

На правах рукописи

Меркушова Екатерина Дмитриевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОГО
ИММУНИТЕТА В ПАТОГЕНЕЗЕ ПСОРИАЗА**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Ганковская Людмила Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Нестерова Ирина Вадимовна

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра аллергологии и иммунологии факультета непрерывного медицинского образования, профессор кафедры

доктор медицинских наук, профессор

Балмасова Ирина Петровна

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной биологии научно-исследовательского медицинского стоматологического института, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Смоленский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.05 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: г. Москва 117997, ул. Островитянова, дом 1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России по адресу: г. Москва 117997, ул. Островитянова, дом 1

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года.

Ученый секретарь диссертационного совета:

кандидат медицинских наук, доцент

Кузнецова Татьяна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Псориаз (Пс) является хроническим генетически детерминированным дерматозом мультифакториальной природы, характеризующимся гиперпролиферацией эпидермальных клеток, нарушением дифференцировки кератиноцитов, воспалительной реакцией в дерме и изменениями в органах и тканях. В последние годы псориаз рассматривается как комплексное заболевание, сочетающее признаки аутовоспалительного и аутоиммунного процессов. Псориаз является одним из самых распространенных воспалительных заболеваний кожи, в среднем от него страдает 2-5% всей мировой популяции. В 30% случаев заболевания псориазом наблюдается осложнение в виде псориатического артрита, который существенно снижает качество жизни пациентов [Oddie A., 2020].

Актуальной проблемой в настоящее время является понимание патогенетических факторов развития псориаза и псориатического артрита. В течение длительного времени предметом для дискуссии был вопрос о том, что является первичным при развитии псориатического воспаления – гиперактивация иммунной системы или нарушение пролиферации и дифференцировки кератиноцитов. В 1995 году группой ученых во главе с Gottlieb S.L была показана главенствующая роль иммунной системы в патогенезе псориаза. Также было показано, что аномальная пролиферация кератиноцитов активируется под действием IL-17, вырабатываемых активированными Th17, что обусловило использование препаратов направленных на блокирование указанного цитокина.

В последние годы все большее внимание направлено на изучение роли врожденного иммунитета в патогенезе псориаза. Важнейшими рецепторами врожденного иммунитета являются паттерн-распознающие рецепторы (PRR - pattern recognition receptors), которые обеспечивают распознавание сигналов опасности экзо- и эндогенной природы PAMP (pathogen-associated molecular pattern) и DAMP (damage - associated molecular pattern), соответственно. Активация эндосомальных TLRs, к которым относят TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, является первым сигналом к индукции синтеза молекул предшественников провоспалительных цитокинов proIL-1 β и proIL-18, играющих важную роль в

развитии псориатического воспаления [Harden J.L., 2015].

В то время как TLR действуют как поверхностные рецепторы, обнаруженные на мембранах клеток и эндосом, NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors, NLRs) являются цитозольными рецепторами, участвующими в обнаружении внутриклеточных патогенов и побочных продуктов повреждения тканей. Эти рецепторы также относятся к семейству PRRs, активация которых приводит к олигомеризации и запуску инфламмосомы. Далее происходит созревание про-каспаз, что обеспечивает процессинг незрелых цитокинов proIL-1 β и proIL-18 в их активные формы [Krishnaswamy J.K., 2013]. Также необходимо отметить, что формирование инфламмосомных комплексов активирует пироптоз - воспалительную смерть клетки.

Помимо факторов врожденного иммунитета, активация которых обеспечивает формирование и поддержание воспалительного процесса, важнейшую роль в патогенезе псориаза играют генетические факторы. В исследовании Harden J.L. была подтверждена генетическая основа псориаза и псориатического артрита семейными, популяционными эпидемиологическими исследованиями, исследованиями ассоциаций с антигенами лейкоцитов человека (HLAs), определением генных связей и исследованиями полиморфизмов генов-кандидатов, белковые продукты которых участвуют в патогенезе заболевания [Harden J.L., 2015].

В последние годы появились немногочисленные данные о роли инфламмосом NLRP3 и NLRP1 в патогенезе Пс, однако точный механизм их участия в патогенезе до конца не выяснен. В настоящее время не проведено комплексных исследований, позволяющих оценить вклад в развитие псориатического воспаления комплексов NLRP1 и NLRP3 и расшифровать механизмы патогенеза псориаза. Исследование молекулярных механизмов системы врожденного иммунитета позволит выявить новые подходы к прогнозу и разработке таргетной терапии псориаза.

Степень разработанности темы исследования

Работы многих исследователей посвящены изучению роли иммунной

системы в патогенезе псориаза и псориатического артрита. Однако, большинство из них сфокусировано на адаптивном иммунном ответе и влиянию цитокиновой регуляции (Blauvelt A et al., 2017, Prinz J et al., 2018, Карапетян Ш.В. и соавт., 2018). В настоящее время на основании экспериментальных и клинических исследований показано значимое влияние врожденного иммунитета на инициацию и развитие псориатического воспаления, а также важный вклад в аутовоспалительный компонент заболевания, однако, точные механизмы остаются не до конца выясненными.

Цель настоящего исследования

Изучение молекулярно-генетических механизмов врожденного иммунитета у пациентов с псориазом и псориатическим артритом.

Задачи исследования:

1. Оценить экспрессию генов распознающих рецепторов *TLR7*, *TLR9* в биоптатах пораженной и непораженной кожи больных псориазом в сравнении с биоптатами кожи здоровых доноров.
2. Изучить экспрессию генов инфламмосомных комплексов (*NLRP1*, *NLRP3*, *CASP1*, *CASP5*, *ASC*) и цитокинов *IL1B*, *IL18* в биоптатах пораженной и нормальной кожи больных псориазом и биоптатах кожи здоровых доноров.
3. Провести иммуногистохимический анализ экспрессии *TLR9*, *CASP5*, *IL-18* в биоптатах из псориатического очага и визуально здоровой кожи больных с псориазом.
4. Исследовать ассоциацию и частоты встречаемости генотипов и аллелей однонуклеотидных полиморфизмов в генах распознающих рецепторов, участвующих в патогенезе псориаза: *TLR7* (rs4696480), *TLR9* (rs187084) у больных с псориазом и псориатическим артритом.
5. Выявить наиболее значимые маркеры системы врожденного иммунитета, ассоциированных с развитием псориатического процесса.

Научная новизна работы

В данной работе впервые проведено комплексное исследование показателей врожденного иммунитета, включая экспрессию генов распознающих рецепторов *TLR9*, *TLR7*, компонентов инфламмосомного комплекса *NLRP1*, *NLRP3*, *CASP1*,

CASP5, *ASC*, а также генов цитокинов *IL1B*, *IL18* в биоптатах поражённой и непоражённой кожи пациентов с псориазом по сравнению с показателями здоровых доноров.

У пациентов с псориазом гиперэкспрессия генов *TLR9*, *NLRP1*, *CASP1*, *CASP5* и *IL18* характерна как для кожи псориатического очага, так и неизменной кожи, что указывает на системность патологического процесса.

Представлены данные о распространенности аллелей генов врожденного иммунитета *TLR7* (*rs4696480*), *TLR9* (*rs187084*) у пациентов с псориазом и псориатическим артритом в славянской популяции.

Впервые представлены данные об ассоциации полиморфизмов генов *TLR7* (*rs4696480*), *TLR9* (*rs187084*) врожденного иммунитета с развитием псориатического артрита у пациентов с псориазом.

С помощью иммуногистохимического метода получены новые данные об экспрессии молекул TLR9, CASP5, IL-18 в биоптатах кожи псориатического очага и визуально неизменной кожи. Показано усиление экспрессии TLR9 и CASP5 в очагах псориатического воспаления по сравнению с непоражённой кожей. При этом показатели экспрессии IL-18 в поражённой и визуально здоровой коже были сопоставимы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определение экспрессии генов врожденного иммунитета *TLR9*, а также компонентов инфламасомных комплексов *NLRP1*, *NLRP3* и цитокинов *IL1B*, *IL18* в биоптатах поражённой и непоражённой кожи пациентов с псориазом могут быть использованы в качестве потенциальных маркеров прогрессирования и распространения воспалительного процесса при псориазе и прогноза его течения.

Обнаружение гомозиготного варианта ТТ в *TLR9* (*rs187084*) у пациентов с псориазом может быть использовано в качестве предиктивного маркера развития псориатического артрита.

Полученные в результате исследования данные могут послужить основой для создания панели экспрессионных маркеров для пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением псориаза для коррекции, оценки эффективности лечения

псориаза и псориатического артрита, а также стать потенциальными мишенями для разработки таргетной терапии.

Методология и методы исследования

Проведено сравнительное исследование с участием пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением псориаза. У пациентов основной группы и группы контроля получали образцы периферической крови для определения полиморфизмов генов *TLR7*, *TLR9* и биоптаты пораженной и визуальной здоровой кожи для исследования уровня экспрессии генов врожденного иммунитета *TLR7*, *TLR9*, *NLRP3*, *ASC*, *CASP1*, *NLRP1*, *CASP5*, *IL1B*, *IL18* методом ПЦР-РВ с обратной транскрипцией, а также для определения экспрессии белков TLR9, CASP5, IL-18 с помощью иммуногистохимического окрашивания биоптатов.

Положения выносимые на защиту

1. У пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением псориаза выявлены нарушения в системе врожденного иммунитета. Дисбаланс проявляется в гиперэкспрессии генов распознающих рецепторов *TLR7*, *TLR9*, компонентов инфламмосомного комплекса *NLRP1*, *CASP1*, *CASP5* и генов цитокинов *IL1B*, *IL18* в биоптатах пораженной кожи пациентов с псориазом. Это свидетельствует о воспалительной реакции и нарушении локальных механизмов врожденного иммунитета в псориатическом очаге. Определено увеличение экспрессии генов *TLR9*, *NLRP1*, *CASP5*, *IL18*, как в пораженной и непораженной кожи у пациентов с псориазом, что указывает на системность воспалительного процесса. Иммуногистохимическое исследование подтвердило усиление экспрессию TLR9, CASP5 в биоптатах пораженной кожи по сравнению с показателями неизменной кожи.
2. Показаны различия в частоте встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма *TLR9* (rs187084) в исследуемых группах. Наличие у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением псориаза гомозиготного варианта ТТ в *TLR9* (rs187084) увеличивает риск развития псориатического артрита

3. На основании проведенного исследования выявлены иммунологически значимые маркеры врожденного иммунитета у пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением псориаза: *TLR9, NLRP1, CASP1, CASP5, IL18*.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточной выборкой пациентов, включенных в исследование, использованием современных методов исследования, соответствующих поставленным цели и задачам. Различия считались статистически достоверными при значении $p < 0,05$. Выводы и практические рекомендации подкреплены данными, представленными в таблицах и рисунках, соответственно вытекают из результатов исследования и подтверждают положения, выносимые на защиту.

Апробация результатов диссертационной работы

Основные положения диссертационной работы были представлены на 17th International Congress of Immunology (Beijing, China, 2019), IV Объединенном иммунологическом форуме (Новосибирск, Россия, 2019), Международной научной конференции "Вакцинология как ответ биологическим угрозам", посвященной 100-летию со дня основания Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Москва, Россия, 2019), EAACI HYBRID CONGRESS 2021 (Krakow, Poland, 2021).

Личный вклад автора

Автором самостоятельно были выполнены: работа и анализ с литературными источниками, разработка дизайна исследования, формулирование цели и задач, выделение нуклеиновых кислот из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени, статистическая обработка данных и интерпретация полученных результатов и формулированием выводов. Автор лично участвовал в подготовке всех публикаций по данной работе, а также лично написал и оформил данную рукопись.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.03.09. – клиническая иммунология, аллергология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности и паспорту специальности клинической иммунологии, аллергологии.

Реализация и внедрение полученных результатов в практику

Основные результаты работы используются в учебном и научном процессе на кафедре иммунологии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России. Результаты работы внедрены в практическую деятельность амбулаторного отделения клиники «Личный доктор - ООО Родина».

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационной работы опубликовано 6 печатных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка использованной литературы. Работа изложена на 117 страницах, содержит 19 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 182 библиографических источника, в том числе 5 отечественных и 177 зарубежных публикаций.

Содержание работы

Объекты исследования. В качестве биологического материала в настоящей работе исследовали периферическую кровь здоровых доноров и пациентов со среднетяжёлым и тяжелым течением псориаза, а также с псориатическим артритом. Также были использованы биоптаты нормальной и пораженной кожи у пациентов со среднетяжёлым и тяжелым течением псориаза и здоровых доноров.

Критериями включения в исследование являлись наличие у пациента псориаза среднетяжелого и тяжелого течения (PASI>10), длительность течения

кожного процесса у больных псориазом составляла не менее 2 лет, наличие у пациента с псориазом псориатического артрита (для группы с псориатическим артритом); согласие больного на участие в исследовании.

Критериями исключения являлись: возраст пациентов до 18 лет и старше 65 лет, наличие тяжелой соматической патологии, наличие острых заболеваний или обострения хронических болезней, у женщин наличие беременности, наличие ВИЧ-инфекции, желание пациента или законных представителей.

В исследование было включено 139 пациентов с псориазом в возрасте от 18 до 65 лет, среди них 108 мужчин и 31 женщина, с установленным диагнозом. Группу пациентов с псориатическим артритом составили 14 мужчин и 15 женщин в возрасте от 26 до 65 лет. Все пациенты проходили обследование в Московском научно-практическом центре дерматовенерологии и косметологии филиал Коломенский (заведующий филиала – Маляренко Е.Н.). Также у 21 пациента (средний возраст 34 ± 11), была взята биопсия из псориатического очага и визуально здоровой кожи с помощью дерматологического пробойника. Биопсии здоровой кожи были взяты у 11 доноров без сопутствующих патологий. На первом этапе из периферической крови выделялась ДНК для определения полиморфизмов. Из биоптатов пораженной и здоровой кожи выделяли РНК для изучения с помощью «Набора для выделения ДНК/РНК из клинического материала» (Интерлабсервис, Россия).

Оценка экспрессии метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для постановки реакции обратной транскрипции использовали «Набор для проведения обратной транскрипции (ОТ)» (Синтол, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Далее проводили ПЦР в реальном времени в присутствии SYBR Green (ДТ-96). Праймеры и реактивы для ПЦР реакции были синтезированы фирмой Синтол (Россия). Экспрессию целевых генов нормализовали на ген домашнего хозяйства – β -актин, оценивали по методу $\Delta\Delta C_t$ [Ребриков Д.В., 2021].

Оценка полиморфных маркеров проводилась методом ПЦР-РВ с TaqMan пробами. В реакции были использованы наборы «ПЦР-Комплект» (Синтол,

Россия), а также праймеры и флуоресцентные зонды для детектирования продуктов реакции.

Иммуногистохимическое исследование. Материал фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине и после гистологической проводки заливали в парафин. Для гистологического исследования срезы толщиной 3-4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования срезы толщиной 3-4 мкм монтировали на высокоадгезивные предметные стекла (“Thermo Scientific Menzel Gläser”). Депарафинирование и ИГХ-исследование проводилось по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуностейнере BenchMark ULTRA. Использовали моноклональные антитела к IL-18 (PAA064Hu01, производитель Cloud-Clone Corp., разведение 1:50), поликлональные антитела к Caspase5 (PAA770Hu01, производитель Cloud-Clone Corp., разведение 1:50), поликлональные антитела к TLR9 (PAA709Hu01, производитель Cloud-Clone Corp., разведение 1:50). Срезы докрашивались гематоксилином. Количественную оценку экспрессии IL-18, Caspase5, TLR9 проводили при помощи программного обеспечения для анализа изображений QuPath [Bankhead P., 2017]. Оценивалась интенсивность цитоплазматической экспрессии в эпидермисе.

Статистические методы обработки полученных данных. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 6.0, GraphPad Prism 5, Microsoft Excel 2010. Для оценки нормального распределения использовался критерий χ -квадрат с поправкой Йетса на непрерывность. Для оценки достоверности различий между исследуемыми группами был применен критерий Краскилла-Уоллиса. Различие показателей считалось достоверным при уровне значимости 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка экспрессии генов TLR7, TLR9 в биоптатах пораженной и непоражённой кожи пациентов с псориазом.

На первом этапе работы были проанализированы уровни экспрессии генов *TLR7* и *TLR9* в псориатическом очаге и в визуально здоровой коже при псориазе.

Предполагается, что исследуемые рецепторы играют важную роль в распознавании предполагаемых аутоантигенов при псориазе - оцРНК и CpG ДНК, выделяющиеся из разрушенных кератиноцитов при псориазе. Взаимодействие с лигандами вызывает активацию исследуемых рецепторов и может приводить к экспрессии генов инфламмосомных комплексов NLRP1 и NLRP3. Нами было показано, что экспрессия генов *TLR7* и *TLR9* в образцах кожи, пораженной псориазом, была повышена в сравнении с экспрессией этих генов в биоптатах кожи группы здоровых доноров в 1,7 ($p = 0,034$) и 4,8 раза ($p = 0,000329$), соответственно (рисунок 1). Также была проведена сравнительная оценка экспрессии генов *TLR7* и *TLR9* в клетках непораженной кожи больных Пс и в клетках здоровой кожи группы сравнения. В биоптатах визуально непораженной кожи при Пс показано увеличение экспрессии гена *TLR9* в 4,3 раза ($p = 0,00124$). Уровень экспрессии *TLR7* достоверно не изменялся (рисунок 1).

Необходимо отметить, что уровни экспрессии генов *TLR7* и *TLR9* в кератиноцитах пораженной и непораженной кожи пациентов с Пс достоверно не отличались ($p = 0,165$ и $p = 0,11$, соответственно).

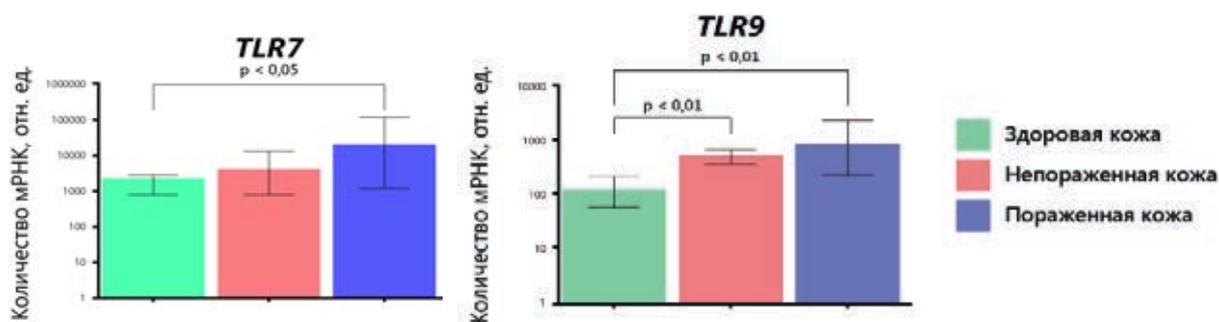


Рисунок 1 - Экспрессия генов *TLR7* и *TLR9* в биоптатах пораженной и непораженной кожи больных псориазом и здоровой кожи доноров группы сравнения (графики представлены в логарифмических координатах).

Оценка экспрессии генов инфламмосомных комплексов NLRP3 (*NLRP3*, *ASC*, *CASP1*) и NLRP1 (*NLRP1* и *CASP5*) в биоптатах пораженной и непораженной кожи пациентов с псориазом.

На следующем этапе работы была оценена экспрессия генов инфламмосомных комплексов NLRP3 (*NLRP3*, *ASC*, *CASP1*) и NLRP1 (*NLRP1* и

CASP5), в пораженной и непораженной коже больных, а также в коже здоровых доноров.

Выявлена гиперэкспрессия гена CASP1 в биоптатах кожи из псориатического очага в 10,3 раз ($p = 0,012$) и в 8 раз в биоптатах непораженной кожи ($p = 0,02$). При этом статистически достоверных различий в экспрессии генов *NLRP3* и адаптерного белка *ASC* в очаге пораженной кожи и визуально здоровой кожи не выявлено. ($p = 0,102$ и $p = 0,182$ соответственно) (рисунок 2). По данным литературы известно, что комплекс NLRP1 активирует процессинг незрелой формы каспазы-1, увеличение экспрессии которой было показано выше. Кроме того, имеются данные о том, что инфламмосомный комплекс NLRP1 реализует свою функцию протеолитического расщепления молекулы про-каспазы-5 без участия адаптерного белка ASC.

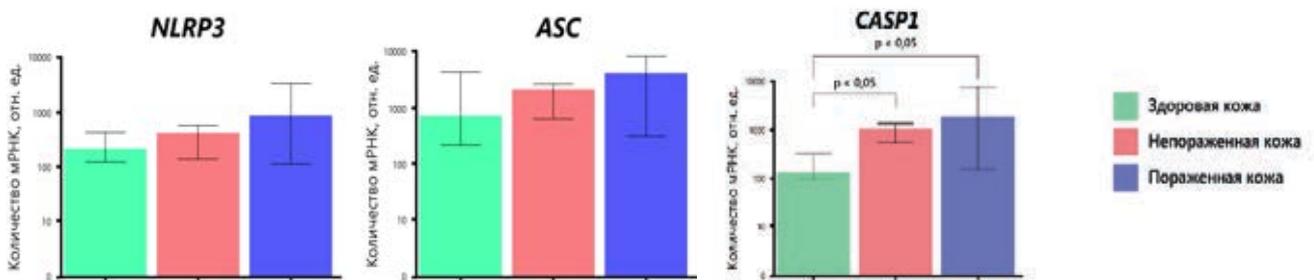


Рисунок 2 - Экспрессия генов компонентов инфламмосомного комплекса NLRP3 в биоптатах пораженной и непораженной кожи больных псориазом и здоровой кожи доноров группы сравнения.

В кератиноцитах пораженной кожи было показано повышение экспрессии гена *NLRP1* в 5 раз ($p = 0,04811$) по сравнению с таковыми контрольной группе. Кроме того, необходимо отметить, значимое повышение экспрессии *CASP5* в клетках псориатического очага в 200 раз ($p = 0,000167$) относительно экспрессии в коже здоровых доноров. В биоптатах визуально здоровой кожи пациентов с псориазом было отмечено статистически достоверное увеличение экспрессии гена *NLRP1* в 3,4 раза ($p = 0,001243$) и гена *CASP5* в 194 раза ($p = 0,000169$) по сравнению с исследуемыми показателями в группе сравнения (рисунок 3).

Столь значимое увеличение экспрессии *CASP5*, вероятно, связано с

постоянной стимуляцией аутоантигеном рецепторов врожденного иммунитета TLR7, 9, гиперэкспрессия которых нами была показана ранее, и активацией NFκB.

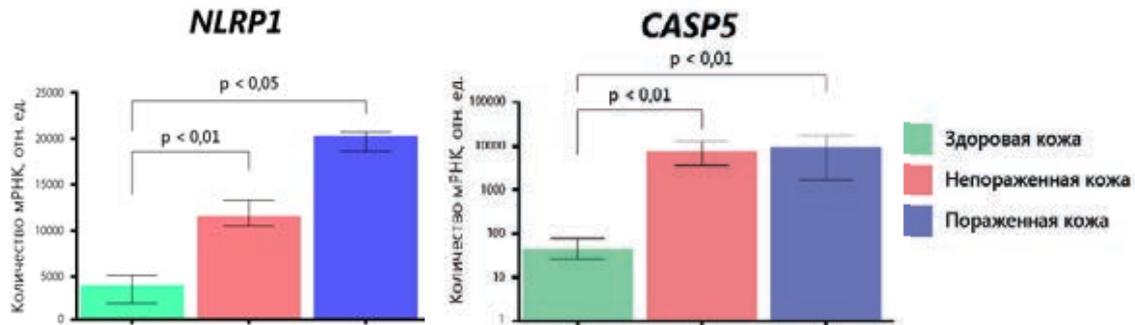


Рисунок 3 - Экспрессия генов инфламмасомного комплекса NLRP1: *NLRP1* и *CASP5* в биоптатах пораженной и непораженной кожи больных псориазом и здоровой кожи доноров группы сравнения.

Этот фактор обеспечивает транскрипцию инфламматорных цитокинов и прогрессирующих их каспаз, поддерживая петлю положительную обратной связи при воспалении. Важно отметить, что уровни экспрессии генов инфламмасом NLRP1 и NLRP3 достоверно не отличались в псориазическом очаге и участках непоражённой кожи у больных псориазом. Полученные результаты подтверждают выдвинутое нами предположение, что комплекс NLRP1 играет значимую роль в патогенезе псориазического воспаления.

Оценка экспрессии генов *IL1B*, *IL18* в биоптатах пораженной и непоражённой кожи пациентов с псориазом.

Активация инфламмасомных комплексов NLRP1 и NLRP3 обеспечивает формирование зрелых активных форм IL-1β и IL-18, поэтому нами был исследован уровень экспрессии генов этих цитокинов. В биоптатах пораженной и непоражённой кожи больных псориазом было показано увеличение экспрессии генов *IL1B* и *IL18*. В кератиноцитах пациентов основной группы нами было выявлено статистически значимое увеличение уровня экспрессии гена *IL1B* в 2,1 раза по сравнению с показателем контрольной группы ($p = 0,04$). Экспрессия гена *IL18* также была увеличена: в 8,4 раз по отношению к группе сравнения ($p = 0,02$). В непораженной коже пациентов с псориазом не было показано статистически

достоверного увеличения экспрессии *IL1B* ($p = 0,34$), напротив, экспрессия *IL18* была выше в 5,9 раз по сравнению с контрольной группой ($p = 0,03$) (рисунок 4). Полученные нами данные согласуются с результатами, полученными в ходе эксперимента Flistiak et al., где было продемонстрировано повышение концентрации IL-18 в плазме, и выявлена корреляция между ее уровнем и степенью тяжести псориатического процесса в соответствии с индексом PASI.

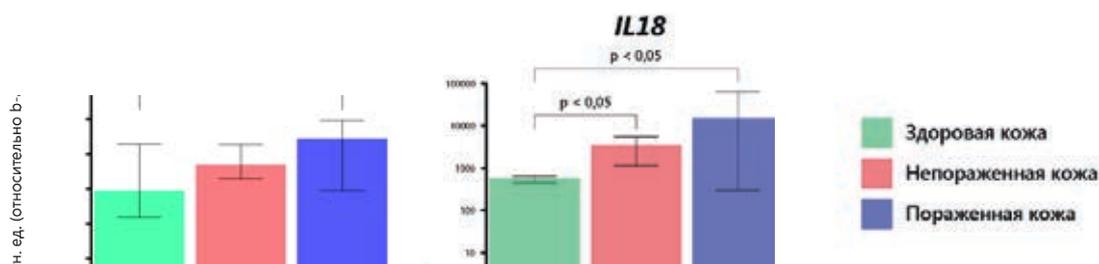


Рисунок 4 - Экспрессия генов *IL1β* и *IL18* в биоптатах пораженной и непораженной кожи больных псориазом и в биоптатах здоровой кожи доноров группы сравнения.

3.5 Иммуногистохимическое исследование экспрессии TLR9, CASP5, IL-18 в биоптатах пораженной и непоражённой кожи пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением псориаза

При морфологическом исследовании в биоптатах из зон псориатического поражения были выявлены гипер- и паракератоз, акантоз, очаговый гипогранулёз. В дерме периваскулярно отмечалась слабо выраженная поверхностная лимфоцитарная инфильтрация в сравнении с непораженной кожей.

Нами была проанализирована экспрессия молекулы TLR9, повышение экспрессии гена которого было показано выше. При иммуногистохимическом исследовании экспрессия рецептора TLR9 была выявлена как в образцах кожи псориатического очага, так и в биоптатах непоражённой кожи. При этом в

кератиноцитах пораженных участков, экспрессия распознающего рецептора была выше (рисунок 5 а,б)

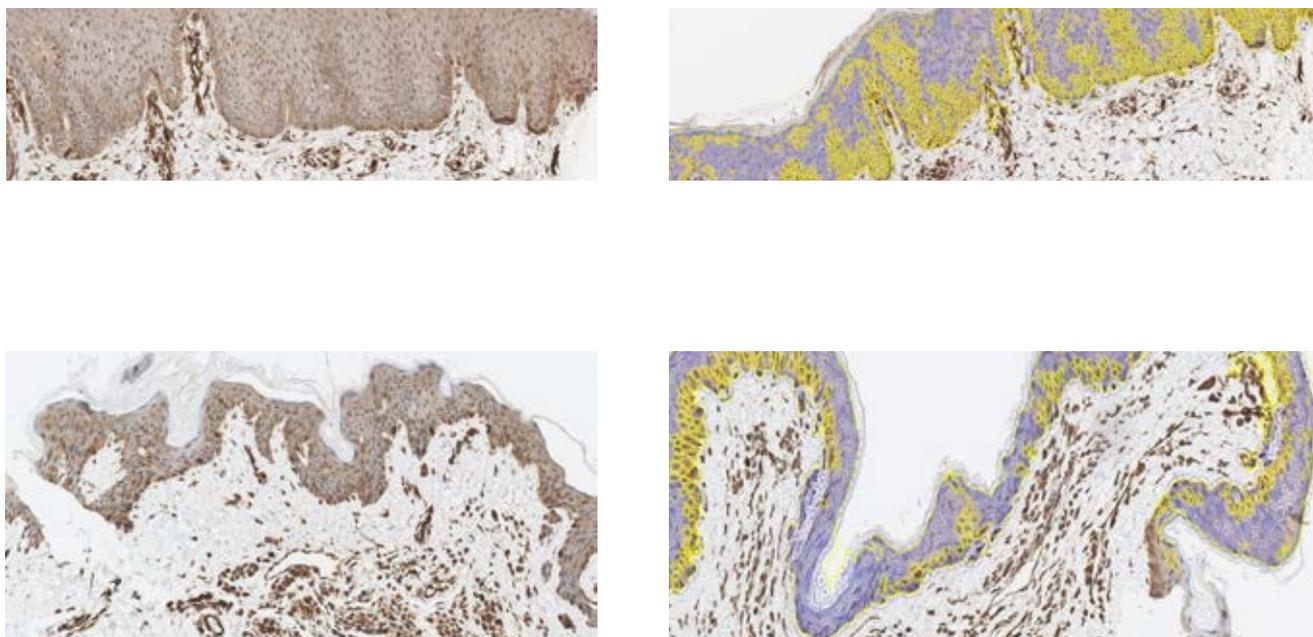


Рисунок 5 - Иммуногистохимическое исследование с антителами к TLR9 биоптатов пораженной кожи (а,б) и неповрежденной кожи (в,г) пациентов с псориазом (x200). На рисунках б) и г) представлена позитивность и интенсивность экспрессии TLR9 (проанализировано программой QuPath). Желтым цветом выделены очаги слабой позитивности, сиреневым цветом – отсутствие экспрессии.

Активация эндосомального рецептора TLR9 при псориазе лигандами LL37/ДНК может вызывать выработку различных провоспалительных цитокинов, включая TNF- α , IL-1 и IL-6, а также интерферонов типа I. Эти цитокины активируют Т-клетки в клетки Th1, Th22 и Th17, тем самым дополнительно стимулируя выработку цитокинов, которые способствуют активации и пролиферации кератиноцитов и рекрутированию воспалительных клеток, таких как нейтрофилы и макрофаги, в псориазные поражения. Эти события приводят к хроническому воспалению кожи.

Далее нами был исследован уровень экспрессии CASP5, которая в составе инфламмосомных комплексов NLRP1 и NLRP3 участвует в процессинге IL-1 β и IL-18. Было продемонстрировано повышение экспрессии CASP5 в биоптатах

пораженной кожи, что соответствует повышению экспрессии уровня исследуемого гена (рисунок ба, б). Необходимо отметить, что при высокой экспрессии гена *CASP5* в непораженной коже пациентов с псориазом, уровень экспрессии белка значительно ниже, чем в биоптатах псориатического очага (рисунок бв, г). Вероятно, это обусловлено наличием посттранскрипционной регуляции, обеспечивающий снижение выработки *CASP5*.

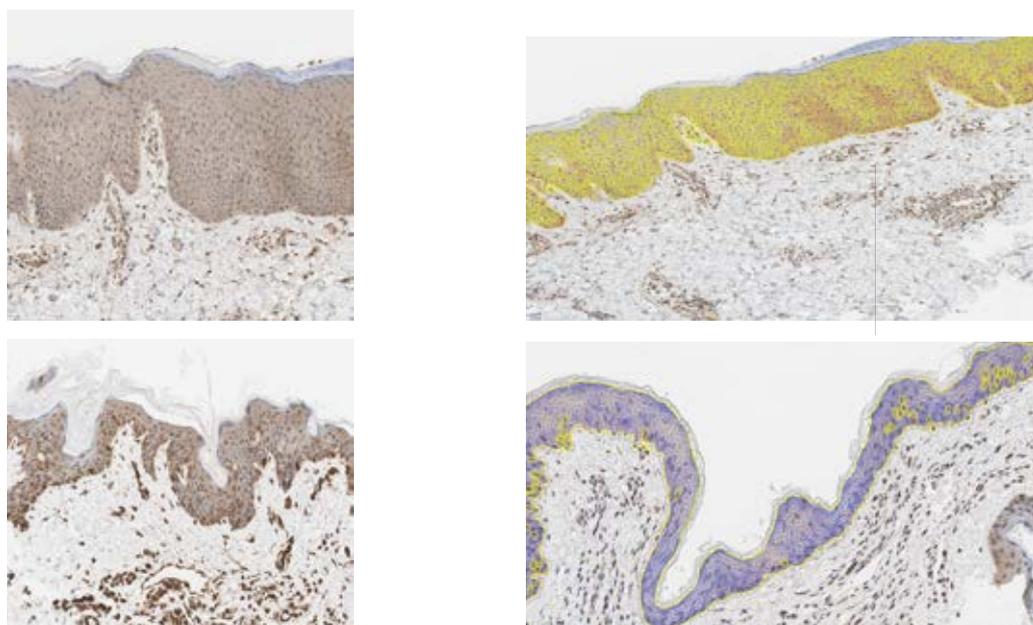


Рисунок 6 - Иммуногистохимическое исследование с антителами к *CASP5* биоптатов пораженной кожи (а,б) и непораженной кожи (в,г) пациентов с псориазом (x200). На рисунках б) и г) представлена позитивность и интенсивность экспрессии *CASP5* (проанализировано программой QuPath). Желтым цветом выделены очаги слабой позитивности, оранжевым цветом - очаги умеренной позитивности (указано стрелкой), сиреневый – отсутствие экспрессии *CASP5*.

Существуют противоречивые исследования экспрессии каспазы-5 в кератиноцитах кожи. В коже кератиноциты являются основным источником IL-1 β и IL-18, но механизмы продукции этих цитокинов с помощью процессинга через *CASP5* при псориатическом воспалении Th1/Th17 остаются неизвестными [Shi J., 2014]. В исследовании Salskov-Iversen M.L. каспаза-1 была описана как ассоциированная с созреванием IL-1 β при псориазе [Salskov-Iversen M.L., 2011]. В нашем исследовании показано, что экспрессия *CASP5* в большей степени

активируется при псориатических поражениях кожи. По сравнению с другими воспалительными комплексами, такими как NLRP3 и AIM2, экспрессируемыми в кератиноцитах, NLRP1 может активировать CASP5 помимо CASP1. Подавление CASP1, NLRP3 и AIM2 в кератиноцитах позволяет предположить, что устойчивая активность IL-18 поддерживается активностью NLRP1 и связанной с ней CASP5.

Таким образом, помимо других инфламмасом, активных в кератиноцитах, NLRP1 способен вносить вклад в продукцию IL-18, особенно в присутствии IL-17A. Данные литературы и результаты проведенного нами исследования показывают значительную роль CASP5 в регуляции псориатического воспаления. Активация компонентов врожденного иммунитета, в том числе TLR9 и CASP5, гиперэкспрессия которых была нами показана, включение соответствующих молекулярной каскадов передачи сигнала обеспечивает усиление выработки провоспалительных цитокинов. Это способствует направлению дифференцировки наивных Th в Th1/Th17, ключевая роль которых доказана в большом количестве исследований [Li B., 2020].

Следующим этапом был проанализирован уровень экспрессии IL-18 в биоптатах пораженной и непораженной кожи у пациентов с псориазом. Нами было продемонстрировано, что уровень экспрессии IL-18 в очаге псориатического воспаления был сопоставим с экспрессией участка визуально непораженной кожи (рисунок 7). Полученные нами данные свидетельствуют о наличии воспалительного процесса еще до выявления видимых признаков псориаза, что говорит о системности воспаления при псориазе. Иммуногистохимический анализ выявил наличие очагов выраженной экспрессии IL-18 в коже с псориатическим поражением. Таким образом, наши полуколичественные результаты ОТ-ПЦР и иммуногистохимические результаты показывают, что и мРНК гена *IL18*, и белковый продукт указанного гена высоко экспрессируется в коже с псориатическим поражением, что предполагает важную роль IL-18 в патогенезе псориаза. Необходимо отметить, что в биоптатах из пораженного очага и визуально здоровой кожи уровень экспрессии белка IL-18 был соизмерим. Это свидетельствует о наличии механизма, обеспечивающего регуляцию активности

воспалительной функции IL-18. Примером такого регулятора может быть ингибирующий белок IL-18 (IL-18BP - IL-18 binding protein). IL-18BP - рецептор-ловушка, который контролирует активность IL-18, аналогично подобному рецептору для IL-1 [Xiao M., 2016].

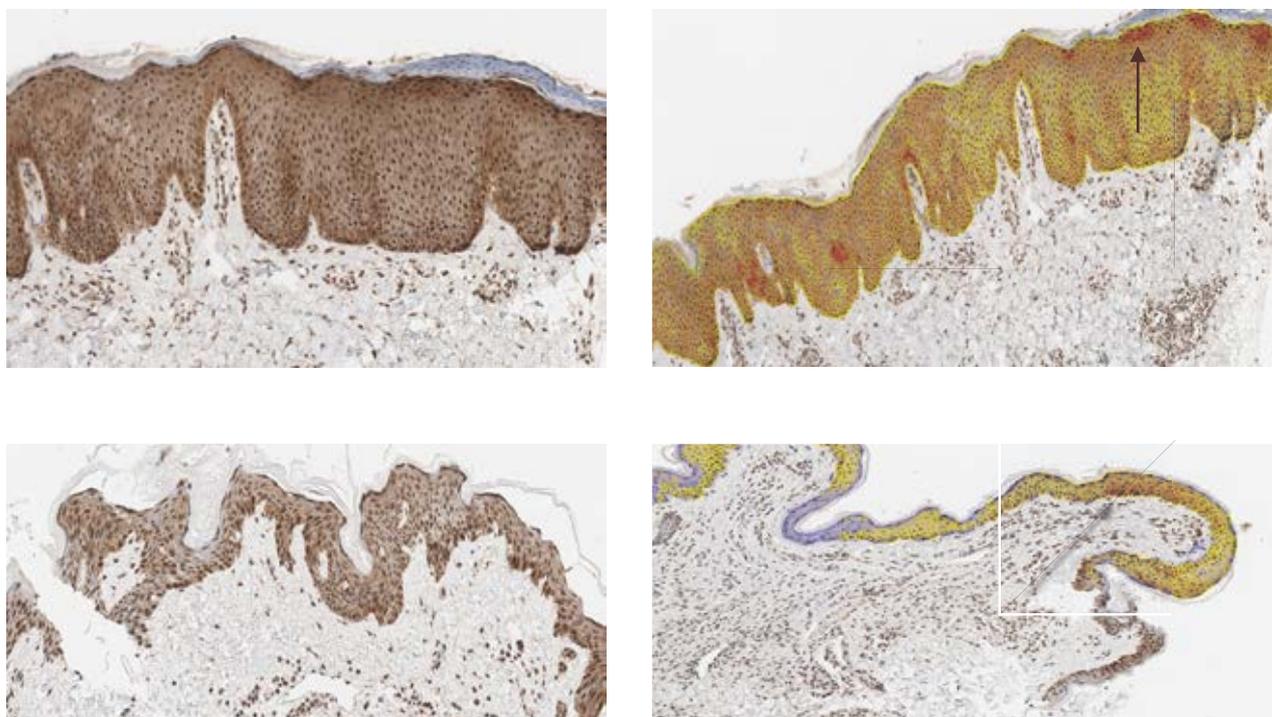


Рисунок 7 - Иммуногистохимическое исследование с антителами к IL-18 биоптатов пораженной кожи (а,б) и непораженной кожи (в,г) пациентов с псориазом (x200). На рисунках б) и г) представлена позитивность и интенсивность экспрессии IL-18 (проанализировано программой QuPath). Желтым цветом выделены очаги слабой позитивности, оранжевым цветом - очаги умеренной позитивности, красным - очаги выраженной позитивности (указано стрелкой), сиреневым – отсутствие экспрессии.

Анализ распределения полиморфных маркеров *TLR7* rs179009 и *TLR9* rs187084 у пациентов с псориазом и псориатическим артритом.

Нами были проанализированы полиморфизмы *TLR7* rs179009 и *TLR9* rs187084 у пациентов с псориазом и псориатическим артритом, а также у группы здоровых доноров.

Анализ распределения полиморфного маркера rs179009 гена *TLR7* показал

незначительное преобладание генотипа СС группы сравнения (37%). Необходимо отметить, что генотипы СТ и ТТ схоже распределены у пациентов с псориазом и псориатическим артритом, однако, статистически значимых отличий выявлено не было (рисунок 8). Однако, было отмечено статистически достоверное различие между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами в распределении аллелей ($\chi^2 = 19,1$, $p=0,0017$), что можно объяснить тем, что в исследование были включены пациенты с хроническим псориазом и псориатическим артритом.

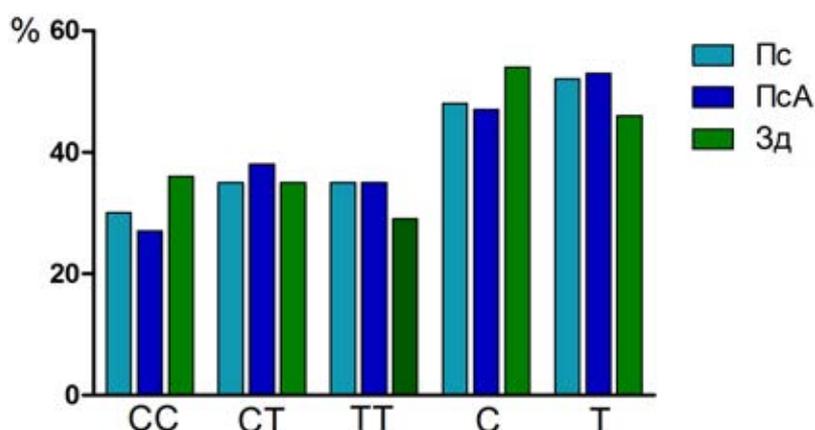


Рисунок 8 - Распространенность генотипов и аллелей полиморфизма *TLR7* rs179009 в исследуемых и контрольной группе.

При изучении частот распределения полиморфизма гена *TLR9* rs187084 было выявлено статистически значимое расхождение с законом Харди-Вайнберга ($\chi^2=4,3$, $p=0,038$). Анализ распределения генотипов полиморфного маркера *TLR9* rs187084 показал преобладание генотипа СТ у пациентов с псориазом по сравнению контрольной группой (OR=2,03, CI = 1,079-3,815, $\chi^2=4,241$, $p=0,04$). При сравнении частот генотипов у пациентов с псориазом, псориатическим артритом и здоровыми донорами нами было продемонстрировано, что генотип ТТ встречался в 59% случаев у больных ПсА, что в 3 раза больше, чем в группе сравнения (OR=6,311, CI = 2,352-16,929, $\chi^2=12,907$, $p<0,001$) и в 3,8 раз больше, чем в группе пациентов с псориазом (OR=5,374, CI = 2,309-12,506, $\chi^2=6,955$, $p=0,009$). Кроме того, аллель Т статистически достоверно преобладал в группе пациентов с псориатическим артритом по сравнению с распределением этого аллеля в группе больных с псориазом (OR=3,076, CI = 1,651-5,731, $\chi^2=12,316$,

$p < 0,001$) (рисунок 9). Проанализированный полиморфизм rs187084 находится в регулярной области промотора гена *TLR9* и по данным исследователей связан с развитием аутоиммунных заболеваний.

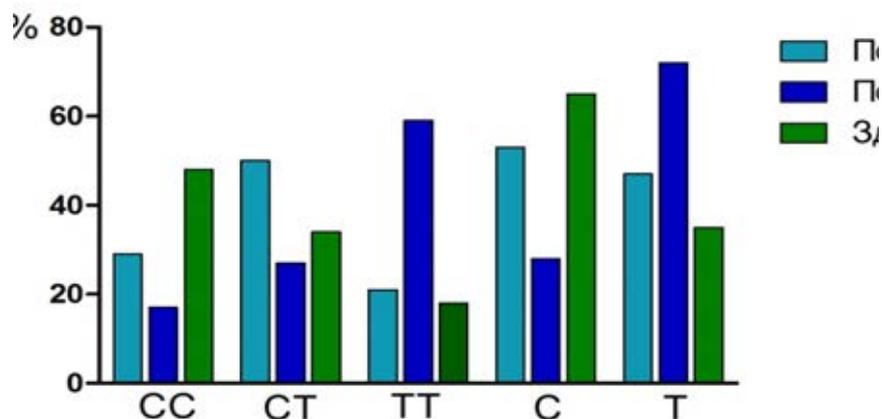


Рисунок 9 - Распространенность генотипов и аллелей полиморфизма *TLR9* rs187084 в исследуемой и контрольной группе.

В работе Gebura et al. была показана ассоциация между rs187084*Т и повышением продукции $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ у пациентов с ревматоидный артритом по сравнению со здоровыми донорами; также отмечалось, что данный аллель связан с менее благоприятным ответом на терапию ингибиторами $TNF\alpha$ при лечении ревматоидного артрита. Вероятно, аналогичным образом пациенты с ПсА не реагируют на лечение анти- $TNF\alpha$. Возможно, наличие аллеля Т в полиморфизме rs187084 может приводить к повышенной экспрессии гена *TLR9*, изменениям в экспрессионном профиле других молекул врожденного и адаптивного иммунитета, а также потенцированию иммунного ответа Th1 и Th17, за счет активной продукции $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ наблюдаемого при Пс [Relja B., 2015].

Таким образом, проведенное нами сравнительное комплексное исследование генов системы врожденного иммунитета при псориазе представляет собой новый подход к изучению механизмов воспаления в псориатическом очаге, а также может быть использовано для разработки новых подходов диагностики и лечения псориаза при тяжелом течении.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективным исследованием по проблематике настоящей диссертационной работы следует считать дальнейшее изучение участия врожденного иммунитета в патогенезе псориаза и псориатического артрита для выявления новых генетических маркеров с целью ранней диагностики заболевания, а также поиск важных мишеней иммунной системы, имеющих ключевое значение в развитии псориатического воспаления для разработки новых терапевтических подходов.

Выводы

1. У пациентов с псориазом в биоптатах пораженной и непораженной кожи выявлена гиперэкспрессия гена *TLR9* в 4,8 и 4,3 раза, соответственно. Выявлено менее значительное повышение экспрессии *TLR7* в пораженной коже больных по сравнению с группой контроля.
2. Определяется усиление экспрессии генов компонентов инфламмосомных комплексов *NLRP1* и *NLRP3* в пораженной и визуально здоровой коже больных псориазом *NLRP1*, *CASP5*, *CASP1* в сравнении с группой контроля. Значимых изменений в экспрессии генов *NLRP3*, *ASC* выявлено не было. Показана гиперэкспрессия гена провоспалительного цитокина *IL18* в биоптатах пораженной и непораженной кожи, а также менее выраженное увеличение экспрессии *IL1B* в псориатическом очаге, что говорит о системном воспалении при псориазе.
3. В биоптатах кожи из псориатического очага выявлена гиперэкспрессия *TLR9*, *CASP5* по сравнению с непораженной кожей у пациентов с псориазом. Уровень экспрессии *IL-18* в биоптатах существенно не изменялся.
4. Исследование ассоциаций полиморфных маркеров в генах врожденного иммунитета выявило различие в распределении генотипов и аллелей полиморфизма *TLR9* rs187084 у больных с псориазом и псориатическим артритом. У пациентов с псориазом, псориатическим артритом и здоровыми донорами генотип ТТ полиморфного маркера *TLR9* rs187084 встречался в 59% случаев у больных ПсА, что в 3 раза больше, чем в группе сравнения (OR=6,311, CI = 2,352-16,929, $\chi^2=12,907$, $p<0,001$) и в 3,8 раз больше, чем в группе пациентов с псориазом.

5. На основании проведенного исследования выявлены значимые маркеры врожденного иммунитета *TLR9*, *NLRP1*, *CASP1*, *CASP5*, *IL1B*, *IL18*, ассоциированные с тяжелой и среднетяжелой формой псориаза.

Практические рекомендации

1. Достоверное усиление экспрессии генов *TLR9*, *CASP1*, *NLRP1*, *CASP5*, *IL18* более чем в 4,3 раза, 8 раз, 3,4 раза, 194 раза, 5,9 раз, соответственно, в биоптатах визуально здоровой кожи пациентов с псориазом средне-тяжелой и тяжелой формы свидетельствует о дисбалансе факторов врожденного иммунитета и может быть использовано для оценки тяжести и прогноза течения заболевания.
2. Выявление гомозиготного варианта ТТ в полиморфном аллеле rs187084Т/С в гене *TLR9* может быть одним предиктивных маркеров развития псориатического артрита у пациентов с псориазом.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Меркушова Е. Д. Роль *TLR9* и компонентов инфламмосомного комплекса в иммунопатогенез псориаза /Е. Д. Меркушова, Е. М. Хасанова, О. А. Свитич, Н. В. Баткаева, М. М. Гитинова, Л. В. Ганковская.// **Российский иммунологический журнал** - 2019 - Т. 13 (22) - №2 - С.406-408
2. Меркушова Е. Д. Механизмы врожденного иммунитета в патогенезе псориаза: подходы к таргетной терапии /Меркушова Е. Д., Хасанова Е. М., Ганковская Л. В.// **Медицинская иммунология** - 2020 - Т. 22 (3) - С.449-458.
3. Меркушова Е.Д. Гиперэкспрессия генов инфламмосомного комплекса *NLRP1* и цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-18 в биоптатах пораженной и непоражённой кожи больных с псориазом/ Меркушова Е.Д., Хасанова Е.М., Ганковская Л.В.// **Иммунология** - 2021 - Т. 42 (1) - С. 21-28.
4. Merkushova E. Overexpression genes of inflammosome complex *NLRP1* and cytokines IL- 1 β , IL- 18 in lesion and unlesion skin patients with psoriasis/ Merkshova E., Khasanova E., Svitich O., Gankovskaya L. **Allergy**. Abstracts from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Hybrid Congress – 2021 – V.4 – P.151-151

5. Merkusheva E.D. Local hyperexpression of inflammasome genes in psoriatic plaque/ Gankovskaya L., Merkusheva K., Khasanova E., Svitich O. **European journal of immunology Suppl.** 17th International Congress of Immunology, Beijing, China - 2019 - V.49 - P.203
6. Меркушова Е.Д., Роль инфламмосомного комплекса в пато- генезе псориаза /Меркушова Е.Д., Хасанова Е.М.// Сборник тезисов XV Международной (XXIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых - 2020 - С.133

Список сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Пс – псориаз

ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) - апоптоз-ассоциированный Speck-подобный белок, содержащий CARD.

CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

DAMP (damage - associated molecular pattern) – молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью

IFN - интерферон

IL - интерлейкин

LL-37 – антимикробный пептид кателицидин

NLR (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) – нуклеотидсвязывающие олигомеризационные доменовые рецепторы

NLRP (Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing) - нуклеотидсвязывающие олигомеризационные рецепторы, содержащие лейцин-обогащенный и пириновый домены

PAMP (pathogen-associated molecular pattern) – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PRR (Pattern recognition receptors) – паттерн-распознающий рецептор

SNP (Single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидная замена

TLR (Toll-like receptors) - Toll-подобный рецептор

TNF – фактор некроза опухоли