

На правах рукописи

Мирошкина Любовь Владимировна

**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ БЛОКАТОРАМИ ФАКТОРА
НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА У ДЕТЕЙ С
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук
профессор

Петричук Светлана Валентиновна

Научный консультант:

доктор медицинских наук
профессор

Потапов Александр Сергеевич

Официальные оппоненты:

Симбирцев Андрей Семенович - доктор медицинских наук, профессор, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА, директор

Назаров Петр Григорьевич - доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», руководитель отдела иммунологии

Ведущая организация:

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « » марта 2016 года в часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков д. 54 и на сайте www.arcerm.spb.ru.

Автореферат разослан « »

2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), объединенные понятием воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), в настоящее время являются одной из самых актуальных проблем детской гастроэнтерологии во всем мире [Abraham C. et al., 2009]. Хронический рецидивирующий характер течения, высокий риск оперативных вмешательств, наличие серьезных осложнений обуславливают потребность в совершенствовании подходов к диагностике и лечению ВЗК [Zhang Y. et al., 2014].

Выявление высоких концентрации провоспалительных цитокинов, главным образом фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), в биоптатах кишечника пациентов с ВЗК позволило разработать патогенетическую стратегию лечения данных заболеваний – биологическую терапию, включающую применение моноклональных антител, селективно блокирующих TNF- α [Симбирцев А.С., 2013; Vermeire S. 2009.].

Внедрение биологических препаратов в схему лечения ВЗК позволило значительно увеличить долю пациентов, достигающих стабильной ремиссии в короткие сроки. Однако у 30% пациентов не удается добиться снижения активности заболевания на фоне применения блокаторов TNF- α , более чем у 50% пациентов наблюдается потеря эффективности терапии в течение первого года лечения [Sanchez-Muñoz F. et al., 2008]. К числу причин, вызывающих развитие толерантности к блокаторам TNF- α , относят выработку собственных антител к препарату, а также вовлечение TNF- α -независимых путей патогенеза ВЗК.

Персонализированный подход к выбору биологического препарата и ранний прогноз недостаточной эффективности терапии позволяет провести своевременную коррекцию схемы лечения, тем самым существенно увеличить клиническую и экономическую эффективность лечения данных заболеваний.

Степень разработанности темы

В настоящее время выявлен ряд показателей, обладающих прогностической значимостью при оценке эффективности биологической терапии. К клиничко-anamnestическим предикторам относят продолжительность заболевания, форму патологии [Vermeire S. et al., 2002], наличие у пациента в анамнезе хирургического вмешательства [Orlando A. et al., 2005]. Прогностические возможности лабораторных тестов были показаны на примере определения сывороточного содержания антинейтрофильных антител [Taylor K. et al., 2001]. В настоящее время широко изучаются способы прогнозирования эффективности инфликсимаба, основанные на оценке фармакокинетических параметров, таких как остаточная сывороточная концентрация инфликсимаба [Maser E. et al., 2006].

Перечисленные прогностические параметры обладают рядом ограничений, так как не позволяют оценить прогноз биологической терапии

до ее начала, исключают возможность построения прогноза в динамике лечения и разрабатывались для взрослых пациентов с ВЗК.

Имеются данные о диагностической и прогностической значимости определения содержания ряда цитокинов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями [Назаров П.Г. и др. 2014]. В работах Ogawa K. et al., 2012 и Di Sabatino A. et al., 2010 в качестве предикторов эффективности биологической терапии инфликсимабом у взрослых пациентов с ВЗК предложены сывороточные концентрации IL-23, IL-17A, IFN- γ , IL-6 и TGF- β .

В настоящее время активно изучается диагностическая и прогностическая значимость определения маркеров аутоиммунного воспаления у пациентов с ВЗК. Выявлена информативность определения антител к *Saccharomyces cerevisiae*, к экзокринной части поджелудочной железы, антител к гликопротеину 2 (anti-GP2) в оценке воспалительной активности ВЗК [Bogdanos D. et al., 2012, Roggenbuck D. et al., 2012].

Исследование содержания и функциональной активности популяций лимфоцитов, играющих важную роль в развитии ВЗК, прежде всего Th17-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) и активированных Т-хелперов, выявило диагностическую значимость данных показателей при оценке воспалительной активности заболевания [Saruta M. et al., 2007, Di Sabatino A. et al., 2010]. Интенсивно изучается роль популяций В-лимфоцитов и информативность их определения в диагностике ВЗК [El-Hodhod M. et al., 2013, Mishima Y. et al., 2009]. Единичные работы посвящены анализу прогностической значимости показателей клеточного иммунитета при ВЗК, показана информативность определения количества циркулирующих Treg лимфоцитов в прогнозе эффективности инфликсимаба у взрослых пациентов с ВЗК [Di Sabatino A. et al., 2010].

В настоящее время получены убедительные доказательства роли митохондриальной дисфункции в патогенезе ВЗК [Alzoghaibi M., 2013, Santhanam S. et al., 2012]. Выявление прямых и косвенных признаков оксидативного стресса в клетках слизистой оболочки кишки и лейкоцитарных инфильтратах непосредственно свидетельствует о нарушении нормальной работы митохондриального аппарата у пациентов с ВЗК [Sifroni K. et al., 2010, Roessner A. et al., 2008, Rezaie A. et al., 2007]. Ключевым ферментом, отражающим активность работы митохондрий, является сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Доказана диагностическая значимость определения СДГ при различных патологических состояниях [Измайлова Т.Д. и др., 2012, Rutter J. et al., 2010]. Выявлена информативность определения активности СДГ в периферических лимфоцитах при ВЗК и других патологиях ЖКТ у детей. [Семенова Г.Ф. и др., 2007, Климова С.В. и др., 2010].

Таким образом, определение цитокинового профиля, исследование состояния популяций лимфоцитов и их функциональной активности является перспективным в связи с потенциальной возможностью выявления новых

лабораторных маркеров прогноза эффективности биологической терапии у пациентов с ВЗК.

Цель исследования – разработать лабораторные критерии прогноза эффективности терапии блокаторами фактора некроза опухоли альфа у детей с ВЗК.

Задачи исследования

1. Выявить особенности цитокинового профиля у детей с ВЗК при различной эффективности биологической терапии.
2. Определить информативность показателей клеточного иммунитета и митохондриальной активности популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности терапии блокаторами фактора некроза опухоли альфа у детей с ВЗК.
3. Оценить динамику иммунологических показателей у детей с ВЗК в течение первого года биологической терапии.
4. Выявить лабораторные предикторы своевременного назначения биологической терапии у детей с ВЗК.
5. Разработать многопараметрический алгоритм прогнозирования эффективности биологической терапии у детей с ВЗК на основании лабораторных показателей.

Научная новизна

Впервые оценено значение содержания широкого спектра циркулирующих цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-8, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TGF- β) в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с ВЗК. Определены пороговые уровни концентраций TNF- α , IL-4, IFN- γ , IL-12p70, TGF- β , позволяющие с высокой точностью прогнозировать эффективность терапии инфликсимабом при ВЗК.

Показана информативность комплексной оценки состояния Т- и В-клеточного звена иммунитета у пациентов с ВЗК в прогнозе эффективности биологической терапии. Выявлена прогностическая значимость определения исходного содержания В-лимфоцитов, Th17-лимфоцитов, активированных Т-хелперов у детей с ВЗК при оценке эффективности биологической терапии.

Впервые исследована активность сукцинатдегидрогеназы в основных и малых популяциях лимфоцитов у детей с ВЗК и доказана информативность определения активности СДГ в популяции Treg лимфоцитов, Т-хелперах и В1-лимфоцитах в прогнозе эффективности инфликсимаба у детей с ВЗК.

Проведено длительное, более одного года, динамическое наблюдение расширенного цитокинового профиля, данных иммунофенотипа лимфоцитов, показателей митохондриальной активности популяций лимфоцитов периферической крови и содержания anti-GP2 антител у детей с ВЗК, имеющих различный терапевтический ответ на инфликсимаб.

На основании патогенетически значимых иммунологических показателей разработана комплексная модель прогнозирования эффективности блокаторов TNF- α у детей с ВЗК.

Теоретическая и практическая значимость

В работе показана значимость определения концентрации TNF- α у детей с ВЗК до начала лечения препаратами, селективно блокирующими TNF- α , позволяющая персонифицировать подбор тактики лечения.

Доказана информативность комплексной оценки состояния клеточного иммунитета у пациентов с ВЗК до начала биологической терапии с целью прогнозирования ее эффективности и проведения своевременной коррекции.

Выявлена значимость определения СДГ в популяциях Treg лимфоцитов, T-хелперах и V1-лимфоцитах периферической крови при оценке эффективности терапии инфликсимабом.

Исследованы закономерности изменения цитокинового профиля, количественных характеристик и митохондриальной активности популяций лимфоцитов периферической крови, содержания anti-GP2 антител на фоне биологической терапии, позволяющие оценить характер влияния блокаторов TNF- α на лабораторные иммунологические показатели у детей с разным эффектом терапии.

В работе продемонстрированы объективные доказательства необходимости раннего назначения биологической терапии у детей с ВЗК с целью повышения её эффективности.

Разработан многопараметрический алгоритм прогнозирования эффективности биологической терапии у детей с ВЗК, позволяющий персонифицировано подходить к выбору тактики лечения и, тем самым, существенно улучшить качество жизни пациента.

Положения, выносимые на защиту

1. Выявлено, что определение концентрации TNF- α в плазме до начала биологической терапии у детей с ВЗК позволяет прогнозировать эффективность лечения в течение первого года.

2. Показано, что оценка количественных показателей основных и малых популяций лимфоцитов и их митохондриальной активности является информативной в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с ВЗК.

3. Установлено, что с увеличением длительности заболевания наблюдается снижение концентрации про- и противовоспалительных цитокинов, снижение митохондриальной активности основных популяций лимфоцитов, снижение содержания NK-клеток, нарастание титра antiGP2 антител.

4. Разработан комплексный прогностический коэффициент, позволяющий с высокой вероятностью (94%) прогнозировать эффективность биологической терапии блокатором TNF- α (инфликсимабом) у детей с ВЗК.

Личный вклад соискателя

Автором выполнен сбор и обработка клинических данных, проведены оценка концентрации циркулирующих цитокинов количественным мультиплексным методом с использованием проточной цитометрии, иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, определение активности СДГ в популяциях лимфоцитов иммуноцитохимическим методом, исследование содержания anti-GP2 антител, осуществлена статистическая обработка и анализ полученных данных.

Внедрение в практику

Разработанные алгоритмы прогноза эффективности терапии блокатором TNF- α (инфликсимабом) у детей с ВЗК с 2012 г. успешно внедрены в практику гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой НИИ Педиатрии им. Г.Н. Сперанского и отделения восстановительного лечения детей с болезнями органов пищеварения НИИ профилактической педиатрии и восстановительного лечения ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава РФ г. Москвы.

Основные положения диссертации были доложены на научно-практических конференциях: 4th European Congress of paediatricians – Europaediatrics-2009 (Москва, 2009), XVI Российская Гастроэнтерологическая Неделя (Москва, 2010), XVII Всероссийская научно-практическая конференция «Интеграция в лабораторной медицине» (Москва, 2012), III Российская конференция с международным участием «Проблемы нарушения клеточной энергетики - Митохондриальная патология» (Москва, 2012), XVIII Российская Гастроэнтерологическая Неделя (Москва, 2012), 8th Congress of ECCO Inflammatory Bowel Diseases (Vienna, Austria, 2013), Объединенный иммунологический форум (Нижний Новгород, 2013), Congress of pediatrics - ICP 2013 (Melbourne, Australia, 2013), XVII форум «Национальные дни лабораторной медицины (Москва, 2013), 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, 2013), 9th Congress of ECCO Inflammatory Bowel Diseases (Copenhagen, Denmark 2014).

Публикации по теме диссертации: по материалам исследования опубликовано 28 печатных работ, в том числе 6 статей в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 182 страницах машинописного текста и состоит из следующих глав: «Введение», «Обзор литературы», «Объем и методы исследования», «Результаты исследования», «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации». Список литературы содержит 181 источник (42 отечественных и 139 зарубежных). Работа иллюстрирована 55 рисунками и 47 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось в период с 2008 по 2013 год в лабораторном отделе и гастроэнтерологическом отделении с гепатологической группой ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава. Для решения поставленных задач было обследовано 100 детей с ВЗК в возрасте от 10 до 17,9 лет (55 мальчиков и 45 девочек). БК была диагностирована у 67 детей, у 33 детей – ЯК. Диагнозы устанавливались на основании анамнестических, клинико-лабораторных, эндоскопических и гистологических данных. Длительность заболевания на момент обследования варьировала от 1 месяца до 13 лет. Все пациенты комплексно обследовались в динамике заболевания на фоне проводимого лечения от 1 до 27 раз, забор крови проводился перед инфузией инфликсимаба.

Длительность наблюдений составила от 1 месяца до 5 лет. Контрольную группу составили 45 практически здоровых детей (25 мальчиков и 20 девочек) в возрасте от 12 до 16 лет.

В зависимости от терапевтического ответа на инфликсимаб все пациенты, вошедшие в исследование, были поделены на две группы – группа детей со стойким положительным эффектом препарата и пациенты с нестабильным эффектом терапии.

Критериями включения пациента в группу со стойким положительным эффектом инфликсимаба (Группа 1, N=25) были выбраны следующие показатели: клинико-эндоскопическая ремиссия заболевания либо минимальная степень воспалительной активности ($PCDIA \leq 10$, $PUCAI \leq 30$, $SES-CD \leq 6$, $EAC \leq 4$) в течение года применения биологической терапии по стандартной схеме введения (5 мг/кг 0-2-6 недель, далее каждые 8 недель).

В группу с недостаточным эффектом инфликсимаба (Группа 2, N=45) были отнесены пациенты с клинико-лабораторными и эндоскопическими признаками активного воспаления ($PCDIA > 10$, $PUCAI > 30$, $SES-CD > 6$, $EAC > 4$) через год биологической терапии по стандартной схеме введения; пациенты, достигшие ремиссии при увеличении стандартной дозировки препарата и/или сокращениями интервалов между инфузиями менее 8 недель, а также дети, развившие острую аллергическую реакцию на введение препарата.

Сравнение данных гемограммы, биохимического анализа крови, а также выбранных иммунологических показателей не выявило значимых различий между пациентами с БК и детьми с ЯК.

В связи с этим, при дальнейшем формировании групп пациентов с БК и ЯК объединяли в зависимости от тяжести течения заболевания и эффективности проводимой терапии.

Клиническая и эндоскопическая активность заболевания, а также данные стандартных лабораторных показателей воспаления на момент начала биологической терапии статистически не различались у пациентов Группы 1 и Группа 2.

В связи с особенностями иммунопатогенеза ВЗК у всех пациентов определяли цитокиновый профиль, проводили иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, иммуноцитохимическое исследование основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови, а также оценивали сывороточную концентрацию anti-GP2 антител (Табл. 1).

Таблица 1.

Данные по количеству проведенных лабораторных исследований

Вид исследования	Количество образцов			
	Болезнь Крона	Язвенный колит	Контрольная группа	Всего
Оценка цитокинового профиля	349	131	20	500
Иммуноцитохимическое исследование лимфоцитов периферической крови	410	128	45	583
Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови	427	138	45	610
Оценка содержания anti-GP2 антител	113	47	20	180

Оценка цитокинового профиля проводилась мультиплексным количественным методом с использованием проточной цитофлуориметрии и включала определение плазменной концентрации следующих цитокинов: IL-1 β , IL-2, IL-8, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-22, IL-23, TGF- β . В работе использовались наборы реагентов HumanTh1/Th2 11plex FlowCytomix и Human FlowCytomixSimplex, протокол исследования соответствовал инструкции производителя (BenderMed Systems GmbH, Германия). Для анализа использовался лазерный проточный цитометр CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, США).

Митохондриальную активность лимфоцитов периферической крови определяли иммуноцитохимическим методом с использованием проточной цитофлуориметрии (пат. №2302635 Петричук С.В. и др., 2007).

Иммуноцитохимический метод основан на измерении активности СДГ в лимфоцитах с помощью инкубации пермеабиллизированных клеток лимфоконцентрата, меченых моноклональными антителами, в среде, состоящей из специфичного для данного фермента субстрата – янтарнокислого натрия, фосфатного буфера, п-нитротетразолия фиолетового и трилона-Б. В процессе ферментативной реакции п-нитротетразолий фиолетовый восстанавливается с образованием нерастворимых в воде круглых гранул формазана (Рис 1А.).

Анализ результата цитохимической реакции проводится с помощью проточного цитометра; показатель митохондриальной активности в выделенных популяциях лимфоцитов определяют по приросту коэффициента

бокового светорассеяния в процентах после проведения цитохимической реакции (Рис 1В).

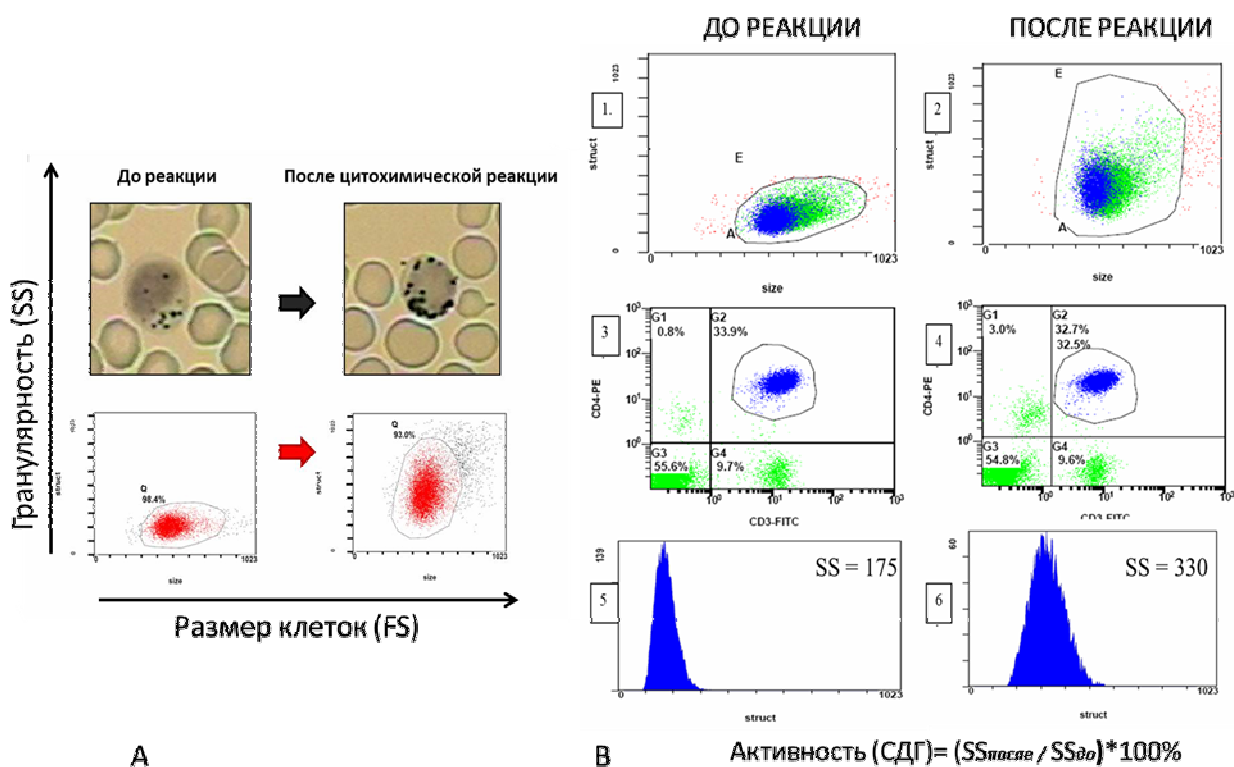


Рис.1. А. Увеличение гранулярности лимфоцитов в результате образования гранул формазана, детектируемое методом световой микроскопии и проточной цитометрии.

В. Выполнение иммуноцитохимического исследования на проточном цитометре. Выделение лимфоцитарного региона до (1) и после (2) проведения цитохимической реакции, выделение популяции по параметрам флуоресценции до (3) и после (4) реакции, распределение клеток по коэффициенту бокового светорассеяния (SS) до (5) и после (6) цитохимической реакции.

Активность оценивали отношением $A = (SS_{\text{после}} / SS_{\text{до}}) * 100\%$.

Определение активности СДГ проводилось с использованием готовых наборов фирмы «МНПК Химтехмаш» (Россия) на проточном цитометре CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, США).

Диагностическая панель основных и малых популяций лимфоцитов, используемая при проведении иммуноцитохимического исследования представлена в таблице 2.

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводилось методом многоцветной проточной цитофлуориметрии на приборе CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, США).

Подготовка клеток периферической крови для многоцветного анализа проводилась в соответствии со стандартизованной технологией (Хайдуков С. В. И др., 2007).

Пробоподготовка включала в себя инкубирование цельной крови (антикоагулянт – этилендиаминтетрауксусная кислота) с моноклональными

антителами, с последующим лизисом эритроцитов и фиксацией клеток на автоматической станции пробоподготовки TQ-PREP™ (Beckman Coulter, США) с использованием набора реагентов ImmunoPrep Reagent System (Beckman Coulter, США).

Выделение минорных популяций лимфоцитов осуществлялось с использованием стратегии последовательного гейтирования.

Количественный анализ основных и малых популяций лимфоцитов проводился согласно существующим рекомендациям (Хайдуков С.В. и др., 2009).

При выполнении иммунофенотипирования использовались следующие меченные флуорохромами моноклональные антитела производства Beckman Coulter (США) и Becton Dickinson (США): CD4-FITC, CD3-FITC, HLA-DR-FITC, CD8-PE, CD19-PE, CD(16+56)-PE, CD294-PE, CD127-PE, CD161-PE, CD3-PerCP, CD45-PerCP, CD45-PC5, CD45-PC7, CD5-PC7 CD25 PE-Cy7 (Табл.2).

Таблица 2. Диагностическая панель основных и малых популяций лимфоцитов и используемая панель моноклональных антител при иммунофенотипировании и проведении иммуноцитохимического исследования

Популяция лимфоцитов	Фенотип клетки	Исследуемые популяции	FITC	PE	PerCP / PC5	PC7
Общая популяция лимфоцитов	CD45+CD14-	Т-лимфоциты, Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты	CD4	CD8	CD3	CD45
Основные популяции лимфоцитов						
Т-лимфоциты	CD3+CD45+	Т-лимфоциты				
В-лимфоциты	CD3-CD19+ CD45+	В-лимфоциты, В1-, В2- клетки	CD3	CD19	CD45	CD5
Т-хелперы	CD3+CD4+CD45+					
Цитотоксические Т-лимфоциты	CD3+CD8+CD45+	НК-клетки, NKT-лимфоциты	CD3	CD(16+56)	CD45	-
НК-клетки	CD3-CD16+CD56+					
Активированные Т-лимфоциты	CD3+HLA-DR+	Активированные Т-лимфоциты	HLA-DR	CD19	CD3	CD45
NKT-лимфоциты	CD3+CD16+CD56+					
Популяции Т-лимфоцитов						
Th2-лимфоциты	CD3+CD4+CD294+	Th2-лимфоциты	CD4	CD294	CD3	CD45
Регуляторные Т-лимфоциты	CD4+CD25+CD127low	Активированные Т-хелперы	CD4	CD127	CD45	CD25
Активированные Т-хелперы	CD4+CD25+CD127high	Treg лимфоциты				
Th17-лимфоциты	CD3+CD4+CD161+	Th17-лимфоциты	CD4	CD161	CD3	CD45
Популяции В-лимфоцитов						
В1-лимфоциты	CD3-CD19+CD5+					
В2-лимфоциты	CD3-CD19+CD5-					

Определение концентрации антител к гликопротеину 2 – anti-GP2 IgA и anti-GP2 IgG – проводилось у 83 детей с ВЗК методом твердофазного иммуноферментного анализа, с использованием диагностических наборов фирмы Medipan Generic Assay GmbH (Dahlewits/Berlin, Германия).

Протокол исследования соответствовал инструкции производителя (MEDIPAN GmbH, Dahlewits/Berlin, Германия). Промывка лунок микропланшета выполнялась с использованием микропланшетного промывателя TECAN HydroFlex™ (Швейцария/Австрия). Обработка результатов иммуноферментного анализа производилась с помощью микропланшетного фотометра TECAN Sunrise™ (Швейцария/Австрия).

Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Magellan™ V 6.5 (TECAN, Швейцария / Австрия).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы «Statistica 6.0». При сопоставлении групп по количественному признаку применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Анализ диагностической и прогностической значимости исследуемых параметров, а также оценку уровня пороговых значений показателей осуществляли методом характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-кривые). ROC-анализ проводили с использованием программы SPSS 16.0

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка цитокинового профиля в зависимости от эффективности терапии блокаторами TNF- α выявила исходно более высокое содержание про- и противовоспалительных цитокинов у пациентов со стойким положительным эффектом инфликсимаба по сравнению с пациентами, имеющими нестабильный эффект от препарата и контрольной группой (Табл. 3). Наиболее выраженное отличие концентраций между пациентами двух групп наблюдалось для TNF- α , IL-4, IFN- γ , TGF- β , IL-12p70, IL-10, IL-1 β , IL-8, IL-2, IL-6, IL-5 ($p < 0,01$) (Рис. 2).

В течение года терапии у детей со стойким эффектом инфликсимаба наблюдалось снижение концентрации TNF- α , IL-2, IL-10, IL-6, IL-5 при этом к концу года лечения содержание IL-8 и IL-12p70 у пациентов данной группы превышало показатели пациентов с нестабильным эффектом терапии ($p < 0,05$).

Примечательно, что содержание исследуемых цитокинов у детей с ВЗК существенно превышало показатели контрольной группы. Исключение составил цитокин TGF- β , концентрация которого была снижена у всех детей с ВЗК, достигая минимальных значений в группе пациентов с нестабильным эффектом терапии.

Таблица 3. Концентрации цитокинов у пациентов со стойким (Группы 1) и нестойким (Группы 2) эффектом инфликсимаба до начала терапии (* $p < 0,01$)

Цитокин	Концентрация цитокина до начала терапии, пг/мл (Ме, LQ-HQ)	
	Группа 1	Группа 2
IL-12p70	1,6 (1,5-97,9) *	1,1 (1,0-1,5) *
IFN-γ	19,3 (1,4-184,3)*	1,6 (1,4-1,6) *
IL-2	110,3 (15,0-396,8)*	15,0 (10,0-196,34)*
IL-10	13,5 (1,9-123,5) *	1,9 (1,5-10,9)*
IL-8	156,0 (0,5-386,5) *	0,5 (0,5-123,9) *
IL-6	4,3 (0,8-56,9) *	1,2 (1,0-1,2) *
IL-4	58,7 (15,0-1197,5)*	15,0 (13,0-20,0)*
IL-5	59,8 (1,6-277,6)*	1,4 (1,0-71,6)*
IL-1β	2,2 (1,9-72,5) *	2,0 (1,9-2,2) *
TNF-α	14,4 (0,0-82,3) *	0,7 (0,5-1,1) *
TNF-β	2,0 (1,7-2,4)	2,4 (2,0-2,4)
IL-23	36,0 (20,0-375,2)	21,0 (10,0-205,8)
IL-17A	90,8 (2,1-402,4)	42,9 (1,0-387,8)
IL-22	36,0 (12,0-37,0)	35,0 (10,0-35,0)
IL-13	4,5 (3,0-4,5)	4,2 (3,0-4,5)
TGF-β	24267,7 (8305,3-35335,0)*	12174,7 (7685,1- 18250)*

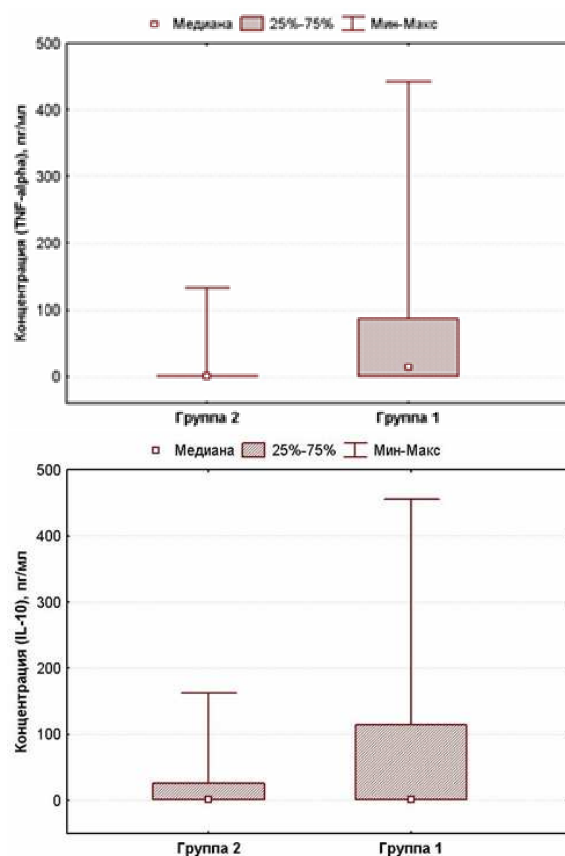
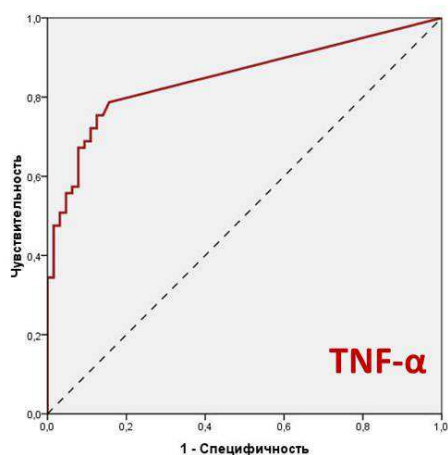


Рис. 2. Концентрации TNF- α и IL-10 у пациентов обеих групп до начала терапии.

ROC-анализ полученных данных продемонстрировал, что наибольшую прогностическую ценность имело определение содержания TNF- α до начала терапии. Снижение плазменной концентрации TNF- α менее 8,7 пг/мл с вероятностью 98% соответствовало прогнозу минимального терапевтического ответа на инфликсимаб в течение года лечения (Рис. 3).



Цитокин	Уровень cut-off, пг/мл	Чувствительность (ДЧ)	Специфичность (ДС)
TNF-α	8,7	67%	98%
IL-4	107,4	67%	88%
IFN-γ	17,5	67%	95%
IL-12p70	8,7	61%	98%
TGF-β	24100	60%	88%

Рис. 3. ROC-кривая для исходной концентрации TNF- α (AUC 0,840 (0,747-0,933), $p < 0,05$) и пороговые концентрации информативных показателей цитокинового профиля до начала лечения инфликсимабом при прогнозировании эффективности препарата

Оценка состояния Т- и В-клеточного звена иммунитета выявила снижение абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов у всех

детей с ВЗК до начала терапии блокаторами TNF- α . Наиболее выраженное снижение наблюдалось у пациентов с нестабильным эффектом биологической терапии (Рис.4).

Митохондриальная активность В-лимфоцитов была существенно выше у пациентов со стойким положительным ответом на терапию, по сравнению с детьми, имеющими нестабильный эффект препарата и контрольной группой.

Все дети с ВЗК до начала терапии имели сниженное количество НК-клеток при сохранении нормальной митохондриальной активности данной популяции.

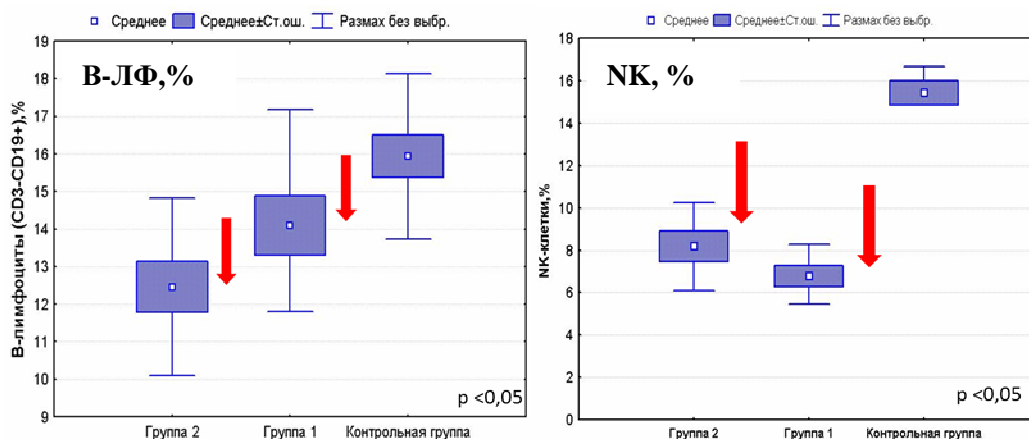


Рис.4. Содержание В-лимфоцитов и НК-клеток у пациентов со стойким (Группа 1) и нестабильным (Группа 2) эффектом инфликсимаба и детей контрольной группы.

Анализ популяционного состава В-лимфоцитов выявил дисбаланс в соотношении В1- и В2-клеток с увеличением содержания В2-клеток у пациентов с ВЗК по сравнению с контрольной группой. Сравнение субпопуляций В-лимфоцитов в группах с разным эффектом терапии показало значимое увеличение доли В1-клеток в общей популяции CD3-CD19+ лимфоцитов у пациентов Группы 2 по сравнению с Группой 1.

Активность СДГ в популяции В1-лимфоцитов была значительно увеличена у пациентов обеих групп до начала терапии по сравнению с контрольной группой, при этом наиболее выраженное увеличение наблюдалось в группе пациентов со стойким эффектом инфликсимаба. Данная группа также характеризовалась увеличением активности СДГ в популяции В2-лимфоцитов по сравнению с Группой 2 и контрольной группой.

Анализ популяций Т-лимфоцитов выявил существенное увеличение содержания активированных Т-лимфоцитов, Th17-лимфоцитов, Treg лимфоцитов и активированных Т-хелперов у всех пациентов с ВЗК до начала терапии, наиболее выраженное у детей с нестойким ответом на инфликсимаб (Рис.5).

Митохондриальная активность Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов была снижена у пациентов с нестабильным эффектом инфликсимаба, при этом в группе детей со стойким ответом на препарат активность СДГ соответствовала нормальным значениям.

Активность СДГ в популяции Th17-лимфоцитов была снижена у всех детей с ВЗК, достигая минимальных значений у пациентов с нестабильным эффектом биологической терапии (Рис.5).

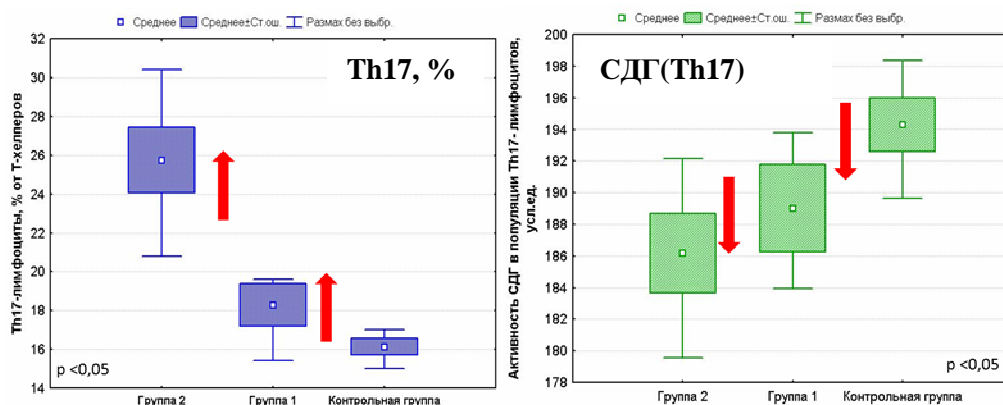


Рис.5 Содержание Th17-лимфоцитов и активность СДГ в них у пациентов со стойким (Группа 1) и нестойким (Группа 2) эффектом инфликсимаба и детей контрольной группы.

Группа пациентов со стойким ответом на инфликсимаб характеризовалась исходно более высокой активностью СДГ в популяции Treg по сравнению с пациентами, имеющими нестабильный эффект терапии (Рис.6).

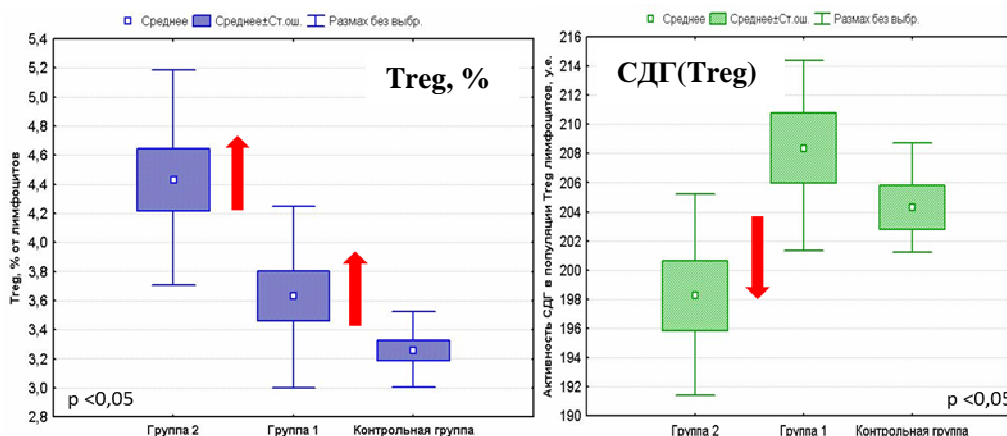
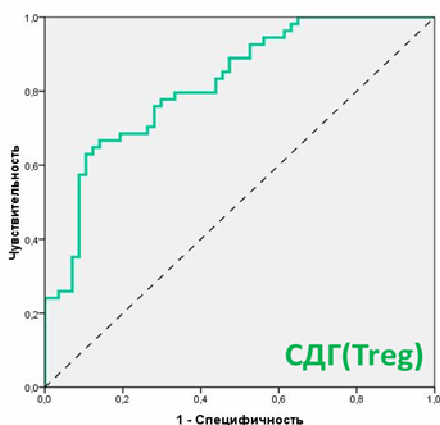
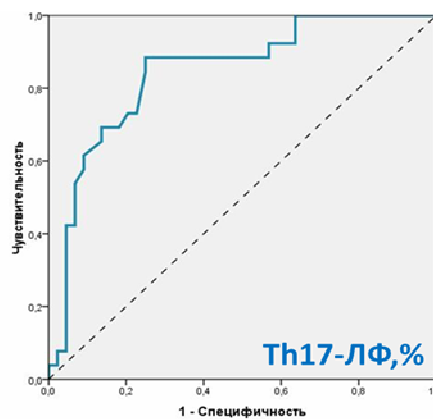


Рис.6 Содержание Treg лимфоцитов и активность СДГ в них у пациентов со стойким (Группа 1) и нестойким (Группа 2) эффектом инфликсимаба и детей контрольной группы.

ROC-анализ выявил наиболее информативные иммуноцитохимические критерии и показатели иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с ВЗК. Наиболее значимым явилось определение: относительного количества Th17-лимфоцитов до начала биологической терапии, исходной активности СДГ в популяции Treg лимфоцитов, в популяции Т-хелперов и В1-лимфоцитов (интервал AUC 0,8-0,9; $p < 0,05$) (Рис.7).



AUC=0,820(0,743-0,896), p<0,05



AUC=0,844 (0,748-0,940), p<0,05

Показатель	Уровень cut-off	Чувствительность	Специфичность
Количество Th17-лимфоцитов, % от CD3+CD4+ лимфоцитов	18,6	70%	87%
Активность СДГ в Treg лимфоцитах, у.е.	207	67%	88%
Активность СДГ в Т-хелперах, у.е.	197	70%	79%
Активность СДГ в В1-лимфоцитах, у.е.	177	65%	76%

Рис.7 ROC-кривые для активности СДГ и относительного количества Th17-лимфоцитов, а также пороговые концентрации данных показателей до начала лечения инфликсимабом в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с ВЗК.

Динамическое наблюдение иммунологических показателей у детей с ВЗК в течение первого года биологической терапии продемонстрировало снижение количества В-лимфоцитов и НК-клеток, причем у пациентов с нестабильным эффектом инфликсимаба данные изменения были выражены в большей степени.

Оценка популяционного состава В-лимфоцитов выявила существенный рост относительного количества В1-клеток, наиболее выраженный у пациентов с нестабильным эффектом терапии.

Сравнение содержания активированных Т-хелперов и Th17-лимфоцитов в группах пациентов с разным эффектом инфликсимаба выявило значительное увеличение содержания данных клеток у детей с нестойким эффектом препарата на всех этапах лечения.

Количество Treg лимфоцитов постепенно возрастало у пациентов со стойким ответом на инфликсимаб в течение первого года терапии, при этом у пациентов с нестойким эффектом лечения численность данной популяции существенно не изменялась (Рис.8).

Митохондриальная активность популяций лимфоцитов у пациентов со стойким положительным ответом на инфликсимаб была достоверно выше на протяжении первого года биологической терапии по сравнению с пациентами с нестабильным эффектом препарата.

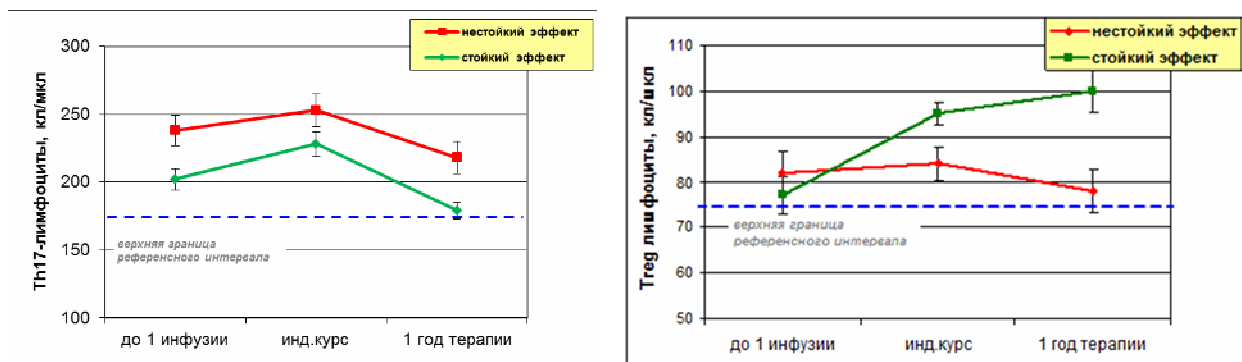


Рис.8 Динамика содержания Th17-лимфоцитов и Treg лимфоцитов у пациентов со стойким и нестойким эффектом инфликсимаба в течение года терапии

Анализ иммунологических показателей в зависимости от длительности заболевания выявил постепенное снижение концентрации циркулирующих цитокинов, снижение содержания NK-клеток, снижение митохондриальной активности в Т-хелперах и В-лимфоцитах с увеличением продолжительности болезни (Рис.9). В связи с наличием аналогичных изменений у пациентов с нестойким ответом на инфликсимаб, можно утверждать, что раннее назначение биологической терапии способствует улучшению прогноза эффективности лечения и повышению качества жизни пациента.

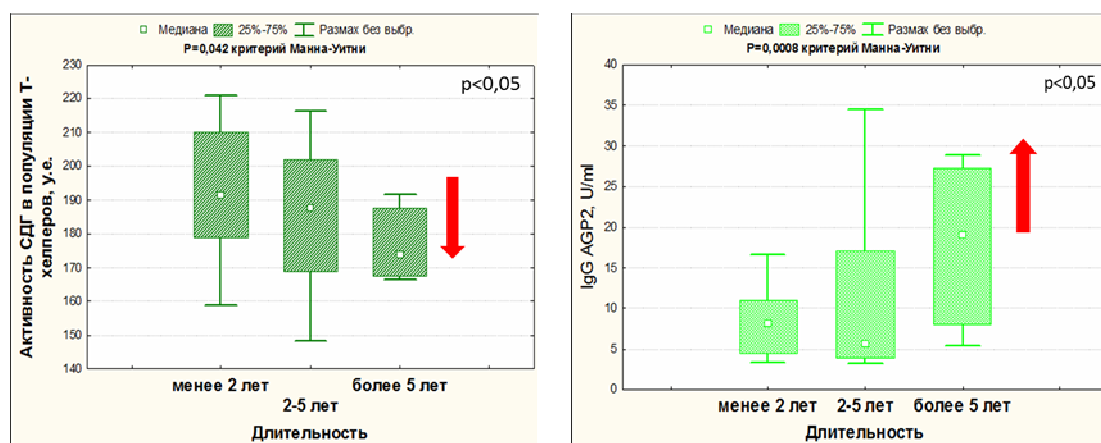


Рис.9 Активность СДГ в популяции Т-хелперов и уровень anti-GP2 IgG у пациентов при разной длительности заболевания.

Определение исходной концентрации anti-GP2 антител у пациентов с разным эффектом инфликсимаба выявило, что нестойкий эффект биологической терапии у пациентов с ВЗК ассоциирован с исходно высокими титрами anti-GP2 IgA, нарастающими в процессе лечения. С увеличением длительности заболевания наблюдалось повышение уровня anti-GP2 IgG и IgA, что также свидетельствует в пользу раннего назначения биологических препаратов в связи с большей вероятностью положительного ответа на терапию (Рис. 9).

Проведенное исследование иммунологических показателей у детей с ВЗК, получающих биологическую терапию блокаторами TNF- α , выявило ряд лабораторных маркеров, демонстрирующих высокую информативность при прогнозировании эффекта инфликсимаба. На основании цитохимических и

иммунологических показателей методом множественной пошаговой регрессии было получено математическое уравнение для расчета прогностического коэффициента эффективности инфликсимаба:

$$K = 0,282 + 0,0038 * \text{СДГ(Treg)} - 0,0229 * (\text{Th17}) + 0,0016 * (\text{TNF-}\alpha) \quad [1]$$

где СДГ(Treg) – активность сукцинатдегидрогеназы в регуляторных Т-лимфоцитах, Th17 – относительное количество Th17-лимфоцитов (% от CD3+CD4+ лимфоцитов), TNF- α – плазменная концентрация TNF- α . Множественный коэффициент корреляции R=0,91.

Для проверки информативности коэффициента K был проведен ROC-анализ, который продемонстрировал отличное качество прогностической модели: AUC=0,935(0,878-0,993); p<0,05. Диагностическая значимость определения прогностического коэффициента K существенно превышала значимость отдельных показателей, вошедших в регрессионное уравнение.

Оптимальное разделение пациентов на детей со стойким положительным эффектом и нестабильным ответом на инфликсимаб наблюдалось при значении прогностического коэффициента K=0,6 (89% чувствительности и 90% специфичность) (Рис.10).

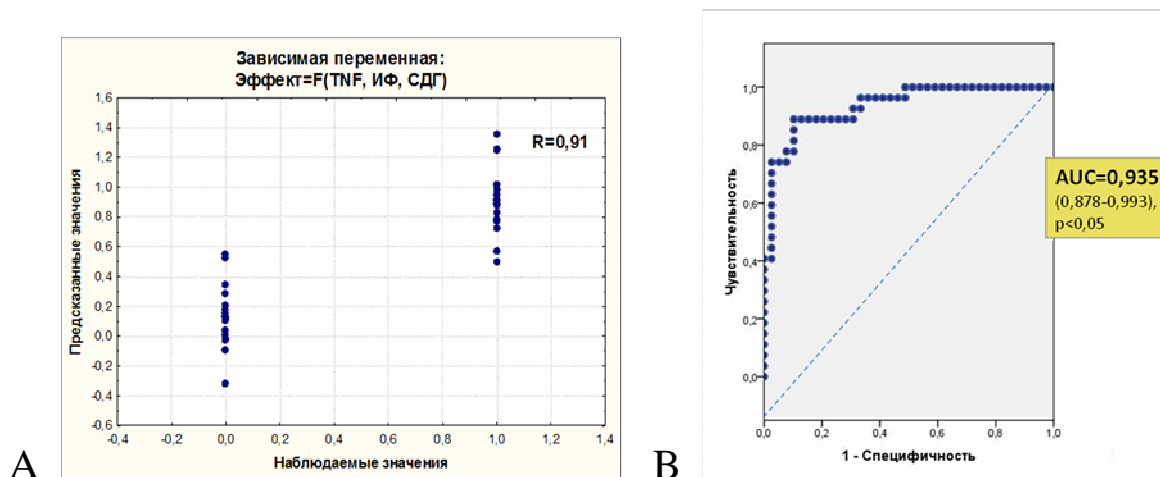


Рис.10 (А) Соответствие наблюдаемого эффекта терапии и эффекта, предсказанного по уравнению регрессии K [1], (В) ROC-кривая для коэффициента K при прогнозе эффективности биологической терапии у детей с ВЗК.

Таким образом, на основании полученных данных наиболее информативные иммунологические показатели были объединены в интегральный прогностический коэффициент, позволяющий с вероятностью 94% правильно прогнозировать эффект биологической терапии до ее начала. Использование данного способа позволяет прогнозировать долгосрочный, не менее 1 года, эффект терапии инфликсимабом у детей с ВЗК на любом этапе лечения, что является особенно актуальным в случаях недостаточной эффективности биологической терапии, требующей коррекции схемы введения инфликсимаба.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов со стойким положительным эффектом терапии блокаторами TNF- α выявлено более высокое исходное содержание TNF- α , IL-4, IFN- γ , TGF- β , IL-12p70, IL-10, IL-1 β , IL-8, IL-2, IL-6, IL-5 в плазме крови по сравнению с пациентами, имеющими нестойкий эффект терапии ($p < 0,01$). Исходная концентрация TNF- α менее 8,7 пг/мл позволяет прогнозировать минимальный терапевтический ответ на инфликсимаб в течение года лечения (ДЧ=67%, ДС= 98%, $p < 0,05$).

2. Наиболее информативными показателями Т- и В-клеточного звена иммунитета в прогнозе минимального терапевтического ответа на инфликсимаб явились: содержание Th17-лимфоцитов, превышающее 18,6% от CD3+CD4+ лимфоцитов (ДЧ=70%, ДС=87%, $p < 0,05$), активность СДГ Treg лимфоцитов менее 207 у.е. (ДЧ=67%, ДС=88%, $p < 0,05$), активность СДГ в популяции Т-хелперов менее чем 197 у.е. (ДЧ=70%, ДС=79%, $p < 0,05$), активность СДГ в популяции В1-лимфоцитов менее 177 у.е. (ДЧ=65%, ДС=75%, $p < 0,05$) до начала лечения.

3. В течение года биологической терапии у детей со стойким эффектом инфликсимаба наблюдалось снижение концентрации TNF- α , IL-2, IL-10, IL-6, IL-5, при этом к концу года лечения содержание IL-8 и IL-12p70 у пациентов данной группы превышало показатели пациентов с нестабильным эффектом терапии ($p < 0,05$).

4. На фоне применения инфликсимаба в течение года у всех пациентов наблюдалось снижение количества В-лимфоцитов и NK-клеток ($p < 0,01$), наиболее выраженное у детей с нестабильным эффектом препарата, при этом содержание активированных Т-хелперов и Th17-лимфоцитов в данной группе было значительно увеличено на всех этапах лечения ($p < 0,05$).

5. Активность СДГ в популяциях Т-хелперов, В-лимфоцитов, NK-клеток, Treg лимфоцитов, активированных Т-хелперов была достоверно выше у пациентов со стойким положительным ответом на инфликсимаб на протяжении первого года биологической терапии ($p < 0,05$).

6. С увеличением длительности заболевания у пациентов с ВЗК наблюдалось снижение концентраций провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, снижение активности СДГ в Т-хелперах и В-лимфоцитах, снижение содержания NK-клеток, нарастание титра anti-GP2 IgG и IgA, что соответствует прогнозу нестойкого эффекта биологической терапии.

7. Разработан интегральный коэффициент, включающий оценку относительного количества Th17-лимфоцитов (% от CD3+CD4+ лимфоцитов), активность СДГ в популяции Treg лимфоцитов, плазменную концентрацию TNF- α , позволяющий с вероятностью 94% (ДЧ=89%, ДС=90%, $p < 0,05$) прогнозировать эффективность биологической терапии у детей с ВЗК до ее начала.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Детям с ВЗК, имеющим гормонозависимую или гормонорезистентную форму патологии, необходимо определение содержания TNF- α при назначении терапии блокаторами TNF- α .

2. При назначении инфликсимаба всем детям с ВЗК следует определять содержание Th17-лимфоцитов, оценивать активность сукцинатдегидрогеназы в популяциях Т-хелперов, регуляторных Т-лимфоцитах и в В1-клетках, что позволит прогнозировать эффект биологической терапии и персонафицировано подходить к выбору тактики лечения.

3. Пациентам с ВЗК, получающим блокаторы TNF- α , необходимо определять цитокиновый профиль, проводить иммуноцитохимическое исследование и иммунофенотипирование популяций лимфоцитов при каждом эпизоде обострения заболевания с целью верификации степени активности воспалительного процесса.

4. Детям с ВЗК рекомендуется определять титр антител к гликопротеину 2 до начала терапии инфликсимабом и в динамике лечения для оценки эффективности препарата и своевременной коррекции терапевтической схемы.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее изучение проблемы, несомненно, является перспективным направлением в диагностике и терапии пациентов с ВЗК. В качестве них можно рассматривать:

- оценку информативности показателей у взрослых пациентов с ВЗК,
- определение прогностической значимости иммунологических и цитохимических параметров у пациентов, получающих другие биологические препараты,
- изучение иммунологических и цитохимических критериев у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, требующими лечение биологическими препаратами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых российских научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации

1. Измайлова Т.Д., Климова С.В., Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Цимбалова Е.Г., Семёнова Г.Ф., Петричук С.В., Потапов А.С. Активность митохондриальных дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови у детей с болезнью Крона// Российский педиатрический журнал. –2010. –№6. –С. 14-19
2. Климова С.В., Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Измайлова Т.Д., Цимбалова Е.Г., Потапов А.С., Петричук С.В. Активность дегидрогеназ лимфоцитов при биологической терапии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2010. – №3 (19). – С. 33-34
3. Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Петричук С.В., Самохина И.В., Цимбалова Е.Г., Потапов А.С. Оценка митохондриальной активности популяций В-лимфоцитов у детей с ВЗК// Российский иммунологический журнал РАН – Т. 7(16). – №2-3.- Апрель-Сентябрь 2013. – С. 233-234
4. Мирошкина Л.В., Петричук С.В., Цимбалова Е.Г., Потапов А.С., Венедиктова М.М., Топтыгина А.П., Курбатова О.В., Измайлова Т.Д., Семикина Е.Л., Варичкина М.А. Цитокиновый профиль у детей с воспалительными заболеваниями кишечника как предиктор эффективности терапии инфликсимабом //Вопросы диагностики в педиатрии. - 2013. – Т.5 (4).- С.33–38
5. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Бобылева Г.В., Мирошкина Л.В., Петричук С.В. Цитокиновый профиль у детей с воспалительными заболеваниями кишечника// Биохимия.- 2014. – Т. 79, № 12. - С. 1675-1681.
6. Мирошкина Л. В., Петричук С. В., Цимбалова Е. Г., Самохина И. В.,Потапов А. С., Венедиктова М. М., Курбатова О. В., Семенова Г. Ф.,Измайлова Т. Д., Капустина Е. Ю Функциональная активность ТН17-Лимфоцитов и регуляторных Т-клеток у детей с воспалительными заболеваниями кишечника.// Российский иммунологический журнал.- 2014. –Т.8 (17). - С.566-569.

Патенты на изобретения Российской Федерации

7. Мирошкина Л.В., Петричук С.В., Цимбалова Е.Г.Потапов А.С., Самохина И. В. Измайлова Т. Д., Курбатова О. В. Венедиктова М. М., Варичкина М.А. Способ прогнозирования эффекта терапии инфликсимабом у детей с болезнью Крона.// Патент РФ №2533435 от 11.07. 2014 с.15

Научные издания, статьи, тезисы докладов и статей

8. Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Петричук С.В., Измайлова Т.Д., Семёнова Г.Ф., Курбатова О.В. Влияние антицитокиновой терапии на активность митохондриальных дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови у детей с ВЗК// Материалы XIII Конгресса педиатров «Фармакотерапия и диетология в педиатрии». –2009. – С.85
9. Miroshkina (Kuznetsova) L., Kurbatova O., Klimova S., Tsimbalova E., Izmailova T., Petrichuk S. Functional mitochondria activity of children with Crohn's disease (CD) // Abstracts of the 4-th Europaediatrics 2009.– 2009.–P.349
10. Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Цимбалова Е.Г., Измайлова Т.Д., Климова С.В., Семенова Г.Ф., Петричук С.В. Активность митохондриальных дегидрогеназ лимфоцитов при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) у детей

//Сборник материалов XVI Российской гастроэнтерологической недели. – 2010. – С.108

11. Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Климова С.В., Семенова Г.Ф. Активность внутриклеточных ферментов при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) у детей // Сборник материалов IX Российского конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии». –2010. – С.466
12. Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Петричук С.В., Писарева И.В., Цимбалова Е.Г., Венедиктова М.М. Цитокиновый профиль и активность энергетических процессов популяций лимфоцитов при воспалительных заболеваниях кишечника у детей //Российский журнал Гастроэнтерологии, Гепатологии, Колопроктологии Приложение №40, Материалы 18 Российской Гастроэнтерологической Недели – 2012. – №5.– С.120
13. Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Венедиктова М.М.,Цимбалова Е.Г., Петричук С.В., Потапов А.С. Прогностическая значимость иммуноцитохимического анализа для оценки эффективности биологической терапии у детей с болезнью Крона// Материалы научно-практической конференции с международным участием «Фармакотерапия и диетология в педиатрии».– 2012. – С.33
14. Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Цимбалова Е.Г., Венедиктова М.М Писарева И.В., Потапов А.С., Петричук С.В. Прогностическая значимость иммуноцитохимического анализа для оценки эффективности биологической терапии. Материалы XI Российского Конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии». – 2012. – С.45-46
15. Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Цимбалова Е.Г., Писарева И.В., Измайлова Т.Д., Потапов А.С., Петричук С.В. Активность сукцинатдегидрогеназы малых популяций лимфоцитов, диагностическая значимость на примере аутоиммунных заболеваний у детей // Материалы XI Российского Конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии». – 2012. – С.262
16. Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Цимбалова Е.Г., Измайлова Т.Д., Петричук С.В., Потапов А.С. Оценка цитокинового профиля у детей с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) на фоне биологической терапии// Сборник материалов XVI Конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии». –2012. – С.400
17. Petrichuk S., Miroshkina (Kuznetsova) L., Semenova G., Izmailova T., Kurbatova O. Mitochondrial enzymes activity of peripheral lymphocytes in children with IBD// Journal of Crohn's and Colitis, – 2013. – Vol.7, Sup.1. - P. 86
18. Miroshkina (Kuznetsova) L., Petrichuk S., Potapov A., Tsimbalova E. Circulating cytokines profiles in children with inflammatory bowel disease under infliximab therapy// Journal of Crohn's and Colitis, – 2013. – Vol.7, Sup.1. – P.120-121
19. Miroshkina (Kuznetsova) L., Petrichuk S., Samohina I., Venediktova M., Potapov A., Tsimbalova E. Lymphocytes minor subsets mitochondrial enzymes activity in children with IBD under infliximab therapy// Journal of Crohn's and Colitis, – 2013. – Vol.7 Sup.1, - P. 89
20. Miroshkina (Kuznetsova) L., Petrichuk S., Tsimbalova E., Potapov A., Semenova G., Kurbatova O. Diagnostic value of the minor lymphocytes subsets succinate dehydrogenase activity in children with autoimmune disease// FEBS Journal – Vol.280, Issue Sup.1.– P. 281
21. Miroshkina (Kuznetsova) L., Petrichuk S., Izmailova T., Kurbatova O., Duckova Z., Tsimbalova E., Potapov A. Succinate dehydrogenase activity of circulating lymphocytes in children with inflammatory bowel disease// Abstracts of International Congress of pediatrics 2013 (ICP) 24-29 august 2013, Melbourne, Australia. – 2013. –

- P.1240.
22. Miroshkina (Kuznetsova) L., Petrichuk S., Samohina I., Semenova G., Tsimbalova E., Potapov A. Serum cytokines level in children with Crohn's disease under infliximab therapy// Abstracts of International Congress of pediatrics 2013 (ICP) 24-29 august 2013, Melbourne, Australia –2013. – P.1224
 23. Мирошкина (Кузнецова) Л.В., Измайлова Т.Д., Закиров Р.Ш., Курбатова О.В., Капустина Е.Ю., Петричук С.В. Проточная энзимология – новые технологии цитохимических исследований в педиатрии// Клиническая лабораторная диагностика. –2013. – №9.- С.53
 24. Miroshkina L., Petrichuk S., Samokhina I, Tsimbalova E., Potapov A., Izmaylova T., Venediktova M., Semenova G., Varichkina M., Mitochondrial activity of B-lymphocytes in children with IBD receiving infliximab // Journal of Crohn's and Colitis. – 2014. –Vol. 8, Sup.1. – P. 186
 25. Miroshkina L., Petrichuk S., Roggenbuck D., Tsimbalova E., Potapov A., Zubkova I., Topytgina A., Kurbatova O., Semikina E., Anushenko A., Kapustina E., Dukhova Z. Anti-GP2 antibodies in children with Crohn's disease receiving infliximab// Journal of Crohn's and Colitis. – 2014. –Vol. 8, Sup.1. — P.281
 26. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Бобылева Г.В., Мирошкина Л.В., Петричук С.В. Особенности местного синтеза цитокинов у детей с воспалительными заболеваниями кишечника //Цитокины и воспаление. -2014 – Т.13(1).- С.126-127
 27. Мирошкина Л.В., Петричук С.В., Цимбалова Е.Г., Потапов А.С., Топтыгина А.П., Курбатова О.В., Венедиктова М.М., Писарева И.В., Измайлова Т.Д., Анушенко А.О. Прогностическая значимость определения цитокинового профиля в оценке эффективности биологической терапии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника.// Цитокины и воспаление. -2014 – Т.13(1).- С.111
 28. Miroshkina L., Kurbatova O., Semenova G., Izmaylova T., Samokhina I., Zakirov R., Freidlin E., Petrichuk S. Succinate dehydrogenase activity of peripheral lymphocytes in children with inflammatory bowel disease.// Journal of World Mitochondria Society/2015.-Vol.1-P.138.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БК – болезнь Крона
ВЗК – воспалительные заболевания кишечника
ДС – диагностическая специфичность
ДЧ – диагностическая чувствительность
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
СДГ – сукцинатдегидрогеназа
ЯК – язвенный колит
anti-GP2 – антитела к гликопротеину 2
ЕАС – эндоскопический индекс активности язвенного колита
IL – интерлейкин
IFN – интерферон
NK – натуральные киллеры
PCDIA – международный педиатрический индекс активности болезни Крона
PUCAI – международный педиатрический индекс активности язвенного колита
SES-CD – эндоскопический индекс активности болезни Крона
TGF – трансформирующий фактор роста
Th17 лимфоциты – Т-хелперы 17
TNF – фактор некроза опухоли
Treg лимфоциты – регуляторные Т-лимфоциты