

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
автономного учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр
здравоохранения детей»

Министерства здравоохранения

Российской Федерации

доктор медицинских наук,
профессор А.П. Фисенко



Фисенко 11.08.2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного автономного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения Российской Федерации на основании
решения заседания проблемной комиссии НИИ педиатрии ФГАУ
«НМИЦ здоровья детей» Минздрава России**

Диссертация «Иммунологические критерии эффективности терапии
псориаза генно-инженерными биологическими препаратами в детском
возрасте» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по
специальностям «3.2.7. Аллергология и иммунология», «3.3.8. Клиническая
лабораторная диагностика» выполнена в Федеральном государственном
автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский
центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской
Федерации (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России).

Соискатель, Купцова Дарья Геннадьевна, 16.08.1992 года рождения,
гражданство Российской Федерации, в 2017 году окончила Федеральное
государственное автономное образовательное учреждение высшего

образования «Российский национальный университет имени Н.И. Пирогова» Российской Федерации (ФГАОУ ВО Минздрава России), где присуждена квалификация врач-биохимик по специальности «Медицинская биохимия».

С 2017 по 2019 год обучалась в ординатуре Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Клиническая лабораторная диагностика». С 2019 года – младший научный сотрудник ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Тема диссертационного исследования «Иммунологические критерии эффективности терапии псориаза генно-инженерными биологическими препаратами в детском возрасте» по специальностям «3.2.7. Аллергология и иммунология», «3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика» утверждена на заседании Ученого совета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, протокол №4 от 14 июля 2020 года.

Сданы кандидатские экзамены по предметам «Аллергология и иммунология», «Клиническая лабораторная диагностика», «История и философия науки», «Иностранный язык (английский)», справка № 20/З-22 выдана 3 марта 2022 года в ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

В период подготовки диссертации с 2019 по 2023 год работала в должности младшего научного сотрудника лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Научные руководители: Мурашкин Николай Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, руководитель НИИ детской дерматологии, заведующий отделением дерматологии с группой лазерной хирургии и заведующий лабораторией патологии кожи у детей отдела научных

исследований НИИ педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Петричук Светлана Валентиновна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Слушали:

1. Выступление Купцовой Д.Г. об основных результатах диссертационной работы.
2. Выступление рецензента к.м.н. Сновской М.А.
3. Выступление рецензента к.м.н. Акуловой С.С.

По результатам рассмотрения диссертации Купцовой Д.Г. «Иммунологические критерии эффективности терапии псориаза генно-инженерными биологическими препаратами в детском возрасте» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям «3.2.7. Аллергология и иммунология», «3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика» принято следующее **заключение**:

Диссертация Купцовой Д.Г. «Иммунологические критерии эффективности терапии псориаза генно-инженерными биологическими препаратами в детском возрасте» посвящена проблеме имеющей большое научное и научно-практическое значение.

Актуальность исследования

Псориаз является хроническим иммуноопосредованным многофакторным воспалительным заболеванием кожи с наследственной предрасположенностью, которое характеризуется повышенной пролиферацией эпидеральных клеток, нарушением кератинизации и

воспалительной реакцией в дерме, обусловленной активацией Т-лимфоцитов и синтезом провоспалительных цитокинов. В педиатрической практике распространенность патологии занимает второе место после атопического дерматита. У детей сохраняется рост тяжелых инвалидизирующих форм заболевания, требующие назначения генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП).

Таргетное действие ГИБП основано на блокаде основных провоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе заболевания: фактор некроза опухоли-альфа (TNF α), интерлейкин (IL)-17, IL-12 и IL-23. За последнее десятилетие применение биологической терапии у детей с псориазом показало свою эффективность, увеличив продолжительность ремиссии и значительно улучшив качество жизни пациентов. В последние годы для врачей-дерматологов встала необходимость оценки показателя «выживаемости терапии», отражающего временной промежуток от начала до отмены ГИБП. Развитие первичной и вторичной неэффективности, нежелательных побочных явлений, плохой переносимости препаратов приводят к замене препарата. Одним из факторов потери ответа на терапию ГИБП является выработка антител к биологическим препаратам и для контроля проводимого лечения рекомендуется мониторинг уровня антител. Тем не менее, отмечается недостаток информации и руководств по тактике переключения биопрепаратов, а также полное отсутствие четких лабораторных маркеров эффективности ГИБП у детей с псориазом.

Псориаз характеризуется сложными взаимодействиями между кератиноцитами и иммунными клетками, играющими определяющую роль в развитии и потенцировании воспаления. Современное понимание патофизиологии псориаза позволило выделить потенциальные иммунологические маркеры в прогнозе эффективности биологической терапии псориаза у детей. К таким маркерам относятся: показатели клеточного иммунитета, функциональная активность клеток иммунной системы, уровень циркулирующих цитокинов и активность фактора

транскрипции NF-кВ. Выявление информативности данных показателей в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом является актуальной и практически значимой задачей для здравоохранения Российской Федерации.

Таким образом, учитывая рост заболеваемости псориазом у детей, наличие тяжелых форм заболевания, развитие резистентности к терапии, изучение механизмов регуляции иммунного ответа и оценка комплекса иммунологических параметров является перспективным направлением поиска потенциальных критериев своевременного прогноза эффективности ГИБП при данной патологии.

Цель исследования диссертационной работы

Разработать информативные иммунологические критерии прогноза эффективности применения генно-инженерных биологических препаратов при псориазе у детей.

Задачи исследования:

1. Оценить показатели клеточного иммунитета (основные и малые популяции лимфоцитов, Т-клетки памяти, клетки-супрессоры миелоидного происхождения) в зависимости от клинических характеристик детей с вульгарным псориазом.

2. Выявить особенности метаболизма лимфоцитов различных субпопуляций (активность митохондриальных дегидрогеназ и эктонуклеотидаз) и клеток-супрессоров миелоидного происхождения (аргиназа-1) у детей с псориазом при разной тяжести заболевания и эффективности лечения.

3. Определить концентрации комплекса циркулирующих цитокинов, регулирующих аутоиммунные реакции, у детей с псориазом в зависимости от тяжести заболевания и эффективности терапии ГИБП.

4. Изучить активность ядерного фактора транскрипции κB (NF-κB) в основных и малых популяциях лимфоцитов у детей с псориазом в зависимости от типа терапии и эффективности применения ГИБП.

5. Установить ранние прогностические критерии эффективности ГИБП у детей с псориазом на основе выявленных информативных иммунологических показателей.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Раскрытие механизмов регуляции иммунного ответа и оценка комплекса иммунологических показателей является актуальным направлением поиска потенциальных критериев своевременного прогноза эффективности ГИБП при псориазе в детском возрасте. Тема диссертационной работы полностью соответствует специальностям «3.2.7. Аллергология и иммунология» (области исследования: №2 Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии, №5 Изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний, №6 Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов) и «3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика» (№3 Клинико-лабораторные методы исследования для определения тяжести, периода и срока болезни, прогноза, контроля за лечением и его результатами, №9 Разработка методов иммунологических исследований. Антигены эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, белков плазмы, HLA-системы. Оценка функциональной активности клеток иммунной системы. Антитела естественные, иммунные и аутоиммунные, иммунные комплексы. Медиаторы иммунитета. Оценка иммунного статуса организма. Мониторинг иммунокорригирующей терапии. Иммунофенотипическая характеристика клеток при заболеваниях крови. Онкоиммунология).

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ

ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Диссертационная работа Купцовой Д.Г. выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ, проводимых в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в рамках НИР «Разработка иммунологических предикторов эффективности терапии блокаторами TNF α при иммуноопосредованных заболеваниях у детей на примере воспалительных заболеваний кишечника и псориаза» (номер регистрационной карты в ЕГИСУ НИОКР АААА-А19-119013090093-2). В 2020 году на заседании Ученого совета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России утверждена диссертационная работа на тему «Иммунологические критерии эффективности терапии псориаза генно-инженерными биологическими препаратами в детском возрасте», протокол №4 от 14 июля 2020 года.

Основные результаты диссертационной работы

В диссертационной работе было обследовано 277 детей с обыкновенным вульгарным псориазом разной степени тяжести и 90 здоровых детей (группа сравнения). Возраст детей, включенных в исследование, составил от 1,4 до 18 лет. Тяжесть течения псориаза оценивали по индексам распространённости и тяжести псориатических поражений – Psoriasis Area and Severity Index (PASI) и площади поверхности тела – Body Surface Area (BSA, %). При PASI <10 баллов степень тяжести псориаза определяли как легкую, при PASI 10-19 как среднетяжелую и при PASI >20 баллов - тяжелую. Часть пациентов (110 детей) были обследованы в динамике до назначения биологической терапии, на 16 и 52 неделях терапии ГИБП (блокаторами TNF α и IL-12/23).

Критериями назначения биологической терапии являлись PASI ≥ 10 и/или BSA $\geq 10\%$. Эффективность биологической терапии псориаза определяли по критерию PASI 75, отражающему снижение PASI на 75% и более относительно значений индекса PASI до назначения терапии. Если к году терапии ГИБП PASI 75 не достигался, терапию считали неэффективной. Проведенное исследование соответствовало этическим принципам Конституции Российской Федерации от 12 декабря 1993 г., Хельсинкской декларацией (WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 года №200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики» и одобрено локальным этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (протокол №2 от 14.02.2020).

В настоящей работе был проведен комплексный анализ иммунологических показателей: оценка содержания основных и малых популяций лимфоцитов, содержания клеток-супрессоров миелоидного происхождения и субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти периферической крови, определение активности митохондриальных дегидрогеназ (сукцинатдегидрогеназы, глицерол-3-fosfatдегидрогеназы) в основных и малых популяциях лимфоцитов, определение активности ферментов пуринергической регуляции (эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза-1 (CD39), экто-5'-нуклеотидаза (CD73)), оценка комплекса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и хемокинов (панель Human Th17), определение активности фактора транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов.

Диссидентом проведен анализ показателей клеточного иммунитета в зависимости от возраста детей и было получено, что возрастная динамика содержания основных популяций лимфоцитов у детей с псориазом соответствует динамике здоровых детей. Выявлено, что для детей с псориазом характерно повышение относительного содержания Т-

лимфоцитов, Th17-лимфоцитов, активированных Т-хелперов и снижение абсолютного количества T_{reg} с возрастом. Диссертант показала, что содержание центральных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти и эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти увеличивается с возрастом детей, а наивных CD4⁺-Т-клеток памяти - снижается.

Диссертант показала значительное увеличение содержания популяции активированных Т-хелперов и популяции клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом относительно группы сравнения. Тяжесть состояния пациентов по индексам PASI и BSA напрямую связано с увеличением содержания Th17, T_{reg}, Thact, MDSCs и M-MDSCs.

При исследовании метаболизма клеток иммунной системы у детей с вульгарным псориазом показано снижение активности митохондриальных дегидрогеназ, степень снижения зависела от популяции лимфоцитов. Активность сукцинатдегидрогеназы снижена в основных популяциях лимфоцитов, а также в популяциях Th17-лимфоцитов, T_{reg} и CD5⁺ В-клеток у детей с псориазом. Диссертантом выявлено повышение иммуносупрессивных функций клеток-супрессоров миелоидного происхождения за счет увеличения экспрессии аргиназы-1. Было показано, что тяжелое течение псориаза у детей сопровождается выраженным снижением активности сукцинатдегидрогеназы в T_{reg} и экспрессии аргиназы-1 в клетках-супрессорах миелоидного происхождения.

В диссертационной работе исследованы ферменты пуринергической регуляции в популяциях CD4⁺-Т-клеток. Было установлено, что наибольшее содержание клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, характерно для популяции T_{reg}. Показано, что в стадии регресса заболевания при снижении индекса PASI происходит нормализация содержания CD39⁺Tregs.

Примененный в работе метод проточной цитометрии с визуализацией позволил диссиденту оценить количество клеток с транслокацией NF-кВ в различных популяциях лимфоцитов. У детей с псориазом, как и в группе сравнения, количество клеток с транслокацией NF-кВ зависит от популяции

клеток и максимальное количество выявлено в В-лимфоцитах. Диссидентом показано увеличение клеток с транслокацией NF-кВ в популяциях Т-хелперов, Thact, Treg, Th17 и Tc17 у детей с псориазом. Установлена обратная корреляционная зависимость уровня транслокации NF-кВ и активности сукцинатдегидрогиназы в популяциях Т-лимфоцитов и НК-клетках.

В диссертационной работе подтверждена патогенетическая роль провоспалительных цитокинов IL-23, IL-22, IL-12p70, IL-27, IL-17E, IL-17F, TNF α в развитии воспалительной реакции при псориазе. Диссидентом показано, что уровень провоспалительных цитокинов напрямую отражает тяжесть заболевания по индексу PASI. Диссидентом установлено, что повышенный уровень провоспалительных цитокинов IFN γ , IL-12p70, IL-1 β , IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNF α до назначения биологической терапии характерен для пациентов с эффективным лечением ГИБП.

Диссидентом установлено, что прогноз эффективности применения ГИБП у детей с псориазом к году терапии возможен по содержанию активированных Т-хелперов, соотношению Th17/Treg, содержанию наивных и эффекторных Т-клеток памяти в периферической крови, уровню циркулирующих цитокинов (IFN γ , IL-12p70, IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNF α) в сыворотке крови до назначения биологической терапии. Выявлено, что уровень транслокации NF-кВ в NK-клетках, Th17-лимфоцитах и цитотоксических Т-лимфоцитах к окончанию индукционного курса (16 недель терапии) позволяет прогнозировать эффект терапии ГИБП к году. Снижение относительного содержания регуляторных Т-клеток, экспрессирующих CD39 $^{+}$ -эктонуклеотидазу, и активности СДГ в Treg после индукционного курса являются факторами риска потери эффекта терапии генно-инженерными биологическими препаратами.

Достоверность результатов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы получены на стандартизированном откалиброванном и сертифицированном оборудовании с использованием современных лабораторных методов. Все представленные в работе результаты основаны на тщательном анализе полученных данных, собранных в ходе исследования. Проведено сравнение авторских данных с данными отечественных и зарубежных исследований, полученных ранее по рассматриваемой тематике. Установлено качественное и количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике. Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается использованием адекватных статистических методов исследования, достаточным объемом проведенных исследований, которые позволили сделать обоснованные выводы.

Научная новизна работы

В рамках настоящей работы Купцовой Д.Г. были предложены новые иммунологические лабораторные показатели, позволяющие проводить оценку тяжести патологического процесса и прогнозировать эффект терапии генно-инженерными биологическими препаратами у детей с псориазом.

Автором впервые описана возрастная динамика основных и малых популяций лимфоцитов у детей с псориазом, а также CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти в периферической крови. Выявлена информативность показателей клеточного иммунитета (Th17, Thact, Treg, MDSCs) в качестве дополнительных лабораторных критериев, отражающих активность заболевания. Определены пороговые значения показателей клеточного иммунитета (Th17, Thact, Treg, Т-клеток памяти), позволяющие прогнозировать эффект ГИБП при вульгарном псориазе у детей.

Впервые проведена оценка содержания клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом и показано увеличение

содержания популяции MDSCs и их функциональной активности, особенно у детей с хорошим эффектом ГИБП.

Впервые в педиатрической практике при псориазе применен иммуноцитохимический метод определения активности митохондриальных дегидрогеназ в основных и малых популяциях лимфоцитов. Показана информативность определения метаболической активности клеток иммунной системы (СДГ в Treg, ГФДГ в NK-клетках) в оценке и прогнозе эффективности проводимого лечения ГИБП.

Впервые у детей с псориазом и условно здоровых детей проведена оценка ферментов пуринергической регуляции - CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидазы в малых популяциях CD4⁺-T-клеток (Th17, Thact, Treg). У детей с псориазом показано снижение супрессорной популяции Th17-лимфоцитов (CD39⁺Th17). Выявлена информативность содержания CD39⁺Treg в качестве дополнительного лабораторного маркера оценки тяжести псориаза у детей и эффективности проводимой биологической терапии блокаторами TNFa и IL-12/23.

Впервые проведена оценка широкого комплекса противо- и провоспалительных цитокинов и хемокинов в сыворотке крови у детей с псориазом. Выявлено существенное увеличение уровней провоспалительных цитокинов (IL-23, IL-22, IL-12p70, IL-27, IL-17E, IL-17F, TNFa), что подтверждает целесообразность назначения антицитокиновой терапии. До назначения терапии определены наиболее информативные цитокины и их пороговые значения, позволяющие прогнозировать эффективность биологической терапии псориаза у детей.

Впервые у детей с псориазом и здоровых детей методом проточной цитометрии с визуализацией проведен анализ транскрипционного фактора NF-кВ в популяциях лимфоцитов. У детей с псориазом установлено существенное повышение активности NF-кВ в Т-хелперах, Thact, Treg, Th17 и Tc17. Показана информативность оценки данного показателя и определены пороговые значения NF-кВ для прогноза эффективности ГИБП. Выявлена

обратная зависимость уровня транслокации NF-κB и активности митохондриальных дегидрогеназ (СДГ, ГФДГ) в популяциях лимфоцитов как у детей с псориазом, так и в группе сравнения.

На основании клинических и иммунологических показателей впервые установлены ранние лабораторные маркеры эффективности биологической терапии псориаза в детском возрасте. Определены пороговые значения иммунологических показателей, позволяющие прогнозировать эффект ГИБП при вульгарном псориазе у детей.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования состоит в детальном изучении основных звеньев иммунопатогенеза псориаза и доказана патогенетическая роль клеток-эффекторов иммунной системы и провоспалительных цитокинов в развитии и поддержании воспалительной реакции при псориазе у детей. Установлены и описаны возрастные зависимости показателей клеточного иммунитета у детей с псориазом и показано повышение относительного содержания Т-лимфоцитов, Th17-лимфоцитов, активированных Т-хелперов при снижении абсолютного количества Treg, а также увеличение относительного содержания центральных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти, эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти и снижение наивных CD4⁺-Т-клеток памяти с возрастом.

Прогресс заболевания и неэффективность проводимой биологической терапии характеризуются нарастанием нарушений субпопуляционного состава лимфоцитов: увеличивается содержание активированных Т-хелперов и соотношение содержания Th17/Treg.

В данной работе раскрыты особенности метаболизма популяций лимфоцитов и супрессорной активности клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом при разной эффективности биологической терапии и показано снижение активности митохондриальных

дегидрогеназ (СДГ, ГФДГ) в популяциях лимфоцитов при повышении экспрессии аргиназы-1 в MDSCs.

Диссидентом впервые показана роль ферментов пуринергической регуляции в поддержании хронического воспаления при псориазе у детей, и установлено, что содержание регуляторных Т-клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, отражает тяжесть воспалительного процесса и эффективность биологической терапии у детей с псориазом. Относительное содержание CD4⁺-Т-клеток, экспрессирующих CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидазы, определяется популяцией лимфоцитов: наибольшее количество клеток с экспрессией CD39 выявлено в популяции Tregs, а с экспрессией CD73 – в популяции активированных Т-хелперов как у детей с псориазом, так и в группе сравнения.

Диссидентом впервые описана активность фактора транскрипции NF-κB в основных и малых популяциях лимфоцитов методом проточной цитометрии с визуализацией. Показано, что уровень транслокации NF-κB определяется популяцией клеток и максимальный в В-лимфоцитах, как у детей с псориазом, так и в группе сравнения. Выявленное увеличение уровня транслокации NF-κB в Т-хелперах, Thact, Th17, Tc17 и Treg у детей с псориазом доказывает участие сигнального пути ядерного фактора транскрипции κB в регуляции воспалительной реакции при псориазе.

В данной работе при исследовании комплекса циркулирующих цитокинов у детей с псориазом впервые показан дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов за счет значительного увеличения IL-23, IL-22, IL-12p70, IL-27, IL-17E, IL-17F, TNF α , что обосновывает необходимость применения антицитокиновой терапии у детей с псориазом. Выявленные взаимосвязи между цитокинами семейства IL-17 (IL-17E и IL-17F) и IL-12 (IL-23 и IL-27), а также с цитокинами IL-31 и IL-33 подчеркивают роль цитокиновой сети в патогенезе псориаза.

Полученные результаты работы вносят вклад в понимание иммунологических процессов в патогенезе псориаза и обосновывают применение ГИБП для лечения данной патологии в детском возрасте.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическая значимость диссертации заключается в том, что полученные в работе иммунологические показатели: содержание Thact, соотношение Th17/Treg, содержание наивных и эффекторных Т-клеток памяти, уровень цитокинов (IFN γ , IL-12p70, IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNF α) в сыворотке крови, активность СДГ в Treg, уровень транслокации NF-кВ в NK-клетках, Th17-лимфоцитах и цитотоксических Т-лимфоцитах отражают тяжесть псориаза у детей и могут быть использованы в прогнозе эффективности ГИБП для своевременной коррекции биологической терапии.

В диссертации использован комплекс базовых иммунологических методов исследования, включающий метод проточной цитометрии для иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови, для оценки содержания клеток-супрессоров миелоидного происхождения и их функциональной активности, для определения количества субпопуляций CD4 $^+$ -Т-клеток с экспрессией CD39 $^+$ и CD73 $^+$ -эктонуклеотидаз, иммуноцитохимический метод для определения активности митохондриальных дегидрогеназ в популяциях лимфоцитов, мультиплексный метод для определения уровня пр- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в сыворотке крови, который позволил выявить значимые лабораторные показатели для оценки тяжести заболевания и прогноза эффективности биологической терапии.

Научно-практическая значимость работы заключается в том, что тяжесть заболевания по индексам PASI и BSA напрямую связана с увеличением содержания Th17, Thact, Treg, MDSCs и моноцитарной субпопуляции MDSCs.

В работе впервые определено содержание клеток-супрессоров миелоидного происхождения в периферической крови у здоровых детей и показано значимое увеличение содержания популяции MDSCs и уровня экспрессии аргиназы-1 у детей с псориазом, что подтверждает роль клеток-супрессоров в развитии аутоиммунной патологии.

При помощи иммуноцитохимического метода показано выраженное снижение активности СДГ в Treg и ГФДГ в общей популяции CD45⁺-лимфоцитов у детей с тяжелым течением заболевания (PASI>20).

Анализ ферментов пуринергической регуляции в популяциях CD4⁺-T-клеток показал, что в стадии регресса заболевания при снижении индекса PASI происходит нормализация относительного содержания регуляторных Т-клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу.

Практическая значимость диссертационной работы состоит в том, что снижение относительного содержания регуляторных Т-клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, и активности СДГ в Treg после индукционного курса являются факторами риска потери эффекта терапии генно-инженерными биологическими препаратами у детей с псориазом.

Отработан и изложен новый современный иммунологический подход к исследованию активности фактора транскрипции NF-κB методом проточной цитометрии с визуализацией, позволяющий количественно определить уровень транслокации NF-κB в основных и малых популяциях лимфоцитов. Показано, что уровень транслокации NF-κB в NK-клетках, Th17-лимфоцитах и цитотоксических Т-лимфоцитах к окончанию индукционного курса (16 недель терапии) позволяет прогнозировать эффект терапии ГИБП к году у детей с псориазом.

На основании установленной обратной корреляционной зависимости уровня транслокации NF-κB и активности сукцинатдегидрогиназы в популяциях NK-клеток и Т-лимфоцитов можно рекомендовать использование доступного иммуноцитохимического метода для оценки активности фактора транскрипции NF-κB.

Разработанные диссидентом информативные иммунологические критерии эффективности ГИБП у детей с псориазом (содержание Thact, соотношение Th17/Treg, содержание наивных и эффекторных Т-клеток памяти, уровень цитокинов (IFN γ , IL-12p70, IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNF α) в сыворотке крови, активность СДГ в Treg, уровень транслокации NF-кБ в NK-клетках, Th17-лимфоцитах и цитотоксических Т-лимфоцитах) могут рассматриваться в качестве новых лабораторных маркеров ранней диагностики тяжести псориаза и эффективности биологической терапии, представляющие научно-практическую значимость для клинической практики.

Внедрение результатов диссертационной работы в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в практику отделения дерматологии с группой лазерной хирургии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, а также в учебный процесс кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации и в учебный процесс кафедры педиатрии и детских инфекционных болезней Клинического института детского здоровья имени Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По материалам диссертации опубликовано 23 печатные работы, из которых 14 статей в научных журналах, включенных в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских

диссертаций (названия журналов: «Медицинская иммунология», «Российский иммунологический журнал», «Иммунопатология, аллергология, инфектология», «Вопросы современной педиатрии», «Вестник Российского государственного медицинского университета», «Вестник уральской медицинской академической науки», «Аллергология и иммунология в педиатрии», «Вестник ташкенской медицинской академии») и 9 публикаций в материалах конгрессов и конференций.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Герасимова Д.Г. Информативность определения клеток супрессоров миелоидного происхождения для оценки тяжести состояния детей с псориазом / Д.Г. Герасимова, О.В. Курбатова, И.В. Самохина, Т.В. Радыгина, Р.Ш. Закиров, С.В. Петричук // Лабораторная служба. – 2017. – Т.6. – №3. – С.56-57.
2. Герасимова Д.Г. Клетки-супрессоры миелоидного происхождения у детей с псориазом / Д.Г. Герасимова, Р.Ш. Закиров, Т.В. Радыгина, О.В. Курбатова, И.В. Самохина, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19. – №S. – С.155.
3. Gerasimova D. Myeloid-derived suppressor cells in children with severe psoriasis / D. Gerasimova, T. Radygina, N. Murashkin, A. Toptygina, S. Petrichuk // Abstract book: 5th European Congress of Immunology. Amsterdam – 2018. – P.361.
4. Герасимова Д.Г. Иммунометаболизм популяций Т-хелперов у детей с псориазом / Д.Г. Герасимова, Т.В. Радыгина, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Лабораторная служба. – 2018. – Т.7. – №3(2). – С.152.
5. Герасимова Д.Г. Популяции клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом / Д.Г. Герасимова, Т.В. Радыгина, Р.Ш. Закиров, Э.Т. Амбарчян, А.И. Материкин, Р.В. Епишев, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т.13. – № 2-

1(22). – С.200-202.

6. Купцова Д.Г. Особенности клеточного иммунитета при псориазе у детей / Д.Г. Купцова, Н.Н. Мурашкин, Т.В. Радыгина, С.В. Петричук // Лабораторная служба. – 2020. – Т.9. – №1. – С.39-40.

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

8. Мурашкин Н.Н., Псориаз и псориатический артрит в детском возрасте / Н.Н. Мурашкин, А.И. Материкин, Э.Т. Амбарчян, Р.В. Епишев, Л.А. Опрыгин, Р.А. Иванов, Д.С. Куколева, Д.Г. Купцова, М.Ю. Помазанова // Вопросы современной педиатрии. – 2020. – Т.19. – №6. – С.444-451.

9. Мурашкин Н.Н. Коморбидности псориаза в детском возрасте / Н.Н. Мурашкин, Л.С. Круглова, Ю.А. Коваленко, Э.Т. Амбарчян, Р.В. Епишев, А.И. Материкин, Л.А. Опрыгин, Р.А. Иванов, Д.С. Куколева, Д.Г. Купцова, М.Ю. Помазанова, Я.В. Козырь // Вопросы современной педиатрии. – 2020. – Т.19. – №6. – С.460-467.

10. Мурашкин Н.Н. Мультиморбидность в детской дерматологии: клинический пример / Н.Н. Мурашкин, А.И. Материкин, Э.Т. Амбарчян, Р.В. Епишев, Л.А. Опрыгин, Р.А. Иванов, Д.С. Куколева, Д.Г. Купцова, А.А. Пушкин, М.Ю. Помазанова, Я.В. Козырь // Вопросы современной педиатрии. – 2020. – Т.19. – №6. – С.483-489.

11. Мурашкин Н.Н. Эффективность и безопасность устекинумаба у детей с бляшечной, эритродермической и ладонноподошвенной формами псориаза: ретроспективное когортное исследование / Н.Н. Мурашкин, Э.Т. Амбарчян, Р.В. Епишев, А.И. Материкин А.И., Л.А. Опрыгин Л.А., Р.А. Иванов, Д.С. Куколева, М.Ю. Помазанова, Д.Г. Купцова, Я.В. Козырь, А.Л. Бакулов // Вопросы современной педиатрии. – 2020. – Т.19. – №6. – С.531-537.

12. Купцова Д.Г. Активность транскрипционного фактора NF-кБ в

лимфоцитах у детей с псориазом / Д.Г. Купцова, Т.В. Радыгина, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т.66. – № S4. – С.34-35.

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

14. Купцова Д.Г. Активность ядерного фактора транскрипции κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом / Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, Н.Н. Мурашкин, О.В. Курбатова, Т.В. Радыгина, А.А. Хотко, Р.А. Иванов // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2022. – №2. – С.30–38.

15. 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, Н.Н. Мурашкин, А.А. Хотко, Р.А. Иванов // Медицинская иммунология. – 2022. – Т.24. – №3. – С.587-596.

16. 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, Е.Л. Семикина, А.П. Фисенко // Российский иммунологический журнал. - 2022. - Т. 25. - №3. - С. 283-290.

17. 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, Т.В. Радыгина, О.В. Курбатова // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2022. – Т.19. – №3. – С.163-172.

18. 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, О.В. Курбатова, Е.Л. Семикина, Н.Н. Мурашкин, А.С. Потапов, А.П. Фисенко // Российский

иммунологический журнал. – 2022. – Т.25. – №4. – С.491-498.

19. Купцова Д.Г. Ранние предикторы эффективности биологической терапии псориаза / Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, Н.Н. Мурашкин, Т.В. Радыгина, О.В. Курбатова // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2023. - №1 (72). – С.49-52.

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

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

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

23. Купцова Д.Г. Содержание субпопуляций CD4+-T-клеток в прогнозе эффективности биологической терапии псориаза у детей / Д.Г. Купцова, Т.В. Радыгина, О.В. Курбатова, А.И. Материкин, Р.В. Епишев, Л.А. Опрятин, А.А. Хотко, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 25. – № 3 – С. 529-536.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на: XVI Всероссийском научном форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017), IX Всероссийской школе по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» (Пушкинские Горы, 2018), 5th European Congress of Immunology (Амстердам, 2018), научно-практическом семинаре «Визуализирующая проточная цитометрия в клинической практике и научных исследованиях» (Москва, 2019), XXVI Всероссийской научно-практической конференции «Клиническая лаборатория: от аналитики к диагнозу» (Москва, 2021), VIII Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2022), 17 Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2022), 8 научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология для практикующих аллергологов-иммунологов, инфекционистов, педиатров, терапевтов и гинекологов» (Сочи, 2022), V Всероссийском Съезде Ассоциации детских аллергологов и иммунологов России (Москва, 2022), XXVIII Всероссийской научно-практической конференции «Наукоемкие лабораторные технологии для клинической практики» (Москва, 2023), Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития инфектологии, медицинской паразитологии, эпидемиологии и микробиологии» (Ургенч, 2023), XVII Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2023).

Проблемная комиссия отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- разработана новая научная концепция о роли клеток-эффекторов, клеток-супрессоров и медиаторов воспаления в развитии и поддержании хронического воспаления у детей с псориазом, позволившая выявить новые

закономерности исследуемого явления;

- предложена оригинальная научная гипотеза о значимости комплекса иммунологических показателей, включающем содержание основных и малых популяций лимфоцитов, Т-клеток памяти, клеток-супрессоров миелоидного происхождения, активность митохондриальных дегидрогеназ и аргиназы-1, ферментов пуринергической регуляции для оценки тяжести заболевания псориазом и эффективности ГИБП у детей;
- доказана перспективность использования комплекса лабораторных иммунологических показателей – содержание Th17-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, активированных Т-хелперов, клеток-супрессоров миелоидного происхождения и их субпопуляций, популяций CD4⁺-Т-клеток памяти, содержание регуляторных Т-клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, активность сукцинатдегидрогеназы в регуляторных Т-клетках, уровень IFN γ , IL-12p70, IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNF α в сыворотке крови – в прогнозе эффективности биологической терапии псориаза у детей;
- введены новые иммунологические критерии для оценки тяжести заболевания псориазом у детей и прогноза эффективности применения генно-инженерных биологических препаратов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- доказана патогенетическая роль клеток-эффекторов иммунной системы и провоспалительных цитокинов в развитии и поддержании воспалительной реакции при псориазе у детей, что обосновывало применение таргетной антицитокиновой терапии в тактике лечения данного заболевания;
- применительно к проблематике диссертации эффективно и результативно, с получением принципиально новых результатов использован широкий комплекс иммунологических методов исследования, в том числе метод проточной цитометрии, метод проточной цитометрии с визуализацией, иммуноцитохимический метод и мультиплексный анализ;

- изложены новые современные иммунологические подходы к исследованию клеточного иммунитета, включающие количественный анализ уровня транслокации NF-кВ в популяциях лимфоцитов у детей с вульгарным псориазом, позволившие доказать участие сигнального пути ядерного фактора транскрипции кВ (NF-кВ) в регуляции воспалительной реакции при псориазе;
- раскрыты изменения характера метаболизма популяций лимфоцитов и супрессорной активности клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом при разной эффективности биологической терапии;
- изучена связь количественных характеристик иммунологических параметров в зависимости от длительности и эффективности генно-инженерных биологических препаратов при псориазе в детском возрасте;
- проведена модернизация существующих алгоритмов диагностики оценки тяжести заболевания псориазом у детей с добавлением информативных иммунологических показателей клеточного иммунитета (Th17, Treg, Thact, MDSCs, M-MDSCs) и медиаторов воспаления (IL-17A, TNF α , IL-2, IL-6, IL-9).

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- разработаны и внедрены новые иммунологические лабораторные критерии, позволяющие персонифицировано и своевременно проводить коррекцию биологической терапии псориаза в детском возрасте;
- определены перспективы практического использования иммунологических показателей (Thact, Th17/Treg, эффекторные Т-клетки памяти), ферментов пуринергической регуляции ($CD39^+$ Tregs), метаболизма лимфоцитов (СДГ в Treg), уровня транслокации NF-кВ в популяциях лимфоцитов (NK-клетки, Th17, $CD8^+$ -Т-клетки) и уровня цитокинов (IFN γ , IL-12p70, IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNF α) в прогнозе эффективности генно-

инженерных биологических препаратов у детей с вульгарным псориазом;

- созданы практические рекомендации по лабораторной диагностике тяжести псориаза у детей и эффективности ГИБП;
- представлена система предложений по дальнейшему совершенствованию обследования детей с вульгарным псориазом, которая будет способствовать прогнозу эффективности биологической терапии и позволит своевременно проводить коррекцию лечения, сокращая сроки реабилитации и сохраняя качество жизни пациентов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- результаты получены на сертифицированном оборудовании и выполнены на высоком научно-методическом уровне, с использованием статистических методов, адекватных поставленным задачам;
- теория исследования построена на известных, проверяемых данных и согласуется с общепринятыми представлениями об иммунопатогенезе псориаза и подходами к лечению данной патологии у детей, представленных в независимых источниках по теме диссертации;
- идея базируется на анализе практики и обобщении передового опыта по изучению эффективности генно-инженерных биологических препаратов у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями;
- использовано сравнение авторских данных и данных отечественных и зарубежных исследований, полученных ранее по рассматриваемой тематике;
- установлено качественное и количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике;
- использованы современные лабораторные методы и достаточный объем проведенных исследований, которые позволили сделать обоснованные выводы.

Личный вклад соискателя состоит в

его включенном участии на всех этапах выполнения диссертационного исследования, проведении анализа состояния вопроса по данным современной литературы по теме диссертации, непосредственном участии по сбору и анализу клинических и лабораторных данных, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке основных публикаций по теме выполненной работы.

Диссертация Купцовой Д.Г. «Иммунологические критерии эффективности терапии псориаза генно-инженерными биологическими препаратами в детском возрасте» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям «3.2.7. Аллергология и иммунология», «3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика» охватывает основные вопросы поставленной научной задачи и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием соответствующего методологически обоснованного плана научного исследования, основной идейной линией, концептуальностью и взаимосвязью выводов.

Диссертация изложена на 240 страницах машинописного текста, включает 40 таблиц, 85 рисунков и главы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов исследования», «Заключение», «Список литературы». Библиография включает 286 источников, в том числе 73 отечественных и 213 зарубежных.

Положительная оценка диссертации вытекает из ее актуальности, достоверности полученных данных, их научной новизны, теоретической и практической значимости, обоснованности выводов.

Исходя из вышеперечисленного, постановили:

Диссертационная работа Купцовой Д.Г. «Иммунологические критерии эффективности терапии псориаза генно-инженерными биологическими препаратами в детском возрасте» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям «3.2.7. Аллергология и иммунология», «3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных научных и практических задач, имеющих существенное значение для развития аллергологии и иммунологии и клинической лабораторной диагностики: раскрыты механизмы вовлеченности клеток иммунной системы в развитие и поддержание воспалительных процессов у детей с псориазом; выявлены нарушения в состоянии клеточного иммунитета, прогрессирующие с возрастом и тяжестью заболевания; изучена роль фактора транскрипции NF-кВ в активации Т-хелперов, активированных Т-хелперов, Th17-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток при псориатическом воспалении; установлены особенности метаболизма популяций лимфоцитов и выявлена информативность уровня циркулирующих цитокинов в оценке тяжести состояния и эффективности проводимой терапии; разработаны лабораторные критерии прогноза эффективности ГИБП у детей с псориазом на основании содержания Thact, соотношения Th17/Treg, содержания наивных и эффекторных Т-клеток памяти, уровня цитокинов (IFN γ , IL-12p70, IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNF α) в сыворотке крови.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, представленным к кандидатским диссертациям (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года с изменениями постановления Правительства Российской Федерации № 723 от 30.07.2014 г.; № 335 от 21.04.2016 г.; № 748 от 02.08.2016 г.; № 650 от 29.05.2017 г.; № 1024 от 28.08.2017 г.; № 1168 от 01.10.2018 г.; № 426 от

20.03.2021 г.; № 1539 от 11.09.2021 г.) и может быть представлена к защите в специализированном диссертационном совете.

Заключение принято на заседании проблемной комиссии НИИ педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, 26 апреля 2023 года в 12.00, по адресу: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр. 1. Присутствовало на заседании 10 членов комиссии. Результаты голосования: «за» - 10 человек, «против» - 0 человек, «воздержались» - 0 человек, протокол № 57 от 26 апреля 2023 года.

Председатель проблемной комиссии
НИИ педиатрии, Федерального государственного
автономного учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр
здоровья детей»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
д.м.н., профессор

Б.К. Таточенко

Подпись профессора Б.К. Таточенко заверяю:

Заместитель директора по научной работе
Федерального государственного
автономного учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр
здравья детей»

Министерства здравоохранения
Российской Федерации,

д.м.н.

06.06.2023



Е.В. Антонова