,6±12,2 недель), чем у пациентов где ADA 1-ый препарат (76,4±9,9 недель, p<0,001).

Сочетание терапии IFX с дополнительными иммунодепрессантами (азатиоприном или метотрексатом), как было показано при анализе электронных баз пациентов с ВЗК, улучшает его фармакокинетику и эффективность [206]. Однако известно, что применение IFX с азатиоприном сопряжено с риском возникновения инфекций и злокачественных новообразований [206]. Нами установлено, что выживаемость при комбинированной терапии IFX/ADA с азатиоприном при ВЗК и ADA с метотрексатом при ПС больше, чем у пациентов только на ГИБП соответственно: IFX с AZA – 70,5±2,8 недель, без AZA - 48,7±5,4 недель с p=0,003; ADA с AZA – 65,4±4,3 недель, без AZA - 56,1±4,7 недель с p=0,044; ADA с метотрексатом – 91,9±9,1 недель, без метотрексата – 81,4±12,8 недель с p=0,034). Однако, различия в кривых выживаемости сохранялись при длительности приёма дополнительных иммунодепрессантов не более 2-х лет для ВЗК и не более 3-х лет при ПС.

Как уже было показано выше, нарушение соотношения между популяциями Th17/Treg и их метаболическая дисрегуляция с усилением процессов гликолиза играет важную роль в иммунопатогенезе ИЗЗ [106, 331, 427, 474, 611]. Нами установлено, что у пациентов с ИЗЗ с высоким индексом Th17/Treg показатель ВБТ был ниже, чем у больных в пределах возрастного диапазона в группах (M±m) и составил: ВЗК IFX – 103,8±15,5 недель против 159,3±4,6 недель (p=0,005); ВЗК ADA – 108,9±8,7 недель против 145,7±8,5 недель (p=0,002); ПС – 106,9±10,3 недель против 168,4±7,4 недель (p<0,001); РС – 113±9,5 недель против 159,3±14,7 (p<0,001). В нашем исследовании также показано, что в группах больных с низкой активностью СДГ в Treg показатель выживаемости был ниже, чем у пациентов с активностью СДГ в референсном диапазоне и составил: ВЗК IFX – 107,7±12,1 недель, ВЗК ADA – 120,1±8,2 недель, ПС – 145,21±8,2 недель, РС – 107,7±12,1

недель против ВЗК IFX – 158,0±14,1 недель (p=0,003), ВЗК ADA – 146,7±9,9 недель (p=0,002), ПС – 162,5±11,2 недель (p=0,029), РС – 158,0±14,1 недель (p=0,003) соответственно. Мониторинг индекса Th17/Treg и уровня активности СДГ в Treg может являться информативным инструментом для оценки эффективности ГИБП у пациентов с ИЗЗ.

Таким образом, выживаемость биологической терапии у детей с ИЗЗ определяется формой патологии, возрастом пациентов, применяемым препаратом, предшествующей биологической терапии, использованием дополнительных иммуносупрессоров (азатиорин, метотрексат), иммунологическим индексом Th17/Treg, а также активностью СДГ в Treg.

4.7. Алгоритм иммунологического обследования для прогноза эффективности ГИБП у пациентов с ИЗЗ

В последние десятилетия активно ведутся работы по поиску маркеров и способов прогнозирования активности патологического процесса и эффективности лечения при различных иммунозависимых заболеваниях. Биомаркер – это определенная характеристика, которая измеряется и является индикатором физиологических и патологических процессов, а также реакций на воздействие или вмешательство [174]. Выделяют несколько подтипов биомаркеров: для мониторинга, прогноза и реакции на лечение [211].

Широкий спектр биологических препаратов, применяемых для лечения иммунозависимых заболеваний, даёт возможность использовать персонализированный подход к каждому пациенту. Необходимы надёжные способы прогнозирования эффективности ГИБП у пациентов для своевременной коррекции терапии. Активно ведутся работы по использованию как лабораторных, так и клинических биомаркеров для оценки эффекта биологической терапии. Так, например, показано, что высокий индекс массы тела связан с неэффективностью лечения ВЗК у пациентов при лечении ADA [100]. Продемонстрированы новые перспективные серологические биомаркеры, которые показали положительную

корреляцию с эффективностью лечения у пациентов с ВЗК (ST2 – рецептор к IL-33), а также мониторинга активности воспалительного процесса (S00A12 – провоспалительный белок, связывающий кальций; фекальный лактоферрин; матриксная металлопротеиназа 9) [373]. У пациентов с псориазом в качестве индикаторов, прогнозирующих эффективность лечения, выявлены корреляции между уровнем PASI и степенью снижения концентрации IFN-γ, IL-13, IFN-γ/IL-13, IL-17A/IL-13, IFN-γ/IL4, and IL-17A/IL-4 под действием биологических препаратов [297]. У пациентов с рассеянным склерозом в качестве прогностического биомаркера рассматриваются нейрофиламенты (компонент нейронального цитоскелета аксона), увеличение концентрации которых, как установлено, коррелирует с активностью заболевания и предсказывает ответ на лечение [113]. Помимо использования сывороточных маркеров прогноз эффекта лечения возможен по изменению содержания различных клеток. Например, для прогноза эффективности блокаторов TNF (IFX/ADA) и ведолизумаба (VDZ) у пациентов с ВЗК оценивался модуль GIMATS, основанный на подсчёте плазматических IgG клеток, воспалительных моноцитов, активированных Т-клеток и стромальных клеток. GIMATS продемонстрировал информативность для прогнозирования ответа IFX/ADA и VDZ (IFX/ADA – AUC = 0,720-0,853; VDZ – AUC = 0,661–0,728). [525]. Также, у пациентов с болезнью Крона исследователями проведена оценка соотношения между подгруппами Т-хелперов (Treg, Th1 и Th17) для прогноза активности заболевания [525]. Авторы считают, что соотношения Treg/Th1 и Treg/Th17 могут являться потенциальными прогностическими индикаторами рецидива болезни Крона [525]. У пациентов с РС индекс частного от соотношения концентрации хемокинового CXC лиганда 13 (CXCL13) в ликворе и в сыворотке крови к соотношению альбумина, измеренного в ликворе и в крови: [CXCL13(ликвор)/CXCL13(сыворотка)]/[Альбумин(ликвор)/Альбумин (сыворотка)] имеет прогностическое значение для прогнозирования активности заболевания и может быть использован в будущем для выбора соответствующего препарата, изменяющего течение заболевание. Поскольку показано, что пациенты с впервые диагностированным РС, имели высокий положительный индекс

(cut-off=18,06) и нуждались в более агрессивном терапевтическом лечении [211].

В работах последних лет особо важная роль отводится биомаркерам, которые способны прогнозировать эффект терапии у пациента до её назначения. В исследовании, проведенном у пациентов с псориатическим артритом установлена хорошая прогностическая значимость между исходным уровнем комплекса маркеров, включающих молекулы, экспрессируемые на поверхности клеток, а также растворимые белки (хемокиновый CXC лиганд 10, матриксная миелопероксидаза 3, S100 кальцийсвязывающий белок A8, кислая фосфатаза 5) и ответом на блокаторы TNF [446].

В нашем исследовании получены информативные иммунологические показатели, с помощью которых можно оценивать эффект как до назначения терапии, так и во время поддерживающего курса для своевременной коррекции. Для всех показателей, которые показали очень хорошее качество в разделительной модели «эффективность – неэффективность» (AUC>0,8) была рассчитана вероятность прогноза эффекта терапии у пациентов 2-х внутренних и 1-ой внешней выборки [49]. Для внутренней выборки был взят каждый третий пациент из общей выборки с известным эффектом к году терапии (ВЗК – 744 наблюдения, РС – 89 наблюдений), внешнюю выборку составили 37 пациента с ПС старше 12 лет (97 наблюдений), получавшие устекинумаб (UST – анти IL-12/23). За высокую вероятность как хорошего, так и плохого эффекта считали значение ≥ 70 %.

Проверка показала высокую вероятность прогноза недостаточного эффекта терапии с помощью следующих показателей: соотношения Th17/Treg - у пациентов с ВЗК в возрастных группах от 6 до 12 лет и старше 12 лет при IFX/ADA до назначения, после индукции и к году терапии, у пациентов с ПС до назначения терапии и после индукции; активности СДГ в Treg (во все периоды лечения) - у пациентов с ВЗК при лечении IFX/ADA; комплекса показателей – активности СДГ в Treg и соотношения Th17/Treg (во все периоды лечения) – у пациентов с ВЗК при лечении IFX/ADA, у пациентов с ПС; абсолютного содержания регуляторных клеток (сумма MDSCs и Treg) – у пациентов с ВЗК при лечении IFX/ADA (до назначения ГИБП и после индукции); наивных $CD4^+$ Т-клеток – у пациентов с ВЗК

при лечении IFX/ADA и пациентов с ПС (после индукции), центральных $CD4^+$ Т-клеток памяти – у пациентов с ВЗК на IFX/ADA (после индукции), эффекторных $CD4^+$ Т-клеток памяти - у пациентов с ПС и РС (после индукции), наивных $CD8^+$Т-клеток – у пациентов с РС (после индукции); содержания CD39 в Treg и CD39 в Th17 (после индукции) – у пациентов с ВЗК при лечении IFX/ADA, у пациентов с РС, а также CD73 в Th17 – у пациентов с РС.

Высокая вероятность прогноза эффективности ГИБП установлена для следующих показателей: соотношения Th17/Treg (до назначения ГИБП) – у пациентов с ВЗК в возрастной группе от 6 до 12 лет при лечении IFX, у пациентов с ПС и РС; активности СДГ в Treg (во все периоды лечения) – у пациентов с ПС; комплекса показателей – активности СДГ в Treg и соотношения Th17/Treg (во все периоды лечения) – у пациентов с ПС и РС; абсолютного содержания регуляторных клеток (сумма MDSCs и Treg) – у пациентов с ПС к году терапии, у пациентов с РС – до назначения ГИБП и к году терапии; наивных $CD4^+$ Т-клеток (после индукции) – у пациентов с ПС, эффекторных $CD4^+$ Т-клеток памяти – (после индукции) – у пациентов с ПС, наивных $CD8^+$ Т- клеток и терминально-дифференцированных $CD8^+$ Т- клеток – у пациентов с РС; CD39 в Treg и CD39 в Th17-лимфоцитах (после индукции) – у пациентов с ПС и РС, а также CD73 в Th17 – у пациентов с РС.

На основании полученных в работе показателей с высокой вероятностью прогноза эффекта ГИБП разработан алгоритм иммунологического обследования пациентов с ИЗЗ на разных этапах лечения (до начала терапии, во время поддерживающего курса). В алгоритм также был включен тест по измерению содержания клеток с транслокацией NF-κB для оценки текущей активности воспалительного процесса у пациентов. Данный тест также показал высокую вероятность прогноза повышенной активности воспалительного процесса при проверке на внутренних и внешней выборках.

Алгоритм иммунологического обследования включает I этап оценки иммунологических показателей до назначения терапии:

1) соотношение Th17/Treg у пациентов с ИЗЗ в зависимости от возраста согласно полученным пороговым значениям:

у пациентов с ВЗК при терапии IFX – 6-12 лет – 1,92, старше 12 лет – 2,04;
у пациентов с ВЗК при терапии ADA – 6-12 лет – 1,8, старше 12 лет – 2,21;
у пациентов с ПС при терапии ADA – 6-12 лет – 2,42, старше 12 лет – 2,48;
у пациентов с РС при терапии INFβ-1a – старше 12 лет – 2,75.

Комментарий: при превышении пороговых значений индекса Th17/Treg прогнозируется риск неэффективности ГИБП и проводится дополнительный тест.

1) дополнительный тест - оценка активности СДГ в Treg.

Комментарий: снижение активности СДГ в Treg ниже 182 усл. ед. подтверждает риск неэффективности терапии (пациент группы риска) и требует мониторинга состояния пациента после начала терапии.

II этап оценки иммунологических показателей (после индукционного курса и во время поддерживающего курса ГИБП) включает:

1) мониторинг соотношения Th17/Treg и активности СДГ в Treg.

Комментарий: при соотношении Th17/Treg выше допустимого значения и активности СДГ в Treg ниже 182 усл.ед. – риск неэффективности; при соотношении Th17/Treg не превышающем возрастные пороговые значения и активности СДГ в Treg ниже 182 усл.ед. или при соотношении Th17/Treg выше возрастных пороговых значений и активности СДГ в Treg ≥182 усл.ед. проводятся дополнительные тесты (уточняющие) в зависимости от патологии (с высокой вероятностью прогноза для данной патологии).

2) дополнительные тесты (уточняющие) прогнозируют риск неэффективности при пороговых значениях:

• у пациентов с ВЗК – CD39 в Treg <34,4 %, регуляторных клеток <213 кл/мкл, TNAIVE <58,9 % от CD4, TEM≥12,9 % от CD4, NF-κB в NK >36 %;
• у пациентов с ПС – TNAIVE <58,1 % от CD4, TCM≥23,2 % от CD4, NF-κB в NK >29 %.
• у пациентов с РС – CD39 в Treg <22,4 %, TcytNAIVE <42,4 % от CD8, TEM≥19,5 % от CD4, NF-κB в NK >27 %; NF-κB в Tc17 >29 %;

3) пациентам с ВЗК после индукционного курса во время плановой госпитализации проводится измерение остаточного уровня IFX/ADA в сыворотке

крови проактивно (непосредственно перед очередным введением ГИБП) и реактивно (при обострении заболевания) и оценивается согласно выявленным пороговым значениям:

• у пациентов с БК при терапии IFX не ниже 4,9 мкг/мл;

• у пациентов с ЯК при терапии IFX не ниже 4,5 мкг/мл;

• у пациентов с БК при терапии ADA (с массой ≥40 кг) не ниже 10,5 мкг/мл;

• у пациентов с БК при терапии ADA (с массой <40 кг) не ниже 14,2 мкг/мл;

• у пациентов с ЯК притерапии ADA (с массой ≥40 кг) не ниже 11,9 мкг/мл;

• у пациентов с ЯК при терапии ADA (с массой <40 кг) не ниже 13,1 мкг/мл;

Комментарий: при снижении остаточного уровня ГИБП ниже пороговых значений с выявленным клинико-лабораторным или эндоскопическим обострением проводится измерение уровня антилекарственных антител; при наличии низкого остаточного уровня IFX/ADA без АЛА проводится коррекция дозы препарата или уменьшение интервала между введением препарата; при наличии низкого остаточного уровня IFX/ADA с АЛА проводится эскалация дозы с добавление иммунодепрессанта (азатиоприн) с последующим мониторингом остаточного уровня ГИБП и повторного измерения АЛА или смена препарата; при достаточном терапевтическом остаточном уровне IFX/ADA у пациента с ремиссией и наличием АЛА коррекция не проводится.

Таким образом, получен алгоритм, позволяющий при иммунологическом обследовании пациентов с ВЗК, ПС и РС, оценить возможные риски развития неэффективности перед назначением ГИБП и разработать индивидуальный план ведения пациента.

Список разрешенных ГИБП для применения у пациентов с ВЗК, ПС и РС расширяется. В связи с этим, алгоритм иммунологического обследования в будущем может быть дополнен и другими маркерами. Известно о пластичности $CD4^+$ Т-клеток и редифференцировке их в различные субпопуляции [151]. Так, у пациентов с ВЗК и РС в инфильтратах воспаленной ткани описана двойная популяция Th17/Th1, обладающая более патогенными свойствами по сравнению с классическими Th17-лимфоцитами (высокая продукция провоспалительных

цитокинов, интенсивно пролиферирующие клетки, устойчивы к действию Treg), исследование которой может быть информативно для оценки тяжести состояния пациента и прогноза эффективности биологической терапии [181, 476].

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, HIF-1a) [522]. 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 [273].

Для повышения эффективности лечения пациентов с иммуноопосредованными заболеваниями разрабатываются препараты, представляющие конъюгаты разных лекарств. Например, в рандомизированном двойном слепом исследовании (ClinicalTrials.gov: NCT03823391) показано более успешное применение конъюгата, состоящего из адалимумаба и модулятора глюкокортикоидных рецепторов у взрослых пациентов с ревматоидным артритом средней и тяжелой степени тяжести по сравнению с адалимумабом [168]. Можно предположить, что для увеличения эффективности лечения пациентов с аутоиммунными заболеваниями будут создаваться комбинации лекарственных средств, воздействующих на метаболические пути аутореактивных лимфоцитов. Так, например, в эксперименте показано, что ингибирование mTOR рапамицином (сиролимусом) и активация AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase - 5' аденозин монофосфат-активирующая протеин киназа) метотрексатом приводило к усилению окисления липидов в $CD4^+$ Т-клетках, уменьшению экспрессии переносчика глюкозы (Glut1) и к снижению гликолиза, опосредованно повышая супрессивную активность Treg [557]. Появление подобного рода таргетных препаратов повлечёт за собой необходимость оценки их эффективности с помощью информативных показателей, в том числе транскрипционных и метаболических факторов, изменяющих метаболизм лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование представляет динамический анализ комплекса иммунологических показателей у детей с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом и ремитирующим рассеянным склерозом, находящихся на биологической терапии, и включающих: содержание основных (Т-, В-, NK-клеток) и малых популяций $CD4^+$ Т-лимфоцитов (активированных Т-хелперов, регуляторных Т-клеток, Th17-лимфоцитов); содержание популяции клеток-супрессоров миелоидного происхождения и их метаболической активности по аргиназе-1; содержание наивных Т-клеток и субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти (центральных, эффекторных, терминально-димфференцированных); содержание малых популяций Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности эктонуклеотидазы CD39 и CD73; активность митохондриальных дегидрогеназ (сукцинатдегидрогеназы, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы) в основных и малых популяциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов; уровень циркулирующих цитокинов и комплексов цитокинов; активность ядерного фактора транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов (Т-, В-, NK-клеток, Т-регуляторных лимфоцитов, активированных Т-хелперов, Th17-клеток, цитотоксических Th17-клеток – Tc17); концентраций остаточных уровней блокаторов фактора некроза опухоли альфа (инфликсимаб, адалимумаб) и антител к ним в сыворотке крови.

Исследование позволило выявить иммунологические критерии, которые позволяют прогнозировать эффективность биологической терапии у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями при разной длительности терапии (до начала терапии, в период поддерживающей терапии). Показана информативность определения соотношения Th17-лимфоцитов к регуляторным Т-клеткам, относительного содержания популяций MDSCs, абсолютного содержания регуляторных клеток (MDSCs и Treg), наивных Т-клеток, популяций Т-клеток памяти для прогноза эффективности биологической терапии. Также показано, что мониторинг содержания NK-клеток с транслокацией ядерного фактора

транскрипции κB является информативным для оценки динамики активности воспалительного процесса.

Независимо от формы патологии в исследовании продемонстрирована значимость определения метаболической активности клеток (по экспрессии эктонуклеотидазы на поверхности Treg и Th17-лимфоцитов, по уровню экспрессии аргиназы-1 в MDSCs, по активности СДГ в Treg) для оценки стадии заболевания и прогноза эффективности ГИБП.

В результате анализа полученных в исследовании данных сформированы цитокиновые комплексы, которые отражают активность патологического процесса и изменяются в зависимости от эффекта терапии и от формы патологии.

В исследовании доказана необходимость проведения терапевтического лекарственного мониторинга остаточного уровня блокаторов TNF и антилекарственных антител у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника и получены пороговые значения в зависимости от формы патологии (болезнь Крона, язвенный колит), массы тела ребёнка, которые прогнозируют состояние «обострение/ремиссия» и эффективность терапии и их целесообразно учитывать при оптимизации лечения.

В исследовании проведен анализ показателя выживаемости биологической терапии в зависимости от возраста, формы патологии, применяемого препарата, использования комбинированной терапии, от иммунологических показателей, остаточного уровня биологического препарата в сыворотке крови пациентов, которые целесообразно учитывать при подборе ГИБП.

Для иммунологических показателей, показавших очень хорошее качество в разделительной модели «эффективность – неэффективность» (AUC>0,8), рассчитана вероятность прогноза эффекта терапии. На основании наиболее информативных критериев разработан 2-х этапный алгоритм обследования пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом и ремитирующим рассеянным склерозом, который позволит лечащим врачам оценить риск неэффективности биологической терапии как до назначения терапии, так и во время поддерживающего курса, для своевременной коррекции лечения.

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 $CD4^+$ Т-лимфоцитов и снижение NK-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 при потере эффекта.

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-1α <187 усл.ед. Дополнительным показателем при лечении рассеянного склероза интерфероном бета-1α является уменьшение активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы в NK-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-1α) на 50%, транскетолазы на 29% при уменьшении уровней М2 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 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 $CD39^+$ в регуляторных Т-лимфоцитах и в Th17-лимфоцитах (при воспалительных заболеваниях кишечника, псориазе и рассеянном склерозе), АТФ-азная активностью фермента CD39 обратно зависит от количества $CD39^+$ регуляторных Т-лимфоцитов. Для мониторинга ответа на биологическую терапию после индукционного курса установлены пороговые значения доли $CD39^+$ 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); TNFβ (14,3 пг/мл), IL-31 (51,3 пг/мл), cTh1(25,2 пг/мл); при рассеянном склерозе – TNFβ (5,1 пг/мл), IL-17F (13,9 пг/мл), IL-27 (512 пг/мл), cTh1 (29,9 пг/мл).

9. Активность фактора транскрипции κB у больных иммунозависимыми заболеваниями существенно зависит от популяции клеток: наибольшее число клеток с транслокацией NF-κB выявлено в популяции B-лимфоцитов по сравнению с NK-клетками и T-лимфоцитами ($p_{CD19_NK}<0,001$, $p_{CD19_CD3}<0,001$), а наименьшее – в T-лимфоцитах ($p_{NK_CD3}<0,001$). Увеличение активности NF-κB при обострении течения воспалительных заболеваний кишечника и псориаза определяется во всех изученных популяциях лимфоцитов, кроме B-лимфоцитов; у больных рассеянным склерозом – в $CD4^+$- и в $CD8^+$ T-лимфоцитах, Treg и Tc17 клетках. При этом выявлены значимые обратные корреляции между числом клеток с транслокацией NF-κB 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-κB в популяции NK-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. Антилекарственные 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 антилекарственных 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±7 недель, у больных язвенным колитом – 135±7 недель, p=0,004); от возраста больных (выживаемость у больных язвенным колитом младше 6 лет при лечении инфликсимабом составила 78 ±10 недель, у детей старше 12 лет – 143 ±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 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 INFβ-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 κB в NK-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 у детей с болезнью Крона, язвенным колитом, вульгарным псориазом и рассеянным склерозом рекомендовано проведение теста по оценке относительного содержания клеток с транслокацией ядерного фактора κB в NK-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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АИЗ – аутоиммунные заболевания

АЛА – антилекарственные антитела

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АМФ – аденозинмонофосфат

АПК – антигенпрезентирующие клетка

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АТФ – аденозинтрифосфат

ауто -Т-клетки – аутореактивные Т-клетки

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ВЭБ – вирус Эпштейн-Барр

ГГТ – гамма-глютамилтранспептидаза

ГИБП – генно-инженерные биологические препараты

ГК – глюкокортикоиды

ГФДГ – глицерол-3-фосфат дегидрогеназа

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДК – дендритные клетки

ИЗЗ – иммунозависимые заболевания

ИМТ – индекс массы тела

МАТ – моноклональное антитело

мДК – миелоидные дендритные клетки

МНК – мононуклеарные клетки периферической крови

МРЭ – магнитино-резонасная энтерография

МФ – макрофаг

НМК – незрелые миелоидные клетки

НФ – нейтрофил

ПИТРС – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза

ПМЛ – прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия

ПС – псориаз

РС – рассеянный склероз

СДГ – сукцинатдегидрогеназа

ТГКС – топические глюкокортикостероиды

ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг

ФК – фекальный кальпротеин

ЦК – цитокин

ЦКК – цитокиновые комплексы

ЦНС – центральная нервная система

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЯК – язвенный колит

ADA (adlimumab) – адалимумаб

ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) – антитела к цитоплазме нейтрофилов

ASCA – (anti- Saccharomyces cerevisiae antibodies) – антитела к Saccharomyces cerevisiae

BAFF (B-cell activating factor) – активатор В-лимфоцитов

Breg (regulatory B cells) – регуляторные В-клетки

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

CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

CD39 (E-NTPD1-ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1) – эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза-1

CD73 (Ecto5’NTasa-ecto-5′-nucleotidase) – экто-5’-нуклеотидаза

DAMP (damage-associated molecular pattern) – молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждениями

DDC (dermal dendritic cells) – дермальные дендритные клетки

DLQI (children's dermatology life quality index) – детский дерматологический индекс качества жизни

EBV (Epstein-Barr virus) – вирус Эпштейн-Барр

EDSS (Expanded Disability Status Scale) – расширенная шкала инвалидизации

EMA (European Medicines Agency) – Европейское агентство лекарственных средств

eАТФ (extracellular ATP) – внеклеточный АТФ

FDA (Food and Drug Administration) – управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств

FOXP3(forkhead box P3) – член семейства forkhead

FSC (forward side scatter) – прямое светорассеяние

GLUT (Glucose transporter) – глюкозный траспортер

GLUT-1(glucose transporter 1) – транспортер глюкозы 1

GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) – гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора

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

Gzm – гранзим

IDO (indoleamin 2,3-deoxygenase) – индоламин-2,3-диоксигеназа

INFβ-1a – интерферон бета-1а

IFX – инфликсимаб

IL (interleukin) – интерлейкин

ILC – лимфоидные клети врожденного иммунитета

iNOS (inducible nitric oxide synthase) – индуцибельная NO-синтаза

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

JAK – янус-киназа

JCV (John Cunningham Virus) – вирус Джона Каннингема (полиомавирус)

MFI (medium intensity fluorescence) – средняя интенсивность флуоресценции

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

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

mTOR (mammalian target of rapamycin) – мишень для рапамицина млекопитающих

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

NK – естественные киллеры

OXPHOS (oxidative phosphorylation) – окислительное фосфорилирование

PAMP (pathogen-associated molecular pattern) – молекулярный паттерн, ассоциированный с патогеном

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

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

pDC (plasmacytoid dendritic cells) – плазмоцитоидные дендритные клетки

PRR (pattern recognize receptor) – рецептор, распознающий компоненты бактериальной стенки патогенных бактерий

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

SSC (side scatter) – боковое светорассеяние

STAT 3 (signal transducer and activator of transcription 3) – сигнальный белок и активатор транскрипции из семейства белков STAT

supTh17 (suppressive Th17) – супрессивные Th17-лимфоциты

Tc17 – субпопуляция цитотоксических Т-лимфоцитов

TCA (citric acid cycle) – цикл трикарбоновых кислот

TCR (t-cell receptor) – Т-клеточный рецептор

TGFβ (transforming growth factor beta) – трансформирующий фактор роста бета

Th (T-helper) – Т-хелпер

Thact (T activated helper cells) – активированные Т-хелперы

TLR (toll-like receptor) – толл-подобный рецептор

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

Tr1 (type 1 regulatory cells) – регуляторные Т-клетки типа 1

Treg (T regulatory cells) – регуляторные Т-клетки

UCEIS – эндоскопический индекс активации

UVB – узкополосная средневолновая фототерапия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаева, Л.М. Лечение рассеянного склероза у детей: обзор клинических исследований / Л.М. Абдуллаева, Б.И. Бурсагова, А.Л. Куренков [и др.] // Неврологический журнал им. Л.О. Бадаляна. – 2023. - Т4. — №.1. —С. 43-51.

2. Адаскевич, В.П. Клинические особенности псориаза у детей и подростков /В. П. Адаскевич, М.А. Катина. // Педиатрия (Приложение к журналу Consilium Medicum). — 2018. — №. 2. — С. 83-88.

3. Амбарчян, Э.Т. Современные подходы к терапии псориаза у детей с учетом особенностей коморбидного фона/ Э.Т. Амбрачян, А.И. Материкин, С.Н. Турбовская [и др.] // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2018. – №. 1. – С. 16-20.

4. Барило, А.А. Теории развития псориаза и роль атопии среди общепринятых концепций. / А.А. Барило, С.В Смирнова // Клиническая дерматология и венерология. — 2021. — Т. 20. — №. 3. —С. 18-26.

5. Белоусова, Е.А. Иммунологические аспекты определения правильной последовательности биологической терапии воспалительных заболеваний кишечника. Резолюция совета экспертов (Санкт-Петербург, 22 мая 2021 г.) / Е.А. Белоусова, И.Г. Козлов, Д.И. Абдулганиева [и др.] // Альманах клинической медицины. — 2021. — Т. 49. — №.7. — С. 485-495.

6. Бойнова, И.В. Клинико-эпидемиологические особенности рассеянного склероза в Российской Федерации. / И.В. Бойнова, Д.В. Самарина, А.В. Каторова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2022. – № 5. —С. 1-11.

7. Будихина, А. С. Роль гликолиза в иммунном ответе / А.С. Будихина, М.В. Пащенков // Иммунология. — 2021. — Т. 42. — №. 1. — С. 5-20.

8. Бурсагова, Б. И. Проблема нейтрализующих антител в терапии рассеянного склероза / Б. И.Бурсагова, Л. А. Пак, В. М. Студеникин [и др.] // Педиатрическая фармакология. — 2011. — Т. 8. — №. 5. —С. 61-64.

9. Быкова, О. В. Препараты, изменяющие течение рассеянного склероза, у детей и подростков/ О. В. Быкова, И.А. Нанкина, И.М. Дроздова [и др.] // Журнал

неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. — 2016. — Т. 116. — №.2-2. — С.44-53.

10. Веселов, А. В. Оценка экономического бремени и текущего состояния организации лекарственного обеспечения пациентов с иммуновоспалительными заболеваниями (на примере язвенного колита и болезни Крона) в Российской Федерации. / А. В. Веселов, Е. А. Белоусова, И. Г Бакулин, Ю. П Успенский [и др.] // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. — 2020, — №. 28 (спецвыпуск). — С. 1137-1145.

11. Головкин, А.С. Пуринергическая регуляция основных физиологических и патологических процессов /А.С. Головкин, И.А. Асадуллина, И.В. Кудрявцев // Медицинская иммунология. — 2018. — Т. 20. — №. 4. — С. 463-476.

12. Горелов, А. В. Воспалительные заболевания кишечника у детей: особенности течения и терапии / А.В. Горелов, Е.В. Каннер // Медицинский совет. Гастроэнтерология. — 2018. — №2. — С. 140-145.

13. Гурина, О. П. Иммунологические маркеры в диагностике воспалительных заболеваний кишечника у детей. Вопросы диетологии /О.П. Гурина, А.Е. Блинов, О.Н. Варламова [и др.] // — 2020. — №. 10. — Т. 4. — С. 5-10.

14. Дворянкова, Е. В. Ключевые аспекты псориаза у детей / Е.В. Дворянкова, З.А. Невозинская, О.В. Ваал [и др.] // Доктор Ру. — 2020. — Т. 19. — №. 10. — С. 16-21.

15. Железникова, Г.Ф. Цитокины и герпесвирусы при рассеянном склерозе у детей. / Г.Ф. Железникова, Н. В. Скрипченко, Г. П. Иванова, А. В. Суровцева [и др.] // Инфекция и иммунитет. — 2015. — Т. 5. — №. 4. — С. 349-358.

16. Жукова, О.В. Эпидемиологические аспекты псориаза у детей / О.В. Жукова, Е.И. Касихина // Клиническая дерматология и венерология. —2018. — Т. 17. — №. 5. — С. 24-28.

17. Заморина, С. А. Иммунология: миелоидные супрессорные клетки: учеб. пособие / С. А. Заморина, М. Б. Раев, П. В. Храмцов; Перм. гос. нац. исслед. ун-т. — Пермь: Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2019. — 88 с. — ISBN 978-5-7944-3413-2.

18. Заморина, С.А. Роль гликоделина в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорныхклеток / С.А. Заморина, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова [и др.] // Медицинская иммунология. — 2021. — Т. 23. — №. 4. — С. 641-646.

19. Иванов, Р.А. Выживаемость биологической терапии у детей, страдающих псориазом: когортное исследование/ Р.А. Иванов, Н.Н. Мурашкин // Вопросы современной педиатрии. — 2021. — Т. 20. — №. 5. — С. 451-458.

20. Ивашкин, В.Т. Проект клинических рекомендаций по диагностике и лечению язвенного колита // В.Т. Ивашкин, Ю.А. Шелыгин, Е.А. Белоусова [и др.] // Колопроктология. — 2019. — Т. 18. — №.4. — С. 7-36.

21. Илларионов, А.С. 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 [и др.] // Вопросы практической педиатрии. — 2021. — Т. 16. — №.2. — С. 14-21.

22. Илларионов, А.С. Терапевтический лекарственный мониторинг адалимумаба при воспалительных заболеваниях кишечника у детей / А.С. Илларионов, Радыгина Т.В., Потапов А.С. [и др.] // Вопросы детской диетологии. — 2021. — Т. 19. — №. 3. — С. 14-25.

23. Информационный материал рабочей группы Экспертного совета по здравоохранению Комитета Совета Федерации по социальной политике. Организация медицинской помощи пациентам с воспалительными заболеваниями кишечника в Российской Федерации в 2015—2021 гг. // Медицинские технологии. Оценка и выбор. — 2021. — №.4 (43). — С. 9-15.

24. Кетлинский, С.А. Цитокины (монография) / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев – Санкт-Петербург: Фолиант. 2008. - 549 с. — ISBN 978-5-93929-171-2

25. Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов /В. А. Козлов, Е. П. Тихонова, А. А. Савченко [и др.]; Поликор – Красноярск: Поликор; Изд-во Поликор, 2021. — 550 с. - ISBN 978-5-94285-235-1.

26. Клинические рекомендации. Болезнь Крона: Союз педиатров России, Общероссийская общественная организация "Российская ассоциация детских

хирургов", Автономная некоммерческая организация "Общество детских гастроэнтерологов, гепатологов и нутрициологов"/ Москва, 2024.

27. Клинические рекомендации. Псориаз: Общероссийская общественная организация "Российское общество дерматовенерологов и косметологов" / Москва, 2023.

28. Клинические рекомендации. Рассеянный склероз: Всероссийское общество неврологов, Национальное общество нейрорадиологов, Медицинская ассоциация врачей и центров рассеянного склероза и других нейроиммунологических заболеваний/ Москва, 2025.

29. Клинические рекомендации. Язвенный колит: Союз педиатров России, Общероссийская общественная организация "Российская ассоциация детских хирургов", Автономная некоммерческая организация "Общество детских гастроэнтерологов, гепатологов и нутрициологов"/ Москва, 2024.

30. Князев, О.В. Эпидемиология воспалительных заболеваний кишечника. Современное состояние проблемы (обзор литературы) / О.В. Князев, Т.В. Шкурко, А.В. Каграманова [и др.] // Доказательная гастроэнтерология — 2020. — Т. 9. — №. 2. — С. 66-73.

31. Козлов, В.А. Клетки-супрессоры–основа иммунопатогенеза аутоиммунных заболеваний / В. А. Козлов // Медицинская иммунология. — 2016. — Т. 18. — №. 1. — С. 7-14.

32. Козлов, В.А. Регуляторные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе аллергических заболеваний / В.А. Козлов, Д.В. Демина // Иммунология— 2017. — Т. 38. — №. 6. — С. 327-336.

33. Корниенко, Е.А. Воспалительные заболевания кишечника с очень ранним началом Альманах клинической медицины / Е.А. Корниенко, А.Н. Крупина, Т.В. Габрусская, Калинина Н.М. [и др.] // — 2016. — Т 44. - № 6. — С. 719-733.

34. Коробко, Д.С. Долгосрочная терапия рассеянного склероза интерфероном бета-1b. Результаты ретроспективного открытого наблюдательного исследования / Д.С. Коробко, М.А. Барабанова, К.З. Бахтиярова, Н.А. Малкова [и др.] // Журнал

неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. — 2022. — Т 122. — № 72. — С. 96-103.

35. Круглова, Л. С. Иммуногенность препаратов биологической терапии / Л. С. Круглова, А. А. Хотко // Эффективная фармакотерапия. — 2018. — №. 34. — С. 22-29.

36. Кубанов, А.А. Индекс PASI (Psoriasis Area and Severity Index) в оценке клинических проявлений псориаза / А.А. Кубанов, А.Э. Карамова, Л.Ф. Знаменская, В.В. Чикин [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. — 2016. — Т. 4. —С. 33-38

37. Кудрявцев, И.В. Экспрессия CD39 регуляторными Т-лимфоцитами при хроническом и остром саркоидозе / И.В. Кудрявцев, Н.М. Лазарева, О.П. Баранова, А.С. Головкин [и др.] // Медицинская иммунология. — 2019. — № 21. — Т. 3. — С. 467-478.

38. Куликова, С.Л. Рассеянный склероз у детей: диагностика, лечение (обзор) / С.Л. Куликова, А.В. Кузнецова, С.А. Лихачев [и др.] // Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа. — 2021. — Т. 11. — №. 1. — С. 69-81.

39. Кунгуров, Н.В. Особенности и тенденции заболеваемости и распространенности псориаза в субъектах Российской Федерации за период 2009–2017 гг. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований / Н.В. Кунгуров, М.М. Кохан, Т.А. Сырнева, А.Н.Шакирова [и др.] // – 2021. — № 8. — С. 9-15.

40. Купцова, Д.Г. Содержание субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток памяти и уровень циркулирующих цитокинов при псориазе у детей/ Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, Н.Н. Мурашкин [и др.] // Вестник уральской медицинской академической науки. — 2022. — №3. — Т.19. — С. 163-172.

41. Купцова, Д.Г. Содержание субпопупуляций CD4+Т-клеток в прогнозе эффективности биологической терапии псориаза у детей/ Д.Г. Купцова, Т.В. Радыгина, О.В. Курбатова [и др.] // Медицинская иммунология. — 2023. — Т. 5. — № 25. — С. 1071-1078.

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

43. Купцова, Д.Г. Особенности содержания цитокинов и хемокинов в сыворотке крови у детей с вульгарным псориазом / Д.Г. Купцова, Т.В. Радыгина, Н.Н. Мурашкин [и др.] // Цитокины и воспаление. — 2023. — №1. — Т. 20. — С. 18-24.

44. Купцова, Д.Г. Оценка количества субпопуляций CD4+ клеток с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у детей с псориазом / Д.Г. Купцова, Т.В. Радыгина, С.В. Петричук [и др.] //Медицинская иммунология. — 2022. — No 3. — Т. 24. — С. 587-596.

45. Купцова, Д.Г. 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 [и др.] // Российский иммунологический журнал. — 2023. — №3. — Т. 26. — С. 329-336.

46. Курбатова, О.В. Перспективы изучения иммунометаболизма в клинической практике / О.В. Курбатова, Д.Г. Купцова, Р.Ш. Закиров, Т.В. Радыгина [и др.]. // Вестник Ташкентской медицинской академии. — 2023. — Т 3. — №. 1. — С. 98-104.

47. Курбатова, О.В. Координация сигнального пути NF-κB и метаболизма лимфоцитов у детей с аутоиммунными заболеваниями / О.В. Курбатова, Т.В. Радыгина, Д.Г. Купцова [и др.] // Российский иммунологический журнал. — 2023. – Т 4. — №. 26. — С. 491-500.

48. Левитская, А.В. Сравнительная эффективность и выживаемость генноинженерных биологических препаратов (ГИБП) при воспалительных заболеваниях кишечника в разных линиях терапии: взгляд клинициста на проблему / А.В. Левитская, Е.А. Белоусова, Е.Ю. Ломакина [и др.] Колопроктология. — 2025 — Т 24 — №.1— 103-114.

49. Лучинин, А.С. Прогностические модели в медицине. Клиническая онкогематология. 2023;16(1):27–36.

50. Лыткина, К.А. Выживаемость биологической терапии у пациентов с псориатическим артритом / К.А. Лыткина, Г.В. Лукина, Е.Н.Кольцова [и др.] // РМЖ. Медицинское обозрение. — 2019. — Т.11. — №. 2. — С. 86-89.

51. Макшаков, Г.С. Связь интратекальной продукции свободных легких цепей иммуноглобулинов с прогрессированием рассеянного склероза / Г.С. Макшаков, В.Д. Назаров, Н.А. Тотолян [и др.]. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. — 2017. — Т.117. — №. 102. — С. 4-10.

52. Матушевская, Е.В. Патогенез и терапия псориаза и псориатического артрита / Е.В. Матушевская, М.В. Коновалова, Е.В. Владимирова, Е.В. Свирщевская // Клиническая дерматология и венерология. — 2019. — Т. 18. — №. 5. - С. 634-643.

53. Меркушова, Е. Д. Роль TLR9 и компонентов инфламмасомного комплекса в иммунопатогенезе псориаза / Е. Д. Меркушова, Е. М. Хасанова, О. А. Свитич [и др.]. // Российский иммунологический журнал. — 2019. — Т. 22. — №2-1. — С. 406-408

54. Мирошкина, Л.В. Функциональная активность Th17-лимфоцитов и регуляторных Т-клеток у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / Л.В. Мирошкина, С.В. Петричук, Е.Г. Цимбалова, И.В. Самохина [и др.]. // Российский иммунологический журнал. - 2014. - №. 17. - Т. 8. - С. 566-569.

55. Мурашкин, Н.Н. Псориаз у детей. Руководство для врачей / Н.Н. Мурашкин; ГЭОТАР-Медиа. - Москва: Изд-во ГЭОТАР-Медиа, 2024. — 552 с. — ISBN 978-5-9704-8119-6

56. Мурашкин, Н.Н. Псориаз и псориатический артрит в детском возрасте / Н.Н. Мурашкин, А.И. Материкин, Э.Т. Амбарчян, Р.В. Епишев [и др.]. // Вопросы современной педиатрии. -2020. - Т. 19. - №. 6. - С. 444-451.

57. Назаров, В.Д. Методы определения связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета / В. Д. Назаров, С. В. Лапин, Е. А. Суркова,

Г. С. Макшаков // Клиническая лабораторная диагностика. — 2016. — Т. 61. — №. 10. — С. 710-714.

58. Олефир, Ю.В. Современные биологические/биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные вопросы разработки и перспективы использования / Ю.В. Олефир, Н.В. Медуницын, Ж.И. Авдеева [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2016. — Т. 16. — №. 2. — С. 67-77.

59. Олисова, О.Ю. Коморбидности при псориазе /О.Ю. Олисова, Л.Г. Гаранян // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2016. — Т. 19. — №. 6. — С. 346-348.

60. Петричук, С. В. Показатели популяционного состава лимфоцитов как предикторы эффективности терапии ингибитором TNFα у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / С. В. Петричук, Л. В. Мирошкина, Е. Л. Семикина [и др.] // Медицинская иммунология. — 2018. — Т. 20. — №. 5.— С. 721-730.

61. 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 [и др.]. // Аллергология и иммунология в педиатрии. — 2023. — №. 2. — С. 54-56.

62. Петричук, С.В. Оценка эффективности анти-TNF терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями по активности NF-κB в популяциях лимфоцитов / С.В. Петричук, Т.В. Радыгина, Д.Г. Купцова [и др.] // Российский иммунологический журнал. — 2022. — Т. 4. — №. 25.— С. 491-498.

63. Пушкарева, А.Е. Применение упадацитиниба у детей с воспалительными заболеваниями кишечника/ А.Е. Пушкарева, А.В. Винокурова, М.О. Прохоренкова [и др.] // Российский педиатрический журнал. — 2024. — Т. 27. — №. S1 - С. 150-150.

64. Радыгина, Т.В. 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 [и др.]. // Российский иммунологический журнал. - 2019. — Т. — №. 13. — С. 1531-1533.

65. Радыгина, Т.В. Использование лекарственного мониторинга инфликсимаба и адалимумаба для оптимизации терапии воспалительных заболеваний кишечника у детей / Т.В. Радыгина, А.С. Илларионов, С.В. Петричук [и др.] // Российский педиатрический журнал. - 2022. — Т. 25. — №. 5. — С. 313-320.

66. Радыгина, Т.В. Особенности показателей клеточного иммунитета в зависимости от активности очагов демиелинизации у детей с рассеянным склерозом/ Т.В. Радыгина, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова [и др.] // Медицинская иммунология. — 2023. — Т. 5. — №. 25. — С. 1019-1026.

67. Радыгина, Т.В. Содержание миелоидных клеток-супрессоров при аутоиммунных заболеваниях у детей / Т.В. Радыгина, Д.Г. Купцова, С.В. Петричук [и др.] // Российский иммунологический журнал. — 2023. — Т. 3. — №. 26. — С. 381-388.

68. Радыгина, Т.В. Экспрессия эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях CD4+ лимфоцитов у условно здоровых детей / Т.В. Радыгина, Д.Г. Купцова, С.В. Петричук [и др.] // Российский иммунологический журнал. — 2022. — Т. 3. — №. 25. — С. 283-290.

69. Радыгина, Т.В. Содержание Т-клеток памяти у детей с иммунозависимыми заболеваниями при разной эффективности биологической терапии / Т.В. Радыгина, С.В. Петричук, Д.Г. Купцова [и др.] // Российский педиатрический журнал. —2025. — Т.1. — №. 28. — С. 23-32.

70. Радыгина, Т.В. Выживаемость биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями / Т.В. Радыгина, С.В. Петричук, А.П.Фисенко [и др.] // Российский педиатрический журнал. — 2024. — Т. 27. — №. 5. — С. 322-330.

71. Радыгина, Т.В. Оценка функциональной активности эктонуклеотидазы CD39+ в регуляторных Т-клетках у детей с воспалительными заболеваниями

кишечника / Т.В. Радыгина, Е.Г. Сорокина, С.В. Петричук [и др.] // Медицинская иммунология. — 2023. — Т. 2. — №. 25. — С. 415-422.

72. Радыгина, Т.В. Изменения цитокиновых комплексов у детей с аутоиммунными заболеваниями при разной эффективности их биологической терапии / Т.В. Радыгина, А.П. Фисенко, С.В. Петричук [и др.] // Российский педиатрический журнал. — 2023. — Т. 26. — №. 6. — С. 390-398.

73. Радыгина, Т.В. Определение ферментов гликолиза и окислительного фосфорилирования в лимфоцитах у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями / Т.В. Радыгина, С.В. Петричук, О.В.Курбатова [и др.] // Аллергология и иммунология в педиатрии. — 2023. — №. 2. — С. 54-56.

74. Радыгина, Т.В. Уровни циркулирующих цитокинов у детей с рассеянным склерозом при разной эффективности интерфероновой терапии / Т.В. Радыгина, С.В. Петричук, О.В. Курбатова [и др.] // Аллергология и иммунология в педиатрии. — 2023. — №. 4. — С. 31-39.

75. Радыгина, Т. В. Метаболизм лимфоцитов и уровень циркулирующих цитокинов у детей с аутоиммунными заболеваниями / Т. В. Радыгина, О.В. Курбатова, Д. Г. Купцова [и др.] // Медицинская иммунология. — 2024. — Т. 5. — №. 26. — С. 1017-1024.

76. Радыгина, Т. В. Содержание CD4+-клеток с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73 у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / Т. В. Радыгина, С.В. Петричук, Д. Г. Купцова [и др.] // Вестник РГМУ. — 2022. — №. 4. — С. 19-26.

77. Радыгина, Т. В. Алгоритм иммунологического обследования детей с иммунозависимыми заболеваниями для прогноза эффективности биологической терапии / Т. В. Радыгина, С.В. Петричук, А.П. Фисенко [и др.] // Российский педиатрический журнал. — 2025. — Т. 28. — №. 6. — С. 19-27.

78. Способ измерения митохондриальной активности лимфоцитов: патент РФ 2302635: G01N33/53; G01 № 33/50 / С. В. Петричук, Т. Д. Измайлова, Т. В. Радыгина; заявитель и патентообладатель ГУ Научный центр здоровья детей

РАМН. – № 2005141145; заявл. 28.12.2005; опубл. 10.07.2007, Бюл. № 19. – 9 с. – Текст: непосредственный.

79. Симбирцев, А. С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека (монография) / А. С. Симбирцев – Санкт-Петербург: Фолиант. 2018. – 512 с. — ISBN 978-5-93929-283-2

80. Топтыгина, А.П. Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста / А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, С.В. Петричук // Медицинская иммунология. — 2017. — Т. 4. — №. 19. — С. 409-420.

81. Топтыгина, А.П. Возрастная динамика экспрессии изоформ CD45 Т-хелперами и Т-цитотоксическими лимфоцитами крови здоровых людей / А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, Е.А. Копыльцова [и др.] // Иммунология. — 2014. — Т. 35. — №. 4. — С. 229-232.

82. Турбовская, С.Н. Эффективность УФВ-терапии с длиной волны 311 нм и такролимуса в лечении псориаза у детей / С.Н. Турбовская, Е.В. Матушевская // Медицинский алфавит. Серия «Дерматология». — 2019. — Т. 26. — №. 2. — С. 22-25.

83. Хайдуков, С.В. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (Проект) / С. В. Хайдуков, Л. А. Байдун, А. В. Зурочка // Проблемы стандартизации в здравоохранении: Научно-практический рецензируемый журнал. — 2012. — Т. 5. — №. 6. - С. 28-44.

84. Хайдуков, С.В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, А.А. Тотолян, В.А. Черешнев // Медицинская иммунология. — 2009. — Т. 11. — №. 2-3. - С. 227-238.

85. Хлебникова, А.Н. Псориаз складок: диагностическая ценность дерматоскопического исследования, опыт применения комбинированного

топического препарата (серия клинических наблюдений) // Альманах клинической медицины. — 2022. — Т.7. — №. 50. — С. 447 —454.

86. Хобейш, М.М. Генно-инженерные биологические препараты в лечении псориаза. Опыт применения устекинумаба у подростка с тяжелым течением псориаза / М.М. Хобейш, Е.В. Соколовский // Медицинский совет. - 2023. - №. 17. - Т. 1. - С. 123-129.

87. Щербакова, О.В. Первичные иммунодефицитные состояния, имитирующие воспалительные заболевания кишечника: клинические аспекты и проблемы дифференциальной диагностики. // Альманах клинической медицины. — 2023. — Т. 51. — №. 8. — С. 456- 468.

88. Юрина, Н.В. Морфологические особенности изменений кожи при неопределенной клинической картине псориаза и атопического дерматита у детей / Н.В. Юрина, Т.А. Агеева, О.А. Макеенко [и др.] // Уральский медицинский журнал. — 2023. — Т.22. — №. 2. — С.102-108.

89. Яблокова, Е. А. Обзор. Течение внекишечных проявлений воспалительных заболеваний кишечника у детей / Е. А. Яблокова, А. В. Горелов, И. В. Сичинава [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2016. — Т. 8. — С. 62-66.

90. Abboud, G. Inhibition of Glycolysis Reduces Disease Severity in an Autoimmune Model of Rheumatoid Arthritis / G. Abboud, SC. Choi [et al.] // Frontiers in immunology. — 2018. — Vol.9. — P. 1-11.

91. Abdallah, H.B. Key signaling pathways in psoriasis: recent insights from antipsoriatic therapeutics / H.B. Abdallah, C. Johansen, L. Iversen // Psoriasis (Auckl.). — 2021. — Vol. 11. — P. 83-97.

92. Ahluwalia, B. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad / B. Ahluwalia, M.K. Magnusson, L. Ohman // Scand J Gastroenterol. — 2017. — Vol. 52. — P. 1185-1193.

93. Aksentijevich, I. NF-κB signaling in inflammation, NF-κB Pathway in Autoinflammatory Diseases: Dysregulation of Protein Modifications by Ubiquitin

Defines a New Category of Autoinflammatory Diseases / I. Aksentijevich, Q. Zhou // Front Immunol. — 2017. — Vol.8. — P.1-11.

94. Alghamdi, A. Prevalence and clinical implications of anti-drug antibody formation and serum drug levels among patients with IBD receiving anti-TNF therapy: A cross-sectional study. / A. Alghamdi, M. Alahmari, K. Aljohani [et al.] // Saudi J Gastroenterol. — 2025. — Vol. 31. — No. 2. — P. 82-92.

95. Allard, B. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets / B. Allard, MS Longhi, SC Robson [et al.] // Immunol Rev. — 2017. — Vol.276. — No.1. — P .121-144.

96. Alroughani, R. Pediatric multiple sclerosis: a review / R. Alroughani, A. Boyko // BMC Neurol. — 2018. —Vol. 18. —No. 1, P. 1-8.

97. Álvarez-Sánchez, N. Peripheral CD39-expressing T regulatory cells are increased and associated with relapsing-remitting multiple sclerosis in relapsing patients / N. Álvarez-Sánchez, I. Cruz-Chamorro, M. Díaz-Sánchez [et al.] // Sci Rep. — 2019. — Vol.9. — No. 1. — P. 2302.

98. Alwan, W. Pathogenesis and treatment of psoriasis: exploiting pathophysiological pathways for precision medicine / W. Alwan, F.O. Nestle // Clin Exp Rheumatol. — 2015. — Vol.33. — No. 5. — Suppl 93. — P. 2-6.

99. Amato, M.P. Neuropsychological features in childhood and juvenile multiple sclerosis: Five-year follow-up / M.P. Amato, B. Goretti, A. Ghezzi [et al.] // Neurology. — 2014. — Vol.83. — No.16. — P.1432-1438.

100. Amini, K. Transmembrane TNF-α Density, but not Soluble TNF-α Level, is Associated with Primary Response to Infliximab in Inflammatory Bowel Disease. / K. Amini, A. H. Asadzadeh, D. Sorrentino [et al.] // Clin Transl Gastroenterol. — 2017. — Vol. 8. — No. 9. — P. 117.

101. Amoriello, R. The brain cytokine orchestra in multiple sclerosis: from neuroinflammation to synaptopathology / R. Amoriello, C. Memo, L. Ballerini [et al.] // Mol. Brain. — 2024. — Vol.17. —P. 1-20.

102. Ananthakrishnan, A.N. Epidemiology and risk factors for IBD / A.N. Ananthakrishnan // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. — 2015. — Vol.12. — P. 205-217.

103. Andres-Ejarque, R. Enhanced NF-κB signaling in type-2 dendritic cells at baseline predicts non-response to adalimumab in psoriasis. / R. Andres-Ejarque, H.B. Ale, K. Grys [et al.] // Nat. Commun. — 2021. — Vol.12.— No. 4741. — P. 1-16.

104. Annibali, V. CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis / V. Annibali, G. Ristori, DF Angelini [et al.] // Brain. — 2011.— Vol.134. — No. 2. — P. 542-554.

105. Antonioli, L. CD39 and CD73 in immunity and inflammation / L. Antonioli, P. Pacher, E. Vizi, G. Haskó // Trends Mol. Med. — 2013. — Vol. 19. — No. 6. — P. 355-367.

106. Antony, I.R. Maladaptive T-Cell Metabolic Fitness in Autoimmune Diseases / I.R. Antony, B.H.S. Wong, D. Kelleher, NK. Verma // Cells. — 2023. —Vol. 12. — No. 21. — P. 2541.

107. Apak, R.A. A case of relapsing acute disseminated encephalomyelitis with high dose corticosteroid treatment / R.A. Apak, B. Anlar, I. Saatci// Brain Dev. — 1999. —Vol. 21. —No. 4. — P. 279-282.

108. Arababadi, M.K. Association of interleukin-4 polymorphisms with multiple sclerosis in southeastern Iranian patients /Arababadi MK, Mosavi R, Ravari A. [et al.] // Ann Saudi Med. — 2012. —Vol. 32. — No. 2. — P. 127-130.

109. Armstrong, A.W. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a Review. / Armstrong AW, Read C. // JAMA. — 2020. — Vol.323. — No.19. — P. 1945-1960.

110. Aschard, H. Genetic effects on the commensal microbiota in inflammatory bowel disease patients. / H. Aschard, V. Laville, E.T. Tchetgen [et al.] // PLOS Genet. — 2019. — Vol. 15. — P. e1008018.

111. Astier, A.L. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis / A.L. Astier, G. Meiffren, S. Freeman, DA. Hafler // J Clin Invest. — 2006. — Vol. 116. — No.12. — P. 3252-3257.

112. Atreya, R. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal

CD14^{+} macrophages / R. Atreya, M. Zimmer, B. Bartsch [et al.] // Gastroenterology. — 2011. — Vol. 141. — No.6. — P. 2026-2038.

113. Ayrignac, X. Serum GFAP in multiple sclerosis: correlation with disease type and MRI markers of disease severity. / X. Ayrignac, E. Le Bars, C. Duflos [et al.]// Sci. Rep. — 2020 — Vol. 10 — No. 1. — P. 10923.

114. Bachelet, D. Occurrence of anti-drug antibodies against interferon-beta and natalizumab in multiple sclerosis: a collaborative cohort analysis / D. Bachelet, S. Hässler, C. Mbogning [et al.] // PLoS One. — 2016. — Vol.1. — P. 1-19.

115. Baecher-Allan, C. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy / C. Baecher-Allan, B. J. Kaskow, H. L. Weiner // Neuron. — 2018. — Vol.97. — No.4. — P. 742-768.

116. Bai, Z. Cerebrospinal fluid and blood cytokines as biomarkers for multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis of 226 studies with 13,526 multiple sclerosis patients / Z. Bai, D. Chen, L. Wang [et al.] // Front. Neurosci. — 2019. — Vol.13. — P. 1-13.

117. Bain, C.C. Intestinal macrophages - specialised adaptation to a unique environment. / C.C. Bain, A.M. Mowat // Eur J Immunol. — 2011 — Vol. 41. — No. 9. — P. 2494-2498.

118. Barberis, M. Metabolic imbalance driving immune cell phenotype switching in autoimmune disorders: Tipping the balance of T- and B-cell interactions. / M. Barberis, A. Rojas López // Clin Transl Med. — 2024. — Vol.14. — No.3. — P. 1-19.

119. Barberis, M. T cell phenotype switching in autoimmune disorders: Clinical significance of targeting metab-olism. / M. Barberis, A. Rojas López // Clin. Transl. Med. — 2022. — Vol.12. — No.7. — P. 1-8.

120. Barnabei, L. NF-κB: At the borders of autoimmunity and inflammation. / L. Barnabei, E. Laplantine, W. Mbongo [et al.] // Front Immunol. — 2021. — Vol. 12. — P. 716469.

121. Baroncini, D. Long-term follow-up of pediatric MS patients starting treatment with injectable first-line agents: A multicentre, Italian, retrospective, observational study.

/ D. Baroncini, M. Zaffaroni, L. Moiola [et al.] // Multiple Sclerosis Journal. — 2018. — Vol. 25. — No. 3. — P. 399-407.

122. Barry, M. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. / M. Barry, RC. Bleackley // Nat Rev Immunol. — 2002. — Vol.2. —No.6. — P. 401-409.

123. Barteneva, N. S. Imaging Flow Cytometry Methods and protocols / N. S. Barteneva, I. A. Vorobjev // Methods Mol. Biol. — 2017. — 188 p.

124. Basdeo, S.A. Polyfunctional, Pathogenic CD161+ Th17 Lineage Cells Are Resistant to Regulatory T Cell-Mediated Suppression in the Context of Autoimmunity / S.A. Basdeo, B. Moran, D. Cluxton [et al.] // J Immunol. — 2015. —Vol. 195. — No. 2. — P. 528-540.

125. Batista, F.D. The who, how and where of antigen presentation to B cells / F.D. Batista, N.E. Harwood // Nat Rev Immunol. — 2009. — Vol.9. — No.1. — P. 15-27.

126. Beecham, A.H. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis / AH. Beecham, NA. Patsopoulos, DK. Xifara [et al.] // Nat Genet. — 2013. — Vol.45. — No. 11. — P. 1353-1360.

127. Beketova, G. Crohn’s disease in children and adolescents (clinical lecture). / G. Beketova, O. Soldatova // Pediatrics. Eastern Europe. — 2017. — Vol.5. — No.4. — P. 472-490.

128. Belpaire, A. From IL-17 to IFN-γ in inflammatory skin disorders: Is transdifferentiation a potential treatment target? / Belpaire A, van Geel N, Speeckaert R. // Front Immunol. — 2022. — Vol.28. — No. 13. — P. 1-8.

129. Berek, K. Immune profiling in multiple sclerosis: a single-center study of 65 cytokines, chemokines, and related molecules in cerebrospinal fluid and serum / K. Berek, A. Bauer, D. Rudzki [et al.] // Front. Immunol. — 2023. — Vol.14. — P. 1200146.

130. Bhargava, P. Novel therapies for memory cells in autoimmune diseases / P. Bhargava, P.A. Calabresi // Clin. Exp. Immunol. — 2015. — Vol. 180. — No.3. — P. 353-360.

131. Bhela, S. Nonapoptotic and extracellular activity of granzyme B mediates resistance to regulatory T cell (Treg) suppression by HLA-DR-CD25hiCD127lo Tregs in

multiple sclerosis and in response to IL-6 / S. Bhela, C. Kempsell, M. Manohar [et al.] // J Immunol. — 2015. — Vol.194. — No.5. — P. 2180-2189.

132. Bickston, S.J. Vedolizumab for induction and maintenance of remission in ulcerative colitis / S.J. Bickston, B.W. Behm, D.J. Tsoulis [et al.] // Cochrane Database Syst. Rev. — 2014. — Vol. 8. — P. CD007571.

133. Bielicki, I.N. Abdominal wall defects-current treatments / I.N. Bielicki, S. Somme, G. Frongia [et al.] // Children (Basel). — 2021. — Vol. 8. — No.2. — P. 1-17.

134. Bischoff, S. C. ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in inflammatory bowel disease / S.C. Bischoff, J. Escher, X. Hébuterne [et al.] // Clin Nutr. — 2020. — Vol. 39. — No.3. — P. 632-653.

135. Bittencourt, V.Z. Targeting immune cell metabolism in the treatment of inflammatory bowel disease / V.Z. Bittencourt, F. Jones, G. Doherty, E.J. Ryan // Inflamm. Bowel Dis. — 2021. — Vol. 27. — P. 1684-1693.

136. Blesl, A. Limited long-term treatment persistence of first anti-TNF therapy in 538 patients with inflammatory bowel diseases: a 20-year real-world study / A. Blesl, L. Binder, C. Högenauer [et al.] // Aliment Pharmacol Ther. — 2021. — Vol.54. — P. 667-677.

137. Bodemer, C. Secukinumab demonstrates high efficacy and a favourable safety profile in paediatric patients with severe chronic plaque psoriasis: 52-week results from a Phase 3 double-blind randomized, controlled trial / C. Bodemer, A. Kaszuba, K. Kingo [et al.] // J Eur Acad Dermatol Venereol. — 2021. — Vol.35. — No.4. — P. 938-947.

138. Bodoor, K. IL-33/13 axis and IL-4/31 axis play distinct roles in inflammatory process and itch in psoriasis and atopic dermatitis / K. Bodoor, F. Al-Qarqaz, LA. Heis [et al.] // Clin Cosmet Investig Dermatol. — 2020. — Vol.13. — P. 419-424.

139. Boesen, M.S. Diagnostic Value of Oligoclonal Bands in Children: A Nationwide Population-Based Cohort Study / M. S. Boesen, A P. Born, P. Jensen [et al.] // Pediatr Neurol. — 2019. —Vol. 97. — P. 56-63.

140. Borsellino, G. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression / G. Borsellino, M.

Kleinewietfeld, D. Di Mitri [et al.] // Blood. — 2007. — Vol.110. — No.4. — P. 1225-1232.

141. Bose, T. Role of immunological memory cells as a therapeutic target in multiple sclerosis / T. Bose // Brain Sci. — 2017. — Vol. 7. — No. 11. — P.148.

142. Bossennec, M. Methotrexate Restores CD73 Expression on Th1.17 in Rheumatoid Arthritis and Psoriatic Arthritis Patients and May Contribute to Its Anti-Inflammatory Effect through Ado Production / M. Bossennec, C. Rodriguez, M. Hubert. [et al.] // J Clin Med. — 2019. — Vol.8. — No. 11. — P.1-16.

143. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. / M. M. Bradford // Anal Biochem. — 1976. — Vol.7. — No.72. — P. 248-254.

144. Brailey, P. M. NKT cells and the regulation of intestinal immunity: a two-way street / P. M. Brailey, M. Lebrusant-Fernandez, P. Barral // FEBS J. — 2020. — Vol.287. — No.9. — P. 1686-1699.

145. Brandon, A. Diagnosis and management of cutaneous psoriasis: a review / A. Brandon, A. Mufti, R. G. Sibbald // Advances in skin & wound care. — 2019. — Vol. 32. — No .2. — P. 58-69.

146. Branisteanu, D. Management of psoriasis in children (Review) / D. Branisteanu, S. Georgescu, IL. Serban [et al.] // Exp Ther Med. — 2021. — Vol.22. — No.6. — P. 1429.

147. Braun, M. Y. The Natural History of T Cell Metabolism / M. Y. Braun // International Journal of Molecular Sciences. — 2021. — Vol.22. — No.13. — P. 1-16.

148. Brembilla, N. C. Revisiting the interleukin 17 family of cytokines in psoriasis: pathogenesis and potential targets for innovative therapies / N. C. Brembilla, WH. Boehncke // Front Immunol. — 2023. — Vol.14. — P. 1186455.

149. Brembilla, N. C. The IL-17 Family of Cytokines in Psoriasis: IL-17A and Beyond / NC. Brembilla, L. Senra, W-H Boehncke // Front Immunol. — 2018. —Vol. 9. — P. 1682.

150. Brenton, J.N. Multiple Sclerosis in Children: Current and Emerging Concepts / J.N. Brenton, R. Kammeyer, L. Gluck [et al.] // Seminars in Neurology. — 2020. — Vol. 40. — No. 2. — P. 192-200.

151. Brescia, C. Metabolic drives affecting Th17/Treg gene expression changes and differentiation: impact on immune-microenvironment regulation. / C. Brescia, S. Audia, A. Pugliano [et al.] // APMIS. — 2024. — Vol. 132. — No. 12. — P. 1026-1045.

152. Bridgewood, C. The novel cytokine Metrnl/IL-41 is elevated in Psoriatic Arthritis synovium and inducible from both entheseal and synovial fibroblasts / C. Bridgewood, T. Russell, H. Weedon [et al.] // Clin Immunol. — 2019. — Vol. 208. — P. 108253.

153. Brito-deac-Sousa, J. Rhythmic profile of memory T and B-cells along childhood and adolescence / J. Brito-deac-Sousa, M. Lima-Silva, I. Costa-Rocha [et al.] // Sci. Rep. — 2023. — Vol.13. — No.1. — P. 20978.

154. Bronckers, I. Psoriasis in Children and Adolescents: Diagnosis, Management and Comorbidities. / I. Bronckers, A. Paller, M. van Geel [et al.] // Paediatr Drugs. — 2015. — Vol.17. — No.5. — P. 373-384.

155. Bronte, V. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards / V. Bronte, S. Brandau, S. Chen [et al.] // Nat Commun. — 2016. — Vol.7. — P. 1-10.

156. Buck, M. T cell metabolism drives immunity / M. Buck, D. O'Sullivan, E. Pearce // J Exp Med. — 2015. — Vol. 212. — No. 9. — P. 1345-1360.

157. Budd, S. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells / S.L. Budd, D.G. Nicholls // J. Neurochem. — 1996. — Vol. 67. — No.6. — P. 2282-2291.

158. Buettner, M. Development and Function of Secondary and Tertiary Lymphoid Organs in the Small Intestine and the Colon / M. Buettner, M. Lochner // Front Immunol. — 2016. — Vol.7. — P. 1-11.

159. Bugaut, H. Major Role of the IL17/23 Axis in Psoriasis Supports the Development of New Targeted Therapies / H. Bugaut, S. Aractingi // Front Immunol. — 2021. — Vol.12. — P. 1-8.

160. Buhaș, M. Gut Microbiota in Psoriasis / MC. Buhaș, LI. Gavrilaș, R. Candrea [et al.] // Nutrients — 2022. — Vol.14. — No.14. — P. 1-21.

161. Burman, J. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for pediatric multiple sclerosis: a registry-based study of the Autoimmune Diseases Working Party (ADWP) and Pediatric Diseases Working Party (PDWP) of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) / J. Burman, K. Kirgizov, K. Carlson [et al.] // Bone Marrow Transplant. — 2017. — Vol.52. — No.8. — P. 133-137.

162. Burnstock, G. Long-term (trophic) purinergic signalling: Purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death / G. Burnstock, A. Verkhratsky // Cell Death & Disease. —2010. — Vol.1. — No.1. — P. 1-10.

163. Burnstock, G. Purinergic system. In: Offermanns S, Rosenthal W, editors. Encyclopedia of Molecular Pharmacology. Berlin, Heidelberg, Springer; — 2008. — P.1047-1053.

164. Burnstock, G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules / G. Burnstock // Neuropharmacology. — 1997. — Vol.36. — No.9. — P. 1127-1139.

165. Burnstock, G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. Philosophical Transactions of the Royal Society of London / G. Burnstock // Series B, Biological Sciences. — 2016. — Vol. — No.371. — P. 1-10.

166. Burnstock, G. Purine and purinergic receptors. / G. Burnstock // Brain and Neuroscience Advances. — 2018. — Vol.2. — P. 1-10.

167. Burnstock, G. The therapeutic potential of purinergic signalling / G. Burnstock // Biochemical Pharmacology. — 2018. — Vol. 151. —No. — P.157-165.

168. Buttgereit, F. Efficacy and Safety of ABBV-3373, a Novel Anti-Tumor Necrosis Factor Glucocorticoid Receptor Modulator Antibody-Drug Conjugate, in Adults with Moderate-to-Severe Rheumatoid Arthritis Despite Methotrexate Therapy: A Randomized, Double-Blind, Active-Controlled Proof-of-Concept Phase IIa Trial. / F. Buttgereit, J. Aelion, B. Rojkovich [et al.] // Arthritis Rheumatol — 2023. — Vol. 75. — No. 6. — P. 879-889.

169. Bynoe, M. S. CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation / M.S. Bynoe, AT. Waickman, D. A. Mahamed [et al.] // BioMed Research International. — 2012. . — P. 1-13.

170. Cai, X. C. Efficacy and safety of biological agents for the treatment of pediatric patients with psoriasis: A bayesian analysis of six high-quality randomized controlled trials / X.C. Cai, Y. Ru, L. Liu [et al.] // Front Immunol. — 2022. — Vol.13. — P. 1-14.

171. Cala, C. M. T cell cytokine signatures: Biomarkers in pediatric multiple sclerosis / C. M. Cala, CE. Moseley, C. Steele, SM. Dowdy // Journal of neuroimmunology. — 2016. — Vol. 297. — P. 1-8.

172. Calabresi, P. A. Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial / P. A. Calabresi, E. W. Radue, D. Goodin [et al.] // Lancet Neurol. — 2014. —Vol.13. — No.6. — P. 545-556.

173. Calahorra, L. Regulatory Cells in Multiple Sclerosis: From Blood to Brain. / L. Calahorra, C. Camacho-Toledano, M. P. Serrano-Regal [et al.] // Biomedicines. — 2022. — Vol.10. —No.2. — P. 1-26.

174. Califf, R.M. Biomarker definitions and their applications. / R.M. Califf // Exp Biol Med (Maywood). — 2018. — Vol. 243. — No. 3. — P. 213-221.

175. Cao, L.Y. Myeloid-derived suppressor cells in psoriasis are an expanded population exhibiting diverse T-cell-suppressor mechanisms. / L.Y. Cao, J. S. Chung, T. Teshima [et al.] // J. Invest. Dermatol. — 2016. — Vol. 136. — No. 9. — P. 1801-1810.

176. Capece, D. NF-κB: blending metabolism, immunity, and inflammation. / D. Capece, D. Verzella, I. Flati [et al.] // Trends Immunol. — 2022. — Vol.43. — No.9. — P. 757-775.

177. Carman, N. Therapeutic drug monitoring in pediatric inflammatory bowel disease. / N. Carman, D.R. Mack, E.I. Benchimol // Curr Gastroenterol Rep. — 2018. — Vol.20. — No.5. — P. 18.

178. Cassinotti, A. Adalimumab for the treatment of Crohn's disease. / A. Cassinotti, S. Ardizzone, G. B. Porro // Biologics. — 2008. —Vol.2. — No.4. — P. 763-777.

179. Cataldi, C. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine profiles in psoriasis: use as laboratory biomarkers and disease predictors. / C. Cataldi, N.L. Mari, M.A. Lozovoy [et al.] // Inflamm. Res. — 2019. — Vol. 68. — No. 7. — P. 557-567.

180. Caza, T. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4 (+) T Cell Subsets. / T. Caza, S. Landas // Biomed Res Int. — 2015. — Vol. 2015. — P. 521957.

181. Cerboni, S. Cytokine-regulated Th17 plasticity in human health and diseases. / S. Cerboni, U. Gehrmann, S. Preite, S. Mitra // Immunology. — 2021. — Vol. 163. — No. 1. — P. 3-18.

182. Chamian, F. Psoriasis vulgaris: an interplay of T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory cytokines in pathogenesis. / F. Chamian, JG. Krueger // Curr Opin Rheumatol. — 2004. — Vol. 16. — No.4. — P. 331-337.

183. Chang, J. T. Pathophysiology of inflammatory bowel diseases. / Chang J. T. // N Engl J Med. — 2020. — Vol.383. — P. 2652-2664.

184. Chehad, A. S. Ustekinumab in Pediatric Dermatology: An Updated Review. / AS. Chehad, N. Boutrid, H. Rahmoune // J Explor Res Pharmacol. — 2023. — Vol.8. — No.1. — P. 66-73.

185. Chen, C. Targeting myeloid-derived suppressor cells is a novel strategy for anti-psoriasis therapy. / C. Chen, L. Tan, W. Zhu [et al.] // Mediators Inflamm. — 2020. — Vol. 2020. — P. 1-12.

186. Chen, K. Research progress on intestinal tissue-resident memory T cells in inflammatory bowel disease. / K. Chen, X. Gu, S.Yang [et al.] // Scand. J. Immunol. — 2023. — Vol. 98. — No. 6. — P. e13332.

187. Chen, L. Skin and gut microbiome in psoriasis: gaining insight into the pathophysiology of it and finding novel therapeutic strategies. / L. Chen, J. Li, W. Zhu [et al.] // Front Microbiol. — 2020. — Vol. 11. — P. 1-15.

188. Chen, L. The role of Th17 cells in inflammatory bowel disease and the research progress. / L. Chen, G. Ruan, Y. Cheng [et al.] // Front Immunol. — 2023. — Vol.13. — P. 1-17.

189. Chen, R. Lymphocyte subsets for predicting inflammatory bowel disease progression and treatment response: a systematic review / R. Chen, C. Li, J. Zheng [et al.] // Front Immunol. — 2024. — Vol.15. —P. 1403420.

190 Chen, W. Interleukin 22 and its association with neurodegenerative disease activity. / W. Chen, J. Wang, H. Yang [et al.] // Front Pharmacol. — 2022. — Vol.13. — P. 1-12.

191. Chen, X. Succinate dehydrogenase/complex II is critical for metabolic and epigenetic regulation of T cell proliferation and inflammation. / X. Chen, B. Sunkel, M. Wang [et al.] // Sci Immunol. — 2022. — Vol.7. —No.70. — P. eabm8161.

192. Chhabra, S. Recent Update on Immunopathogenesis of Psoriasis / S. Chhabra, S. Dogra, K. Sharma [et al.] // Indian J Dermatol. — 2022. — Vol.67. — No.4. — P. 360-373.

193. Chiricozzi, A. Integrative responses to IL-17 and TNF-α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. / A. Chiricozzi, E. Guttman-Yassky, M. Suárez-Farinas [et al.] // J Investig Dermatol — 2011. — Vol.131. — P. 677-687.

194. Chiricozzi, A. Scanning the immunopathogenesis of psoriasis. / A. Chiricozzi, P. Romanelli, E. Volpe [et al.] // Int J Mol Sci — 2018. — Vol. 19. — No. 179. — P. 1-31.

195. Chitnis, T. Trial of fingolimod versus interferon beta-1a in pediatric multiple sclerosis. / T. Chitnis, D.L. Arnold, B. Banwell [et al.] // N Engl J Med — 2018. — Vol. 379. — No. 11. — P. 1017-1027.

196. Choi, S.Y. Potential Utility of Therapeutic Drug Monitoring of Adalimumab in Predicting Short-Term Mucosal Healing and Histologic Remission in Pediatric Crohn's Disease Patients. / S.Y. Choi, Y.O. Choi, Y.H. Choe, B. Kang // J Korean Med Sci. — 2020. — Vol. 35. —No.16. — P. 1-10.

197. Choi, SY. Adalimumab in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. / S.Y. Choi, B. Kang // Front Pediatr. — 2022. — Vol. 10. — P. 852580.

198. Chou, W. C. Impact of intracellular innate immune receptors on immunometabolism. / W. C. Chou, E. Rampanelli, X. Li, JP. Ting // Cell Mol Immunol. — 2022. — Vol.19. — No.3. — P. 337-351.

199. Christophers, E. Bimodal immune activation in psoriasis. / E. Christophers, G. Metzler, M. Röcken // Br J Dermatol. — 2014. — Vol. 170. — P. 59-65.

200. Chu, C. C. Harnessing Dendritic Cells in Inflammatory Skin Diseases / CC. Chu, P. Di Meglio, FO. Nestle // Semin Immunol. — 2011. — Vol. 23. — P. 28-41.

201. Cîrstoveanu, C. Antiproliferative therapy with sirolimus and propranolol for congenital vascular anomalies in newborns (Case reports). / C. Cîrstoveanu, A.M. Bizubac, C. Mustea [et al.] // Exp Ther Med. — 2021. — Vol. 22. — No .4. — P. 1097.

202. Cluxton, D. Differential Regulation of Human Treg and Th17 Cells by Fatty Acid Synthesis and Glycolysis. / D. Cluxton, A. Petrasca, B. Moran, JM. Fletcher // Front Immunol. — 2019. — Vol. 4. — No. 10. — P. 1-12.

203. Cohen, L. J. Genetic Factors and the Intestinal Microbiome Guide Development of Microbe-Based Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. / L. J. Cohen, J.H. Cho, D. Gevers, H. Chu // Gastroenterology. — 2019. — Vol.156. — P. 2174-2189.

204. Cohen, S. Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. / S. Cohen, PE. Bigazzi, T. Yoshida// Cell Immunol. — 1974. — Vol.12. — P. 150-159.

205. Colgan, S. P. Physiological roles for ecto-5’-nucleotidase (CD73) / S. P. Colgan, H. K. Eltzschig, T. Eckle, L. F. Thompson // Purinergic Signal. — 2006. — Vol. 2. — No. 2. — P. 351-360.

206. Cong, D. Combination therapy in inflammatory bowel disease: Current evidence and perspectives. / D. Cong, H. Yu-Hong, J. Min // International Immunopharmacology. — 2023. — Vol. 114. — P. 109545.

207. Conrad, C. Psoriasis: From pathogenesis to targeted therapies. / C. Conrad, M. Gilliet // Clin Rev Allergy Immunol. — 2018. — Vol.54. — P. 102-113.

208. Conrad, N. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. / N. Conrad, S. Misra, J.Y. Verbakel [et al.] // Lancet. — 2023. — Vol. 401. — No. 10391. — P. 1878-1890.

209. Consonni, F.M. Myeloid-derived suppressor cells: ductile targets in disease. / F.M. Consonni, C. Porta, A. Marino [et al.] // Front Immunol. — 2019. — Vol. 10. — P. 1-15.

210. Cortese, I. Evidence-based guideline update: Plasmapheresis in neurologic disorders: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. / I. Cortese, V. Chaudhry, YT. So [et al.] // Neurology. — 2011. — Vol. 76. — No. 3. — P. 294-300.

211. Costa, J. Biomarkers in multiple sclerosis: An update./ J. Costa, G. Macaron, K. Khaled // Biomarkers in Neuropsychiatry. — 2023. — Vol. 9. — P. 100075.

212. Cree, B. A. Gut microbiome analysis in neuromyelitis optica reveals overabundance of Clostridium perfringens. / B. A. Cree, C. M. Spencer, M. Varrin-Doyer [et al.] // Ann Neurol. — 2016. — Vol..80. — No. 3. — P.443-447.

213. Cristante, E. Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications / E. Cristante, S. McArthur, C. Mauro [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2013. — Vol. 110. — No. 3. — P. 832-841.

214. Croese, T. Immune cell compartmentalization for brain surveillance and protection. / T. Croese, G. Castellani, M. Schwartz // Nat Immunol. — 2021. — Vol. 22. — No. 9. — P. 1083-1092.

215. D'Angelo, C. Profiling of canonical and non-traditional cytokine levels in interferon-β-treated relapsing-remitting-multiple sclerosis patients. / C. D'Angelo, M. Reale, E. Costantini [et al.] // Front Immunol. — 2018. — Vol. 4. — No. 9. — P.1-10.

216. Dand, N. Psoriasis and Genetics / N. Dand, S.K. Mahil, F. Capon [et al.] // Acta Derm Venereol — 2020. — Vol.100. — No.3. — P. 54-64.

217. Danne, C. A Large Polysaccharide Produced by Helicobacter hepaticus Induces an Anti-inflammatory Gene Signature in Macrophages. / C. Danne, G. Ryzhakov,

M. Martínez-López [et al.] // Cell Host Microbe. — 2017. — Vol. 22. — No. 6. — P. 733-745.

218. De Lange, K. M. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. / K. M. De Lange, L. Moutsianas, J. C. Lee [et al.] // Nat Genet. — 2017. — Vol. 49. — No. 2. — P. 256-261.

219. De Salvo, C. IL-33 drives eosinophil infiltration and pathogenic type 2 helper T-cell immune responses leading to chronic experimental ileitis / C. De Salvo, X. M. Wang, L. Pastorelli [et al.] // The American Journal of Pathology. — 2016. — Vol. 186. — No. 4. — P. 885-898.

220. De Souza, H. S. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. / H. S. De Souza, C. Fiocchi // Nat Rev Gastroenterol Hepatol. — 2016. — Vol. 13. — No. 1. — P. 13-27.

221. DeBerardinis, R. J. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation / R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou [et al.] // Cell Metab. — 2008. — Vol. 7. — No. 1. — P. 11-20.

222. DeBerardinis, R. J. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis / R.J. DeBerardinis, A. Mancuso, E. Daikhin [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. — 2007. — Vol. 104. — P. 19345-19350.

223. Dendrou, C. A. Immunopathology of multiple sclerosis. / C. A. Dendrou, L. Fugger, M. A. Friese // Nat Rev Immunol. — 2015. — Vol. 15. — No. 9. — P. 545-558.

224. Derkacz, A. Diagnostic Markers for Nonspecific Inflammatory Bowel Diseases / A. Derkacz, P. Olczyk, K. Komosinska-Vassev // Disease Markers. — 2018. — Vol. 2018. — P. 7451946.

225. Desplat-Jégo, S. Quantification of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid by nephelometry / S. Desplat-Jégo, L. Feuillet, J. Pelletier [et al.] // J Clin Immunol. — 2005. — Vol. 25. — No. 4. — P. 338-345.

226. Di Lernia, V. Effectiveness of etanercept in children with plaque psoriasis in real practice: a one-year multicenter retrospective study / V. Di Lernia, C. Guarneri, L.

Stingeni [et al.] // Journal of Dermatological Treatment. — 2017. — Vol. 29. — No. 3. — P. 217-219.

227. Di Virgilio, F. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation / F. Di Virgilio, A. C. Sarti, R. C. Silva // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2020. — Vol. 318. — No. 5. — P. 832-835.

228. Di Virgilio, F. Purinergic signaling in the immune system / F. Di Virgilio, M. Vuerich // Auton Neurosci. — 2015. — Vol. 191. — P. 117-123.

229. Diotallevi, F. Biological Treatments for Pediatric Psoriasis: State of the Art and Future Perspectives. / F. Diotallevi, O. Simonetti, G. Rizzetto [et al.] // Int J Mol Sci — 2022. — Vol.23. — No.19. — P. 1128.

230. Dodero-Anillo, J. M. Optimising the Therapeutic Interval for Biologics in Patients with Psoriasis. / J. M. Dodero-Anillo, I. C. Lozano-Cuadra, E. Rios-Sanchez [et al.] // Life (Basel). — 2022. — Vol. 12. — No. 12. — P. 2075.

231. Dotson, J. L. Feasibility and validity of the pediatric ulcerative colitis activity index in routine clinical practice / J. L. Dotson, W. V. Crandall, P. Zhang [et al.] // Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. — 2015. — Vol. 2. — No. 60. — P. 200-204.

232. Duan, Y. IL-33 contributes to disease severity in psoriasis-like models of mouse / Y. Duan, Y. Dong, H. Hu [et al.] // Cytokine. — 2019. — Vol. 119. — P. 159–167.

233. Dudley, M. ECCO-EFCCA Patient Guidelines on Crohn’s Disease (CD): Surgical Treatment. / M. Dudley, M. Kojinkov, D. Baraga // J Crohn’s Colitis. — 2016. — Vol. 14. — No.2. — P. 155-168.

234. Dulic, S. Specific T-Cell Subsets Can Predict the Efficacy of Anti-TNF Treatment in Inflammatory Bowel Diseases. / S. Dulic, G. Toldi, F. Sava [et al.] // Arch Immunol Ther Exp (Warsz). — 2020. — Vol. 68. — No. 2. — P. 1-10.

235. Dunn, N. Long-Term Consequences of High Titer Neutralizing Antibodies to Interferon-β in Multiple Sclerosis / N. Dunn, A. Fogdell-Hahn, J. Hillert, T. Spelman // Front Immunol. — 2020. — Vol. 11. — P. 1-8.

236. Eckmann, L. NOD2 and Crohn's Disease: Loss or Gain of Function? / L. Eckmann, M. Karin // Immunity. — 2005. — Vol. 22. — No. 6. — P. 661-667.

237. El Hadad, J. The Genetics of Inflammatory Bowel Disease / J. El Hadad, P. Schreiner, S.R. Vavricka [et al.] // Mol Diagn Ther. — 2024. — Vol. 28. — No. 1. — P. 27-35.

238. Elberdín, L. Real-world use of ustekinumab therapeutic drug monitoring in moderate to severe psoriasis / L. Elberdín, R.M. Fernández-Torres, M. Mateos [et al.] // Front Med (Lausanne). — 2022. — Vol. 9. — P. 1-8.

239. El-Hodhod, M. A. Enhanced blood lymphocytes apoptosis in children with inflammatory bowel disease. / M. A. El-Hodhod, R. H. Aly, S. R. Youssef [et al.] // ISRN Gastroenterol. — 2013. — P. 415417.

240. Faas, M. M. Extracellular ATP and adenosine: the yin and yang in immune responses? / MM. Faas, T. Sáez, P. de Vos // Mol Aspects Med. — 2017. — Vol. 55. — P. 9-19.

241. Fengming, Y. Biomarkers of inflammatory bowel disease. / Y. Fengming, W. Jianbing // Disease Markers. — 2014. — P. 710915.

242. Fernández, D. Purinergic signaling as a regulator of Th17 cell plasticity. / D. Fernández, F. Flores-Santibáñez, J. Neira [et al.] // PLoS ONE. — 2016. — Vol. 11. — No. 6. — P. e0157889.

243. Ferrari, D. The P2X7 receptor: A key player in IL-1 processing and release / D. Ferrari, C. Pizzirani, E. Adinolfi [et al.] // Journal of Immunology. — 2006. — Vol. 176. — No. 7. — P. 3877-3883.

244. Fletcher, J. M. CD39Foxp3 regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. / J. M. Fletcher, R. Lonergan, L. Costelloe [et al.] // The Journal of Immunology. — 2009. — Vol. 183. — No. 11. — P. 7602-7610.

245. Florian, T.L Inflammatory Cytokines and Clinical Outcome Following Biological Therapy in Adult Bio-Naïve Psoriasis Patients. / T.L. Florian, I. A. Florian, S. C. Vesa [et al.] // Curr Issues Mol Biol. — 2024. — Vol. 46. — No. 7. —P. 7719-7729.

246. Foerster, E. G. How autophagy controls the intestinal epithelial barrier / E. G.

Foerster, T. Mukherjee, L. Cabral-Fernandes [et al.] // Autophagy. — 2022. — Vol. 18. — No. 1. — P.86-103.

247. Forkel, M. Distinct Alterations in the Composition of Mucosal Innate Lymphoid Cells in Newly Diagnosed and Established Crohn's Disease and Ulcerative Colitis / M. Forkel, S. van Tol, C. Höög [et al.] // J Crohns Colitis. — 2019. — Vol. 13. — No. 1. — P. 67-78.

248. Franca, R. Therapeutic drug monitoring to improve outcome of anti-TNF drugs in pediatric inflammatory bowel disease / R. Franca, D. Curci, M. Lucafo [et al.] // Expert Opin Drug Metab Toxicol. — 2019. — Vol. 15. — No. 7. — P. 527-539.

249. Friedman, D. J. From the cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease / D. J. Friedman, B. M. Kunzli, Y. I. A-Rahim [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. — 2009. — Vol. 106. — No. 39. — P. 16788-16793.

250. Friedrich, M. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease / M. Friedrich, M. Pohin, F. Powrie // Immunity. — 2019. — Vol. 50. — No. 4. — P. 992-1006.

251. Friess, J. Fingolimod alters the transcriptome profile of circulating CD4+ cells in multiple sclerosis / J. Friess, M. Hecker, L. Roch [et al.] // Sci Rep. — 2017. — Vol. 7. — P. 42087.

252. Fu, Y. Immunometabolism shapes B cell fate and functions / Y. Fu, L. Wang, B. Yu [et al.] // Immunology. — 2022. — Vol. 166. — No. 4. — P. 444-457.

253. Furiati, S. C. Th1, Th17, and Treg Responses are Differently Modulated by TNF-α Inhibitors and Methotrexate in Psoriasis Patients. / S. C. Furiati, J. S. Catarino, M. V. Silva [et al.] // Sci Rep. — 2019. — Vol. 9. — No.1. — P. 1-11.

254. Furlan, R. Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes. / R. Furlan, E. Brambilla, F. Ruffini [et al.] // J Immunol. — 2001. — Vol. 167. — No. 3. — P. 1821-1829.

255. Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the

immune system. / D. I. Gabrilovich, S. Nagaraj // Nat Rev Immunol. — 2009. — Vol. 9. — No. 3. — P. 162-174.

256. Gaffen, S. L. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. / SL. Gaffen, R. Jain, AV. Garg, DJ. Cua // Nat Rev Immunol. — 2014. — Vol. 14. — No. 9. — P. 585-600.

257. Galvez, J. Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. / J. Galvez // ISRN Inflamm. — 2014. — Vol. 2014. — P. 928461.

258. Gaublomme, J. T. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. / J. T. Gaublomme, N. Yosef, Y. Lee [et al.] // Cell. — 2015. — Vol.1 63. — No. 6. — P. 1400-1412.

259. Geltink, R. I. K. Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function / R. I. K. Geltink, R. L. Kyle, E. L. Pearce // Annu Rev Immunol. — 2018. — Vol. 36. — P. 461-488.

260. Georgescu, S. R. Advances in Understanding the immunological pathways in psoriasis. / S. R. Georgescu, M. Tampa, C. Caruntu [et al.] // Int J Mol Sci. — 2019. — Vol. 20. — No. 3. — P. 739.

261. Gerlach, K.TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. / K. Gerlach, Y. Hwang, A. Nikolaev [et al.] // Nat Immunol. — 2014. — Vol. 15. — No. 7. — P.676-686.

262. Gerriets, V. A. Metabolic Programming and PDHK1 Control CD4+ T Cell Subsets and Inflammation. / V. A. Gerriets, R. J. Kishton, A. G. Nichols [et al.] // J Clin Invest. — 2015. — Vol. 125. — No. 1. — P. 194-207.

263. Gibson, D. J. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in Inflammatory Bowel Disease. / D. J. Gibson, L. Elliott, E. McDermott [et al.] // Inflamm Bowel Dis. — 2015. — Vol. 21. — No. 12. — P. 2806-2814.

264. Gilio, L. Fatigue in multiple sclerosis is associated with reduced expression of interleukin-10 and worse prospective disease activity. / L. Gilio, F. Buttari, L. Pavone [et al.] // Biomedicines. — 2022. — Vol. 10. — No. 9. — P. 2058.

265. Gisbert, J. P. Primary Failure to an Anti-TNF Agent in Inflammatory Bowel Disease: Switch (to a Second Anti-TNF Agent) or Swap (for Another Mechanism of Action)? / J. P. Gisbert, M. Chaparro // J Clin Med. — 2021. — Vol. 10. — No. 22. — P. 5318.

266. Gisbert, J. P. Systematic review with meta-analysis: The efficacy of a second anti-TNF in patients with inflammatory bowel disease whose previous anti-TNF treatment has failed. / J. P. Gisbert, A. C. Marin, A. G. McNicholl, M. Chaparro // Aliment Pharmacol Ther. — 2015. — Vol. 41. — No. 7. — P. 613-623.

267. Glocker, E. O. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. / E. O. Glocker, D. Kotlarz, K. Boztug [et al.] // N Engl J Med. — 2009. — Vol. 361. — No. 21. — P. 2033-2045.

268. Goedegebuure, P. Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer. / P. Goedegebuure, J. Mitchem // Curr Cancer Drug Targets. — 2011. — Vol. 11. — No. 6. — P. 734-751.

269. Goldstein, J. D. IL-36 signaling in keratinocytes controls early IL-23 production in psoriasis-like dermatitis. / J. D. Goldstein, E. Y. Bassoy, A. Caruso [et al.] // Life Sci Alliance. — 2020. — Vol. 3. — No. 6. — P. e202000688.

270. Golhen, K. Understanding efficacy-safety balance of biologics in moderate-to-severe pediatric psoriasis. / K. Golhen, C. Winskill, M. Theiler [et al.] // Front Med (Lausanne). — 2022. — Vol. 9. — No. 944208. — P.1-21.

271. Gomez-Bris, R. CD4 T-Cell Subsets and the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. / R. Gomez-Bris, A. Saez, B. Herrero-Fernandez // Int J Mol Sci. — 2023. — Vol. 24. — No. 3. — P. 2696.

272. Gorman, M. P. Increased relapse rate in pediatric-onset compared with adult-onset multiple sclerosis. / M. P. Gorman, B. C. Healy, M. Polgar-Turcsanyi [et al.] // JAMA Neurology. — 2009. — Vol. 66. — No. 1. — P. 54-59.

273. Gouirand, V. Regulatory T Cells and Inflammatory Mediators in Autoimmune Disease. / V. Gouirand, I. Habrylo, M.D.Rosenblum. // J Invest Dermatol. —2022. — Vol. 142. — No. 3. — P. 774-780.

274. Grant, Ch. R. Dysfunctional CD39 (POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. / Ch. R. Grant, R. Liberal, BS. Holder // Hepatology. — 2014. — Vol. 59. — No. 3. — P. 1007-1015.

275. Greeck, V. B. Alterations in Lymphocytic Metabolism-An Emerging Hallmark of MS Pathophysiology? / V. B. Greeck, S. K. Williams, J. Haas [et al.] // Int J Mol Sci. — 2023. — Vol. 24. — No. 3. — P. 2094.

276. Greenfield, A. L. B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era. / A. L. Greenfield, S. L. Hauser // Ann Neurol. — 2018. — Vol .83. — No. 1. — P. 13-26.

277. Gregori, S. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. / S. Gregori, K. S. Goudy, M. G. Roncarolo // Front Immunol. — 2012. — Vol. 3. — P. 1-12.

278. Greiner, T. What Guides Peripheral Immune Cells into the Central Nervous System? / T. Greiner, M. Kipp // Cells. — 2021. — Vol. 10. — No. 8. — P. 2041.

279. Gross, C. C. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. / C. C. Gross, A. Schulte-Mecklenbeck, A. Rünzi [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2016. — Vol. 113. — No. 21. — P. 2973-2982.

280. Guan, Q. Recent Advances: The Imbalance of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. / Q. Guan, J. Zhang // Mediators Inflamm. — 2017. — Vol. 2017 — P. 4810258.

281. Guan, Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. / Q. Guan // J Immunol Res. — 2019. — Vol. 2019. — P. 7247238.

282. Gudi, V. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. / V. Gudi, S. Gingele, T. Skripuletz, M. Stangel // Front Cell Neurosci. — 2014. — Vol. 8. — P. 1-24.

283. Guo, Q. NF-κB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. / Q. Guo, Y. Jin, X. Chen [et al.] // Sig Transduct Target Ther. — 2024. — Vol. 9. — No. 1. — P. 1-37.

284. Haile, L. A. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. / L. A. Haile, R. von Wasielewski, J. Gamrekelashvili [et al.] // Gastroenterology. — 2008. — Vol. 135. — No. 3. — P. 871-881.

285. Hamaidi, I. Sirtuins are crucial regulators of T cell metabolism and functions. / I. Hamaidi, S. Kim // Exp Mol Med. — 2022. — Vol. 54. — P. 207-215.

286. Hammarin, A. L. Analysis of PCR as a tool for detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. / A. L. Hammarin, G. Bogdanovic, V. Svedhem [et al.] // J Clin Microbiol. — 1996. — Vol. 34— No. 12. — P. 2929-2932.

287. Han, L. Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4+ CD25 high Foxp3+ regulatory T-cells in psoriasis / L. Han, H. Sugiyama, Q. Zhang [et al.] // Australas. J. Dermatol. — 2018. — Vol. 59. — No. 1. — P. 31-38.

288. Harbord, M. European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. / M. Harbord, R. Eliakim, D. J. Bettenworth [et al.] // Crohns Colitis. — 2017. — Vol. 11. — No. 7. — P. 769-784.

289. Harley, J. B. Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. / J. B. Harley, J .A. James // Bull NYU Hosp Jt Dis. —2006. — Vol. 64. — No. 1-2. — P. 45-50.

290. Hauser, S. L. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. / S. L. Hauser, A. K. Bhan, F. Gilles [et al.] // Ann Neurol. — 1986. — Vol. 19 — No. 6. — P. 578-587.

291. Havrdova, E. Alemtuzumab CARE-MS I 5-year follow-up: durable efficacy in the absence of continuous MS therapy. / E. Havrdova, D.L. Arnold, J.A.Cohen [et al.] // Neurology. — 2017. — Vol. 89. — No. 11. — P. 1107-1116.

292. Hemmer, B. Contribution of individual amino acids within MHC molecule or antigenic peptide to TCR ligand potency. / B. Hemmer, C. Pinilla, B. Gran [et al.] // J Immunol. — 2000. — Vol. 164. — No. 2. — P. 861-871.

293. Hensiek, A.E. Familial effects on the clinical course of multiple sclerosis. / A.E. Hensiek, S.R. Seaman, L.F. Barcellos [et al.] // Neurology. — 2007. — Vol. 68. — No. 5. — P. 376-383.

294. Ho, A. W. T cells and the skin: from protective immunity to inflammatory skin disorders. / A. W. Ho, T. S. Kupper // Nat Rev Immunol. — 2019. — Vol. 19. — No. 8. — P. 490-502.

295. Hong, J. J. TNF-alpha inhibitors and ustekinumab for the treatment of psoriasis: therapeutic utility in the era of IL-17 and IL-23 inhibitors / J. J. Hong, E. K. Hadeler, M. L. Mosca [et al.] // J Psoriasis Psoriatic Arthritis. — 2022. — Vol.7. — No.2. — P.79-92.

296. Housley, W. J. Genetic variants associated with autoimmunity drive NFkappaB signaling and responses to inflammatory stimuli. / W. J. Housley, S. D. Fernandez, K. Vera [et al.] // Sci Transl Med. —2015. — Vol. 7. — No. 291. — P. 1-24.

297. Hsieh, C.L. IFN-γ, IL-17A, IL-4, and IL-13: Potential Biomarkers for Prediction of the Effectiveness of Biologics in Psoriasis Patients. / C.L. Hsieh, S.J. Yu, K.L. Lai [et al.]// Biomedicines. — 2024. — Vol. 12 — No. 1. — P. 1-13.

298. Hu, H. Re-establishing immune tolerance in multiple sclerosis: focusing on novel mechanisms of mesenchymal stem cell regulation of Th17/Treg balance. / H. Hu, H. Li, R. Li [et al.] // J Transl Med. — 2024. — Vol. 22. — No. 1. — P. 1-20.

299. Hu, Z. Regulation of T cell immunity by cellular metabolism. / Z. Hu, Q. Zou, B. Su. // Front Med. —2018. — Vol. 12. — No. 4. — P. 463-472.

300. Huang, Y. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. / Y. Huang, Z. Chen //Am J Transl Res. — 2016. — Vol. 8. — No. 6. — P. 2490-2497.

301. Hunter, C. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. / C. A. Hunter, S. A. Jones. // Nat Immunol. —2015. — Vol. 16. — No. 5. — P. 448-457.

302. Huppert, J. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. / J. Huppert, D. Closhen, A. Croxford [et al.] //FASEB J. — 2010. — Vol. 24. — No. 4. — P. 1023-1034.

303 Huppke, P. Therapy of highly active pediatric multiple sclerosis. / P. Huppke, B. Huppke, D. Ellenberger [et al.] // Mult. Scler. J. — 2019. — Vol. 25. — No. 1. — P. 72-78.

304. Iacobaeus, E. Phenotypic and functional alterations of myeloid-derived suppressor cells during the disease course of multiple sclerosis. / E. Iacobaeus, I. Douagi, R. Jitschin, [et al.] // Immunol. Cell Biol. — 2018. — No. 96. — P. 820-830.

305. Iacobazzi, D. New insights into NF-κB signaling in innate immunity: focus on immunometabolic crosstalks. / D. Iacobazzi, P. Convertini, S. Todisco [et al.] // Biology (Basel) — 2023. — Vol. 12. — No. 6. — P. 776.

306. Iannetti, P. Intravenous immunoglobulin and interferon: Successful treatment of optic neuritis in pediatric multiple sclerosis. / P. Iannetti //J Child Neurol. —2004. — Vol. 19. — No. 8. — P. 623-626.

307. Imam, T. Effector T Helper Cell Subsets in Inflammatory Bowel Diseases. / T. Imam, S. Park, M. H. Kaplan [et al.] // Front Immunol. — 2018. — Vol. 9. — P. 1212.

308. Irrera, N. BAY 11-7082 inhibits the NF-κB and NLRP3 inflammasome pathways and protects against IMQ-induced psoriasis. / N. Irrera, M. Vaccaro, A. Bitto [et al.] // Clin Sci (Lond). — 2017. — Vol. 131. — No. 6. — P. 487-498.

309. Isaacs, A. Virus interference. I. The interferon. / A. Isaacs, J.Lindenmann // Proc R Soc Lond B Biol Sci. — 1957 — Vol. 147. — P. 258-267.

310 Islam, M. S. Epidermal growth factor is a critical regulator of the cytokine IL-33 in intestinal epithelial cells. / M. S. Islam, K. Horiguchi, S. Iino, [et al.] // British Journal of Pharmacology. — 2016. — Vol. 173. — No. 16. — P. 2532-2542.

311. Israel, L. Clinical and genetic heterogeneity of CARD14 mutations in psoriatic skin disease / L. Israel, M. Mellett // Frontiers in Immunology — 2018. — Vol. 9. — P.1-15.

312. Iwata, Y. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. / Y. Iwata, T. Matsushita, M. Horikawa [et al.] // Blood. — 2011. — Vol. 117. — No. 2. — P. 530-541.

313. Jacobse, J. Intestinal Regulatory T Cells as Specialized Tissue-Restricted Immune Cells in Intestinal Immune Homeostasis and Disease. / J. Jacobse, J. Li, E. Rings [et al.] // Front Immunol. — 2021. — Vol. 12. — P. 716499.

314. Jakimovski, D. Interferon beta for multiple sclerosis. / D. Jakimovski, C. Kolb, M. Ramanathan [et al.] // Cold Spring Harb. Perspect. Med. —2018 — Vol. 8 . — No. 11. — P. 1-19.

315. Jakovljevic, M. Induction of NTPDase1/CD39 by reactive microglia and macrophages is associated with the functional state during EAE. / M. Jakovljevic, I. Lavrnja, I. Bozic [et al.] // Frontiers in Neuroscience. — 2019— Vol. 13. — P. 1-20.

316. Jamshidian, A. Biased Treg/Th17 balance away from regulatory toward inflammatory phenotype in relapsed multiple sclerosis and its correlation with severity of symptoms. / A. Jamshidian, V. Shaygannejad, A. Pourazar [et al.] // J Neuroimmunol. — 2013. — Vol. 262. — No. 1-2. — P. 106-112.

317. Janzen, N. R. Interactive Roles for AMPK and Glycogen from Cellular Energy Sensing to Exercise Metabolism. / N. R. Janzen, J. Whitfield, N. J. Hoffman // Int J Mol Sci. — 2018. — Vol. 19. — No. 11. — P. 3344.

318. Jiang, Q. Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. / Q. Jiang, G. Yang, F. Xiao, [et al.] // Front. Immunol. — 2021 — Vol. 12. — P. 688066.

319. Joosse, M. The role of therapeutic drug monitoring of anti-tumor necrosis factor alpha agents in children and adolescents with inflammatory bowel disease. / M. Joosse., J. Samsom, C. van der Woude, [et al.] // Inflamm Bowel Dis. —2015. — Vol. 21. — No. 9. — P. 2214-2221.

320. Kamata, M. Dendritic Cells and Macrophages in the Pathogenesis of Psoriasis. / M. Kamata, Y. Tada // Front Immunol. —2022. — Vol. 13. — P. 941071.

321. Kapizioni, C. Biologic therapy for inflammatory bowel disease: real-world comparative effectiveness and impact of drug sequencing in 13 222 patients within the UK IBD BioResource. / C. Kapizioni, R. Desoki, D. Lam, [et al.] // J. Crohns Colitis. — 2024. — Vol. 18. — No. 6. — P. 790-800.

322. Karczewski, J. New insights into the role of T cells in pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. / J. Karczewski, A. Dobrowolska, A. Rychlewska-Hanczewska [et al.] // Autoimmunity. —2016. — Vol. 49. — P. 435-450.

323. Kaskow, B. J. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. / B. J. Kaskow, C. Baecher-Allan // Cold Spring Harb Perspect Med. — 2018 — Vol. 8. — No. 4. — P. 1-14.

324. Kean, J.M. Seroepidemiology of human polyomaviruses. / J.M. Kean, S. Rao, M. Wang [et al.] // PLoS Pathog. — 2009. — Vol. 5. — No. 3. — P. e1000363.

325. Kearney, N. Real world use of biologic drug levels and anti-drug antibodies in patients with psoriasis – does therapeutic drug monitoring have a place in routine clinical practice? / N. Kearney, K. McKenna // Journal of Dermatological Treatment. — 2021. — Vol. 33. — No. 3. — P. 1676–1681.

326. Kedia-Mehta, N. Competition for nutrients and its role in controlling immune responses. / N. Kedia-Mehta, D.K. Finlay // Nat. Commun. —2019. Vol. 10. — No. 1. — P. 2123.

327. Kemanetzoglou, E. CNS demyelination with TNF-α blockers. / E. Kemanetzoglou, E. Andreadou // Curr Neurol Neurosci Rep. — 2017. — Vol. 17. — P. 36.

328. Kestens, C. Dutch Initiative on Crohn and Colitis (ICC). Adalimumab and infliximab are equally effective for Crohn’s disease in patients not previously treated with anti-tumor necrosis factor-α agents. / C. Kestens, M. van Oijen, C. Mulder [et al.] //Clinical gastroenterology and hepatology. —2013. — Vol. 11. — No. 7. — P. 826831.

329. Khor, B. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. / B. Khor, A. Gardet, R. J. Xavier // Nature. — 2011. — Vol. 474. — No. 7351. — P. 307–317.

330. Kim, H. O. Pediatric Psoriasis: From New Insights into Pathogenesis to Updates on Treatment. / H. O. Kim, S. Y. Kang, J. C. Kim [et al.] //Biomedicines. — 2021. — Vol. 9. — No. 8. — P. 940.

331. Kim, J. The imbalance between Type 17 T-cells and regulatory immune cell subsets in psoriasis vulgaris. / J. Kim, A. Moreno, J. G. Krueger // Front. Immunol. — 2022. — Vol. 13. — P. 1005115.

332. Kishore, M. Regulatory T cell migration is dependent on glucokinase-mediated glycolysis. / M. Kishore, K. C. P. Cheung, H. Fu [et al.] //Immunity. — 2017. — Vol. 47. — P. 875-889.

333. Klag, T. Defective antibacterial barrier in inflammatory bowel disease. / T. Klag, E. F. Stange, J. Wehkamp // Dig Dis. — 2013. — Vol. 31. — No. 3-4. — P. 310-316.

334. Kliegman, R. M. Diseases of the epidermis. In: Nelson Textbook of Pediatrics. / R. M. Kliegman, J. W. S. Geme, N. J. Blum [et al.] — Philadelphia: Elsevier, 2020. — 4264pp.

335. Kobayashi, T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. / T. Kobayashi, S. Okamoto, T. Hisamatsu [et al.] // Gut. — 2008 — Vol. 57. — No. 12. — P. 1682-1689.

336. Kokubo, K. Conventional and pathogenic Th2 cells in inflammation, tissue repair, and fibrosis. / Kokubo K, Onodera A, Kiuchi M [et al.] //Front. Immunol. — 2022. — Vol. 13. — P. 945063.

337. Kolbinger, F. Beta-defensin 2 is a responsive biomarker of IL-17A-driven skin pathology in patients with psoriasis. / F. Kolbinger, C. Loesche, M. A. Valentin, [et al.] // J Allergy Clin Immunol. — 2017. — Vol. 139. — No. 3. — P. 923-932.

338. Kono, M. Pyruvate Kinase M2 is Requisite for Th1 and Th17 Differentiation. / M. Kono, K. Maeda, I. Stocton-Gavanescu [et al.] // JCI Insight. — 2019. — Vol. 4. — No. 12. — P. 1-13.

339. Kontaki, E. Aberrant function of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in experimental colitis and in inflammatory bowel disease (IBD) immune responses. / E. Kontaki, D. T. Boumpas, M. Tzardi [et al.] // Autoimmunity. — 2017. — Vol. 50. — No. 3. — P. 170-181.

340. Kopylov U. Predicting durable response or resistance to antitumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease// U. Kopylov, E. Seidman / Therap. Adv. Gastroenterol. – 2016. - Vol. 9. — No. 4. — P. 513-526.

341. Kornberg, M. D. The immunologic Warburg effect: Evidence and therapeutic opportunities in autoimmunity. / Kornberg M. D. // Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine. — 2020. — Vol. 12. — No. 5. — P. e1486.

342. Krawiec, P. Serum interleukin 17A and interleukin 17F in children with inflammatory bowel disease. / P. Krawiec, E. Pac-Kożuchowska // Sci Rep. — 2020. — Vol. 10. —P. 12617.

343. Kubo, M. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. / M. Kubo, Y. Motomura // Front Immunol. —2012 — Vol. 30. — No. 3. — P. 275.

344. Kuhn, K. A. Bacteroidales recruit IL-6-producing intraepithelial lymphocytes in the colon to promote barrier integrity. / K. A. Kuhn, H. M. Schulz, E. H. Regner [et al.] // Mucosal Immunol. — 2018. — Vol. 11— No. 2. — P. 357-368.

345. Kumar, B. V. Human Tissue-resident memory T cells are defined by core transcriptional and functional signatures in lymphoid and mucosal sites. / B. V. Kumar, W. Ma, M. Miron [et al.] // Cell Rep. — 2017. — Vol. 20. — P. 2921-2934.

346. Kumar, Singh P. Exploration of the therapeutic aspects of Lck: A kinase target in inflammatory mediated pathological conditions. / Singh P. Kumar, A. Kashyap, O. Silakari // Biomed Pharmacother. —2018. — Vol. 108. — P. 1565-1571.

347. Kurihara, K. Significance of IL-17A-producing CD8 (+)CD103 (+) skin resident memory T cells in psoriasis lesion and their possible relationship to clinical course. / K. Kurihara, T. Fujiyama, P. Phadungsaksawasdi [et al.] // J Dermatol Sci. — 2019 — Vol. 95. — P. 21-27.

348. Kurtovic, N. O. Serum concentrations of interferon gamma (IFN-γ) in patients with psoriasis: Correlation with clinical type and severity of the disease. / N. O. Kurtovic, E. K. Halilovic // Med Arch. — 2018. — Vol. 72. — P. 410-413.

349. Kurtzke, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). / Kurtzke JF. // Neurology. —1983 — Vol. 33. — No. 11. — P. 1444-1452.

350. Lai, L. J. Natural killer T cells and ulcerative colitis. / L. J. Lai, J. Shen, Z. H. Ran // Cell Immunol. — 2019. — Vol. 335. — P. 1-5.

351. Lam, M. C. Vedolizumab for ulcerative colitis and Crohn"s disease: results and implications of GEMINI studies. / M. C. Lam, B. Bressler // Immunotherapy. — 2014 — Vol. 6 — No. 9. — P. 963-971.

352. Lamanna, W. C. The structure-function relationship of disulfide bonds in etanercept. / W. C. Lamanna, R. E. Mayer, A. Rupprechter [et al.] // Sci Rep. — 2017— Vol. 7. — P. 3951.

353. Landells, I. Ustekinumab in adolescent patients age 12 to 17 years with moderate-to-severe plaque psoriasis: Results of the randomized phase 3 CADMUS study. / Landells I., Marano C., Hsu M.-C. [et al.] // J. Am. Acad. Dermatol. —2015. — Vol. 73. — P. 594-603.

354. Laroni, A. Dysregulation of regulatory CD56 (bright) NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. / A. Laroni, E. Armentani, N. Kerlero de Rosbo, [et al.] // J Autoimmun. — 2016. — Vol. 72. — P. 8-18.

355. Laukova, M. Regulatory T cells as a therapeutic approach for inflammatory bowel disease. / M. Laukova, A. Glatman Zaretsky // Eur J Immunol. —2023. — Vol. 53 — No.2. — P. e2250007.

356. Lavoie, S. The Crohn’s disease polymorphism, ATG16L1 T300A, alters the gut microbiota and enhances the local Th1/Th17 response. / S. Lavoie, K.L. Conway, K.G. Lassen, [et al.] // Elife. — 2019. — Vol. 8. — P. 39982.

357. Lecluse, L. L. Extent and clinical consequences of antibody formation against adalimumab in patients with plaque psoriasis. / L. L. Lecluse, R. J. Driessen, P. I. Spuls, [et al.] // Arch Dermatol. — 2010. — Vol. 146. — No.2. — P. 127-132.

358. Lee, E.B. Psoriasis risk factors and triggers. / E. B. Lee, K. K. Wu, M.P. Lee [et al.] // Cutis. — 2018. — Vol. 102. — P. 18-20.

359. Lee, G. R. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity. / Lee GR. // Int J Mol Sci. — 2018. — Vol. 19. — P. 730.

360. Lee, S. H. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease./ S. H. Lee, J. E. Kwon, M. L. Cho // Intest Res. —2018. — Vol. 16. — No.1. — P. 26-42.

361. Lees, J. R. A little stress is good: IFN-gamma, demyelination, and multiple sclerosis. / J. R. Lees, A. H. Cross // J Clin Invest. — 2007. — Vol. 117. — No.2. — P. 297-299.

362. Leijten, E. F. Tissue-resident memory CD8+ T cells from skin differentiate psoriatic arthritis from psoriasis. / E. F. Leijten, T. S. van Kempen, M. A. Olde Nordkamp [et al.] // Arthritis Rheumatol. — 2021. — Vol. 73. — P. 1220–1232. 363. Li, R. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. / R. Li, A. Rezk, Y. Miyazaki // Sci Transl Med. —2015. — Vol. 7. — No.310. — P. 310ra166.

364. Li, Y. Characterization and biological significance of IL-23-induced neutrophil polarization. / Y. Li, L. Zhu, Z. Chu [et al.] // Cell Mol Immunol. —2018. — Vol. 15. — No.5. — P. 518-530.

365. Li, Y. The possible role of the novel cytokines il-35 and il-37 in inflammatory bowel disease. / Y. Li, Y. Wang, Y. Liu // Mediators of Inflammation. — 2014. — Vol. 2014. — P. 136329.

366. Liau, M.M. Therapeutic drug monitoring of biologics in psoriasis// M.M. Liau, H.H. Oon // Biologics. – 2019. – Vol. 13. — P. 127-132.

367. Lim, H. Structural Biology of the TNFα Antagonists Used in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. / H. Lim, S.H. Lee, H.T. Lee [et al.] // Int. J. Mol. Sci. —2018. — Vol. 19. — P. 768.

368. Lima, M. Chemokine receptor expression on normal blood CD56(+) NK-cells elucidates cell partners that comigrate during the innate and adaptive immune responses and identifies a transitional NK-Cell population. / M. Lima, M. Leander, M. Santos [et al.] // Immunol Res. —2015. — Vol. 2015. — P. 839684.

369. Lin, A. M. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. / A. M. Lin, C. J. Rubin, R. Khandpur [et al.] // J Immunol. — 2011. — Vol. 187. — No.1. — P. 490-500.

370. Lin, W. The integrated stress response prevents demyelination by protecting oligodendrocytes against immune-mediated damage. / W. Lin, S. L. Bailey, H. Ho [et al.] // J Clin Invest. —2007. — Vol. 117. — No.2. — P. 448-456.

371. Lin, Y. Cyclin-Dependent Kinase 7 Promotes Th17/Th1 Cell Differentiation in Psoriasis by Modulating Glycolytic Metabolism. / Y. Lin, K. Xue, Q. Li [et al.] // J Invest Dermatol. — 2021. — Vol. 141. — No.11. — P. 2656-2667.

372. Liu, C. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. / C. Liu, D. Chu, K. Kalantar-Zadeh // Adv Sci (Weinh). — 2021. — Vol. 15. — P. e2004433.

373. Liu, D. Inflammatory bowel disease biomarkers./ D. Liu, V. Saikam, K.A. Skrada [et al.]// Med Res Rev. — 2022. — Vol. 42. — No. 5. — P. 1856-1887.

374 . iu, S. The relationship between CD4+ T cell glycolysis and their functions. / S. Liu, S. Liao, L. Liang [et al.] //Trends Endocrinol. Metab. —2023. — Vol. 34. — No. 6. — P. 345-360.

375. Liu, T. NF-κB signaling in inflammation. / T. Liu , L. Zhang , D. Joo [et al.]// Signal Transduct Target Ther. —2017. — Vol.2. — P.17023.

376. Liu, X. Q. Circulating inflammatory cytokines and psoriasis risk: A systematic review and meta-analysis. / X. Q. Liu, P. L. Zhou, X. Y. Yin [et al.] // PLoS ONE. — 2023. — Vol. 18. — No. 10. — P. e0293327.

377. Liu, X. T. Enhanced migratory ability of neutrophils toward epidermis contributes to the development of psoriasis via crosstalk with keratinocytes by releasing IL-17A. / X. T. Liu, Z. R. Shi, S. Y. Lu [et al.] // Front Immunol. — 2022. — Vol. 13. — P. 817040.

378. Longhi, M. S. Characterization of human CD39+ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. / M. S. Longhi, A. Moss, A. Bai // PLoS ONE. — 2014. — Vol. 9. — P. e87956.

379. Lopetuso, L. Can we predict the efficacy of anti-TNF agents? / L. Lopetuso, V. Gerardi, V. Papa [et al.] // Int. J. Mol. Sci. —2017. — Vol. 18. — P. 1973.

380. Lopetuso, L. R. Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease. / L. R. Lopetuso, S. Chowdhry, T. T. Pizarro // Front Immunol. —2013. — Vol. 4. — P. 181.

381. Louis, N. A. Control of IFN-alphaA by CD73: implications for mucosal inflammation. / Louis NA, Robinson AM, MacManus CF // J Immunol. —2000. — Vol. 180. — P. 4246-4255.

382. Louveau, A. Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege. / A. Louveau, T. H. Harris, J. Kipnis // Trends Immunol. —2015. — Vol. 36. — P. 569-577.

383. Lu, H. Monocyte-macrophages modulate intestinal homeostasis in inflammatory bowel disease. / Lu H, Suo Z, Lin J, [et al.] // Biomark Res. —2024. — Vol. 12. — No. 1. — P. 76.

384. Lu, L. F. Molecular orchestration of differentiation and function of regulatory T cells. / L. F. Lu, A. Rudensky // Genes Dev. —2009. — Vol. 23. — No. 11. — P. 1270-1282.

385. Lu, Q. Immunology of Inflammatory Bowel Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutics. / Q. Lu, M. F. Yang, Y. J. Liang [et al.] // J Inflamm Res. —2022. — Vol. 15. — P. 1825-1844.

386. Lu, W. Suppression of HIV Replication by CD8(+) Regulatory T-Cells in Elite Controllers. /Lu W, Chen S, Lai C [et al.] //Front Immunol. — 2016. — Vol. 7. — P. 134.

387. Luan, L. An increased proportion of circulating Th22 and Tc22 cells in psoriasis. / L. Luan, Y. Ding, S. Han [et al.] //Cell Immunol. — 2014. — Vol. 290. — P. 196-200.

388. Lucafò M, Curci D, Bramuzzo M, et al. Serum Adalimumab Levels After Induction Are Associated With Long-Term Remission in Children With Inflammatory Bowel Disease. / Lucafò M, Curci D, Bramuzzo M, // Front Pediatr. — 2021. — Vol. 9. — P. 646671.

389. Luchtman, D. W. IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis: Current and future developments. / D. W. Luchtman, E. Ellwardt, C. Larochelle [et al.] // Cytokine Growth Factor Rev. — 2014. — Vol. 25. — P. 403-413.

390. Lyu, Y. An Overview of Tissue-Resident Memory T Cells in the Intestine: From Physiological Functions to Pathological Mechanisms. / Y. Lyu, Y. Zhou, J. Shen // J. Front Immunol. —2022. — Vol. 13. — P. 912393.

391. Ma, Z. Myeloid-derived suppressor cell-derived arginase-1 oppositely modulates IL-17A and IL-17F through the ESR/STAT3 pathway during colitis in mice. / Z. Ma, Y. Zhen, C. Hu [et al.] //Front. Immunol. — 2020. — Vol. 11. — P. 687.

392. MacDonald, J. K. Anti-IL-12/23p40 antibodies for induction of remission in Crohn’s disease. / J. K. MacDonald, T. M. Nguyen, R. Khanna [et al.] // Cochrane Database Syst Rev. — 2016. — Vol. 11. — No. 11. — P. CD 007572.

393. Mack, D. R. Laboratory values for children with newly diagnosed inflammatory bowel disease. / D. R. Mack, C. Langton, J. Markowitz [et al.] // Pediatrics. —2007. — Vol. 119. — P. 1113-1119.

394. Macpherson, A. J. IgA Function in Relation to the Intestinal Microbiota. / A. J. Macpherson, B. Yilmaz, J. P. Limenitakis [et al.] // Annu Rev Immunol. —. 2018. — Vol. 36. — P. 359-381.

395. Magliozzi, R. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. / R. Magliozzi, O. Howell, A. Vora [et al.] // Brain. — 2007. — Vol. 130. — No. 4. — P. 1089-1104.

396. Mahil S.K., Capon F., Barker J.N. Update on psoriasis immunopathogenesis and targeted immunotherapy. / Mahil S.K., Capon F., Barker J.N. // Semin. Immunopathol. — 2016. — Vol. 38. — P. 11-27.

397. Makshakov, G. Diagnostic and prognostic value of the cerebrospinal fluid concentration of immunoglobulin free light chains in clinically isolated syndrome with conversion to multiple sclerosis. / G. Makshakov, V. Nazarov, O. Kochetova [et al.] // PLoS One. — 2015. — Vol. 10. — No. 11. — P. e0143375.

398. Maksimow, M. Early prediction of persistent organ failure by soluble CD73 in patients with acute pancreatitis. / M. Maksimow, K. Lea, A. Nieminen [et al.] // Critical Care Medicine. — 2014. — Vol. 42. — No. 12. — P. 2556-2564.

399. Malpass, K. Multiple sclerosis: 'Outside-in' demyelination in MS. / K. Malpass // Nat Rev Neurol. —2012 — Vol. 8. — No. 2. — P. 61.

400. Maltz, R. Imaging modalities in pediatric inflammatory bowel disease. /R. Maltz, D. J., Podberesky, S. A. Saeed // Curr Opin Pediatr. — 2014 — Vol. 26. — No. 5. — P. 590-596.

401. Mantia, L. La. Double-blind trial of dexamethasone versus methylprednisolone in multiple sclerosis acute relapses. / L. La. Mantia, M. Eoli, C. Milanese // Eur Neurol. — 1994. — Vol. 34. — No. 4. — P. 199-203.

402. Marcil, V. A cross-sectional study on malnutrition in inflammatory bowel disease: Is there a difference based on pediatric or adult age grouping? / V. Marcil, E. Levy, D. Amre // Inflammatory Bowel Diseases. — 2019. — Vol. 8. — No. 25. — P. 1428-1441.

403. Marelli-Berg, F.M. Metabolic regulation of leukocyte motility and migration. / F.M. Marelli-Berg, M. J. Jangani // Leukoc. Biol. — 2018 — Vol. 104. — P. 285-293.

404. Margoni, M. No evidence of disease activity including cognition (NEDA-3 plus) in naive pediatric multiple sclerosis patients treated with natalizumab. / M. Margoni, F. Rinaldi, A. Riccardi, [et al.] // J. Neurol. —2020 — Vol. 267. — No. 1. — P. 100-105.

405. Marsal, J. Managementof Non-response and Loss of Response to Anti-tumor NecrosisFactor Therapy in Inflammatory BowelDisease. / J. Marsal, M. Barreiro-de Acosta, I. Blumenstein [et al.] // Front. Med. — 2022 — Vol. 9. — P. 897936.

406. Martin, R. Lessons from studies of antigen-specific T cell responses in Multiple Sclerosis. / R. Martin, B. Bielekova, B. Gran [et al.] // J Neural Transm Suppl. —2000. — Vol. 60. — P. 361-373.

407. Martynova, E. Serum and cerebrospinal fluid cytokine biomarkers for diagnosis of multiple sclerosis / E. Martynova, M. Goyal, S. Johri, [et al.] // Hindawi Mediators of Inflammation. —2020— Vol. 2020. — P. 1-10.

408 Mauri, C. The expanding family of regulatory B cells. / C. Mauri, M. Menon // Int Immunol. —2015. — Vol. 27. — No. 10. — P. 479-486.

409. Mauro, C. NF-kappaB controls energy homeostasis and metabolic adaptation by upregulating mitochondrial respiration. / C. Mauro, S. C. Leow, E. Anso [et al.] // Nat. Cell Biol. —2011. — Vol. 13. —P. 1272-1279.

410. McDaniel, D. K. Emerging roles for noncanonical NF-κB signaling in the modulation of inflammatory bowel disease pathobiology. / D. K. McDaniel, K. Eden, V.M. Ringel. // Inflamm. Bowel Dis. — 2016. — Vol. 22. — No. 9. — P. 2265-2279.

411. Meephansan, J. Pathogenic Role of Cytokines and Effect of Their Inhibition

in Psoriasis. An Interdisciplinary Approach to Psoriasis. In: Psoriasis. An Interdisciplinary Approach to Psoriasis / J. Meephansan, U. Subpayasarn, M. Komine [et al.] // — London: InTech. , 2017. — 246pp.

412. Megna, M. Psoriasis in children: a review. / M. Megna, M. Napolitano, A. Balato [et al.] // Curr. Pediatr. Rev. — 2015. — Vol. 11. — No. 1. — P. 10-26.

413. Meka, R. R. IL-27-induced modulation of autoimmunity and its therapeutic potential. / R. R. Meka, S. H. Venkatesha, S. Dudics [et al.] //Autoimmunity Reviews. — 2015. — Vol. 14. — No. 12. — P. 1131-1141.

414. Melero-Jerez, C. Myeloid-derived suppressor cells support remyelination in a murine model of multiple sclerosis by promoting oligodendrocyte precursor cell survival, proliferation, and differentiation. / C. Melero-Jerez, B. Fernández-Gómez, R. Lebrón-Galán [et al.] // Glia. — 2021. —Vol. 69. — No. 4. — P. 905-924.

415. Melzer, N. CD8+ T cells and neuronal damage: direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability. / N. Melzer, S. G. Meuth, H. Wiendl // FASEB J. — 2009. — Vol. 23. — No. 11. — P. 3659-3673.

416. Mencarelli, A. Calcineurin-mediated IL-2 production by CD11chighMHCII+ myeloid cells is crucial for intestinal immune homeostasis. / A. Mencarelli, H. J. Khameneh, J. Fric [et al.] // Nat Commun. —2018. — Vol. 9. — No. 1. — P. 1102.

417. Menter, A. Joint American Academy of Dermatology National Psoriasis Foundation guidelines of care for the management and treatment of psoriasis in pediatric patients. / A. Menter, K. M. Cordoro, D. M. R. Davis [et al.] // J Am Acad Dermatol. — 2020. — Vol. 82. — No. 1. — P. 161-201.

418. Menting, S. P. Developing a Therapeutic Range of Adalimumab Serum Concentrations in Management of Psoriasis: A Step Toward Personalized Treatment. / S. P. Menting, E. Coussens, M. F. Pouw [et al.] // JAMA Dermatol. — 2015. — Vol. 151. — No. 6. — P. 616-622.

419. Michielan, A. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. / A. Michielan, R. D'Incà // Mediators Inflamm. — 2015. — Vol. 2015. — P. 628157.

420. Miller, D. M. A meta-analysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations. / D. M. Miller, B. Weinstock-Guttman, F. Béthoux [et al.] // Mult Scler J. — 2000. — Vol. 6. — No. 4. — P. 267-273.

421. Millrud, C.R. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. / C. R. Millrud, C. Bergenfelz, K. Leandersson // Oncotarget. — 2017. — Vol. 8. — P. 3649-3665.

422. Miron, M. Maintenance of the human memory T cell repertoire by subset and tissue site. / M. Miron, W. Meng, A. M. Rosenfeld [et al.] // Genome Med. — 2021. — Vol. 13. — No. 1. — P. 100.

423. Mishima, Y. Alterations of peripheral blood CD5+ B cells in inflammatory bowel disease. / Y. Mishima, S. Ishihara, Y. Amano // Scand J. Gastroenterol. — 2009. Vol. 44. — No. 2. — P. 172-179.

424. Miterski, B. Inhibitors in the NFkappaB cascade comprise prime candidate genes predisposing to multiple sclerosis, especially in selected combinations. / Miterski B, Böhringer S, Klein W [et al.] // Genes Immun. — 2002. — Vol. 3. — P. 211-219.

425. Mizumaki K., Horii M., Kano M., Komuro A., Matsushita T. Suppression of IL-23-mediated psoriasis-like inflammation by regulatory B cells. / Mizumaki K., Horii M., Kano M. [et al.] // Sci. Rep. —2021. — Vol. 11. — No. 1. — P. 2106.

426. Mjösberg, J. Human innate lymphoid cells. / J. Mjösberg, H. Spits // J Allergy Clin Immunol. — 2016. — Vol. 138. — No. 5. — P. 1265-1276.

427. Mo, C. Imbalance between T helper 17 and regulatory T cell subsets plays a significant role in the pathogenesis of systemic sclerosis. / C. Mo, Z. Zeng, Q. Deng [et al.] // Biomed Pharmacother. — 2018. — Vol. 108. — P. 177-183.

428. Molnarfi, N. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. / N. Molnarfi, U. Schulze-Topphoff, M. S. Weber // J Exp Med. — 2013. — Vol. 210. — No. 13. — P. 2921-2937.

429. Molodecky, N. A. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. / N. A. Molodecky, I. S. Soon, D. M. Rabi [et al.] // Gastroenterology. — 2012. — Vol. 1. — No. 142. — P. 46-54.

430. Monastero, R. N. Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. / R. N. Monastero, S. Pentyala // Int J Inflam. — 2017. — Vol. 2017. — P. 4309485.

431. Moosavi, B. Genetic, epigenetic and biochemical regulation of succinate dehydrogenase function. / B. Moosavi, X. L. Zhu, W. C. Yang [et al.] // Biol Chem. — 2020. — Vol. 401. — No. 3. — P. 319-330.

432. Mortier, E. Editorial: Modulating Cytokines as Treatment for Autoimmune Diseases and Cancer. / E. Mortier, A. Ma, B. A. Malynn [et al.] // Front Immunol. — 2020. — Vol. 11. — P. 608636.

433. Mosca, M. The Role of IL-17 Cytokines in Psoriasis. / M. Mosca, J. Hong, E. Hadeler // Immunotargets Ther. — 2021. — Vol. 10. — P. 409-418.

434. Murphy, A. C. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. / A. C. Murphy, S.J. Lalor, M.A. Lynch // Brain Behav Immun. — 2010. — Vol. 24. — No. 4. — P. 641-651.

435. Nagasawa, M. Innate Lymphoid Cells (ILCs): Cytokine Hubs Regulating Immunity and Tissue Homeostasis. / M. Nagasawa, H. Spits, X.R. Ros // Cold Spring Harb Perspect Biol. — 2018. — Vol. 10. — No. 12. — P. a030304.

436. Nakase, H. The influence of cytokines on the complex pathology of ulcerative colitis. / H. Nakase, N. Sato, N. Mizuno [et al.] // Autoimmun Rev. — 2022. — Vol. 21. — No. 3. — P. 103017.

437. Nalleweg, N. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. / N. Nalleweg, M. T. Chiriac, E. Podstawa [et al.] // Gut. — 2015. — Vol. 64. — P. 743-755.

438. Narula, S. New Perspectives in Pediatric Neurology - Multiple Sclerosis. / S. Narula // Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. —2016. — Vol. 46. — No. 2. — P. 62-69.

439. National Clinical Guideline Centre (UK). Multiple Sclerosis: Management of Multiple Sclerosis in Primary and Secondary Care. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK). — 2014. —PMID: 25340249.

440. Naviglio, S. Causes of Treatment Failure in Children With Inflammatory Bowel Disease Treated With Infliximab: A Pharmacokinetic Study. / S. Naviglio, D. Lacorte, M. J. Lucafo [et al.] // Pediatr Gastroenterol Nutr. — 2019. — Vol. 68. — No. 1. — P. 37-44.

441. Nestle, F.O. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. / F. O. Nestle, C. Conrad, A. Tun-Kyi [et al.] // J Exp Med. —2005. — Vol. 202. — P. 135-143.

442. Nowak-Gottl, U. Pharmacokinetics, efficacy, and safety of LMWHs in venous thrombosis and stroke in neonates, infants and children. / U. Nowak-Gottl, C. Bidlingmaier, A. Krumpel [et al.] //Br J Pharmacol. — 2008. — Vol. 153. — P. 1120-1127.

443. Nussbaum, L. Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment. / L. Nussbaum, Y.L. Chen, G.S. Ogg // Br. J. Dermatol. — 2021. — Vol. 184. — No. 1. — P. 14-24.

444. Ochoa-Repáraz, J. The influence of gut-derived CD39 regulatory T cells in CNS demyelinating disease. / Ochoa-Repáraz J., Kasper L. H. // Transl. Res. — 2017. Vol. 179. — P. 126-138.

445. Odenwald, M. A. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target. / Odenwald MA, Turner JR. // Nat Rev Gastroenterol Hepatol. — 2017. — Vol. 14. — No.1. — P. 9-21.

446. Offenheim, R. Candidate Biomarkers for Response to Treatment in Psoriatic Disease. / R. Offenheim, O.F. Cruz-Correa, D. Ganatra [et al.] // J Rheumatol. 202.4 — Vol. 51. — No. 12. — P. 1176-1186.

447. Oh, S. Glycerol 3-phosphate dehydrogenases (1 and 2) in cancer and other diseases. / S. Oh, X. L. Mai, J. Kim, [et al.] // Exp Mol Med. — 2024. — Vol. 56. — No.5. — P. 1066-1079.

448. Ohnmacht, C. MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through RORgammat (+) T cells. / C. Ohnmacht, J. H. Park, S. Cording, [et al.] //. Science. —2015. — Vol. 349. — P. 989-993.

449. Oka, T. CXCL17 attenuates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation by recruiting myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells. / T. Oka, M. Sugaya, N. Takahashietal // J. Immunol. — 2017. — Vol. 198. — No.10. — P. 3897-3908.

450. Oliveira, S. B. Monteiro IM. Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children. / S. B. Oliveira, I. M. Monteiro // BMJ. — 2017. — Vol. 357. — P. j2083.

451. Ottoboni, L. Clinical relevance and functional consequences of the TNFRSF1A multiple scle-rosis locus. / Ottoboni L., Frohlich I., Lee M. [et al.] // Neurology. — 2013. — Vol. 81. — No.22. — P. 1891-1899.

452. Palavra, F. TyPed study: Natalizumab for the treatment of pediatric-onset multiple sclerosis in Portugal. / Palavra F., Figueiroa S., Correia A.S. [et al.] // Mult. Scler. Relat. Disord. — 2021. — Vol. 51. — P. 102865.

453. Paller, A. S. Long-term etanercept in pediatric patients with plaque psoriasis. / A. S. Paller, E. C. Siegfried, L. F. Eichenfield [et al.] //J Am Acad Dermatol. — 2010. — Vol. 63. — No.5. — P. 762-768.

454. Palsson-McDermott, E.M. Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. / E. M. Pålsson-McDermott; L. A. O'Neill // Cell Res. —2020. — Vol. 30. — P. 300-314.

455. Papamichael, K. Appropriate Therapeutic Drug Monitoring of Biologic Agents for Patients With Inflammatory Bowel Diseases. / K. Papamichael, A. S. Cheifetz, G. Y. Melmed [et al.] // Clin Gastroenterol Hepatol. — 2019 — Vol. 17. — No.9. — P. 1655-1668.

456. Pappa, A. Pediatric IBD patients show medication and disease activity dependent changes in NK cell and CD4 memory T cell populations. / A. Pappa, J. Mührer, P. Gast, [et al.] // Front. Pediatr. —2023. — Vol. 11. — P. 1123873.

457. Park, B. V. Metabolic Regulation of T Cell Differentiation and Function. / Park BV, Pan F. // Mol Immunol. —2015. — Vol. 68. — No.2. — Pt C. — P. 497-506.

458. Parks, N. E. NEDA treatment target? No evident disease activity as an actionable outcome in practice. / N. E. Parks, E. P. Flanagan, C. F. Lucchinetti [et al.] // J Neurol Sci. —2017. — Vol. 383. — P. 31-34.

459. Patsopoulos, N. A. Genetics of multiple sclerosis: an overview and new directions. / N.A. Patsopoulos // Cold Spring Harb. Perspect. Med. —2018. — Vol. 8. — No.7. — P. a028951.

460. Pearce, E. L. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. / E. L. Pearce, M. C. Poffenberger, C. H. Chang [et al.] // Science. —2013. — Vol. 342. — No.6155. — P. 1242454.

461. Perl, A. Expanding scope of TEMRA in autoimmunity./ A. Perl, L. Morel // EBioMedicine. —2023. — Vol. 90. — P. 104520.

462. Phan, C. Biological treatments for paediatric psoriasis: a retrospective observational study on biological drug survival in daily practice in childhood psoriasis. / C. Phan, A. Beauchet, A. C. Burztejn [et al.] //J Eur Acad Dermatol Venereol. —2019. — Vol. 33. — No. 10. — P. 1984-1992.

463. Philipp, S. Ustekinumab for the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis in paediatric patients (≥6 to <12 years of age): Efficacy, safety, pharmacokinetic and biomarker results from the open-label CADMUS Jr study. / S. Philipp, A. Menter, A. Nikkels [et al.] // Br. J. Dermatol. — 2020. — Vol.183. — P. 664-672.

464. Pickert, G. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. / G. Pickert, C. Neufert, M. Leppkes [et al.] // J Exp Med. — 2009. — Vol. 206. — No. 7. — P. 1465-72.

465. Pigneur, B. Phenotypic Characterization of Very Early-onset IBD Due to Mutations in the IL10, IL10 Receptor Alpha or Beta Gene. / B. Pigneur, J. Escher, M. Elawad [et al.] // Inflamm. Bowel Dis. —2013. — Vol. 19. — P. 2820-2828.

466. Pinho, R.M. DNA methylation as a regulator of intestinal gene expression. / Pinho R.M., Maga E.A. // Br. J. Nutr. — 2021. — Vol. 126. — P. 1611-1625.

467. Pinson, R. Psoriasis in children. / R. Pinson, B. Sotoodian, L. Fiorillo // Psoriasis (Auckl). —2016. — Vol. 6. — P. 121-129.

468. Poggi, A. Human Gut-Associated Natural Killer Cells in Health and Disease. / A. Poggi, R. Benelli, R. Venè // Front. Immunol. — 2019. — Vol. 10. — P. 961.

469. Poma, P. NF-κB and Disease / P. Poma // Int J Mol Sci — 2020. — Vol. 21. — No. 23. — P. 1-3.

470. Pott, J. Intestinal Epithelial Cell Autophagy Is Required to Protect against TNF-Induced Apoptosis during Chronic Colitis in Mice. / J. Pott, A. M. Kabat, K. J. Maloy // Cell Host Microbe. —2018. — Vol. 23. — No. 2. — P. 191-202.

471. Preiningerova, J.L. Multiple sclerosis and microbiome. / J. L. Preiningerova, Z. Jiraskova Zakostelska, A. Srinivasan [et al.] //Biomolecules. —2022. — Vol. 12. — No. 3. — P. 433.

472. Privitera, G. Predictors and Early Markers of Response to Biological Therapies in Inflammatory Bowel Diseases. / G. Privitera, D. Pugliese, G. Rapaccini [et al.] // Journal of clinical medicine. — 2021. — Vol. 10. — No. 4. — P. 853.

473. Przybyła, T. Purinergic signaling in B cells. / T. Przybyła, M. Sakowicz- T. Burkiewicz, Pawełczyk // Acta Biochimica Polonica. — 2018. — Vol. 65. — No. 1. — P. 1-7.

474. Pucino, V. Editorial: The role of immunometabolism in autoimmune mediated and autoinflammatory disorders. / V. Pucino, M. Guma // Front. Immunol. — 2022. — Vol. 13. — P. 969939.

475. Qiu, R. Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases. / R. Qiu, L. Zhou, Y. Ma [et al.] // Clin Rev Allergy Immunol. — 2020. — Vol. 58. — No. 1. — P. 52-70.

476. Quirant-Sánchez, B. Th1Th17CM Lymphocyte Subpopulation as a Predictive Biomarker of Disease Activity in Multiple Sclerosis Patients under Dimethyl Fumarate or Fingolimod Treatment. / B. Quirant-Sánchez, S. Presas-Rodriguez, M. J. Mansilla [et al.] // Mediators Inflamm. — 2019. — P. 8147803.

477. Rai, R. Cross Talk of Purinergic and Immune Signaling: Implication in Inflammatory and Pathogenic Diseases. Purinergic System. In: Purinergic System. / R. Rai // — London: InTech. 2022. — 196pp.

478. Raphael, I. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. / I. Raphael, S. Nalawade, T. N. Eagar [et al.] // Cytokine. — 2015. — Vol. 74. — No. 1c 5-17.

479. Raphael, I. Memory CD4+ T-cells in immunity and autoimmune diseases. / I. Raphael, R.R. Joern, T.G. Forsthuber // Cells. —2020. — Vol. 9. — No. 3. — P. 531.

480. Ray-Jones, H. One SNP at a time: moving beyond GWAS in psoriasis / H. Ray-Jones, S. Eyre, A. Barton [et al.]. // Journal of Investigative Dermatology. — 2016. — Vol. 136. — No. 3. — P. 567-573.

481. Rinker, J. R. Elevated CSF free kappa light chains correlate with disability prognosis in multiple sclerosis. / J. R. Rinker, K. Trinkaus, A. H. Cross // Neurology. — 2006. — Vol. 67. — No. 7. — P. 1288-1290.

482. Roblin, X. Higher Serum Infliximab Concentrations Following Subcutaneous Dosing are Associated with Deep Remission in Patients with Inflammatory Bowel Disease. / X. Roblin, S. Nancey, K. Papamichael [et al.]// J Crohns Colitis. — 2024. — Vol. 18. — No. 5. — P. 679-685.

483. Roblin, X. Addition of azathioprine to the switch of anti-TNF in patients with IBD in clinical relapse with undetectable anti-TNF trough levels and antidrug antibodies: a prospective randomised trial. / X. Roblin, N. Williet, G. Boschetti [et al.] //Gut. —2020. — Vol. 69. — No. 7. — P. 1206-1212.

484. Rocamora-Reverte, L. The Complex Role of Regulatory T Cells in Immunity and Aging. / L. Rocamora-Reverte, F. L. Melzer, R. Würzner [et al.] // Front. Immunol. — 2021. — Vol. 11. — P. 616949.

485. Ron-Harel, N. Mitochondrial Metabolism in T Cell Activation and Senescence: A Mini-Review N. / N. Ron-Harel, A. H. Sharpe, M. C. Haigis / Gerontology. — 2015. — Vol. 61. — P. 131-138.

486. Ronholt K, Iversen L. Old and New Biological Therapies for Psoriasis. / Ronholt K, Iversen L. // Int J Mol Sci. — 2017. — Vol. 18. — No. 11. — P. 2297.

487. Ross, S. H. Cantrell. Signaling and function of interleukin-2 in T lymphocytes. / S. H. Ross, D. A. Cantrell // Annu Rev Immunol. —2018. — Vol. 36. — P. 411-433.

488. Rothschild, D.E. Modulating inflammation through the negative regulation of

NF-κB signaling. / D. E. Rothschild, D. K. McDaniel, V. M. Ringel-Scaia [et al.] // J. Leukoc. Biol. —2018. — P. 1-39.

489. Round, J. L. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. / J. L. Round, S. K. Mazmanian // Nat Rev Immunol. — . — Vol. 9. — No. 5. — P. 313-23.

490. Ruemmele, F. M. European Crohn"s and Colitis Organisation; European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn"s disease. / F. M. Ruemmele, G. Veres, K. L. Kolho [et al.] // J Crohns Colitis. — 2014 — Vol. 8. — No. 10. — P. 1179-1207.

491. Ruiz-Gaviria, R. Specificity and sensitivity of aquaporin 4 antibody detection tests in patients with neuromyelitis optica: A meta-analysis. / R. Ruiz-Gaviria, I. Baracaldo, C. Castañeda [et al.] // Mult Scler Relat Disord. — 2015. — Vol. 4. — No. 4. — P. 345-349.

492. Ruocco, G. T helper 9 cells induced by plasmacytoid dendritic cells regulate interleukin-17 in multiple sclerosis. / G. Ruocco, S. Rossi, C. Motta [et al.] // Clin. Sci (Lond). — 2015. — Vol. 129. — No. 4. — P. 291-303.

493. Ruocco, G. Distinct Expression of Inflammatory Features in T Helper 17 Cells from Multiple Sclerosis Patients. / G. Ruocco, M. De Bardi, L. Battistini [et al.] // Cells. — 2019. — Vol. 8. — P. 533.

494. Russo, M. F. Incidence of lymphomas in inflammatory bowel disease: report of an emblematic case, systematic review, and meta-analysis. / M. F. Russo, A. Diddoro, A. Iodice [et al.] // Front Med (Lausanne). — 2023. — Vol. 10. — P. 1172634.

495. Sabat, R. T cell pathology in skin inflammation. / R. Sabat, K. Wolk, L. Loyal [et al.] // Semin Immunopathol. — 2019. — Vol. 41. — No. 3. — P. 359-377.

496. Sadeghi, M. Innate immune cells: Key players of orchestra in modulating tumor microenvironment (TME). / M. Sadeghi, S. Dehnavi, M. Sharifat [et al.] // Heliyon. —2024. — Vol. 10. — No. 5. — P. e27480.

497. Sadovnick, A. D. Purinergic receptors P2RX4 and P2RX7 in familial multiple sclerosis. / A. D. Sadovnick, B. J. Gu, A. L. Traboulsee // Human Mutation. — 2017. — Vol. 38. — No. 6. — P. 736-744.

498. Saez, A. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. Int. / A. Saez, B. Herrero-Fernandez, R. Gomez-Bris [et al.] // J. Mol. Sci. — 2023. — Vol. 24. — P. 1526.

499. Santana, P.T. Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenic Role and Potential Therapeutic Targets. / P.T. Santana, S.L.B. Rosas, B.E. Ribeiro [et al.] // Int. J. Mol. Sci. —2022. — Vol. 23. — No. 7. — P. 3464.

500. Saule, P. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. / P. Saule, J. Trauet, V.Dutriez // Mech. Ageing Dev. —2006 . — Vol. 127. — No. 3. — P. 274-281.

501. Schenk, U. ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. / U. Schenk, M. Frascoli, M. Proietti [et al.] // Science Signaling. —2011. — Vol. 4. — No. 162. — P. ra12.

502. Schiering, C. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. / C. Schiering, T. Krausgruber, A. Chomka [et al.] // Nature. —2014. — Vol. 513. — No. 7519. — P. 564-568.

503. Schlapbach, C. Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. / C. Schlapbach, A. Gehad, C. Yang // Sci Transl Med. — 2014. — Vol. 6. — P. 219ra8-ra8.

504. Schleinitz, N. Natural killer cells in human autoimmune diseases. / N. Schleinitz, F. Vély, J. R. Harlé // Immunology. —2010. — Vol. 131. — No. 4. — P. 451-458.

505. Schmedding, A. Decentralized surgery of abdominal wall defects in Germany. / A. Schmedding, B. Wittekind, E. Salzmann-Manrique [et al.] // Pediatr. Surg. Int. — 2020. — Vol. 36. — No. 5. — P. 569-578.

506. Schneider, E. Generation and function of non-cell-bound CD73 in inflammation. / E. Schneider, A. Rissiek, R. Winzer [et al.] // Frontiers in Immunology. — 2019. — Vol. 10. — P. 1729.

507. Schon, M. Pathogenic function of IL-1beta in psoriasiform skin lesions of flaky skin (fsn/fsn) mice. / M. Schon, C. Behmenburg, D. Denzer [et al.] // Clin. Exp. Immunol. —2001. — Vol. 123. — P. 505-510.

508. Schön, M. P. Adaptive and Innate Immunity in Psoriasis and Other Inflammatory Disorders. / M. P. Schön // Front Immunol. —2019. — Vol. 10. — P. 1764.

509. Schreiner, B. Perspectives on cytokine-directed therapies in multiple sclerosis. / B. Schreiner, B. Becher // Swiss Med Wkly. —2015. — Vol. 145. — P. w14199.

510. Schuler, P.J. Human CD4 + CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73 + exosomes or CD73 + cells. / P. J. Schuler, Z. Saze, C. S. Hong// Clin. Exp. Immunol. —2014. —Vol. 177. — No. 2. — P. 531-543.

511. Schulz-Kuhnt, A. Regulation of Human Innate Lymphoid Cells in the Context of Mucosal Inflammation. / Schulz-Kuhnt A, Wirtz S, Neurath MF [et al.] // Front Immunol. —2020. — Vol. 11. — P. 1062.

512. Selinger, C. P. Biological therapy for inflammatory bowel disease: cyclical rather than lifelong treatment? / C. P. Selinger, K. Rosiou, M. V. Lenti. // BMJ Open Gastroenterol. —2024. — Vol. 11. — No. 1. — P. e001225.

513. Selter, R. C. Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients. / R. C. Selter, V. Biberacher, V. Grummel [et al.] // Mult Scler. — 2013. — Vol. 19. — No. 11. — P. 1454-61.

514. Senol, M. G. Reversible myelopathy with vitamin B12 deficiency. / M. G. Senol, G. Sonmez, F. Ozdag, [et al.] // Singapore Med J. —2008. — Vol. 49. — No. 11. — P. e330-2.

515. Serafini, B. Tissue-resident memory T cells in the multiple sclerosis brain and their relationship to Epstein-Barr virus infected B cells. / B. Serafini, B. Rosicarelli, C. Veroni [et al.] // J Neuroimmunol. — 2023. — Vol. 376. — P. 578036.

516. Serio, J. Evaluation of sirolimus dosing in neonates and infants with lymphatic disorders: a case series. / J. Serio, S. Gattoline, J. Collier H [et al.] // Pediatr. Pharmacol. Ther. —2022. — Vol. 27. — No. 5. — P. 447-451.

517. Sewell, G. W. Interleukin-23 in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Implications for Therapeutic Intervention. / G. W. Sewell, A .Kaser // J Crohns Colitis. — 2022. — Vol. 16(Supplement 2. — P. ii3-ii19.

518. Shao, S. Neutrophil exosomes enhance the skin autoinflammation in generalized pustular psoriasis via activating keratinocytes. / S. Shao, H. Fang, J. Zhang [et al.] // Faseb j. — 2019. — Vol. 33. — P. 6813-6828.

519. Shaoul, R. An Overview of Tools to Score Severity in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. / R. Shaoul, A. S. Day // Front. Pediatr. — 2021. — Vol. 9 . — P. 615216.

520. Sharfe, N. NFκB pathway dysregulation due to reduced RelB expression leads to severe autoimmune disorders and declining immunity. / N. Sharfe, I. Dalal, Z. Naghdi [et al.] // J. Autoimmun. — 2023. —Vol. 137. — P. 102946.

521. Shen, Q. Advances in pathogenesis and nanoparticles (NPs)-mediated treatment of psoriasis. / Q. Shen, R. Liu, S. Tan [et al.] // Front. Immunol. —2022. — Vol. 13. — P. 1089262.

522. Shi, H. Metabolic Control of Treg Cell Stability, Plasticity, and Tissue-Specific Heterogeneity. / H. Shi, H. Chi. // Front Immunol. — 2019. — Vol. 10. — P. 2716.

523. Shi, J-T. Diagnostic Utility of Non-invasive Tests for Inflammatory Bowel Disease: An Umbrella Review. / J-T. Shi, Y. Zhang, Y. She [et al.] // Front. Med. —2022. — Vol. 9. — P. 920732.

524. Shi, Y. Metabolic reprogram and T cell differentiation in inflammation: current evidence and future perspectives. / Y. Shi, H. Zhang, C. Miao // Cell Death Discov. —2025. — Vol. 11. — No. 1. —P. 123.

525. Shi, Y. MIN score predicts primary response to infliximab/adalimumab and vedolizumab therapy in patients with inflammatory bowel diseases. / Y. Shi, W. He, M. Zhong // Genomics. — 2021. — Vol. 113. — P. 1988-1998.

526. Shmais, M. Proactive versus Reactive Therapeutic Drug Monitoring: Why, When, and How? / M. Shmais, M. Regueiro, J. G. Hashash //I nflamm Intest Dis. —2021. — Vol. 7. — No. 1. — P. 50-58.

527. Shyer, J.A. Metabolic signaling in T cells. / J. A. Shyer, R. A. Flavell, W. Bailis //Cell Res. —2020. — Vol. 30. — P. 649-659.

528. Sieminska, I. The Immunology of Psoriasis-Current Concepts in Pathogenesis. / I. Sieminska, M. Pieniawska, T. M. Grzywa // Clin Rev Allergy Immunol. —2024. — Vol. 66. — No. 2. — P. 164-191.

529. Silva, F. The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease. / F. Silva, B. Rodrigues, M. Ayrizono [et al.] // Gastroenterology Research and Practice. —2016. — Vol. 2016. — P. 2097274.

530. Simpson, S. Stimulated PBMC-pro-duced IFN-γ and TNF-α are associated with altered relapse risk in multiplesclerosis: results from a pro-spective cohort study./ S. Simpson , N. Stewart , I. van der Mei [et al.] // J. Neurol. Neurosurg. Psychi-atry. —2015. — Vol. 86. — No. 2. — P. 200-220.

531. Singh, N. Early infliximab trough levels are associated with persistent remission in pediatric patients with inflammatory bowel disease. / N. Singh, C. J. Rosenthal, G. Y. Melmed [et al.] // Inflamm Bowel Dis. — 2014. — Vol. 20. — No. 10. — P. 1708-1713.

532. Slater, C. A. Antinuclear antibody testing: A study of clinical utility. / C. A. Slater, R. B. Davis, R. H. Shmerling // Arch Intern Med. —1996. — Vol. 156. — No. 13. — P. 1421-1425.

533. Soenen, R. Promising Tools to Facilitate the Implementation of TDM of Biologics in Clinical Practice. / R. Soenen, C. Stove, A. Capobianco [et al.] // J Clin Med. —2022. — Vol. 11. — No. 11. — P. 3011.

534. Sokic-Milutinovic, A. Inflammatory Bowel Disease: From Conventional Immunosuppression to Biologic Therapy. / A. Sokic-Milutinovic, T. Milosavljevic // Dig Dis. — 2024. — Vol. 42. — No. 4. — P. 325-335.

535. Solberg, S. M. Serum cytokine measurements and biological therapy of psoriasis - Prospects for personalized treatment? / S. M. Solberg, L. F. Sandvik, M. Eidsheim // Scand J Immunol. — 2018. — Vol. 88. — No. 6. — P. e12725.

536. Soler, D. The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti-β4α7 integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel diseases. / D. Soler, T. Chapman, L. L. Yang [et al.] //J Pharmacol Exp Ther. —2009. — Vol. 330. — P. 864-875.

537. Solomon, A. J. Misdiagnosis of multiple sclerosis. / A. J. Solomon, R. T. Naismith, A. H. Cross // Neurology. — 2018. — Vol. 92. — No. 1. — P. 26-33.

538. Sotnikov, I. CD73-dependent regulation of interferon alpha and interleukin-10 in the inflamed mucosa. / I. Sotnikov, N. A. Louis // Sci World J. —2010. — Vol. 10. — P. 2167-2180.

539. Sperlagh, B. Potent effect of interleukin-1 beta to evoke ATP and adenosine release from rat hippocampal slices. / B. Sperlagh, M. Baranyi, G. Haskó [et al.] // J. Neuroimmunol. — 2004. — Vol. 151. — No. 1-2. — P. 33-39.

540. Sperlagh, B. ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors. / B. Sperlagh, G. Haskó, Z. Németh [et al.] //Neurochem. Int. —1998. —Vol. 33. — No. 3. — P. 209-215.

541. Sperlagh, B. The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and Basal Ganglia: pharmacological and clinical aspects. / B. Sperlagh, E. S. Vizi // Curr. Top. Med. Chem. — 2011. —Vol. 11. — No. 8. — P. 1034-1046.

542. Steenholdt, C. Individualised therapy is more cost-effective than dose intensification in patients with Crohns disease who lose response to anti-TNF treatment: a randomised, controlled trial. / C. Steenholdt, J. Brynskov, O. O. Thomsen [et al.] //Gut. — 2014. — Vol. 63. — P. 919-927.

543. Steinman, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. / Steinman L. // Nat. Med. — 2007. — Vol. 13. — P. 139-145.

544. Strik, A. Therapeutic drug monitoring-based dosing of TNF inhibitors in inflammatory bowel disease: the way forward? / A. S. Strik, S. E. Berends, M. Löwenberg // Expert Review of Clinical Pharmacology. —2019. — Vol. 12. — No.9. — P. 885-891.

545. Strizova, Z. M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality? / Z. Strizova, I. Benesova, R. Bartolini [et al.] // Clin Sci (Lond). —2023. — Vol. 137. — No. 15. — P. 1067-1093.

546. Sun, S. C. Non-canonical NF-κB signaling pathway. / S. C. Sun // Cell Res. —2011. — Vol. 21. — P. 71-85.

547. Sun, X. Formation and clinical effects of anti-drug antibodies against biologics in psoriasis treatment: An analysis of current evidence. / X. Sun, Z. Cui, Q. Wang // Autoimmun Rev. —2024. — Vol. 23. — No. 4. — P. 103530.

548. Sun, W. Psoriasis 1 reduces psoriasis like skin inflammation by inhibiting the VDR mediated nuclear NF κB and STAT signaling pathways / W. Sun, Y. Gao, X. Yu [et al.]. Mol Med Rep. — 2018. — Vol. 18. — No. 3. —P. 2733-2743.

549. Syversen, S. W. Effect of Therapeutic Drug Monitoring vs Standard Therapy During Maintenance Infliximab Therapy on Disease Control in Patients With Immune-Mediated Inflammatory Diseases: A Randomized Clinical Trial / S. W. Syversen, K. K. Jorgensen, G. L. Goll [et al.]. // JAMA. — 2021. — Vol. 326. — No. 23. — P. 2375-2384.

550. Tahani, S. Elevated serum level of IL-4 in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients. / S. Tahani, L. Dehghani, H. Jahanbani-Ardakani [et al.] // J Immunoassay Immunochem. — 2019. — Vol. 40. — No.5. — P. 555-563.

551. Takahashi, H. Plasma trough levels of adalimumab and infliximab in terms of clinical efficacy during the treatment of psoriasis. / H. Takahashi, H. Tsuji, A. Ishida-Yamamoto // J Dermatol. — 2013. — Vol. 40. — No. 1. — P. 39-42.

552. Tegtmeyer, D. Inflammatory bowel disease caused by primary immunodeficiencies – Clinical presentations, review of literature, and proposal of a rational diagnostic algorithm. / D. Tegtmeyer, M. Seidl, P. Gerner [et al.]. // Pediatr Allergy Immunol. —2017. — Vol. 28. — No.5. — P. 412-429.

553. Tenembaum, S. N. Subcutaneous interferon beta-1a in pediatric multiple sclerosis: A retrospective study. / S. N. Tenembaum, B. Banwell, D. Pohl [et al.]. // J Child Neurol. —2013. — Vol. 28. — No.7. — P. 849-856.

554. Thompson, A. J. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. / Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F [et al.]. // Lancet Neurol. — 2018. — Vol. 17. — No.2. — P. 162-173.

555. Thurgate, L. E. Overview of Inflammatory Bowel Disease Unclassified in Children / L. E. Thurgate, D. A. Lemberg, A. S. Day // [et al.]. Inflamm Intest Dis. — 2019. — Vol. 4. — P. 97-103.

556. Toledano, M. Clinical Approach to the Differential Diagnosis of Multiple Sclerosis. / M. Toledano, B. G. Weinshenker, A. J. Solomon // Curr Neurol Neurosci Rep. — 2015. — Vol. 15. — No.8. — P. 57.

557. Tomaszewicz, M. T regulatory cells metabolism: The influence on functional properties and treatment potential. / M. Tomaszewicz, A. Ronowska, M. Zieliński [et al.]. // Front Immunol. — 2023. — Vol. 14. — P. 1122063.

558. Tracey, D. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. / D. Tracey, L. Klareskog, E. H. Sasso, [et al.]. // Pharmacol Therap. — 2008. — Vol. 117. — P. 244.

559. Trenova, A. G. Cytokines in Multiple Sclerosis – Possible Targets for Immune Therapies. / Trenova AG, Slavov GS. // J Neurol Exp Neurosci. — 2016. — Vol. 1. — No.2. — P. 25-29.

560. Tsoi, L.C. Cytokine responses in nonlesional psoriatic skin as clinical predictor to anti-TNF agents. / L. C. Tsoi, M. T. Patrick, S. Shuai [et al.] // J Allergy Clin Immunol. —2022. — Vol. 149. — No.2. — P. 640-649.

561. Turner, D. Which PCDAI Version Best Reflects Intestinal Inflammation in Pediatric Crohn Disease? / D. Turner, A. Levine, T. D. Walters [et al.]. // J Pediatr Gastroenterol Nutr. —2017. — Vol. 64. — No.2. — P. 254-260.

562. Turner, D. Management of Pediatric Ulcerative Colitis: Joint ECCO and ESPGHAN Evidence-based Consensus Guidelines. / D. Turner, A. Levine, J. C. Escher [et al.]. // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. —2012. — Vol. 55. — P. 340–361.

563. Turner, D. Management of Paediatric Ulcerative Colitis, Part 1: Ambulatory Care - An Evidence-based Guideline From European Crohn's and Colitis Organization and European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. / D. Turner, F. M. Ruemmele, E. Orlanski-Meyer [et al.] // J Pediatr Gastroenterol Nutr. — 2018. — Vol. 67. — No.2. — P. 257-291.

564. Turner, D. Management of Paediatric Ulcerative Colitis, Part 2: Acute Severe Colitis-An Evidence-based Consensus Guideline From the European Crohn's and Colitis Organization and the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. / D. Turner, F. M. Ruemmele, E. Orlanski-Meyer [et al.]. // J Pediatr Gastroenterol Nutr. —2018. — Vol. 67. — No.2. — P. 292-310.

565. Uhlig, H. H. Translating Immunology into Therapeutic Concepts for Inflammatory Bowel Disease. / H. H. Uhlig, F. Powrie // Annu Rev Immunol. — 2018. — Vol. 36. — P. 755-781.

566. Ungar, B. Optimizing Anti-TNF-α Therapy: Serum Levels of Infliximab and Adalimumab Are Associated With Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. / B. Ungar, I. Levy, Y. Yavne [et al.] // Clin Gastroenterol Hepatol. — 2016. — Vol. 14. — No.4. — P. 550-557.

567. Ungaro, R. A Treat-to-Target Update in Ulcerative Colitis: A Systematic Review. / R. Ungaro, J. F. Colombel, T. Lissoos // Am J Gastroenterol. — 2019. — Vol. 114. — No. 6. — P. 874-883.

568. Urcelay, E. Role of interleukin 4 in Spanish multiple sclerosis patients. / Urcelay E, Santiago JL, Mas A [et al.]. // J Neuroimmunol. — 2005. — Vol. 168. — No. 1–2. — P. 164-167.

569. Uttarkar, S. Regulatory cells in the skin: Pathophysiologic role and potential targets for anti-inflammatory therapies. / S. Uttarkar, N. C. Brembilla, W. H. Boehncke // J. allergy Clin. Immunol. — 2019. — Vol. 143. — No.4. — P. 1302-1310.

570. Van den Bossche, J. Immunometabolism at the basis of health and disease; an editorial. / J. Van den Bossche, T. Horng, D. G. Ryan // Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. — 2023. — Vol. 1869. — No. 6. — P. 166715.

571. Van der Weele, L. ABIRISK Consortium. Longitudinal analysis of anti-drug antibody development in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1a (Rebif™) using B cell receptor repertoire analysis. / L. Van der Weele, S. Pollastro, B. D. C. Van Schaik [et al.]. // J Neuroimmunol. — 2022. — Vol. 370. — P. 577932.

572. Van Gisbergen, K. P. J. M., Zens K., Münz C. T-cell memory in tissues. / K. P. J. M. Van Gisbergen, K. D. C. Zens, Münz // Eur. J. Immunol. — 2021. — Vol. 51. — No.6. — P. 1310-1324.

573. Van Hoeve, K. Higher Infliximab Trough Levels Are Associated With Better Outcome in Paediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease. / K. Van Hoeve, E. Dreesen, I. Hoffman [et al.] // J Crohns Colitis. — 2018. — Vol. 12. — No.11. — P. 1316-1325.

574. Van Rheenen, P. F. The Medical Management of Paediatric Crohn's Disease: an ECCO-ESPGHAN Guideline Update. / P. F. van Rheenen, M. Aloi, A. Assa, [et al.] // J Crohns Colitis. —2021. — Vol. 15. — No.2. — P. jjaa161.

575. Vanaki, E. Expression patterns of Th1/Th2 transcription factors in patients with guttate psoriasis. / E. Vanaki, M. Ataei, M. H. Sanati [et al.] // Acta Microbiol Immunol Hung. —2013. — Vol. 60. — P. 163-174.

576. Vande Casteele N, Herfarth H, Katz J, Falck-Ytter Y, Singh S. American Gastroenterological Association Institute Technical Review on the Role of Therapeutic Drug Monitoring in the Management of Inflammatory Bowel Diseases. / Vande Casteele N, Herfarth H, Katz J [et al.] // Gastroenterology. —2017. — Vol. 153. — No.3. — P. 835-857.

577. Verma, N.K. LFA-1/ICAM-1 ligation in human T cells promotes Th1 polarization through a GSK3β signaling-dependent Notch pathway. / N. K. Verma, M.H. Fazil, S.T. Ong [et al.] // J. Immunol. —2016. — Vol. 197. — P. 108-118.

578. Verma, N. K. Not Just an Adhesion Molecule: LFA-1 Contact Tunes the T Lymphocyte Program. / N. K. Verma, D. Kelleher // J Immunol. —2017. — Vol. 199. — No. 4. — P. 1213-1221.

579. Vičić, M. Current Concepts of Psoriasis Immunopathogenesis. / M. Vičić, M. Kaštelan, I. Brajac [et al.] // Int J Mol Sci. — 2021. — Vol. 22. — No.21. — P. 11574.

580. Viglietta, V. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. / V. Viglietta, C. Baecher-Allan, H. L. Weiner [et al.] // J Exp Med. —2004. — Vol. 199. — No.7. — P. 971-979.

581. Vignali, D. A. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. / D. Vignali A., V. K. Kuchroo // Nature Immunology. — 2012. — Vol. 13. — No. 8. — P. 722-728.

582. Vincenzi, F. Multiple sclerosis lymphocytes upregulate A2A adenosine receptors that are antiinflammatory when stimulated. / F. Vincenzi, C. Corciulo, M. Targa, [et al.] // European Journal of Immunology. —2013. — Vol. 43. — No. 8. — P. 2206-2216.

583. Von Büdingen, H. C. Update on the autoimmune pathology of multiple sclerosis: B-cells as disease-drivers and therapeutic targets. / H. C. Von Büdingen, A. Palanichamy, K. Lehmann-Horn, [et al.] // Eur Neurol. —2015. — Vol. 73. — No. 3-4. — P. 238-246.

584. Von Meyenn. L. Targeting T Cell Metabolism in Inflammatory Skin Disease. / L. Von Meyenn, N. L. Bertschi, C. Schlapbach // Front Immunol. —2019. — Vol. 10. — P. 2285.

585. Vuerich, M. Dysregulation of adenosinergic signaling in systemic and organ-specific autoimmunity. / M. Vuerich, R. P. Harshe, S. C. Robson [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2019. — Vol. 20. — No.3. — P. 528.

586. Vuerich, M. Control of gut inflammation by modulation of purinergic signaling. / M. Vuerich, S. Mukherjee, S. C. Robson // Front Immunol. — 2020. — Vol. 11. — P. 1882.

587. Vukelic, M. T cell metabolism in lupus. / M. Vukelic, M. Kono, G. C. Tsokos // Immunometabolism. — 2020. — Vol. 2. — No. 2. — P. e200009.

588. Vyas, S. P. A Decade of Th9 Cells: Role of Th9 Cells in Inflammatory Bowel Disease. / S. P. Vyas, R. Goswami A // Front Immunol. —2018. — Vol. 9. — P. 1139.

589. Walrath, T. IFN-γ and IL-17A regulate intestinal crypt production of CXCL10 in the healthy and inflamed colon. / T. Walrath, R. A. Malizia, X. Zhu [et al.] // Am J Physiol Gastrointest Liver. — 2020. — Vol. 318. — No.3. — P. G479-G489.

590. Walton, C. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. / C. Walton, R. King, L. Rechtman [et al.] // Mult Scler. — 2020. — Vol. 26. — No.14. — P. 1816-1821.

591. Wang, K. Role played by MDSC in colitis-associated colorectal cancer and potential therapeutic strategies. / K. Wang, Y. Wang, K. Yin // J Cancer Res Clin Oncol. —2024. — Vol. 150. — No. 5. — P. 243.

592. Wang, Q. Cytokine profiles and the relationship of disease severity in patients with psoriasis. / Q. Wang, D. Yan, S. Zheng [et al.] // Indian J. Dermatol. — 2022. — Vol. 67. — No.2. — P. 204.

593. Wang, W.M. Role of interferon regulatory factor-mediated signaling in psoriasis. / W. M. Wang, F. Li, H. Z. Jin // Int J Med Sci. —2021. — Vol. 18. — No.16. — P. 3794-3799.

594. Wang, Y. Role of myeloid-derived suppressor cells in the promotion and immunotherapy of colitis-associated cancer. / Wang Y, Ding Y, Deng Y [et al.] // J Immunother Cancer. — 2020. — Vol. 8. — No.2. — P. e000609.

595. Warburg, O. On the origin of cancer cells. / O. Warburg // Science. —1956. — Vol. 123. — No. 3191. — P. 309-314.

596. Wei, L. K. Association of NOTCH3 gene polymorphisms with ischemic stroke and its subtypes: A meta-analysis. / L. K. Wei, L. R. Griffiths, L Irene [et al.] // Medicina (Kaunas). — 2019. — Vol. 55. — No. 7. — P. 351.

597. Weigmann, B. Th9 cells in inflammatory bowel diseases. / B. Weigmann, M. F. Neurath // Semin Immunopathol. — 2017. — Vol. 39. — P. 89-95.

598. Wilkinson, N. Defining the Therapeutic Range for Adalimumab and Predicting Response in Psoriasis: A Multicenter Prospective Observational Cohort Study. / N. Wilkinson, T. Tsakok, N. Dand [et al.] // J Invest Dermatol. — 2019. — Vol. 139. — No.1. — P. 115-123.

599. Wing, A. Interleukin-17- and interleukin-22-secreting myelin-specific CD4(+) T cells resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients. / A. Wing, J. Hygino, T. Ferreira [et al.] // Immunology. — 2016. — Vol.147. — No. 2. — P. 212-220.

600. Wing, J. B. Human FOXP3(+) regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. / J. B. Wing, A. Tanaka, S. Sakaguchi // Immunity. —2019. — Vol.50. — P. 302-316.

601. Wu, B. Molecular Control of Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases. / B. Wu, Y. Wan // Int Immunopharmacol. —2020. — Vol. 80. — P. 106187.

602. Wu, H. Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus. / H. Wu, Y. Zhen, Z. Ma / [et al.] / Sci. Transl. Med. — 2016. — Vol.8. — No. 331. — P. 331ra40.

603. Wu, W. H. Intestinal Microbes in Autoimmune and Inflammatory Disease. / W. H. Wu, D. F. Zegarra-Ruiz, G. E. Diehl //Front Immunol. —2020. — Vol.11. — P. 597966.

604. Xi, Q. High frequency of mononuclear myeloid-derived suppressor cells is associated with exacerbation of inflammatory bowel disease. / Q. Xi, Y. Li, J. Dai [et al.] // Immunol Invest. — 2015. — Vol.44. — No. 3. — P. 279-287.

605. Xiong, X. Th17/Treg balance is regulated by myeloid-derived suppressor cells in experimental autoimmune myocarditis. / X. Xiong, M. Yu, D. Wang // Immun Inflamm Dis. — 2023. — Vol. 11. — No. 6. — P. e872.

606. Xu, D. Myeloid-derived suppressor cell: a crucial player in autoimmune diseases. / D. Xu, C. Li, Y. Xu [et al.] // Front. Immunol. — 2022. — Vol. 13. — P. 1021612.

607. Xu, X. A Metabolism Toolbox for CAR T Therapy. / X. Xu, J. N. R. Gnanaprakasam, J. Sherman [et al.]. // Front Oncol. — 2019 . — Vol.9. — P. 322.

608. Xu, X. R. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. / X. R. Xu, C. Q. Liu, B. S. Feng [et al.] // World J Gastroenterol. — 2014. — Vol. 20. — P. 3255-3264.

609. Yadav, P.K. Potential role of NK cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. / P. K. Yadav, C. Chen, Z. Liu // J. Biomed. Biotechnol. — 2011. — Vol. 2011. — P. 348530.

610. Yamamoto, M. Serum cytokines correlated with the disease severity of generalized pustular psoriasis. / M. Yamamoto, Y. Imai, Y. Sakaguchi [et al.] // Dis Markers. —2013. — Vol. 34. — P. 153-161.

611. Yan, J. B. The function and role of the Th17/Treg cell balance in Inflammatory bowel disease. / J. B. Yan, M. M. Luo, Z. Y. Chen // J Immunol Res. — 2020. — Vol. 2020. — P. 8813558.

612. Yan, K. Methotrexate restores the function of peripheral blood regulatory T cells in psoriasis vulgaris via the CD73/AMPK/mTOR pathway / K. Yan, W. Xu, Y. Huang [et al.] // Br J Dermatol. — 2018. — Vol.179. — No.4. — P. 896-905.

613. Yan, K. The distinct role and regulatory mechanism of IL-17 and IFN-γ in the initiation and development of plaque vs guttate psoriasis / K. Yan, L. Han, H. Deng [et al.] // J Dermatol Sci. — 2018. — Vol. 92. — No. 1. — P. 106-113

614. Yang, H.H. Efficacy and safety of adalimumab in comparison to infliximab for Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis. / H. H. Yang, Y. Huang, X. C. Zhou [et al.] // World J Clin Cases. — 2022. — Vol. 10. — No. 18. — P. 6091-6104.

615. Yang, S. Role of TNF-TNF receptor 2 signal in regulatory T cells and its therapeutic implications. / S. Yang, J. Wang, D. D. Brand // Front Immunol. — 2018. — Vol. 19. — No. 9. — P. 784.

616. Yang, W. CD4+ T cell metabolism, gut microbiota, and autoimmune diseases: implication in precision medicine of autoimmune diseases. / W. Yang, T. Yu, Y. Cong // Precis Clin Med. —2022. — Vol. 5. — No. 3. — P. pbac018.

617. Yang, Y. Natural killer cells in inflammatory autoimmune diseases. / Y. Yang, J. Day, F. Souza-Fonseca Guimaraes [et al.]. //, Clin Transl Immunology. —2021. — Vol. 10. — No. 2. — P. e1250.

618. Yenyuwadee, S. The evolving role of tissue-resident memory T cells in infections and cancer. / S. Yenyuwadee, J. L.Sanchez-Trincado Lopez, R. Shah [et al.] // Science advances. —2022. — Vol.8. — No.33. —P. eabo5871.

619. Yoshida, H. The immunobiology of interleukin-27. / H. Yoshida, C. A. Hunter // Annual Review of Immunology. —2015. — Vol. 33. —P. 417-443.

620. Zaidi, D. Regulation of Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells (NF-κβ) in Inflammatory Bowel Diseases. / D. Zaidi, E. Wine // Front. Pediatr. — 2018. — Vol. 6. —P. 317.

621. Zapata-Cobo, P. Changes in T Lymphocytes and Cytokines After Anti-TNF Treatment in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: Association with Response to Pharmacologic Therapy. / P. Zapata-Cobo, S. Salvador-Martín, S. Gil-Manso // Int J Mol Sci. — 2025. — Vol. 26. — No. 7. —P. 3323.

622. Zeng, J. Implications of CD39 in immunerelated diseases. / J. Zeng, Z. Ning, Y. Wang [et al.] // Int Immunopharmacol. —2020. — Vol.89 (Pt A). —P. 107055.

623. Zettl, U. K. Interferon β-1a and β-1b for patients with multiple sclerosis: updates to current knowledge. / U. K. Zettl, M. Hecker, O. Aktas, [et al.] // Expert Rev Clin Immunol. —2018. — Vol.14. — No.2. —P. 137-153.

624. Zhang, L. Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. / L. Zhang, S. Yuan, G. Cheng [et al.] // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6. — No. 12. —P. e28432.

625. Zhang, Q. 30 Years of NF-κB: A blossoming of relevance to human pathobiology. / Q. Zhang, M. J. Lenardo, D. Baltimore // Cell. — 2017. — Vol.168. — No.1-2. —P. 1-40.

626. Zhang Q., Pan Y., Yan R., Zeng B., Wang H., Zhang X., Li W., Wei H., Liu Z. Commensal bacteria direct selective cargo sorting to promote symbiosis. / Zhang Q., Pan Y., Yan R. [et al.] // Nat. Immunol. —2015. — Vol.16. —P. 918–926.

627. Zhang, R. Dextran sulphate sodium increases splenic Gr1(+)CD11b(+) cells which accelerate recovery from colitis following intravenous transplantation. / R. Zhang, S. Ito, N. Nishio // Clin Exp Immunol. — 2011. — Vol. 164. — No. 3. —P. 417-427.

628. Zhang, S. The Alterations in and the Role of the Th17/Treg Balance in Metabolic Diseases. / S. Zhang, X. Gang, S. Yang [et al.] // Front Immunol. —2021. — Vol. 12. — P. 678355.

629. Zhang, S. Metabolic regulation of the Th17/Treg balance in inflammatory bowel disease. / S. Zhang, R. Zhong, S. Tang [et al.] // Pharmacol Res. —2024. — Vol. 203. —P. 107184.

630. Zhang X, Kiapour N, Kapoor S, Khan T, Thamilarasan M, Tao Y, Cohen S, Miller R, Sobel RA, Markovic-Plese S. IL-11 Induces Encephalitogenic Th17 Cells in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. / Zhang X, Kiapour N, Kapoor S [et al.] // J Immunol. — 2019. — Vol. 203. — No. 5. —P. 1142-1150.

631. Zhang, X. IL-11 Induces Th17 Cell Responses in Patients with Early Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. / X. Zhang, Y. Tao, M. Chopra, [et al.] // J. Immunol. —2015. — Vol. 194. — No. 11. —P. 5139-5149.

632. Zhang, Y. Evaluating IL-6 and IL-10 as rapid diagnostic tools for Gram-negative bacteria and as disease severity predictors in pediatric sepsis patients in the intensive care unit. / Zhang Y, Li B and Ning B// Front. Immunol. —2022. — Vol. 13. —P. 1043968.

633. Zhang, H. Y. Target tissue ectoenzyme CD39/CD73-expressing Foxp3+ regulatory T cells in patients with psoriasis / H. Y. Zhang, K. X. Yan, Q. Huang [et al.] // Clin Exp Dermatol. — 2015— Vol. 40 — No. 2 —P. 182-191.

634. Zhang, M. Metabolic regulation of T cell development / M. Zhang, X. Lin, Z. Yang [et al.] // Front Immunol. — 2022. — Vol. 13. — P. 946119.

635. Zhao, F. The paradoxical role of MDSCs in inflammatory bowel diseases: From bench to bedside. / F. Zhao, W. Gong, J. Song [et al.] // Front Immunol. — 2022. — Vol. 13. — P. 1021634.

636. Zhao, J. Th17 Cells in Inflammatory Bowel Disease: Cytokines, Plasticity, and Therapies. / J. Zhao, Q. Lu, Y. Liu [et al.] // J Immunol Res. — 2021. — Vol. 2021. — P. 8816041.

637. Zhou, L. Essential immunologic orchestrators of intestinal homeostasis. / Zhou L, Sonnenberg GF. // Sci Immunol. —2018. — Vol. 3. — No. 20. — P. eaao1605.

638. Zhou, Y. Nuclear Factor κB (NF-κB)-Mediated Inflammation in Multiple Sclerosis. / Y. Zhou, C. Cui, X. Ma, // Front Immunol. —2020. — Vol. 11. —P. 391.

639. Zhu, J. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. / J. Zhu, W. E. Paul // Cell Res. —2010. — Vol. 20. — P. 4-12.

640. Zhu, J. IL-33 alleviates DSS-induced chronic colitis in C57BL/6 mice colon lamina propria by suppressing Th17 cell response as well as Th1 cell response. / J. Zhu, Y. Wang, F. Yang [et al.] // International Immunopharmacology. 2015 —29 — Vol. 2. —P. 846-853.

641. Zhu, W. J. Hypoxia-inducible factor-1: A potential pharmacological target to manage psoriasis. / W.J. Zhu, P. Li, L. Wang, Y.C. Xu // Int Immunopharmacol. — 2020. — Vol. 86— P. 106689.

642. Zhu, X. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. / X. Zhu, J. Zhu // Int J Mol Sci. —2020. — Vol. 21. — No. 21. —P. 8011.

643. Zitouni, J. Effectiveness and Safety of Adalimumab, Etanercept and Ustekinumab for Severe Psoriasis in Children Under 12 Years of Age: A French-Italian Daily Practice Cohort (BiPe Jr). / J. Zitouni, A. Beauchet, R. Curmin [et al.] // Paediatr Drugs. —2022. — Vol. 24. — No. 3. —P. 281-292.