

На правах рукописи

Сенникова Светлана Валерьевна

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ В
КАПИЛЛЯРНОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАЗОМ**

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2025

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

**Топтыгина
Анна Павловна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник научного клинического отдела дерматологии Государственного бюджетного учреждения Свердловской области «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии»

**Филимонкова
Нина Николаевна**

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств Института профессионального образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Козлов
Иван Генрихович**

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2025 г. в _____ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.063.01 на базе ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620041, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской/Академическая, 22/20 и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iir.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан _____ 2025 г.

Ученый секретарь Совета 24.1.063.01
на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН,
кандидат биологических наук

Ю.А. Журавлёва

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень научной разработанности темы. Псориаз – хроническое иммуноассоциированное воспалительное заболевание кожи мультифакториальной природы, с рецидивирующим течением и дебютом в трудоспособном возрасте. Частота встречаемости псориаза среди населения ежегодно увеличивается. К настоящему моменту около 125 миллионов человек во всем мире страдает псориазом. Общая заболеваемость псориазом составляет около 2–3 % населения мира [Bu J. et al., 2022; World Health Organization, 2016]. В 2021 г. распространенность псориаза среди взрослого населения Российской Федерации составила 280,3 на 100 тыс. населения, по сравнению с 260,8 на 100 тыс. населения в 2020 г. При этом заболеваемость псориазом среди взрослого населения увеличилась на 14%, с 58,8 до 66,9 на 100 тыс. [Кубанов А.А. и др., 2022].

Исследование иммунопатогенеза псориаза позволяет обеспечить рациональный терапевтический подход, проявляющийся в клиническом улучшении состояния кожного покрова и продолжительной ремиссии [Жуков А.С. и др., 2021]. Псориатическое воспаление развивается в результате длительного взаимодействия между активно пролиферирующими кератиноцитами и инфильтрирующими кожу активированными иммунными клетками [Di Cesare A. et al., 2009]. Сдвиг кожного микробиома в зоне псориатического высыпания в сторону условно-патогенных микроорганизмов, активирующих иммунную систему, рассматривается как один из основных триггеров, провоцирующих заболевание [Belkaid Y. et al., 2014]. Одни исследователи находят возрастание *Actinobacteria* и *Firmicutes* [Alekseyenko A. et al., 2013; Ali Abd S. et al., 2022], другие отмечают снижение *Firmicutes* [Assarsson M. et al., 2018]. Возможно, такие различия связаны с разной локализацией псориатических высыпаний [Karooor B. et al., 2022].

Ключевыми клетками, запускающими процесс формирования псориатической бляшки, являются эпителиальные клетки кожи – кератиноциты. Из гибнущих из-за повреждающих факторов кератиноцитов в начале заболевания выделяются антимикробные пептиды, например, β -дефензины и S100 белки и активный пептид кателицидина LL37 [Rendon A. et al., 2019]. LL37 связывает, как чужеродную, так и собственную ДНК и РНК из гибнущих клеток. Комплекс LL37-ДНК активирует плазмацитоидные дендритные клетки (pDC) через TLR9 [Kim T. et al., 2017], что индуцирует продукцию интерферонов 1-го типа (IFN- α и IFN- β), а комплекс LL37/РНК активирует pDC через TLR7, и миелоидные DC (mDC) - через TLR8 [Morizane S. et al., 2012; Rendon A. et al., 2019]. Сложный каскад цитокинов, обеспечивающий поддержание хронического воспаления в коже, инициируется и поддерживается взаимодействием клеток врожденного и адаптивного иммунитета, прежде всего дендритных клеток, Т-лимфоцитов и кератиноцитов [Vičić M. et al., 2021]. Созревающие DC мигрируют в дренирующие лимфоузлы, где активируют и вовлекают в воспалительный процесс Т-лимфоциты [Lee E. et al., 2018; Santini S. et al., 2011] и запускают продукцию цитокинов, вовлеченных в патогенез псориаза [Ganguly D. et al., 2009; Gilliet M. et al., 2008]. Ведущая роль в патогенезе псориаза отведена CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеткам и оси интерлейкинов (IL)-23/IL-17 [Hirahara K. et al., 2016]. Зрелые DC продуцируют IL-12 и IL-23, которые направляют дифференцировку Т-хелперов в Th1, Th17 и Th22 [Rendon A. et al.,

2019]. Эти хелперы секретируют ряд провоспалительных цитокинов: IL2, IFN- γ , фактор некроза опухоли (TNF), IL-17 и IL-22 [Li V. et al., 2020]. Провоспалительная цитокиновая среда индуцирует кератиноциты к продукции кателицидина, хемокинов, антимикробных пептидов и ростовых факторов, способствуя накоплению в очаге поражения нейтрофилов и mDC, а избыток ростовых факторов и цитокинов тормозит созревание кератиноцитов и способствует их активной пролиферации. Таким образом, формируется петля положительной обратной связи, которая усиливает процесс воспаления в коже [Elias P. et al., 2008; Young H. et al., 2004].

На сегодняшний день не существует методов, позволяющих излечить псориаз. Более достижимая цель терапии псориаза – контролируемая ремиссия, нормализация качества жизни пациента и уменьшение возможности развития коморбидных состояний [Бакулев А.Л. и др., 2020]. Терапия наружными лекарственными средствами в местах воспалительного процесса кожи снижает риск развития нежелательных явлений, в сравнении с системной терапией. Однако использование только топической терапии допустимо, когда высыпания на коже занимают менее 10% площади поверхности тела, при псориазе легкой степени тяжести [van de Kerkhof P. et al., 2008]. Также актуально применение наружных лекарственных средств как дополнительного метода лечения при средней и тяжёлой форме псориаза [Elmets C. et al., 2021]. Около 75 % пациентов страдают псориазом легкой и умеренной степени тяжести, в этом случае стандартным терапевтическим подходом является подбор топических средств лечения, в частности, глюкокортикоидов. Преимущество этих средств в хорошей эффективности, высокой комплаентности лечения и минимальном риске системных побочных эффектов [Afifi T. et al., 2005; Mason A. et al., 2013]. Действие глюкокортикостероидов опосредуется связыванием с цитозольными глюкокортикоидными рецепторами, а последующая транслокация комплекса препарат-глюкокортикоидный рецептор в ядро клетки активирует экспрессию генов, отвечающих за синтез противовоспалительных белков, таких как IL-10, антагонист рецептора IL-1, β -адренергический рецептор и протеинфосфатаза 1 [Филимонкова Н.Н. и др., 2010; Uva L. et al., 2012]. Комплексы глюкокортикоид-глюкокортикоидный рецептор блокируют факторы транскрипции, активирующие воспаление. Такая блокировка снижает продукцию цитокинов: IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, TNF [Cato A. et al., 2002]. Однако при использовании топических глюкокортикостероидов возможно развитие побочных эффектов [Кунгуров Н.В. и др., 2013]. Отмечается тенденция к рецидивам псориазных элементов в очагах регресса после завершения терапии [Clancy D. et al., 2017; Suarez-Farinas M. et al., 2011]. Генно-инженерные биологические препараты избирательно связывают цитокиновые рецепторы или сами цитокины. Наиболее актуальными являются ингибиторы IL-17 (секукинумаб, нетакимаб, иксекизумаб), TNF (адалимумаб, этанерцепт, инфликсимаб, цетролизумаб пэгол), IL-12/23 (устекинумаб) или IL-23 (гуселькумаб) [Федеральные клинические рекомендации Дерматовенерология 2015]. Развитие фарминдустрии и исследования патогенетических механизмов псориаза способствуют развитию новых терапевтических подходов, специфично воздействующих на этиопатогенетические звенья при псориазе [Ceccarelli M. et al., 2021]. Персонализированный

подход к лечению пациента с анализом локального иммунного статуса кожи позволяет достичь более выраженного клинического эффекта от терапии [Разнатовский К.И.и др., 2021; Griffiths С.Е.М. et al., 2021].

Таким образом, исследование, направленное на изучение особенностей параметров иммунитета в капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки, в сравнении с венозной кровью, и реакции на применение топического глюкокортикоида, выявляющей действие препарата на различные звенья иммунопатогенеза псориаза, является, несомненно, весьма актуальным и своевременным.

Цель работы: исследование особенностей иммунопатогенеза заболевания у больных псориазом для обоснования топической терапии.

Задачи исследования.

1. Оценить особенности микробиоты в зоне псориатической бляшки в сравнении с микробиотой кожи рук здоровых добровольцев.

2. Исследовать возможность определения уровней основных и малых субпопуляций мононуклеаров и цитокинового профиля в капиллярной крови и сопоставить результаты с аналогичным определением в венозной крови на группе взрослых здоровых добровольцев.

3. Исследовать распределение основных и малых субпопуляций мононуклеаров периферической крови из венозной крови и капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки, с помощью поверхностных CD-маркеров у пациентов с псориазом в сравнении с аналогичными параметрами здоровых добровольцев.

4. Провести оценку цитокинового профиля в плазме венозной крови и капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки в сравнении с аналогичными параметрами здоровых добровольцев.

5. На примере местной терапии больных псориазом препаратом, содержащим глюкокортикоидный гормон, выявить пригодность разработанной методики определения субпопуляционного состава мононуклеаров и цитокинового профиля капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки, для персонализированного подхода к оценке ведущих иммунопатогенетических факторов и эффективности лечения у конкретного больного.

Научная новизна. Установлено, что у здоровых взрослых нет значимых различий между капиллярной и венозной кровью в субпопуляционном составе мононуклеаров и концентрации цитокинов, за исключением достоверно повышенного уровня Т- и В-клеток памяти в капиллярной крови.

Обнаружено, что определение субпопуляционного состава мононуклеаров у больных псориазом более информативно в капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки, чем в венозной крови. В капиллярной крови больных псориазом выявлено 15 из 22-х субпопуляций, значимо отличающихся от здорового контроля, тогда как в венозной крови такие отклонения обнаружены только в 12-и из 22-х исследованных субпопуляций мононуклеаров.

Показано, что изменения в цитокиновом профиле капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки, более информативны, чем в венозной крови. В капиллярной крови

выявлены значимые отклонения от группы здоровых в уровнях 13-и из 15-и определявшихся цитокинов, тогда как в венозной крови обнаружены изменения в концентрации только 8-и цитокинов.

Доказано, что для наблюдения в динамике процесса лечения больных псориазом наиболее информативным является определение параметров субпопуляций мононуклеаров и концентраций цитокинов в капиллярной крови, взятой вблизи очага воспаления, по сравнению с венозной кровью. Так, в группе пациентов, леченных топическим стероидом, нормализация измененных параметров чаще выявлялась именно в капиллярной крови.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в получении новых знаний об иммунопатогенезе псориаза, участии различных субпопуляций мононуклеаров в работе местного иммунитета и активности синтеза ими различных цитокинов в псориазической бляшке. Показано, что на местном уровне в псориазический процесс вовлечены практически все известные субпопуляции хелперов. Важно, что значимо повышенный уровень Treg и Vreg не сопровождается усилением противовоспалительного звена, что объясняет хроническое прогрессирование аутовоспалительного процесса при псориазе.

Показана активная вовлеченность В-клеточного звена в иммунопатогенез псориаза. Привлечение в зону псориазического воспаления В1-клеток обусловлено, по-видимому, вовлеченностью этих клеток в очистку зоны воспаления от гибнущих клеток. С этой же функцией, очевидно, связано увеличение количества М2-моноцитов.

Выявлено активное участие эпителиальных клеток в поддержании воспаления в псориазической бляшке за счет синтеза ими IL-25 и IL-33, индуцирующими синтез провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками. IL-31, реализующий ощущения зуда при atopическом дерматите, не задействован при псориазе.

Доказано, что для изучения иммунопатогенеза псориаза и лабораторной оценки эффективности лечения более информативно использовать определение параметров иммунитета в капиллярной крови, взятой вблизи зоны псориазического воспаления, чем в венозной крови. При этом в группе здоровых людей не было выявлено значимых различий между венозной и капиллярной кровью, что свидетельствует о том, что различия, выявляемые в группе больных, связаны с активной миграцией различных субпопуляций мононуклеаров в зону псориазической бляшки и вовлеченности этих клеток в аутовоспалительный процесс.

Практическая значимость работы заключается в том, что предложен простой и удобный способ оценки локального иммунитета по анализу субпопуляционного состава мононуклеаров и цитокинового профиля капиллярной крови, взятой вблизи очага псориазического воспаления. Получен патент «Способ определения и оценки местного иммунитета у больных псориазом» (Патент RU 2804243).

Показано, что капиллярной крови, взятой в 2 микроветты по 200 мкл, достаточно для исследования клинического анализа крови, 22-х субпопуляций мононуклеаров и 15-и цитокинов.

Рассчитаны пороговые разделяющие значения (cut off) для параметров клеточного иммунитета и цитокинового профиля в капиллярной крови, взятой рядом с псориатической бляшкой (26 параметров), и венозной крови (13 параметров), что позволяет оценить активность вовлеченности иммунной системы в воспалительный ответ при псориазе.

На примере оценки субпопуляционного состава мононуклеаров и цитокинового профиля капиллярной крови, взятой вблизи очага псориатического воспаления, в процессе лечения топическим стероидом и после его отмены установлено, что предложенный метод оценки адекватно выявляет наличие терапевтического эффекта глюкокортикостероидного препарата только в процессе лечения и наблюдаемый эффект отмены препарата. Результаты проведенных лабораторных анализов в капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки, четко совпадают с результатами клинического наблюдения.

Методология и методы исследования. Выполнено простое открытое сравнительное проспективное исследование клинических проявлений и лабораторных показателей: субпопуляционного состава мононуклеаров и цитокинового профиля венозной и капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки у 40 пациентов с псориазом, в зависимости от проводимой терапии в сравнении с группой здорового контроля (20 человек). Получение биологического материала (венозная и капиллярная кровь, мазки с поверхности кистей рук или из зоны псориатического воспаления) проводилось согласно положениям Хельсинкской Декларации ВМА (2000) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999), а также согласно ГОСТ Р. 52379-2005, GOOD CLINICAL PRACTICE (GCP) «Российские и международные требованиями по надлежащей клинической практике», одобренными Российской академией медицинских наук. В соответствии с заявленной целью исследования для решения поставленных задач использовали формально-логические методы для анализа научной литературы, клинико-anamnestические, иммунологические и статистические методы исследования.

Внедрение результатов работы. Результаты диссертационной работы внедрены в работу ФГБУЗ Центральная медико-санитарная часть №119 ФМБА России, Медико-санитарная часть № 93 (Москва) и в работу отдела подготовки кадров высшей квалификации ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Москва).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов проведенных исследований определяется достаточным объемом выборки пациентов, количеством проведенных исследований, выполненных современными методами, обладающими высокой чувствительностью и объективностью на высокоточных, автоматизированных диагностических приборах, оснащенных системами автоматизированного сбора, учета и анализа данных, и использованием корректных методов статистической обработки материала.

Материалы диссертационной работы были доложены на конференциях различного уровня: 14-м и 15-м Международном форуме дерматологов и косметологов IFDC (Москва, 2021 и 2022 гг.), где доклады заняли 1-е и 2-е место, соответственно, в конкурсе молодых ученых; 8-й Научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая

иммунология» (Сочи, 2022, 2-е место в конкурсе молодых ученых); Юбилейной научно-практической конференции «ФГБУЗ «Центральная медико-санитарная часть № 119 ФМБА»: 50 лет на страже здоровья работников ракетно-космической отрасли» (Москва, 2022); XVII Всероссийском форуме с международным участием им. акад. В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2023); V Объединенном иммунологическом форуме (Пушкинские Горы, 2024); 14-м Всероссийском Форуме Национального альянса дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2024). Аprobация диссертации состоялась на расширенном заседании секции Ученого совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора «Общая и прикладная иммунология», 14.11.2024 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них статей в журналах, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий», рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки РФ для публикаций основных результатов диссертационных исследований – 5, в том числе статей в журналах, включенных в базу Scopus и Web of Science – 5, тезисов в материалах конференций – 4, получен 1 патент.

Личный вклад автора. Автор лично вела пациентов, оценивала результаты лечения, собирала биологический материал, проводила пробоподготовку для определения показателей иммунного статуса с помощью цитофлуорометрии и концентрации цитокинов мультиплексным методом, проводила анализ литературы, статистическую обработку, анализ и описание полученных результатов. Определение параметров клинического анализа крови на гематологическом анализаторе и анализ субпопуляций мононуклеаров на проточном цитометре выполнен совместно с сотрудниками клинико-диагностической лаборатории ФГАУ «НМИЦ здоровья» детей Минздрава России (зав. лабораторным отделом д.м.н. Е.Л. Семикина). Микробиологические исследования выполнены совместно с сотрудниками отдела медицинской биотехнологии ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (руководитель отдела д.б.н. Е.А. Воропаева).

Положения, выносимые на защиту.

1. Параметры клинического анализа крови, субпопуляционного состава мононуклеаров и цитокинового профиля в капиллярной и венозной крови здоровых доноров значимо не различаются.

2. У больных псориазом определение субпопуляционного состава мононуклеаров и цитокинового профиля в капиллярной крови, взятой вблизи псориазической бляшки, более информативно, чем в венозной крови.

3. Разработанный метод оценки параметров субпопуляционного состава мононуклеаров и цитокинового профиля в капиллярной крови, взятой вблизи псориазической бляшки, пригоден для выявления ключевого звена в иммунопатогенезе псориаза у конкретного больного для персонализированного подбора и контроля эффективности терапии псориаза.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 164 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных

исследований, заключения, выводов, рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицей, 18 рисунками и 3 приложениями. Список литературы содержит 334 источника, из них работ отечественных авторов – 51, зарубежных авторов – 283.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. В рамках простого открытого сравнительного проспективного исследования были обследованы 40 больных хроническим распространенным вульгарным псориазом с локализацией высыпаний на пальцах рук легкой и средней степени тяжести (29 мужчин и 11 женщин), обратившихся в дерматологический кабинет медицинской санитарной части № 93. Диагноз установлен согласно клинико-anamnestическим критериям Российских клинических рекомендаций по диагностике и лечению псориаза (группа 1). Среднее время от начала заболевания составило $18,68 \pm 2,25$ лет. На момент начала обследования пациенты не использовали топических лекарственных препаратов, фототерапии и системной терапии, направленной на лечение псориаза более 1 месяца. Пациенты с приверженностью к терапии наружными топическими глюкокортикостероидами в количестве 20 человек были выделены в группу 1а. Пациентов группы 1а лечили с помощью местной терапии: 0,1% крема мометазона 14 дней, локально на очаги поражения 1 раз в сутки. В группу сравнения вошли 20 практически здоровых взрослых (14 мужчин и 6 женщин), средний возраст $46,60 \pm 2,38$ года (группа 2). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского (протокол № 52 от 29.01.2020), обследованные подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Каждый пациент проходил клинико-лабораторное обследование в соответствии со схемой (таблица 1); люди, входившие в контрольную группу, были обследованы однократно по схеме 1-й визит.

Таблица 1 – Дизайн исследования

| 1-й визит (день 0) Старт терапии | 2-й визит (через 7 дней от начала терапии) | 3-й визит (через 14 дней от начала терапии) Завершение терапии | 4-й визит (через 28 дней от начала терапии) | 5-й визит (через 6 месяцев от начала терапии). |
|---|--|---|--|---|
| -PASI -DLQI -Забор капиллярной и венозной крови для анализов. | -ДИШС -Выявление нежелательных явлений и побочных реакций | -Оценка PASI, ДИШС, DLQI; выявление нежелательных явлений и побочных реакций; -Взятие капиллярной и венозной крови. | Заключительная оценка результатов терапии; -Оценка PASI, ДИШС, -Взятие капиллярной и венозной крови. | -Заключительная оценка отдаленных результатов терапии, выявление субъективных жалоб, врачебное обследование, оценка PASI, ДИШС. |

Примечание: PASI – индекс активности и степени тяжести заболевания; DLQI – Дерматологический индекс качества жизни; ДИШС – дерматологический индекс шкалы симптомов.

Для оценки площади поражения, активности и степени тяжести заболевания использовали индекс PASI (Psoriasis Area and Severity Index) и дерматологический индекс шкалы симптомов (ДИШС). Для оценки влияния заболевания на качество жизни пациенты

до лечения (День 0) и после завершения лечения (День 14) самостоятельно заполняли опросник DLQI (Dermatology Life Quality Index).

Для микробиологического посева мазок с площади 1 см² брали сухим тампоном с очагов псориатического воспаления на коже кистей рук у пациентов или с кожи кистей рук у здоровых обследуемых в транспортную систему *Amies*. Проводили посевы на диагностические среды, окрашивание по Граму, использовали биохимические тест-системы. Видовую идентификацию проводили на микробиологическом анализаторе VastoSCREEN (НПФ «Литех», Россия).

Капиллярную кровь отбирали из пальца руки у здоровых однократно, а у псориатических больных из пальца руки вблизи очага с клиническими проявлениями - до лечения, на 14-й и 28-й день в конечном объеме 400 мкл в две микроветты (Microvette® 200 K3 EDTA). Взятие крови из локтевой вены производили с использованием системы Vacutainer® в вакуумную пробирку с EDTA в объеме 3 мл. Клинический анализ капиллярной и венозной крови проводили на гематологическом автоматизированном 5 Diff анализаторе Sysmex XN (Япония).

Определение численности субпопуляций мононуклеаров осуществляли в цельной венозной и капиллярной крови с последующим лизированием эритроцитов с использованием технологии и реактивов BD Biosciences (США). Использовали композиции МКАТ при четырехцветном окрашивании: CD27/CD1d/CD5/CD19; CD14/CD16/CD45/CD8; CD45RA/CD45R0/CD4/CD161; CD25/CD127/CD4/CXCR5; CD3/CD16-56/CD4/CD294. Проточный цитометр BD FACS Canto II, программа обработки информации FACSDiva и некоммерческая программа Win.MDI.2.8.

Цитокины в плазме капиллярной и венозной крови (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- γ , TNF, sCD40L) определяли мультиплексным методом с использованием коммерческих тест-систем «Th-17» (BioRad, США), определяемый динамический диапазон 0,2-6200 пг/мл. Постановка осуществлялась в 96-луночном формате.

Полученные результаты были исследованы на предмет нормальности распределения признака по методу Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении вычисляли среднюю арифметическую и ее ошибку ($M \pm SE$). Различия между группами оценивали с помощью *t* критерия Стьюдента. В противном случае результаты представляли в виде медианы, первого и третьего квартиля (Me (LQ-HQ)) и применяли критерий Манна-Уитни для анализа различий. Для сравнения частот использовали метод χ^2 . Уровень $p < 0,05$ считали значимым. Расчеты проводились с помощью программ «Microsoft Office Excel 12» и «Statistica 6.0». ROC-анализ проводили с помощью пакета программ «SPSS16».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Проведена оценка влияния различий в процедуре взятия венозной и капиллярной крови на уровень изучаемых параметров. По результатам клинического анализа крови, не обнаружено различия между капиллярной и венозной кровью в группах 1 и 2. Сопоставление параметров для этих групп представлено в *таблице 2*. Отсутствие значимых различий между параметрами клинического анализа капиллярной и венозной крови свидетельствует об отсутствии

влияния процедур взятия крови на полученные результаты. Выявленные далее различия в уровнях некоторых субпопуляций белой крови связаны с целенаправленной миграцией этих клеток в зону воспаления и вовлеченностью этих клеток в иммунопатогенез псориаза.

Таблица 2 – Результаты сопоставления клинического анализа капиллярной и венозной крови в группах здоровых и больных псориазом

| | Здоровые | | Больные псориазом | |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|
| | Капилляр | Вена | Капилляр | Вена |
| Гемоглобин, г/л | 139,0±5,4 | 139,0±5,1 | 150,0±4,4 | 149,0±2,8 |
| Эритроциты, 10 ¹² /л | 4,60±0,22 | 4,78±0,23 | 4,99±0,15 | 4,97±0,11 |
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 7,01±0,45 | 7,04±0,42 | 7,67±0,48 | 7,67±0,47 |
| Нейтрофилы, % | 58,00±1,73 | 58,00±1,63 | 59,00±1,69 | 60,00±1,59 |
| Эозинофилы, % | 2,00±0,32 | 2,00±0,31 | 2,00±0,33 | 2,00±0,34 |
| Базофилы, % | 1,00±0,05 | 1,00±0,03 | 1,00±0,07 | 1,00±0,11 |
| Лимфоциты, % | 32,00±1,76 | 32,00±1,77 | 30,00±1,64 | 29,00±1,66 |
| Моноциты, % | 8,00±0,41 | 8,00±0,42 | 8,00±0,36 | 8,00±0,32 |
| Лимфоциты, 10 ⁹ /л | 2,25±0,11 | 2,25±0,13 | 2,20±0,13 | 2,12±0,12 |
| Моноциты, 10 ⁹ /л | 0,560±0,047 | 0,540±0,045 | 0,620±0,041 | 0,630±0,045 |

При исследовании спектра микробиоты кожи рук в группе 2 было обнаружено 46 штаммов микроорганизмов, а в группе 1 было выделено 56 штаммов. В группе 2 род *Staphilococcus spp.* составил 36,96%, а в группе 1 – 50% и выявлен широкий спектр коагулазотрицательных стафилококков: *S. hominis*-12,35%, *S. epidermidis*-12,37%, *S. haemolyticus*-7,25%, *S. capitis*-5,52%, *S. aureus* 3,17%, тогда как на коже рук в группе 2 преобладал *S. epidermidis*-15,4%. Известно, что *S. epidermidis* поддерживает гомеостаз кожи и препятствует росту условно патогенного *S. aureus* [Zheng et al., 2022]. На коже рук группы 1 в 2 раза реже выявлялись *Bacillus spp.* и *Corynebacterium spp.*, и, напротив, почти в 2 раза чаще обнаруживались *Micrococcus spp.*, чем в группе сопоставления. Спектр выявленных родов микроорганизмов существенно различался в этих группах. Так, в группе 1 не высевались *Brachybacterium spp.*, *Kocuria spp.*, *Neisseria spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Candida spp.* и *Rothia spp.*, которые представляли 23,91% от видового состава микробиоты кожи рук в группе 2. При этом в группе 1 были высеяны *Pseudomonas spp.*, *Moraxella spp.*, *Paenibacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Cryptococcus spp.*, составившие 10,73% от всех выявленных штаммов, но не обнаруженные в группе 2. Таким образом, наши исследования подтверждают ранее полученные результаты о нарушении спектра микробиоты кожи в очагах воспаления у псориазических больных [Chat et al., 2022], что рассматривается как один из триггерных механизмов псориаза.

В таблице 3 представлены абсолютный и относительный уровень основных субпопуляций лимфоцитов, содержащихся в капиллярной и венозной крови здоровых людей и больных псориазом. Средние значения содержания большинства основных субпопуляций лимфоцитов в венозной и капиллярной крови у здоровых людей не различались. В капиллярной крови содержалось значимо больше клеток памяти (CD45R0⁺), за счёт Т-хелперов памяти (CD4⁺CD45R0⁺), как в абсолютном, так и в процентном выражении. В венозной крови выявлено значимо меньшее абсолютное количество дважды

положительных (CD45RA⁺/CD45R0⁺) клеток, чем в капиллярной. При сопоставлении групп 1 и 2 у больных псориазом обнаружено значимое повышение уровней субпопуляций дважды положительных клеток (CD45RA⁺/CD45R0⁺): в капиллярной крови в 1,64 раза, и в венозной крови в 1,86 раза; значимое повышение уровней В-клеток (CD19): в 1,4 раза в капиллярной крови и в 1,5 раза в венозной крови и значимое повышение уровней НКТ-клеток: в 3,48 раз в капиллярной крови и в 3 раза в венозной крови. Аналогичные отличия получены и в абсолютном выражении. Кроме того, в капиллярной крови обнаружено значимое снижение в 1,2 раза в абсолютном и относительном уровне субпопуляции CD4⁺CD45R0⁺.

Таблица 3 – Сопоставление основных субпопуляций лимфоцитов капиллярной и венозной крови в группе здоровых доноров и больных псориазом

| | Здоровые | | | | Больные псориазом | | | |
|--|-------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| | Капиллярная кровь | | Венозная кровь | | Капиллярная кровь | | Венозная кровь | |
| | % | кл/мм ³ | % | кл/мм ³ | % | кл/мм ³ | % | кл/мм ³ |
| CD45RA ⁺ | 49,37± 3,98 | 1096±96 | 50,57± 3,99 | 1032±98 | 48,31± 3,74 | 1025±90 | 45,15± 3,05 | 930±78 |
| CD45R0 ⁺ | 36,72± 1,87 | 809±58 | 26,17± 2,60 [#] | 535±48 [#] | 34,12± 2,19 | 736±64 | 30,64± 2,79 | 646±67 |
| CD45RA ⁺ / CD45R0 ⁺ | 8,06± 0,73 | 178±16 | 7,47± 0,64 | 148±14 [#] | 13,26± 0,99 [*] | 359±32 [*] | 13,76± 0,93 [*] | 370±35 [*] |
| CD4 ⁺ CD45RA ⁺ | 14,21± 2,75 | 257±51 | 11,40± 2,28 | 228±57 | 14,07± 1,09 | 305±31 | 12,42± 1,11 | 265±25 |
| CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ | 26,78± 1,82 | 772±41 | 18,14± 1,83 [#] | 353±33 [#] | 22,88± 1,70 [*] | 497±46 [*] | 19,70± 1,87 | 416±39 |
| CD3 ⁺ | 68,84± 3,64 | 1510±116 | 69,36± 3,36 | 1404±96 | 65,03± 2,64 | 1408±95 | 63,88± 2,59 | 1349±95 |
| CD3+CD4 ⁺ | 43,03± 2,53 | 959±87 | 38,61± 2,42 | 826±60 | 40,77± 2,23 | 890±76 | 38,62± 2,03 | 827±68 |
| CD3+CD8 ⁺ | 19,46± 1,83 | 425±34 | 19,01± 1,71 | 392±41 | 21,45± 1,25 | 457±36 | 18,23± 1,40 | 413±41 |
| CD19 ⁺ | 9,73± 0,75 | 214±17 | 8,88± 0,86 | 181±19 | 13,63± 1,55 [*] | 298±26 [*] | 13,05± 1,23 [*] | 260±23 [*] |
| CD3 ⁻ CD16/56 ⁺ | 12,15± 1,78 | 267±41 | 11,24± 1,12 | 230±29 | 11,16± 1,37 | 236±41 | 10,16± 1,11 | 218±39 |
| CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ | 1,13± 0,41 | 27±5 | 0,87± 0,08 | 23±4 | 3,93± 0,53 [*] | 98±6 [*] | 2,61± 0,46 ^{#*} | 57±11 ^{#*} |

Примечание: # p < 0,05 по сравнению с капиллярной кровью; * p < 0,05 по сравнению с соответствующим параметром группы здоровых людей.

Была исследована субпопуляционная структура CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов в капиллярной и венозной крови у больных псориазом в сравнении со здоровыми (рисунк 1). Следует оговориться, что субпопуляции хелперов, для которых неизвестны типичные поверхностные маркеры (Th1, Th9 и Th22) объединены в группу «Прочие». Группа «Прочие» представляет собой разницу между общим количеством CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов и суммой количества лимфоцитов в определявшихся нами субпопуляциях.

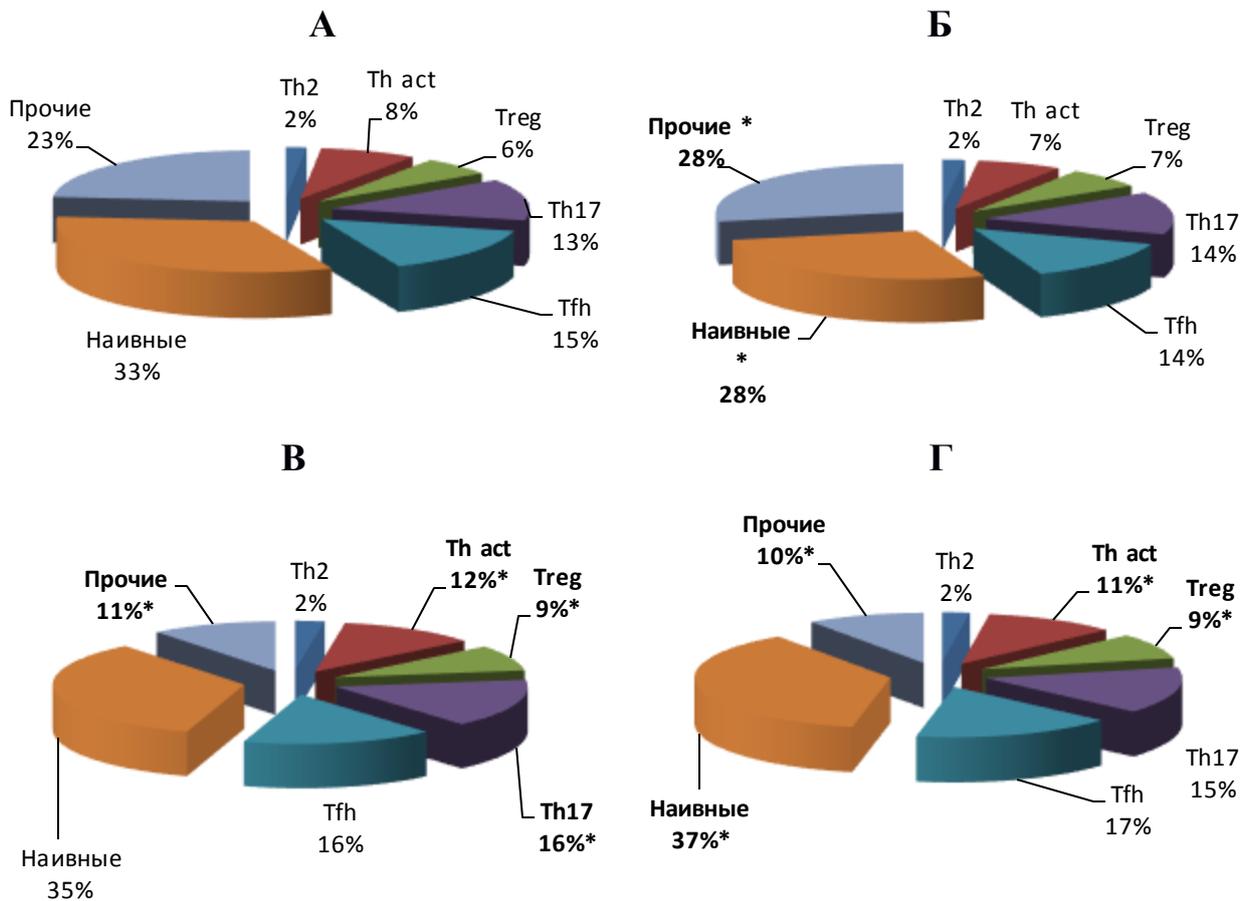


Рисунок 1 – Распределение субпопуляций CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови здоровых людей и больных псориазом

Примечание: А – Здоровые, капиллярная кровь; Б – Здоровые, венозная кровь; В – Больные псориазом, капиллярная кровь; Г – Больные псориазом, венозная кровь; * $p < 0,05$

В группе здоровых обнаружено значимое снижение в венозной крови по сравнению с капиллярной кровью наивных CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов в 1,2 раза и повышение содержания группы «Прочие» также в 1,2 раза. В группе больных псориазом при сопоставлении с соответствующими параметрами группы здоровых людей не выявлено различий в уровнях субпопуляций Th2 и Tfh, как в капиллярной, так и в венозной крови. Значимых различий в уровнях субпопуляций венозной и капиллярной крови больных псориазом не выявлено. При сопоставлении уровней субпопуляций в крови пациентов с псориазом с группой сравнения было обнаружено значимое повышение Th17 в капиллярной крови пациентов в 1,25 раза по сравнению со здоровыми, Th_{act} в капиллярной и венозной крови в 1,48 раза и повышение уровня Treg в капиллярной крови в 1,44, а в венозной крови в 1,23 раза. Кроме того, в венозной крови выявлено повышение уровня наивных Т-клеток в 1,32 раза ($p < 0,05$). Уровень лимфоцитов, вошедших в группу «Прочие», напротив, значимо снизился в капиллярной крови пациентов в 2,2 раза, а в венозной крови - в 2,9 раза. Считается, что относительно сбалансированные иммунологические параметры у больных псориазом свидетельствуют о том, что Treg контролируют воспалительный процесс. В то же время, хронически рецидивирующее течение заболевания говорит о неспособности противовоспалительного звена подавить аутовоспаление [Buckner, J.H., 2010, Купцова Д.Г., 2022].

Субпопуляционный состав В-лимфоцитов представлен на *рисунке 2*. Доля В-клеток памяти (Вm) в капиллярной крови здоровых людей была значимо выше, чем в венозной крови в 1,5 раза, а уровень В2-клеток – значимо ниже в 1,2 раза. В венозной крови по сравнению с капиллярной кровью у пациентов с псориазом был значимо снижен уровень Вm в 1,2 раза и значимо повышен уровень В2-клеток так же в 1,2 раза. При сопоставлении группы псориатических пациентов с группой здоровых людей было выявлено значимое снижение уровня субпопуляции В2 клеток в капиллярной и венозной крови в 1,2 раза. Также в капиллярной крови больных оказался значимо снижен уровень Вm в 1,2 раза. В то же время, у пациентов с псориазом было обнаружено значимое повышение уровня В1-клеток в капиллярной крови в 1,6 раза, а в венозной крови – в 1,5 раза, и значимое повышение уровня Breg в капиллярной крови в 1,5 раза, а в венозной крови – в 1,8 раза. Участие В-лимфоцитов в патогенезе псориаза отмечалась несколькими группами исследователей [Lu et al., 2016; Toussi et al., 2019].

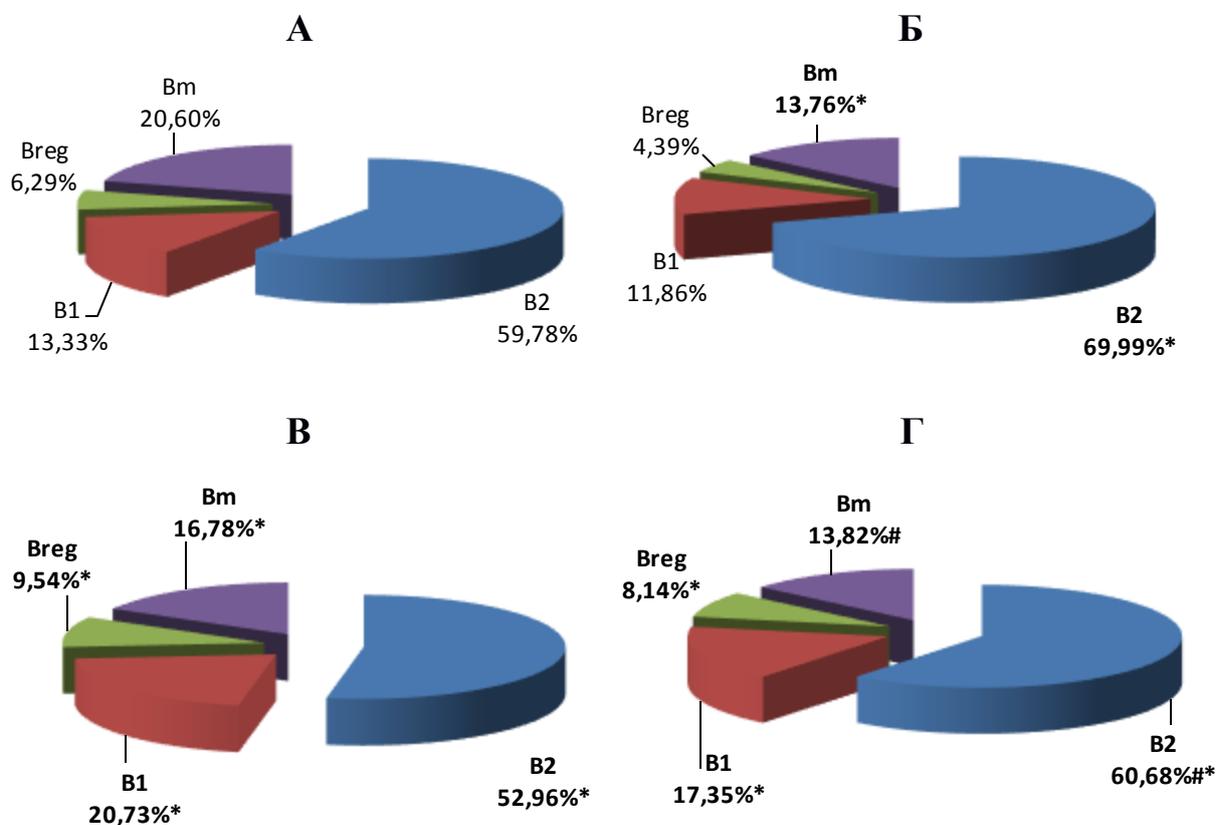


Рисунок 2 – Распределение субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови здоровых людей и больных псориазом

Примечание: А – Здоровые, капиллярная кровь; Б – Здоровые, венозная кровь; В – Больные псориазом, капиллярная кровь; Г – Больные псориазом, венозная кровь; # $p < 0,05$ по сравнению с капиллярной кровью; * $p < 0,05$

Были идентифицированы три субпопуляции моноцитов периферической крови, в соответствии с принятой в мировой литературе классификацией: классические моноциты $CD14^{hi}CD16^{-}$ (M1), неклассические (M2) моноциты $CD14^{lo}CD16^{hi}$ и промежуточные моноциты (M_{int}), $CD14^{+}CD16^{int}$. Помимо этих 3 групп были моноциты, не попавшие в эти группы, их отнесли в группу «Прочие» (*рисунок 3*). Не было выявлено значимых различий

в соотношении субпопуляций моноцитов в венозной и капиллярной крови в группе здоровых и в группе пациентов с псориазом. Было выявлено значимое снижение уровня субпопуляции M1 в капиллярной крови больных в 1,1 раза и M_{int} – в 1,3, а в венозной крови – в 1,5 раза. Отмечено значимое повышение уровня M2-моноцитов в капиллярной крови пациентов в 1,5 раза и в 1,4 раза в венозной крови. Субпопуляция «Прочие» составила в капиллярной крови больных 5,62%, а в венозной крови 5,59%, что значимо отличалось от группы здоровых, где эта субпопуляция не превышала 1%. Эти результаты хорошо согласуются с более ранними работами, в которых было показано участие моноцитов в патогенезе псориаза [Garcia-Rodriguez S., 2013, Pochernina V.V., 2020].

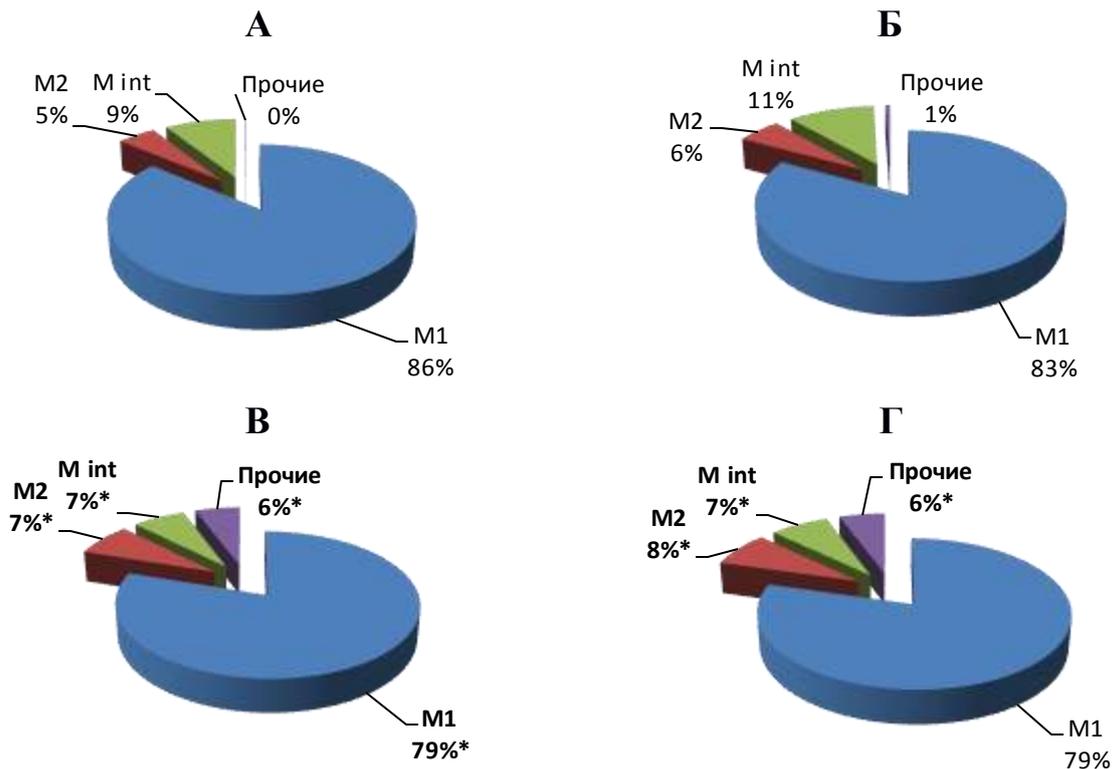


Рисунок 3 – Распределение субпопуляций моноцитов в периферической крови здоровых людей и больных псориазом

Примечание: А – Здоровые, капиллярная кровь; Б – Здоровые, венозная кровь; В – Больные псориазом, капиллярная кровь; Г – Больные псориазом, венозная кровь; * $p < 0,05$

Таким образом, в капиллярной крови пациентов с псориазом уровни 15 субпопуляций из 22 исследованных продемонстрировали значимые отклонения от соответствующих параметров группы сравнения, а в венозной крови – только 12 субпопуляций. Для проверки информативности полученных различий в субпопуляционном составе капиллярной и венозной крови был проведен ROC-анализ данных, результаты которого представлены в *таблице 4*. Следует отметить, что в таблице отражены только те субпопуляции, для которых были получены значимые различия. Для капиллярной крови удалось рассчитать пороговые разделяющие значения (cut off) для 10-и субпопуляций лимфоцитов и 3-х субпопуляций моноцитов, значения которых с высокой чувствительностью и специфичностью позволяют разделить здоровых и больных псориазом. Для венозной крови удалось рассчитать cut off только для 8-и субпопуляций лимфоцитов и 1-й субпопуляции моноцитов. При этом

чувствительность и специфичность для этих параметров в венозной крови оказалась ниже, чем в капиллярной. Полученные данные свидетельствуют о большей информативности определения субпопуляционного состава капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки, по сравнению с аналогичными параметрами в венозной крови.

Таблица 4 – Результаты ROC-анализа и расчета cut off для субпопуляций мононуклеаров

| | Площадь под кривой (AUC) и доверительные интервалы | | Cut off | | Чувствительность (%); специфичность (%) | |
|---|--|----------------------|-------------------|----------------|---|----------------|
| | Капиллярная кровь | Венозная кровь | Капиллярная кровь | Венозная кровь | Капиллярная кровь | Венозная кровь |
| Лимфоциты: | | | | | | |
| CD45RA/CD45RO | 1,00 (1,00-1,00)* | 0,937 (0,865-1,009)* | 1,09 | 0,95 | 100; 100 | 100; 80 |
| CD25 ⁺ CD127 ⁺ CD4 ⁺ | 0,921 (0,812-1,03)* | 0,737 (0,569-0,906)* | 10,95 | 10,35 | 84,21; 100 | 57,89; 95 |
| CD25 ⁺ CD127 ⁺ CD4 ⁺ | 0,912 (0,80-1,024)* | 0,687 (0,503-0,871)* | 7,1 | 7,23 | 78,9; 100 | 68,42; 75 |
| CD45R0 ⁺ CD4 ⁺ CD161 ⁺ | 0,751 (0,537-0,972)* | <0,5 | 14,39 | NS | 73,68; 66,67 | NS |
| CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ | 0,645 (0,418-0,872)* | <0,5 | 14,49 | NS | 78,94; 50 | NS |
| CD19 ⁺ | 0,912 (0,799-1,025)* | 0,659 (0,516-0,874)* | 12,71 | 12,71 | 84,21; 100 | 52,63; 100 |
| CD5 ⁺ CD19 ⁺ | 0,781 (0,560-1,001)* | 0,771 (0,618-0,924)* | 14,32 | 13,65 | 89,47; 66,67 | 73,68; 75 |
| CD1d ⁺ CD5 ⁺ CD19 ⁺ | 0,886 (0,746-1,026)* | 0,776 (0,618-0,935)* | 8,61 | 7,27 | 84,21; 88,33 | 63,16; 95 |
| CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ | 0,561 (0,202-0,921)* | 0,547 (0,352-0,743)* | 8,04 | 12,72 | 100; 50 | 47,37; 80 |
| CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ | 1,00 (1,00-1,00)* | 0,792 (0,636-0,949)* | 2,01 | 1,76 | 100; 100 | 63,16; 100 |
| Моноциты: | | | | | | |
| CD14 ^{hi} CD16 ⁻ | 0,969 (0,902-1,037)* | <0,5 | 84,85 | NS | 66,67; 100 | NS |
| CD14 ^{lo} CD16 ^{hi} | 0,956 (0,88-1,032)* | 0,886 (0,768-1,003)* | 5,35 | 7,7 | 84,21; 100 | 78,95; 95 |
| CD14 ⁺ CD16 ^{int} | 0,684 (0,471-0,898)* | <0,5 | 7,55 | NS | 83,33; 68,42 | NS |

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с группой здорового контроля. NS- не значимые различия.

Результаты определения уровней цитокинов в плазме крови здоровых и больных псориазом до лечения представлены в *таблице 5*. Для большинства исследованных цитокинов уровни в плазме капиллярной и венозной крови в группе здоровых доноров не различались. Однако для IL-10, IL-25 и TNF обнаружены значимые превышения их концентраций в капиллярной крови по сравнению с венозной кровью ($p < 0,05$). У пациентов с псориазом выявлено значимое снижение концентрации цитокинов в венозной по сравнению с капиллярной кровью для 14 цитокинов. Повышение отмечено только для sCD40L, уровень которого в венозной крови в 1,3 раза превышал уровень капиллярной

крови. Степень повышения концентрации в капиллярной крови была различной для разных цитокинов. Интересно, что как в венозной, так и в капиллярной крови уровни IL-10 не различались между группами здоровых и больных псориазом, а IL-31 не различался только в капиллярной крови. В то же время, концентрация всех других исследованных цитокинов в капиллярной крови пациентов значимо превышала соответствующие параметры группы здоровых.

Таким образом, выявлены различия цитокинового профиля у больных псориазом по сравнению со здоровыми. Эти различия более выражены в капиллярной крови: значимые изменения концентрации отмечены у 13 из 15 исследованных цитокинов, против 8 из 15 в венозной крови. По-видимому, это связано с тем, что взятие капиллярной крови производили рядом с очагом псориазического воспаления и содержание цитокинов в ней соответствовало состоянию воспаления в конкретном очаге, тогда как показатели венозной крови отражают средний уровень цитокинов во всем организме и менее информативны.

Таблица 5 – Концентрация цитокинов (пг/мл) в плазме капиллярной и венозной крови больных псориазом и здоровых людей (M±SE)

| | Пациенты с псориазом | | Здоровые | |
|--------|----------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| | Капиллярная кровь | Венозная кровь | Капиллярная кровь | Венозная кровь |
| IL-1 | 39,26±3,12* | 1,38±0,16 [#] | 1,88±0,27 | 1,37±0,16 |
| IL-4 | 13,99±1,21* | 5,64±0,59 ^{#*} | 2,54±0,32 | 2,76±0,34 |
| IL-6 | 6,57±0,53* | 3,27±0,31 [#] | 4,12±0,47 | 3,23±0,33 |
| IL-10 | 3,52±0,37 | 1,82±0,21 [#] | 4,14±0,52 | 2,11±0,28 [#] |
| IL-17A | 4,08±0,41* | 1,46±0,14 ^{#*} | 1,35±0,16 | 1,05±0,15 |
| IL-17F | 24,36±2,14* | 10,20±1,03 [#] | 12,57±1,51 | 11,95±1,66 |
| IL-21 | 47,86±4,18* | 13,92±1,21 ^{#*} | 7,89±1,01 | 7,97±0,98 |
| IL-22 | 12,27±1,11* | 2,67±0,32 ^{#*} | 4,51±0,45 | 3,75±0,38 |
| IL-23 | 24,70±2,09* | 10,12±1,10 ^{#*} | 6,87±0,88 | 7,33±0,93 |
| IL-25 | 4,09±0,38* | 1,42±0,13 [#] | 1,72±0,21 | 1,13±0,17 [#] |
| IL-31 | 511,84±48,23 | 304,97±28,50 ^{#*} | 571,28±41,78 | 517,33±40,76 |
| IL-33 | 47,38±4,22* | 21,10±2,15 [#] | 19,21±2,08 | 18,54±2,16 |
| IFN-γ | 15,89±1,39* | 9,03±1,01 [#] | 11,56±1,25 | 10,01±1,15 |
| TNF | 10,32±0,98* | 6,27±0,57 ^{#*} | 2,14±0,28 | 1,17±0,18 [#] |
| sCD40L | 759,20±67,78* | 979,75±89,76 ^{#*} | 340,34±32,13 | 334,50±31,11 |

Примечание: [#] p < 0,05 по сравнению с капиллярной кровью; * p < 0,05 по сравнению с соответствующим параметром группы здоровых людей.

Для концентрации цитокинов в капиллярной и венозной крови также был проведен ROC-анализ, результаты которого представлены в *таблице 6*. Для венозной крови удалось рассчитать пороговые разделяющие значения (cut off) только для 4-х из 15-и изученных цитокинов, тогда как в капиллярной крови – для 13-и. При этом чувствительность и специфичность для цитокинов венозной крови были ниже, чем для соответствующих цитокинов в капиллярной крови, что говорит о большей информативности определения цитокинового профиля в капиллярной крови, взятой вблизи псориазической бляшки, чем в венозной крови.

Таблица 6 – Результаты ROC-анализа и расчета cut off для цитокинов

| | Площадь под кривой (AUC) | | Cut off | | Чувствительность (%); специфичность (%) | |
|---------------|--------------------------|----------------------|-------------------|----------------|---|----------------|
| | Капиллярная кровь | Венозная кровь | Капиллярная кровь | Венозная кровь | Капиллярная кровь | Венозная кровь |
| IL-1 | 0,972 (0,917-1,028)* | <0,5 | 4,94 | NS | 94,44; 100 | NS |
| IL-4 | 1,00 (1,00-1,00)* | 0,944 (0,839-1,05)* | 5,29 | 3,41 | 100; 100 | 94,44; 100 |
| IL-6 | 0,9 (0,795-1,005)* | <0,5 | 5,32 | NS | 83,33; 90 | NS |
| IL-17A | 0,883 (0,759-1,007)* | <0,5 | 1,98 | NS | 77,78; 100 | NS |
| IL-17F | 0,944 (0,839-1,05)* | <0,5 | 15,88 | NS | 94,44; 100 | NS |
| IL-21 | 0,944 (0,839-1,05)* | 0,614 (0,413-0,815)* | 12,47 | 10,52 | 94,44; 100 | 44,44; 100 |
| IL-22 | 0,90 (0,78-1,02)* | <0,5 | 5,88 | NS | 83,33; 100 | NS |
| IL-23 | 1,00 (1,00-1,00)* | <0,5 | 8,69 | NS | 100; 100 | NS |
| IL-25 | 0,869 (0,722-1,017)* | <0,5 | 2,21 | NS | 83,33; 100 | NS |
| IL-33 | 0,767 (0,596-0,938)* | <0,5 | 28,37 | NS | 66,67; 100 | NS |
| IFN- γ | 0,603 (0,392-0,813)* | <0,5 | 14,77 | NS | 50; 100 | NS |
| TNF | 1,00 (1,00-1,00)* | 1,00 (1,00-1,00)* | 4,13 | 2,7 | 100; 100 | 94,44; 100 |
| sCD40L | 0,947 (0,856-1,039)* | 0,664 (0,449-0,879)* | 430,92 | 494,25 | 88,89; 100 | 61,11; 100 |

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с группой здорового контроля. NS- не значимые различия.

Изменения индексов PASI и ДИШС в процессе наблюдения за пациентами в течение 6 мес. представлены в *таблице 7*. Через 14 дней, то есть на момент окончания терапии, отмечено значимое снижение индекса PASI ($p < 0,05$) на 38,05%. Следовательно, была выявлена позитивная ответная реакция на наружную терапию. К 28 дню наблюдений (14 день от завершения терапии) средний индекс PASI не отличался от исходного уровня. ДИШС продемонстрировал схожую динамику. При оценке отдаленных результатов через 6 мес. после лечения (день 180) индекс PASI и ДИШС значимо не отличался от исходного уровня. DLQI довольно чувствителен к стадии обострения и ремиссии псориаза. Однако на фоне лечения глюкокортикостероидным препаратом он снизился лишь на 18,13%. Таким образом, при использовании топических глюкокортикостероидов клинический эффект наблюдался только в период использования препаратов и был нестойким.

Таблица 7 – Изменение индексов PASI и ДИШС в процессе лечения (M \pm SE)

| | День 0 | День 14 | День 28 | День 180 (6 мес.) |
|------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| PASI | 10,38 \pm 0,64 | 6,43 \pm 0,34 | 9,92 \pm 0,71 | 9,65 \pm 0,72 |
| ДИШС | 22,11 \pm 0,93 | 16,11 \pm 0,70 | 19,61 \pm 0,97 | 18,71 \pm 0,77 |

Примечание: PASI – индекс активности и степени тяжести заболевания; ДИШС – дерматологический индекс шкалы симптомов.

Были исследованы показатели субпопуляционного состава мононуклеарных клеток капиллярной и венозной крови больных псориазом в процессе лечения в сравнении со здоровыми. На момент окончания использования препарата (14 день исследования) в капиллярной крови обнаружено снижение M1 с 79,89% до 71,96% и подъем уровня M2 с 7,11% до 10,73%. В том же сроке в венозной крови выявлен подъем уровня M2 с 8,06% до 11,62%. Однако уровни этих параметров все еще значительно отличались от соответствующих уровней здоровых ($p < 0,05$). На 28 день наблюдения в капиллярной крови больных группы 1a выявлено значимое снижение, по сравнению с исходным уровнем, процента субпопуляции CD45RA⁺/CD45R0⁺ с 13,63% до 10,67%, Tfh – с 15,42% до 13,27%, B1-клеток с 21,23% до 16,45%, NK-клеток с 10,26% до 7,72%, а моноцитов M_{int} с 9,49% до 8,01%. Субпопуляция NK-клеток была значимо снижена и по отношению к исходному уровню, и к здоровому контролю ($p < 0,05$). В венозной крови уровень субпопуляции CD4⁺CD45R0⁺ значимо повысился с 21,70% до 24,79% и стал значимо превышать уровень здорового контроля ($p < 0,05$). Уровень NK-клеток снизился с 9,47% до 8,15%, и, как в капиллярной крови, стал значимо снижен относительно группы сравнения. Уровень M_{int} значимо снизился с 8,29% до 6,07% и оставался значимо ниже уровня здорового контроля. Уровень Treg, T_{act}, NKT-, B-клеток и Vreg продолжал значимо превышать уровень здорового контроля и в капиллярной, и в венозной крови.

Таким образом, можно заключить, что изменения в субпопуляционном составе мононуклеаров в результате лечения отмечались и в капиллярной, и в венозной крови, но в капиллярной крови наблюдалась более выраженная динамика.

Анализ изменений цитокинового профиля по результатам лечения в группе 1a показал, что цитокины-маркеры основных субпопуляций Т-хелперов отвечали на проводимое лечение (рисунки 4).

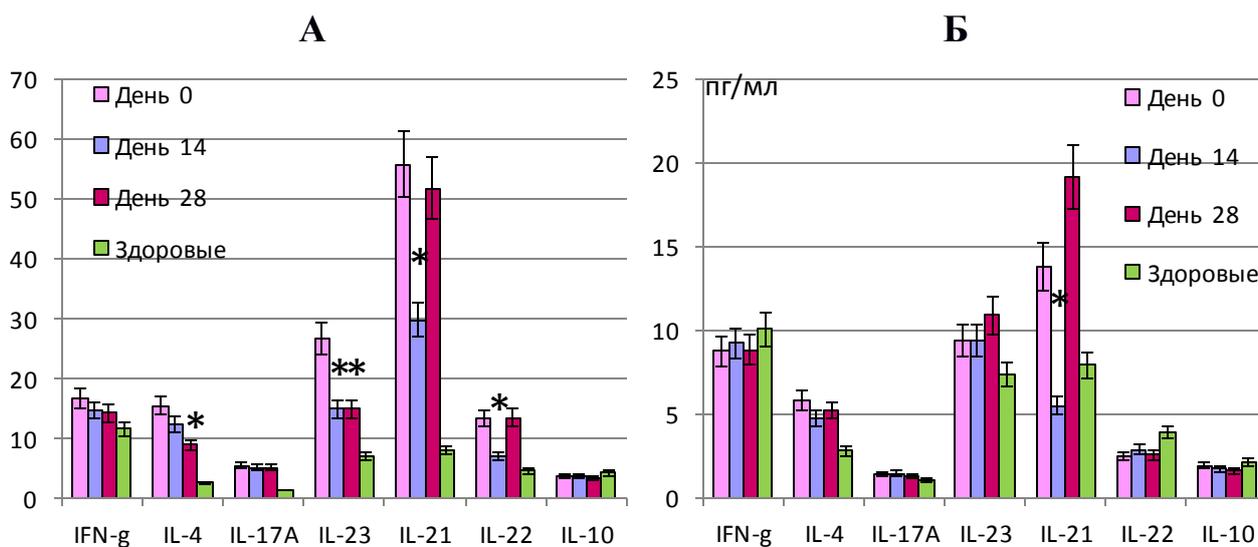


Рисунок 4 – Динамика уровней цитокинов-маркеров основных субпопуляций Т-хелперов у пациентов группы 1a в результате лечения

Примечание: А – капиллярная кровь; Б – венозная кровь; * $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем

В венозной крови на момент окончания лечения было выявлено значимое снижение только IL-21 (цитокин-маркер Tfh) до 5,49 пг/мл, однако через 2 недели уровень этого цитокина вновь поднялся до 19,15 пг/мл, превысив и исходно повышенный уровень. В капиллярной крови на момент окончания лечения (14 день) обнаружено значимое снижение IL-21 (Tfh) с 55,68 до 29,79 пг/мл и IL-22 (Th22) с 13,19 до 6,99 пг/мл, но через 14 дней после завершения лечения уровни этих цитокинов вернулись к изначально повышенным значениям. При этом уровень IL-23 (Th17) снизился с 26,71 до 14,92 пг/мл и оставался на этом уровне на 28 день наблюдения, а уровень IL-17A, также продуцируемый Th17, оставался без изменений повышенным. Концентрация IL4 (Th2), значимо снизилась только на 28 день наблюдения с 15,40 пг/мл до 8,93 пг/мл ($p < 0,05$). Концентрация IL-10 не менялась в течение 28 дней наблюдения ни в капиллярной, ни в венозной крови.

На рисунке 5 представлена динамика уровней провоспалительных цитокинов.

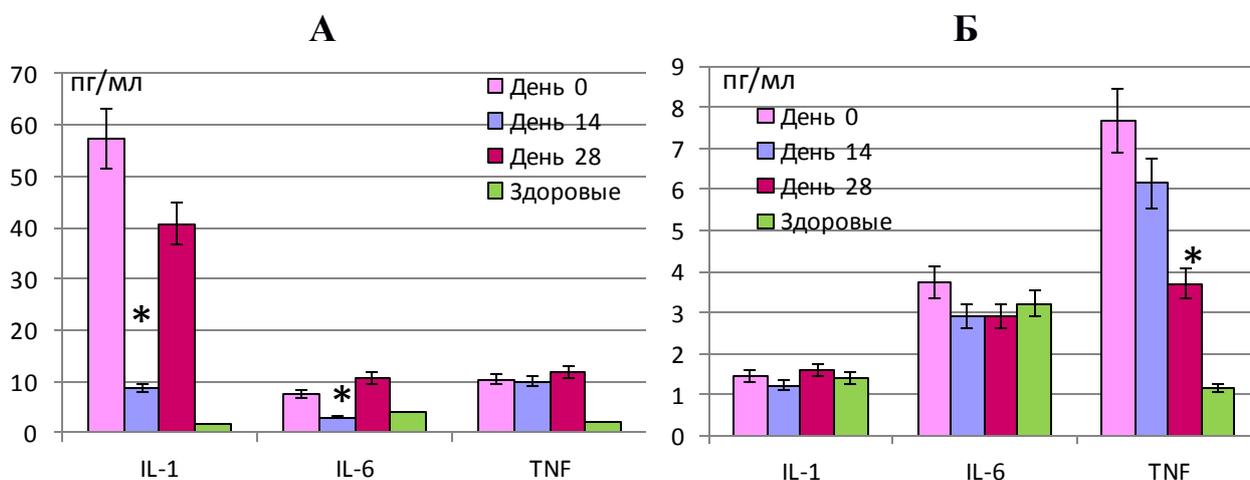


Рисунок 5 – Динамика уровней провоспалительных цитокинов в крови пациентов группы 1а в результате лечения

Примечание: А – капиллярная кровь; Б – венозная кровь; * $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем. ($p < 0,05$).

Уровень IL-1 β в капиллярной крови, исходно повышенный более чем в 30 раз, значимо снижался на 14-й день до 8,63 пг/мл, но все еще превышал уровень группы сравнения в 4,6 раза. На 28 день он вновь возрастал до 40,69 пг/мл. Уровень IL-6 исходно превышал параметр группы сравнения в 1,8 раза, но на момент окончания лечения понизился до 3,02 пг/мл, что было сопоставимо с уровнем группы 2, но через 14 дней после лечения снова поднялся до 10,63 пг/мл, превысив даже исходный уровень группы больных псориазом. В то время как уровень TNF был повышен и не реагировал на лечение. При этом в венозной крови больных псориазом уровни IL-1 β и IL-6, изначально не отличавшиеся от группы сравнения, не менялись в процессе лечения. А концентрация TNF, исходно превышавшая уровень группы сравнения в 6,6 раза, снизилась на момент окончания лечения до 6,14 пг/мл, а еще через 14 дней до 3,69 пг/мл. Различия с исходным уровнем были значимы, но уровень TNF все еще значимо превышал параметр группы сравнения ($p < 0,05$).

Рисунок 6 отражает уровни цитокинов, задействованных в репарации эпителия. В капиллярной крови на момент окончания лечения выявлено значимое снижение уровня IL-25 и IL-33 с 4,68 пг/мл до 2,69 пг/мл и с 44,19 пг/мл до 22,59 пг/мл, соответственно, что стало

сопоставимо с уровнями этих параметров группы сравнения. Эти цитокины выделяются поврежденными эпителиальными клетками, сигнализируя иммунокомпетентным клеткам о возникшей проблеме.

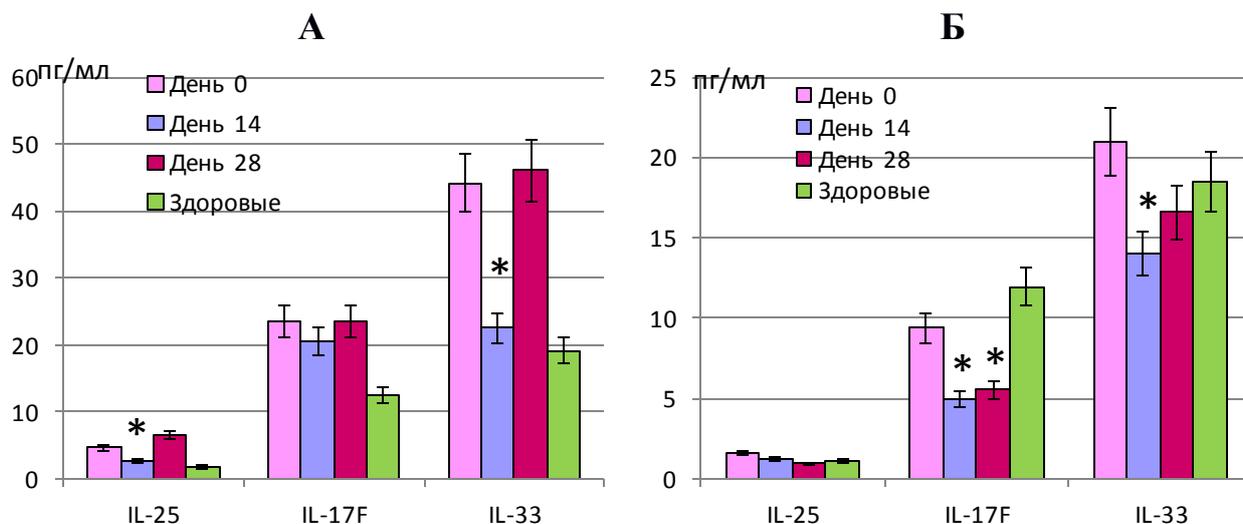


Рисунок 6 – Динамика уровней цитокинов, участвующих в защите эпителиальных клеток, в крови пациентов группы 1а в результате лечения

Примечание: А – капиллярная кровь; Б – венозная кровь; * $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем.

Спустя 14 дней после лечения уровни этих цитокинов вновь повысились до 6,47 пг/мл и 46,07 пг/мл соответственно, что практически не отличалось от исходного уровня. Уровень цитокина IL-17F, отвечающего за защиту от микроорганизмов эпителиальных клеток, в капиллярной крови оставался повышенным относительно группы сравнения во всех точках наблюдения. При этом в венозной крови выявлено значимое снижение уровней IL-17F с 9,38 пг/мл до 4,97 пг/мл на 14-й день и 5,57 пг/мл спустя еще 2 недели, что было даже ниже концентрации этого параметра в группе здоровых ($p < 0,05$). Обнаружено значимое снижение уровня IL-33 на 14-й день с 20,93 пг/мл до 14,03 пг/мл и подъем до 16,58 пг/мл, что значимо не отличалось от показателя группы сравнения. Уровень IL-25 в венозной крови не отличался от уровня контрольной группы и не менялся в ответ на лечение. Уровни IL-31 и sCD40L не изменялись в ответ на лечение ни в капиллярной, ни в венозной крови. При этом концентрация sCD40L оставалась значимо повышенной, а IL-31 не отличалась от уровня группы 2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что проводимое лечение приводит к значимым изменениям в цитокиновом профиле как капиллярной, так и венозной крови. Аналогичные результаты для венозной крови были получены рядом авторов [Gottlieb A.V., 2005, Piskin G., 2006]. При этом в капиллярной крови наблюдаются изменения в уровнях большего количества цитокинов, чем в венозной. Интересно, что в группе 1а изменения в концентрации цитокинов, зафиксированные на момент окончания лечения (14-й день), нивелируются спустя 2 недели после лечения, что сопоставимо с динамикой дерматологических индексов и согласуется с результатами других исследователей [Suarez-Farinas M., 2011, Круглова Л.С., 2022].

ВЫВОДЫ

1. Выявленные отклонения в спектре микробиоты кожи в очагах воспаления у пациентов с псориазом следует рассматривать как один из триггерных механизмов развития псориаза.

2. Результаты определения параметров клинического анализа крови, субпопуляционного состава мононуклеаров и цитокинового профиля в капиллярной и венозной крови в группе здоровых взрослых значимо не различаются, за исключением уровней Т- и В-клеток памяти, которые в капиллярной крови значимо повышены.

3. Количества капиллярной крови в 400 мкл, взятой в 2 микроветты, достаточно для исследования клинического анализа крови, 22-х субпопуляций мононуклеаров и 15-и цитокинов.

4. У больных псориазом при определении субпопуляционного состава мононуклеаров в капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки, выявляются различия с группой здоровых в уровнях 15 из 22 исследованных субпопуляций, что более информативно, чем исследование венозной крови, в которой обнаружены отклонения только в 12 из 22 субпопуляций мононуклеаров.

5. В капиллярной крови больных псориазом обнаружены значимые отклонения в концентрации 13 цитокинов из 15 исследованных, что еще более информативно, чем определение в венозной крови, где обнаружены отклонения в уровнях только 8 цитокинов.

6. При динамическом наблюдении в процессе лечения пациентов в группе леченых топическим стероидом результаты определения изменений уровней субпопуляций мононуклеаров и цитокинов в капиллярной крови были более информативны, чем в венозной крови.

7. Предложенный метод исследования субпопуляционного состава мононуклеаров и цитокинового профиля капиллярной крови, взятой вблизи псориатической бляшки, пригоден для выявления ведущего звена в иммунопатогенезе псориаза у конкретного пациента и оценки эффективности лечения; на примере пациентов с псориазом, леченых топическим стероидом (0,1% мометазоном) в течение 14 дней, предложенный метод выявлял терапевтический эффект (по снижению исходно повышенных уровней субпопуляций мононуклеаров и цитокинов) и его нивелирование после отмены препарата, что совпадало с клиническими наблюдениями (по изменению индексов PASI и ДИШС).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При исследовании иммунопатогенеза псориаза и лабораторных параметров эффективности терапии больных псориазом следует проводить исследования в капиллярной крови, взятой вблизи зоны псориатического воспаления. Это более информативно, чем исследование тех же параметров в венозной крови, и менее травматично, чем гистологическое исследование биоптата кожи.

2. При оценке иммунитета у пациентов с псориазом следует ориентироваться на пороговые разделяющие значения (cut off), рассчитанные нами для субпопуляций мононуклеаров и концентраций цитокинов в капиллярной и венозной крови, учитывая, что чем большее количество параметров отклоняется от уровней здорового контроля, пересекая значения cut off, тем сильнее иммунная система вовлечена в псориатическое воспаление.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В качестве дальнейшей перспективы развития темы планируется исследовать значимость выявленных параметров иммунитета в капиллярной крови при других воспалительных заболеваниях кожи, например экземы, имеющей аллергическую природу воспалительной реакции, или при грибковых поражениях кожи. Планируется исследование влияния различных иммуномодулирующих препаратов при терапии псориаза, используя разработанный метод оценки параметров иммунитета в капиллярной крови, взятой вблизи зоны псориазического воспаления. Также планируется проведение исследования влияния IL-36 и его рецепторного антагониста на баланс про- и противовоспалительных факторов в барьерных тканях при различной патологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus и RSCI:

1. Сенникова, С.В. Семейство интерлейкина 36 как новый регулятор воспалительного ответа в барьерных тканях / С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина // Медицинская иммунология. – 2020. – Т.22, № 1. – С.49-60. (ИФ РИНЦ – 0,907; IF Scopus – 0,7; Q-4) doi: 10.15789/1563-0625-IFA-1880.

2. Сенникова, С.В. Субпопуляционный состав мононуклеаров и цитокиновый профиль венозной и капиллярной крови больных псориазом и здоровых людей / С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, Р.Ш. Закиров, С.С. Акулова // Медицинская иммунология. – 2021. – Т. 23, № 6. – С. 1333-1346. (ИФ РИНЦ – 0,907; IF Scopus – 0,7; Q-4) doi: 10.15789/1563-0625-MSA-2391.

3. Сенникова, С.В. Изменение субпопуляционного состава мононуклеаров капиллярной и венозной крови больных псориазом в зависимости от лечения / С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина // Российский иммунологический журнал. – 2022. – Т. 25, № 4. – С. 521-528. (ИФ РИНЦ – 0,225; IF Scopus - 0,4; Q-4) doi: 10.46235/1028-7221-1159-SIM.

4. Сенникова, С.В. Отличия в спектре микробиоты кожи и параметрах локального иммунитета в очаге воспаления у дерматологических больных от здоровых людей / С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина, Е.А. Воропаева // Российский иммунологический журнал. – 2023. – Т. 26, № 4. – С. 477-484. (ИФ РИНЦ – 0,225; IF Scopus - 0,4; Q-4) doi: 10.46235/1028-7221-13086-DIT.

5. Сенникова, С.В. Изменение цитокинового профиля капиллярной и венозной крови больных псориазом в зависимости от лечения / С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина, А.А. Колобов, А.С. Симбирцев // Медицинская иммунология. – 2023. – Т.25, № 6. – С. 1395-1406. (ИФ РИНЦ – 0,907; K1; IF Scopus – 0,7; Q-4). doi: 10.15789/1563-0625-CIT-2592

Патент

6. Патент RU 2804243 С1 Российской Федерации СПК G01N 33/48 (2023.02); G01N 33/577 (2023.02) Способ определения и оценки местного иммунитета у больных псориазом / Топтыгина А.П., Сенникова С.В.; заявитель и патентообладатель ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (RU), заявл. 18.10.2022, опубл. 26.09.2023 // Бюл. – 2023. - № 27 - 13 с.: с ил.

Тезисы

7. Сенникова, С.В. Сопоставление субпопуляций мононуклеаров капиллярной и венозной крови больных псориазом и здоровых людей / С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина // 14 международный форум дерматологов и косметологов IFDC 2021 (Москва, 17-19 марта 2021): сб. тез. – Москва, 2021. – С. 81-82.

8. Сенникова, С.В. Сравнение цитокинового профиля капиллярной и венозной крови больных псориазом до и после лечения топическими стероидами и здоровых людей / С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина // Синтез науки и практики: 15-й Междунар. форум дерматовенерологов и косметологов (15-17.03.2022 г., Москва): сб. тр. – Москва, 2022. - С. 63-64.

9. Сенникова, С.В. Модуляция местного иммунитета у больных псориазом / С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина // Дни иммунологии в Санкт-Петербурге: XVII Всероссийский научный форум с

междунар. участием им. академика В.И. Иоффе (Санкт-Петербург, 05-08 июня 2023г.): тез. докладов. – Санкт-Петербург, 2023. - Режим доступа: www.immundays.spbraaci.ru.

10. Сенникова, С.В. Изменения в составе микробиоты кожи у больных псориазом поддерживают провоспалительный профиль местного иммунитета / С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина // Дерматовенерология и косметология: синтез науки и практики: 14 Всерос. форум Национального Альянса дерматологов и косметологов с международным участием (Москва, 15-16 октября 2024 г.): сб. тр. – Москва, 2024. - С.5.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|--|---|
| ВМА-Всемирная Медицинская Ассоциация | IFDC – Integrative Faculty of |
| ДИШС - дерматологический индекс шкалы симптомов | Dermatovenerologists and Cosmetologists |
| ДНК- дезоксирибонуклеиновая кислота | IFN- α, β, γ – интерферон- α, β, γ |
| МКАТ - моноклональные антитела | IL-1,2,3,4... - интерлейкин -1,2,3,4... |
| МСЧ –медико-санитарная часть | LL37 - пептид кателицидина |
| РНК- рибонуклеиновая кислота | НК- натуральные киллеры, |
| РОДВК- Российское Общество Дерматовенерологов и Косметологов | НКТ- Т-клетки, несущие рецепторы натуральных киллеров |
| Vm- В-клетки памяти | M1-классические активированные моноциты |
| Breg -регуляторные В -клетки | M2-альтеративно активированные моноциты |
| CD- кластер дифференцировки | pDC – плазмоцитойдные дендритные клетки |
| DC – дендритная клетка | PASI - Psoriasis area severity index (площадь и тяжесть псориатических поражений) |
| DLQI - Dermatology Life Quality Index | Th1,2,17,22... – Т-хелперы 1,2,17,22... типа |
| EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота | TLR - toll-подобные рецепторы |
| GCP -Good Clinical Practice | TNF - фактор некроза опухоли |
| iDC- воспалительные дендритные клетки | Treg - регуляторные Т-клетки |

Сенникова Светлана Валерьевна

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ В КАПИЛЛЯРНОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАЗОМ

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук