

«УТВЕРЖДАЮ»

директор ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой

д.м.н., профессор А.М. Лила



2020 г.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой" по первичной экспертизе диссертации «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита» на соискание степени доктора медицинских наук Авдеевой Анастасией Сергеевной

Диссертация "Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита" выполнена в лаборатории ранних артритов Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой"

В период подготовки диссертации соискатель Авдеева Анастасия Сергеевна работала в Федеральном государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой" в период с 2012г младшим научный сотрудник, с 2013г – научным сотрудником лаборатории иммунологии и молекулярной биологии ревматически заболеваний. С 2017г – научным сотрудником лаборатории стандартизации терапии ревматических заболеваний, затем лаборатории ранних артритов, с 2018г по настоящее время –старшим научным сотрудником лаборатории ранних артритов.

В 2007г. окончила с отличием Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тульский государственный университет» по специальности "лечебное дело".

В 2013г решением диссертационного совета при Научно-исследовательском институте ревматологии РАМН была присуждена ученая степень кандидата медицинских наук. Тема диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук «Сравнительная клинко-иммунологическая характеристика терапии моноклональными антителами к CD 20 антигену В- лимфоцитов и рецепторам интерлейкина-6 при ревматоидном артрите», специальность ревматология (14.01.22)

Научный консультант - д.м.н., профессор, академик РАН Насонов Евгений Львович, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой".

### **По итогам обсуждения принято следующее заключение:**

Диссертационная работа Авдеевой Анастасии Сергеевны «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита» выполнена по специальности- ревматология и входила в план научно-

исследовательской работы Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой" (ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой) в рамках научной темы №371: «Разработка концепции персонифицированной медицины на основе инновационных технологий диагностики, лечения и профилактики аутоиммунных ревматических заболеваний», Государственный регистрационный номер 01200900996, УДК 616.-002.77. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой (протокол №32 от 20.12.2018г).

Основные положения и выводы диссертации основаны на материалах первичной документации и полностью им соответствуют.

Работа посвящена изучению роли молекулярных и клеточных биомаркеров в оценке активности и тяжести ревматоидного артрита (РА), прогнозированию эффективности терапии базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) и генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП).

### **Степень разработанности темы исследования**

Изучение патогенеза РА и разработка новых терапевтических подходов, по-прежнему, является актуальной задачей современной ревматологии. Важная роль в развитии аутоиммунных заболеваний в целом, и РА в частности, уделяется нарушениям уровня и функциональной активности Т рег клеток. В литературе представлены противоречивые данные об уровне и функциональной активности данной клеточной субпопуляции у пациентов с РА, что требует дальнейшего изучения.

Еще одной актуальной проблемой является более объективная оценка активности РА, что лежит в основе современной концепции терапии заболевания (стратегия Treat To Target, лечение до достижения цели – ремиссии или низкой активности). В настоящее время в клинической практике используется большое количество индексов активности (DAS 28, SDAI, CDAI, RAPID 3), включающих в себя ряд субъективных показателей, которые могут существенно варьировать в зависимости от наличия сопутствующих заболеваний, а также других причин и значительно влиять на активность. Лабораторные показатели, включенные в индексы (СРБ и СОЭ) также являются неспецифическими. В связи с этим были предприняты попытки разработки новых мультипараметрических индексов активности, включающих в себя несколько маркеров, отражающих различные звенья патогенеза заболевания. Широко обсуждается значение индекса иммунологического активности РА - VECTRA DA, расчет которого основан на измерении концентрации 12 ключевых белков (VCAM-1, EGF, VEGF-A, ИЛ-6, ФНО-Р1, ММП-1, -3, YKL-40, лептин, резистин, SAA, СРБ) в сыворотке крови, ассоциирующихся с определенными компонентами индекса DAS28. В ряде работ была продемонстрирована высокая корреляционная взаимосвязь VECTRA DA с уровнем острофазовых показателей, индексами активности заболевания, выраженностью деструктивных изменений в суставах. Были предприняты попытки разработки российского индекса иммунологической активности, однако он не был валидирован. В настоящее время наиболее перспективным представляется комплексный подход к оценке активности, основанный на анализе клинических данных, ряд лабораторных маркеров, отражающих ведущие звенья

иммунопатогенеза заболевания и результатов инструментальных исследований (выраженность и активность воспаления в суставах по данным УЗ-исследования). Все вышеизложенное послужило основанием для проведения настоящей работы.

**Задачами данного исследования стали:** изучить исходный уровень субпопуляций Т лимфоцитов (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+/56+), содержание В лимфоцитов, факторов их активации (BAFF и APRIL), CD4+CD25+CD127-FOXP3+ регуляторных Т клеток и их функциональную активность у пациентов с ранней и развернутой стадией РА; оценить взаимосвязь субпопуляций Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток, В-лимфоцитов с клинико-лабораторными показателями активности заболевания, уровнем острофазовых показателей (СОЭ, СРБ) аутоантител (IgM/IgA РФ и АЦБ) у больных РА; уточнить их динамику на фоне различных схем терапии; в динамике оценить содержание белков острой фазы воспаления (СРБ и кальпротектина), аутоантител (IgM/IgA РФ, АЦЦП, АМЦВ); уточнить их взаимосвязь с активностью заболевания, выраженностью синовиального воспаления по данным УЗИ и эрозивно-деструктивными изменениями суставов у пациентов с РА; изучить уровень маркера деструкции костной и хрящевой ткани (ММП-3), проанализировать его взаимосвязь с уровнем острофазовых показателей, аутоантител, эффективностью терапии и развитием эрозивно-деструктивных изменений суставов с помощью рентгенологических и ультразвуковых методов; оценить динамику показателей цитокинового профиля и их роль при мониторинге активности заболевания и прогнозировании эффективности терапии; выявить комплекс наиболее информативных маркеров мониторинга активности заболевания и прогнозирования эффективности терапии

В исследование было включено 232 больных РА, из которых 90 имели раннюю стадию заболевания и 142 развернутую стадию болезни. Среди включенных в исследование больных преобладали женщины (соотношение женщин и мужчин в группе раннего РА составило 4,6:1; развернутого РА 6,5:1), среднего возраста (медиана возраста в группе раннего РА составила 53,0 год, развернутого РА 51 год). Медиана длительности заболевания в группе раннего РА составила 5,0 месяцев, развернутого РА – 56,0 месяцев. Проспективно было прослежено 90 пациентов из группы раннего и 122 – из группы развернутого РА. Все больные были разделены на ряд подгрупп: 54 пациента получили две инфузии ритуксимаба (РТМ), из которых 20 - биоаналог и 34-оригинальный препарата, 43 больных – 6 инфузий тоцилизумаба (ТЦЗ), 25 больных – адалимумаб (АДА) каждые две недели, остальные пациенты получали монотерапию метотрексатом (МТ), контрольную группу составили 30 здоровых доноров.

Результаты исследования свидетельствуют о более низкой процентной концентрации (ПК) FoxP3+CD25+ клеток (5,57%, 4,73% и 6,92%) и их функциональной активности (снижение относительного и абсолютного содержания FoxP3+ICOS+, FoxP3+CD154+, FoxP3+CD274+ клеток ( $p < 0,05$ )) у пациентов с ранним и развернутым РА по сравнению со здоровыми донорами, что ассоциировалось с высокой воспалительной активностью (уровнем СРБ ( $r = -0,65$ ) и СОЭ ( $r = -0,59$ ), индексами DAS28 ( $r = -0,64$ ), SDAI ( $r = -0,6$ ), CDAI ( $r = -0,6$ )), наличием системных проявлений, сопровождалось гиперпродукцией IgMPФ. У больных с развернутой стадией РА по сравнению с пациентами с ранней стадией болезни

регистрировалось повышение уровня CD4+ лимфоцитов (45% и 50,7%) и более низкая концентрация CD25+CD127- клеток (5,57% и 4,73%,  $p < 0,05$ ).

Терапия метотрексатом приводила к увеличению числа Трег с высоким уровнем маркеров активации (CD152+surface (0,65% и 2,07%), особенно среди пациентов, достигших ремиссии/низкой активности заболевания (FoxP3+CD274+ 1,25% и 0,44%,  $p < 0,05$ ) и оказывается более эффективной при высоком уровне CTLA-4 на поверхности FoxP3+Т лимфоцитов (1,3% и 0,24%,  $p < 0,05$ ). Применение РТМ сопровождалось развитием полной деплеции CD19+ лимфоцитов, повышением уровня CD3+ (76,1% и 82,9%) и CD3+CD4+ лимфоцитов (51,7% и 58,6%) и CD4+CD25+CD127- клеток (6,8% и 7,3%,  $p < 0,05$ ). Лучший эффект РТМ наблюдается в группе пациентов с высоким уровнем CD4+CD25+CD127- лимфоцитов (7,35% и 5,8%,  $p < 0,05$ ).

Концентрации IgM/IgA РФ и АМЦВ коррелировала с активностью заболевания (индексами DAS28 ( $r=0,4$ ), SDAI ( $r=0,4$ ), CDAI ( $r=0,4$ )) и уровнем острофазовых показателей (СРБ ( $r=0,4$ ) и СОЭ ( $r=0,5$ )). Высоко позитивный уровень АМЦВ в большей степени, чем АЦЦП был связан с развитием суставной деструкции (суммарное значение счета Sharp 96,5 и 57,0). Применение МТ при раннем РА сопровождалось снижением уровня IgM РФ; использование РТМ (оригинального препарата и биоаналога), ТЦЗ приводило к снижению уровня IgM/IgA РФ и АМЦВ ( $p < 0,05$ ), не оказывая существенного влияния на концентрацию АЦЦП. Клиническая эффективность анти-В клеточной терапии ассоциируется с исходно высоко позитивным уровнем IgM РФ (более 110 МЕ/мл) и АМЦВ (более 305,7 Ег/мл) в сыворотке крови; а ТЦЗ – с высоко позитивным уровнем АМЦВ (более 770 Ед/мл). Использование РТМ и ТЦЗ позволяло добиться иммунологической ремиссии у 7,4% и 7,1% больных соответственно.

У пациентов с РА повышенный уровень ММП-3 коррелировал с воспалительной активностью (DAS28 ( $r=0,6$ ), СРБ ( $r=0,67$ )), числом эрозий до начала терапии ( $r=0,47$ ). Использование МТ, РТМ и ТЦЗ приводило к снижению уровня ММП-3 ( $p < 0,05$ ). Применение МТ при раннем РА было более эффективно у пациентов с исходным уровнем ММП-3 менее 54,6 нг/мл, и при его снижении менее 25,1 нг/мл. Нормализация концентрации ММП-3 на фоне терапии ТЦЗ ассоциировалась с сохранением достигнутой ремиссии заболевания после отмены препарата.

Концентрация провоспалительных цитокинов (ИЛ-6), хемокинов (IP-10), факторов роста (VEGF) у пациентов с РА позитивно коррелировала с индексами активности (DAS 25, SDAI, CDAI); острофазовыми показателями (СРБ) и уровнем IgM РФ в сыворотке крови. Применение МТ, РТМ и ТЦЗ приводило к снижению уровня цитокинов, участвующих в патогенезе РА (ИЛ-6, ИЛ-17, ФНО- $\alpha$ , IP-10, IFN $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, VEGF,  $p < 0,05$ ); применение ингибиторов ФНО- $\alpha$  (АДА) приводило к снижению хемокинов (IP-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) и факторов роста (VEGF),  $p < 0,05$ .

Воспалительные изменения суставов по данным УЗИ (показатели серой шкалы и энергетического доплера) коррелировали с повышенным уровнем СРБ ( $r=0,6$ ), ИЛ-6 ( $r=0,4$ ) и ММП-3 ( $r=0,47$ ). Сохраняющаяся воспалительная активность по данным энергетического доплера ассоциировалась с исходным уровнем ММП-3 более 60,0 нг/мл (AUC 0,85) и базальным уровнем ИЛ-6 более 43,3 пг/мл (AUC 0,72).

### **Конкретное участие автора в получении научных результатов**

Автором был проведен анализ литературных данных, посвященных роли клеточных и молекулярных биомаркеров в патогенезе ревматоидного артрита, влиянию БПВП и ГИБП на течение и прогноз заболевания. Была сформулирована цель исследования, определены задачи, выбраны оптимальные методы (иммуноферментный и мультиплексный анализ, иммунонефелометрия, электрохемилюминисценция) для изучения роли молекулярных и клеточных биомаркеров в патогенезе заболевания, оценке активности и прогнозировании эффективности терапии ревматоидного артрита. Был разработан план исследования, который включал оценку широкого спектра иммунологических показателей у пациентов с ранним и развернутым ревматоидным артритом, получавших терапию как базисными противовоспалительными препаратами, так и различными классами генно-инженерных биологических препаратов и их биоаналогами. Автор осуществлял набор, клинический осмотр и динамическое наблюдение пациентов в соответствии с планом, проводил лабораторные исследования. Освоил методику определения субпопуляций Т рег лимфоцитов методом проточной цитофлюориметрии. Была разработана специальная электронная база для хранения и статистической обработки данных. Проведен статистический анализ с использованием пакета программ «Statistica 8,0» («StatSoft», США), включая методы параметрического и непараметрического анализа. Полученные данные были обобщены, проанализированы, сопоставлены с результатами других авторов, что нашло отражение в разделе обсуждения. Сформулированы выводы и практические рекомендации по оценке уровня аутоантител, маркеров деструкции костной ткани, показателям цитокинового профиля, которые были внедрены в практику. Все результаты исследования отражены в публикациях. Личный вклад автора составляет не менее 85%.

### **Научная новизна исследования**

Впервые дана оценка широкого спектра клеточных и молекулярных биомаркеров – острофазовых показателей, аутоантител (IgM/IgA РФ, АЦЦП, АМЦВ), маркеров деструкции костной ткани (ММП-3), показателей цитокинового профиля, и FoxP3+ регуляторных Т клеток для мониторинга активности и тяжести заболевания, прогнозирования эффективности терапии БПВП и ГИБП у пациентов с ранним и развернутым РА.

Снижение уровня и функциональной активности FoxP3+ регуляторных Т лимфоцитов у пациентов как с ранней, так и развернутой стадией заболевания ассоциировалось с более высокой воспалительной активностью, наличием системных проявлений болезни и гиперпродукцией аутоантител. Установлено позитивное влияние МТ и РТМ на уровень и функциональную активность Т рег у пациентов с РА. При изучении роли аутоантител впервые был выявлен вклад АМЦВ в развитие деструктивных изменений в суставах и их более тесная взаимосвязь с индексами воспалительной активности и уровнем острофазовых показателей, по сравнению с АЦЦП и РФ. Продемонстрирована возможность достижения иммунологической ремиссии РА у пациентов на фоне терапии БПВП (МТ) и ГИБП (РТМ и ТЦЗ), что проявлялось в развитии отрицательной сероконверсии по IgM РФ и АЦЦП. Впервые показана роль ММП-3 в оценке воспалительной активности и прогнозирование развития деструктивных изменений в суставах; продемонстрировано предсказательное значение ММП-3 для оценки

эффективности терапии МТ у пациентов с ранним РА, в также возможности сохранения ремиссии заболевания после отмены терапии ТЦЗ. Впервые установлено сходное влияние МТ, РТМ и ТЦЗ на показатели цитокинового профиля, проявляющееся в снижение уровня патогенетически значимых цитокинов, позволяющее говорить о подавлении активации CD4+ Т лимфоцитов. Применение ингибиторов ФНО- $\alpha$  влияет в большей степени на уровень хемокинов (IP-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) и факторов роста (VEGF). Впервые было продемонстрировано достоверное снижение уровня IP-10 при использовании МТ, что является одним из важных противовоспалительных эффектов препарата.

Впервые доказана тесная взаимосвязь между исходно высоким уровнем ММП-3 и ИЛ-6 и сохраняющейся воспалительной активностью по данным ЭД.

### **Теоретическая и практическая значимость.**

На основании проведенного исследования определены наиболее информативные биомаркеры, ассоциирующиеся с активностью и тяжестью заболевания, развитием деструктивных изменений в суставах. IgM/IgA РФ и АМЦВ коррелируют с активностью заболевания, подвергаются изменениям на фоне терапии. АМЦВ в большей степени, чем АЦЦП влияют на развитие деструкции костной ткани, мониторинг их уровня информативен для выявления групп пациентов с потенциально более тяжелым течением заболевания. В отличие от IgMРФ, динамика АЦЦП на фоне терапии отсутствует.

Определение уровня ММП-3 в сыворотке крови может быть полезным для более точной оценки выраженности синовиального воспаления, прогнозирования развития деструктивных изменений в суставах. Мониторинг концентрации ММП-3 на фоне терапии позволит прогнозировать эффективность метотрексата при раннем РА, оценить возможность отмены терапии ГИБП при достижении ремиссии заболевания.

Измерение сывороточной концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-6), хемокинов (IP-10), факторов роста (VEGF) позволяет более точно оценить как клиническую активность РА, так и выраженность УЗ воспаления в суставах по данным энергетического доплера.

Снижение уровня и функциональной активности Т рег при раннем и развернутом РА свидетельствует о существенном вкладе данной клеточной субпопуляции в патогенез РА, что создает предпосылки для разработки новых методов терапии.

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой настоящего диссертационного исследования явились научные положения и достижения отечественных и зарубежных авторов в области изучения роли нарушений клеточного и гуморального звена иммунной системы в патогенезе РА. Проведена оценка в динамике широкого спектра молекулярных (острофазовых показателей, уровня аутоантител, маркеров деструкции костной и хрящевой ткани, проказателей цитокинового профиля) и клеточных (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+/56+, CD19+, FoxP3+ Т лимфоцитов) биомаркеров у 90 пациентов с ранней и 142 больных с развернутой стадией РА в сопоставлении с показателями клинической активности заболевания и данными инструментальных методов исследования. Оценка влияние ГИБП, селективно блокирующих ведущие звенья патогенеза РА, на широкий спектр лабораторных показателей позволило оценить вклад различных иммунологических

нарушений в течение и прогноз заболевания. Проспективное исследование больных в реальной клинической практике на базе ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой проводилось в течение 7 лет. Выполнен тщательный анализ лабораторных, инструментальных и клинических показателей активности заболевания на фоне различных стратегий терапии.

#### **Апробация работы**

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на ежегодных конгрессах EULAR (Мадрид 2013, Париж 2014, Рим 2015, Лондон 2016, Мадрид 2017, Амстердам 2018, Мадрид 2019), 9 и 10 международных конгрессах по аутоиммунитету (Ницца 2014, Лейпциг 2016.), конгрессах CORA (Сорренто 2015, Болонья 2017, Флоренция 2019), средиземноморском конгрессе ревматологов (Генуя 2018). II, III Евразийском конгрессе ревматологов (Москва, 2014, Минск 2016), VI Съезде ревматологов России (Москва, 2013), Национальных днях лабораторной медицины России (Москва 2013), Всероссийской конференции «Коморбидные проблемы в ревматологии и онкоревматологии» (Казань 2015), I, II и III междисциплинарных конференциях «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва 2016, 2017, 2018), II и V Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва 2016, 2019), школе ревматологов им В.А. Насоновой «Современные аспекты клинической иммунологии в ревматологии» (Москва, 2015), ежегодных научно-практических конференциях ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой (Москва 2018, 2019), общероссийском конгрессе с международным участием «Дерматологические проблемы в ревматологии» (Москва, 2019), всероссийском конгрессе с международным участием «Дни ревматологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2014, 2019), Общероссийском конгрессе с международным участием «Проблемы аутоиммунитета и аутовоспаления в ревматологии» (Москва, 2019), VIII конференции «Здоровые иммунной системы. Моноклональные антитела в диагностике и лечении системных и онкологических заболеваний» (Москва, 2019).

#### **Степень достоверности результатов проведенного исследования.**

Степень достоверности результатов проведенных исследований определяется количеством клинических наблюдений с использованием современных методов исследования. Полученные данные обработаны с помощью статистических программ, где подтвердили свою достоверность. Научные положения, выводы и рекомендации, представленные в диссертации, аргументированы и логически обоснованы результатами клинических и инструментальных исследований.

#### **Полнота изложения материалов диссертации в публикациях.**

По материалам диссертации опубликовано 87 печатных работ: 2 главы в монографии, 46 статей (из них 38 оригинальных), в том числе 43 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России для публикации основных результатов диссертационных исследований, а также 39 тезисов в отечественной и иностранной печати.

#### **Внедрение полученных результатов в практику.**

Основные результаты работы внедрены в практику Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский

институт ревматологии имени В.А. Насоновой", Государственного учреждения здравоохранения «Тульская областная клиническая больница», Федерального государственного бюджетного учреждения «9 лечебно-диагностический центр» Министерства обороны Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тульский государственный университет» и используются для оценки активности и тяжести заболевания, мониторинга проводимого лечения и выявления потенциальных предикторов эффективного ответа на терапию генно-инженерными биологическими препаратами. По материалам работы подготовлены и опубликованы главы «Тоцилизумаб» в книге «Генно-инженерные биологические препараты в лечении ревматоидного артрита» (под ред. акад. Е.Л. Насонова, М.: Има-пресс, 2013); глава «Опыт применения тоцилизумаба у больных ревматоидным артритом в России: исследование ЛОРНЕТ» в книге «Генно-инженерные биологические препараты в лечении ревматоидного артрита» (под ред. акад. Е.Л. Насонова, М.: Има-пресс, 2013). Полученные данные используются в лекционном материале последипломного образования для практических врачей (Школа ревматологов).

#### **Заключение:**

По актуальности темы, объему проведенных исследований, новизне и научно-практической значимости полученных результатов диссертация соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации (постановление правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. №842) предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук.

Диссертация Авдеевой Анастасии Сергеевны «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита» рекомендуется на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.22 – ревматология и по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.

Заключение принято на заседании ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой". На заседании присутствовали 76 человек, в том числе 31 член из 40, входящих в состав членов Ученого совета. Результаты голосования: "за" - 31 человек, "против" - нет, "воздержалось" - нет, протокол № 6 от 03 марта 2020г.

Ученый секретарь  
ФГБНУ НИИР им. В.А.Насоновой  
кандидат медицинских наук



О.А. Никитинская