

На правах рукописи



Парамонов Алексей Александрович

Клинико-генетические ассоциации репертуара Т-клеточных рецепторов при псориазе

3.1.23. Дерматовенерология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Кочергин Николай Георгиевич

Официальные оппоненты:

Корсунская Ирина Марковна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» Российской академии наук, лаборатория физико-химических и генетических проблем дерматологии, заведующая лабораторией

Матушевская Елена Владиславовна – доктор медицинских наук, профессор, Академия постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства, кафедра дерматовенерологии и косметологии, профессор кафедры

Ведущая организация: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского»

Защита диссертации состоится «18» марта 2024 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.17 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119435, Москва, ул. Большая Пироговская, д.19

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук, доцент

Чебышева Светлана Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Актуальной задачей современной медицины является изучение молекулярных механизмов запуска и развития многофакторных заболеваний, а также обнаружение новых терапевтических мишеней и способов воздействия на них. Среди иммунозависимых заболеваний кожи в данном аспекте интерес представляет псориаз.

Псориаз – папуло-сквамозный аутовоспалительный дерматоз мультифакториальной природы, в развитии которого большое значение имеют генетические, метаболические, иммунологические и другие провоцирующие факторы. Данное заболевание характеризуется гиперпролиферацией клеток эпидермиса, нарушением кератинизации, воспалительной реакцией в дерме, изменениями в различных органах и системах (коморбидности) (Кочергин Н.Г., 2012; Олисова О.Ю. и соавт., 2016).

Распространенность псориаза в популяции составляет 2-3% и различается в зависимости от региона и этнической принадлежности пациентов – в Российской Федерации чаще встречается у коренных жителей Крайнего Севера (Знаменская Л.Ф. и соавт., 2011).

В настоящее время отмечается тенденция к росту заболеваемости среди лиц трудоспособного возраста, увеличению числа тяжелых и инвалидизирующих форм (псориатический артрит, псориатическая эритродермия, пустулезный псориаз) (Кочергин Н.Г. и соавт., 2009).

Остается открытым вопрос о механизме включения антигенов HLA при псориазе. Согласно одной из концепций антигены некоторых микроорганизмов (вирус) имеют сходство со структурными детерминантами HLA, то есть имеет место мимикрия. В результате такого сходства формируется иммунопатологический процесс в организме (Скрипкин Ю.К., 1993, Шилов В.Н., 2001., Jones D. A., 2004). Однако данный вирус до сих пор не обнаружен.

Имунопатогенез псориаза имеет ряд стадий и характеризуется изменением функционирования различных клеток и передачи сигналов, в результате чего возникают псориатические высыпания.

T-лимфоциты играют важную роль в приобретенном иммунном ответе, они обеспечивают распознавание и уничтожение субстанций, несущих чужеродные антигены. Активация T-лимфоцита происходит при взаимодействии T-клеточного рецептора (TCR, T-cell receptor) с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC, Major Histocompatibility Complex) и связанным с ней антигеном. Это событие является ключевым при запуске иммунного ответа, а T-клеточный рецептор – ключевой характеристикой T-лимфоцита.

TCR представляет собой трансмембранный белок и состоит из двух различных цепей ковалентно связанных между собой дисульфидными связями. Для Т-клеток II-типа (Th2) характерны так называемые α и β цепи, для Т-клеток I-типа (Th1) – γ и δ . Каждая цепь α , β , γ и δ имеет по одному наружному вариабельному V- и константному C-домену за которыми следует трансмембранный домен и короткий цитоплазматический «хвост». Цепи соединены между собой дисульфидной связью, которую образуют их C-домены вблизи клеточной мембраны. V домены отвечают за связывание антигена, презентруемого с молекулами МНС. В составе вариабельного домена содержится характерный для иммуноглобулинов гипервариабельный участок (CDR, complementarity determining region).

У взрослого человека насчитывается порядка 10^{12} Т-лимфоцитов, а репертуар различных TCR оценивается примерно в 10^7 разных вариабельных участков. При этом в геноме исходно нет достаточного количества комбинаций для кодирования такого разнообразия TCR. Данное разнообразие достигается за счет так называемой соматической рекомбинации вариабельных участков. Гены TCR состоят из повторяющихся сегментов, принадлежащих к трем классам: V (variable), D (diversity) и J (joining). В процессе V(D)J-перестройки генные сегменты, по одному из каждого класса, соединяются вместе. Поэтому вариабельные домены каждой из цепей рецептора кодируются объединенными последовательностями сегментов V(D)J.

На сегодняшний день антиген или иная причина инфильтрации кожи иммунными клетками при псориазе не установлены. Возможным путем ее выявления является поиск и идентификация специфических комбинаций Т-клеточных рецепторов, ассоциированных с заболеванием. Лекарственная терапия, направленная на специфические комбинации Т-клеточных рецепторов, ассоциированных с заболеванием, может блокировать aberrantную реакцию Т-клеток на клетки собственного организма, предотвращая или ослабляя заболевание. В будущем, изучение репертуара Т-клеточных рецепторов позволит осуществлять мониторинг течения многих болезней и их развития под действием проводимой терапии. Таким образом, необходимо уже сейчас проводить исследование репертуаров Т-клеточных рецепторов при псориазе.

Степень разработанности темы исследования

Анализ отечественной и зарубежной литературы показал низкую степень разработанности темы. Имеются единичные работы, в которых изучалась роль Т-клеточных рецепторов в развитии и поддержании воспаления при псориазе. А также имеются единичные работы, в которых производился поиск взаимосвязей между клиническими параметрами псориаза и особенностями репертуара Т-клеточных рецепторов.

Цель исследования

На основании изучения полученных результатов анализа массивного секвенирования нового поколения репертуара Т-клеточных рецепторов выявить специфические комбинации последовательностей, кодирующих Т-клеточные рецепторы, ассоциированные с псориазом в качестве потенциальной терапевтической мишени.

Задачи исследования

1. Провести сравнительный анализ репертуара Т-клеточных рецепторов с помощью современного метода массивного секвенирования нового поколения у пациентов с вульгарным псориазом в пораженной и непораженной коже при оценке тяжести кожных проявлений по индексу PASI.

2. Сравнить репертуар Т-клеточных рецепторов у больных вульгарным псориазом и у здоровых индивидуумов с помощью современного метода массивного секвенирования нового поколения.

3. Изучить клинико-иммунологические ассоциации больных среднетяжелым и тяжелым вульгарным псориазом.

4. Изучить сравнительную эффективность УФБ-311 нм в качестве монотерапии и ее комбинации с метотрексатом на основании динамики уровня регуляторных Т-клеток в крови и показателей индекса PASI.

Научная новизна

1. Впервые метод высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) применен на достаточной выборке для изучения образцов, полученных из биоптатов кожи пациентов с псориазом.

2. Впервые с использованием метода высокопроизводительного секвенирования нового поколения, на достаточной выборке, установлено более неравномерное распределение клонотипов Т-клеток при вульгарном псориазе по сравнению со здоровыми индивидуумами: выявлено преобладание по количеству одного или нескольких клонотипов Т-клеток при большом количестве клонотипов, присутствующих в незначительном количестве.

3. Впервые методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения обнаружен ряд новых, уникальных последовательностей, кодирующих Т-клеточные рецепторы, которые преобладали в пораженной коже при псориазе.

4. Впервые установлен ряд новых, уникальных последовательностей Т-клеточных рецепторов, которые присутствовали в коже у пациентов с вульгарным псориазом и отсутствовали у людей из группы здорового контроля.

5. Впервые при вульгарном псориазе установлена корреляция между соотношением содержания некоторых последовательностей, кодирующих Т-клеточные рецепторы, в пораженной и видимо неизменной коже и значениями индекса PASI.

6. Впервые на основании анализа динамики уровня регуляторных Т-клеток в крови и показателей индекса PASI проведена клинико-иммунологическая оценка эффективности комбинированной иммуносупрессивной терапии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установленные специфические комбинации Т-клеточных рецепторов и характер динамики иммунологических показателей при псориазе могут лечь в основу разработки более эффективных систем диагностики и новых методов терапии псориаза. А выявленные данные о взаимосвязи между клиническими характеристиками распространенности и тяжести псориаза и содержанием регуляторных Т-клеток в периферической крови могут заложить основу для будущих исследований, посвященных использованию уровня данных клеток в качестве прогностического маркера течения псориаза, оценки и корректировки терапии.

Методология и методы исследования

В работе применялись общенаучные и специфические (формальные) методы научного исследования, в их числе - описание, наблюдение в динамике, сопоставление данных, эксперимент, анализ результатов и формулирование выводов. Применялись клинико-анамнестические, иммунологические и молекулярно-генетические методы исследования, а также проводилась оценка эффективности комбинированной, иммуносупрессивной терапии. Степень достоверности диссертационного исследования, основанная на отображенных результатах апробированного научно-методического подхода, подтверждается аналитическими методами обработки полученных результатов, точными расчетам, статистическим анализом и интерпретацией полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Для ряда комбинаций Т-клеточных рецепторов установлена взаимосвязь между уровнем их содержания в коже и индексом площади поражения и тяжести течения псориаза (PASI).

2. Распределение клонов Т-клеток в коже при псориазе характеризуется большей неравномерностью по сравнению с кожей здоровых людей: при псориазе отмечается преобладание одной или нескольких последовательностей вместе с наличием большого числа последовательностей, присутствующих в малом количестве.

3. Количество уникальных последовательностей, кодирующих Т-клеточные рецепторы, в псориазической бляшке, превышает таковое в видимо неизменной коже у больных псориазом и в коже здоровых людей.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным количеством пациентов группы исследования, наличием групп сравнения, применением современных методов исследования (клинических, иммунологических, генетических), соответствовавших целям и поставленным задачам исследования, а также использованием адекватных методов статистической обработки данных (критерий Стьюдента, критерия Хи-квадрат Пирсона, U-критерия Манна-Уитни). Результаты исследования научно обоснованы. Полученные данные основаны на достаточном количестве исследований: изучены и проанализированы 207 российских и зарубежных источников. Четко сформулированы критерии включения и исключения из исследования. Добровольное участие пациентов в исследовании подтверждалось их письменным согласием. Проверена первичная документация (истории болезни, таблицы первичных данных, протоколы исследований).

Материалы диссертации доложены и обсуждены на XXXVI Научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения: Московский дерматологической школе 150 лет: от истоков до современной дерматовенерологии и косметологии» и на заседании Московского общества дерматовенерологов и косметологов имени А. И. Пospelова (март, 2019).

Апробация диссертационной работы состоялась на научно-практической конференции кафедры кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрав России(Сеченовский Университет) 25 октября 2023 года.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в формировании концепции и дизайна исследования. Автором поставлены цель и задачи, определены материалы и методы исследования, проведены сбор материала, анализ и статистическая обработка полученных результатов, а также опубликованы печатные труды по результатам научной работы.

Внедрение в практику результатов исследования

Полученные результаты внедрены в учебный и лечебный процессы кафедры и клиники кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 5 работ, в том числе научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук – 3; иных публикаций по результатам исследования – 2.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа Парамонова Алексея Александровича «Клинико-генетические ассоциации репертуара T-клеточных рецепторов при псориазе» соответствует специальности 3.1.23. Дерматовенерология. Область исследований, результаты которых отражены в диссертации, отражены соответствуют п.2 «Этиология и патогенез дерматозов, лимфопролиферативных заболеваний кожи, новообразований кожи и ИППП (изучение причинно-следственных связей между генетическими, патоморфологическими, иммунологическими, биохимическими, функциональными особенностями и клиническими проявлениями заболеваний)» паспорта научной специальности 3.1.23. Дерматовенерология.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, описания собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и указателя литературы. Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, иллюстрирована 16 таблицами и 9 рисунками. Указатель литературы состоит из 214 источников (40 отечественных и 174 иностранных авторов). Весь материал собран, обработан и проанализирован лично автором.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на базе кафедры и клиники кожных и венерических болезней имени В.А.Рахманова Института клинической медицины имени Н.В.Склифосовского ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России(Сеченовский Университет) и ФГБУН Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской Академии Наук.

В исследование включено 68 пациентов с диагнозом L40.0 Псориаз обыкновенный (30 мужчин и 38 женщин). В контрольную выборку вошли 22 здоровых добровольца (10 мужчин и 12 женщин).

Из группы пациентов, включенных в исследование, для специального генетического обследования было отобрано 20 больных, клинически и этнически однородных, у которых была произведена биопсия кожи (однократно, до лечения). Также произведена биопсия кожи для данного генетического обследования у 7 человек из группы здоровых добровольцев контрольной выборки.

В зависимости от варианта лечения больные были распределены на группы: группа 1 (n=32) - 32 пациента, в лечении которых была использована УФБ-311 нм фототерапия, группа 2 (n=36) - 36 пациентов, в лечении которых был использован метотрексат совместно с УФБ-311 нм фототерапией.

Произведен анализ результатов оценки клинических проявлений заболевания и иммунного статуса, сравнение в группах с разными вариантами лечения, а также сопоставление клинических проявлений и иммунологических показателей (корреляционный анализ). Полученные в ходе исследования данные подверглись обработке, результаты работы представлены в общем виде (таблицы и графики).

Молекулярно-генетические исследования

Забор биоптатов кожи больных вульгарным псориазом проводили под местной анестезией 2% раствора лидокаина (Dermo-punch, 4 мм, Sterylab, Италия). Образцы забирали из очагов наиболее активного поражения (яркость высыпаний, острота процесса, шелушение) и непораженной кожи на расстоянии 3–4 см от очага поражения. Образцы здоровой кожи брали у здоровых добровольцев без псориаза в анамнезе и признаков поражения кожи.

Образцы помещали в аликвоты со стабилизирующим реактивом RNA later (Life Technologies, США). Измельчение биоптата проводили на лабораторном гомогенизаторе Tissue Lyser LT (QIAGEN, США) до полной гомогенизации образца. РНК получали с помощью набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Количественное измерение РНК в образце проводили с помощью флуориметра Qubit с набором RNA BR Assay Kit (Life Technologies, США). Библиотеки кДНК на основе выделенной РНК получали с помощью метода быстрой амплификации 5'-концов кДНК (5'-RACE) с набором реактивов Mint-2 cDNA synthesis kit (Евроген). В качестве праймеров использовали смесь Reverse Primer Mix, в состав которой входили три праймера BC1R, DC1R, GC1R. Амплификацию проводили в ПЦР-амплификаторе (BioRad, iQ4). Использовали Encyclo-полимеразу и праймеры, специфические для одной из цепей TCR - BC2R, GC2R, Smart, Step Out. С целью визуализации продуктов реакции проводили электрофорез фрагментов ДНК, выделенной из биоптатов кожи после каждого раунда ПЦР.

Общее количество образцов составило 47. Из них 40 образцов пораженной и непораженной кожи (по 20 образцов соответственно) и 7 образцов, выделенных из кожи здоровых доноров группы контроля.

Набор Neb Next DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina (NEB) применялся для подготовки к секвенированию. Полученный продукт был очищен на колонках набором Clean up Mini (Евроген), далее его элюировали в 27 мкл воды, для дальнейшего анализа на Bioanalyzer использовали аликвоту.

Подготовленная библиотека была секвенирована на аппарате Illumina HiSeq 2000 в соответствии с актуальным протоколом производителя. Полученные в результате высокопроизводительного секвенирования прочтения CDR3 для β -цепей разделили по баркодам с помощью программы Flexbar.

Затем было проведено попарное сравнение представленности последовательностей TCR в пораженной и непораженной коже с использованием программы MIGES.

Иммунологические методы исследования

Кровь из локтевой вены забирали трехкратно (до лечения, через 3 месяца и через 6 месяцев после начала терапии). Субпопуляции Т-лимфоцитов в крови определяли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител Beckman Coulter (США) на проточном цитофлюориметре Becton Dickinson (США) в соответствии с протоколом производителя. Уровни цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора (eBioscience, США) в соответствии с протоколом производителя.

Оценка эффективности проводимой терапии

Оценку проводимой терапии проводили в соответствии с индексом определения площади поражения и оценки тяжести течения псориаза (PASI). Снижение PASI на 90% и более расценивалось, как клиническое выздоровление, значительное улучшение обозначено как уменьшение индекса PASI на 75%, улучшение - на 50%, незначительное улучшение - на 30%.

Методы статистической обработки

Статистический анализ полученных данных проводился на компьютере с использованием программ Microsoft Excel 13 и SPSS Statistics 17.0. Для количественных данных рассчитывались средние значения (M), стандартные отклонения ($M \pm \sigma$), медиана и квартили ($Me [Q25; Q75]$). Статистическая достоверность результатов исследования оценивалась с помощью программы Mann-Whitney U Test Calculator, так как он подходит для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо количественного признака и позволяет, не делая предположения о стандартном распределении, сравнить две выборки – больных вульгарным псориазом и здоровых испытуемых. Оценку разнообразия репертуара Т-клеточных рецепторов проводили с помощью индекса разнообразия Шеннона, который рассчитывали по следующей формуле:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \cdot \ln p_i$$

где H - индекс разнообразия Шеннона; Σ - сумма клонов от 1 до S ; S - количество клонов, $p_i = n_i/N$ – доля определенной последовательности, \ln - натуральный логарифм, n_i - численность i -ой последовательности, N - общая численность последовательностей.

Результаты собственных исследований

Клиническая характеристика больных до лечения

Всего под нашим наблюдением находилось 68 пациентов. Средний возраст начала заболевания составил $34,1 \pm 10,5$ лет, заболевание развилось в возрасте до 30 лет у 37 больных (54,4 %), после 30 лет - у 31 пациента (45,6 %), средняя длительность заболевания - $16,8 \pm 8,5$ лет. Всего в выборке больных было 30 мужчин (44,1 %) и 38 женщин (55,9 %). Средний возраст больных псориазом составил $41,2 \pm 16,3$ года, при этом больше всего пациентов было в возрастной группе от 30 до 39 лет - 22 (32,4%) больных.

Распределение больных псориазом по форме заболевания показало, что у 53 пациентов (77,9 %) был бляшечный псориаз. Экссудативная форма заболевания выявлена у 15 больных (22,1 %). Наиболее частыми факторами, которые способствовали развитию и обострению заболевания являлись стресс и психоэмоциональное напряжение - более чем у трети пациентов - 39,7 % (27 случаев). На втором месте в структуре этих факторов было употребление алкоголя - у 14 больных (20,6 %). Стрептококковая инфекция выступала в качестве фактора обострения и развития болезни в 11 (16,2 %) случаях. Прием лекарственных средств - 3 (4,4 %) случая. Не были четко установлены такие факторы у 15 (18,1%) обследованных больных псориазом. Анализ жалоб пациентов показал, что на зуд жаловались более половины - 46 больных (55,4 %), на чувство

стягивания и сухость кожи - 31 пациент (37,4 %). Отсутствовали жалобы только у 6 пациентов (7,2 %).

Таким образом, выявленные в группах клинико-anamнестические параметры говорят о том, что значимых различий в группах исследования установлено не было и значимых межгрупповых отличий не было.

Оценка уровня показателя PASI в группах больных показала, что в первой группе значение данного показателя составило $19,4 \pm 2,4$ балла, во второй группе оно было несколько выше - $23,7 \pm 5,7$ балла. Таким образом, оценка по индексу PASI свидетельствовала, что у всех больных, включенных в исследование, был псориаз средней и тяжелой степени. Оценка показателя дерматологического индекса качества (ДИКЖ) жизни у больных, включенных в исследование, свидетельствовала о том, что в группе 1 значение его составило $14,0 \pm 3,3$ баллов, у больных группы 2 - $14,5 \pm 2,4$ баллов. Таким образом, у наблюдаемых больных псориазом качество жизни было существенно снижено.

Анализ репертуаров T-клеточных рецепторов в пораженной и непораженной коже у больных псориазом

На следующем этапе исследования был проведен анализ результатов секвенирования 40 образцов, полученных из биопсий пораженной (ПК) и непораженной кожи (НК) пациентов с псориазом (20 человек). Количество прочтений составило $9,7 \cdot 10^7$ прочтений CDR3 последовательностей для β -цепи. Таким образом, были получены данные, достаточные для характеристики репертуара TCR.

Анализ представленности уникальных клонотипов T-клеток показал, что больше всего уникальных клонотипов содержится именно в очагах пораженной кожи пациентов с псориазом (ПК) по сравнению с видимо неизменной кожей пациентов с псориазом (НК) и кожей здоровых добровольцев (З). Данные представлены на Рисунке 1.

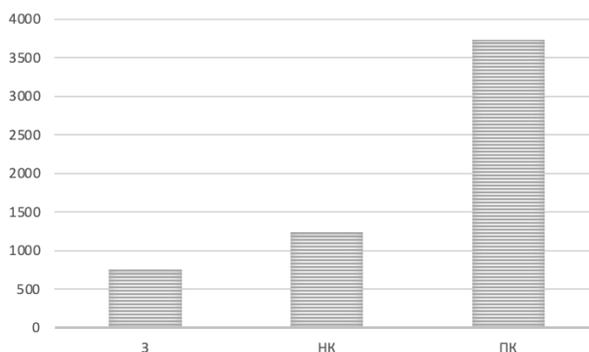


Рисунок 1 – Количество уникальных клонотипов T-клеток в коже здоровых добровольцев (З), непораженной (НК) и пораженной (ПК) коже пациентов с псориазом, определяемых по β -цепи

Данное наблюдение наводит нас на мысль о том, что в пораженную кожу мигрируют определенные клоны Т-клеток, несущие конкретные TCR и отвечающие за распознавание определенного антигена или нескольких антигенов.

Индекс разнообразия Шеннона (H), который был рассчитан для Т-клеточных рецепторов по фрагменту CDR3 для β -цепи в группе пациентов, болеющих псориазом был выше, чем таковой у здоровых добровольцев. Значения данного показателя для больных псориазом и для здоровых индивидуумов составили $2,3 \pm 0,2$ и $1,5 \pm 0,1$ соответственно ($p < 0,05$).

Данное наблюдение говорит о том, что для кожи пациентов с псориазом характерно присутствие одного или нескольких клонотипов Т-клеток, которые сильно выдаются по количеству среди всех других. Вместе с этим в коже при псориазе имеется большое количество клонотипов Т-клеток, присутствующих в малом количестве. Таким образом, распределение клонотипов Т-клеток в коже при псориазе неравномерное. Данный факт дополнительно свидетельствует о том, что в пораженную кожу мигрируют определенные клонотипы Т-клеток, реагирующие на один или несколько антигенов.

Сравнительное изучение относительной представленности клонотипов Т-клеток у пациентов с псориазом в пораженной и непораженной коже, несущих определенные TCR, а также в коже здоровых добровольцев, показало наличие ряда общих клонотипов, которые обнаруживались у большинства пациентов из выборки. Был выявлен ряд последовательностей, кодирующих Т-клеточные рецепторы, соответствующий определенным критериям: 1) присутствие у больных псориазом и отсутствие у здоровых добровольцев, 2) преобладание в пораженной коже у больных псориазом по сравнению с непораженной. При этом определенные последовательности обнаруживались практически у всех пациентов из выборки (до 90%, 18 из 20 человек). Нуклеотидные структуры обнаруженных последовательностей, соответствующих данным критериям представлены в Таблице 1.

Существование нуклеотидных последовательностей CDR3-участков для β -цепи TCR, преобладающих в пораженной псориазом коже и отсутствующих у здоровых индивидов позволяет предположить наличие патогенетической связи данных последовательностей с развитием воспаления при псориазе. Данное наблюдение требует дальнейшего изучения и сопоставления полученных данных с клиническими параметрами.

Кроме того, была определена аминокислотная структура для описанных последовательностей. Аминокислотные последовательности, соответствующие наиболее представленным нуклеотидным последовательностям CDR3-участков для β -цепи TCR, представленность которых в пораженной коже была значительно выше, чем в непораженной коже и которые отсутствовали в коже здоровых добровольцев представлены в Таблице 2.

Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности CDR3-участков для β -цепи TCR представленность которых в пораженной коже была выше, чем в непораженной коже при псориазе и которые отсутствовали в коже здоровых добровольцев

Количество пациентов, чел, (%)	Нуклеотидная последовательность
18 (90,0)	TGTGCCAGCAGATCCGGGACAGGGAGCAATCAG
18 (90,0)	TGTGCTAGTGGCCCCGAGACAGGGATCTATGGCTACACCTTC
18 (90,0)	TGTGCCAGCAGC TTCAAGGTTATACCCAGTAC
17 (85,0)	TGTGCCAGCAGCCTTAGCGGTCAAGTTATTATAGAC
17 (85,0)	TGTGCCAGCAGTTCGGGCCTGCTTGATCAGCCCCAGCATTTT
14 (70,0)	TGTGCCAGCAGCTCCCTTTACTCTAGACGGAACACTGAAGCTTTC
12 (60,0)	TGTGCCAGCAGTACCCCAACGGGACTATCAGACACAGATACGCAG
11 (55,0)	TGTGCCAGCAGCGTAGGACAGGGTCTCGACGAGCAG
9 (45,0)	TGTGCCAGCAGCGTTGTTTACGGATCTATTCGCAGATCG
9 (45,0)	TGTGCCAGCAGCTACCCAGAAGGACAGGGAGCCTACGAG
9 (45,0)	TGTGCCAGCAGTTACTCCCCGGGGGAACACTGAAGCTTTCTTT
9 (45,0)	TGTGCCAGCTGGGACGCGATTGTTGGTTCAAGATATTT

Таблица 2 – Аминокислотная структура обнаруженных нуклеотидных последовательностей

Нуклеотидная последовательность	Аминокислотная последовательность
TGTGCCAGCAGATCCGGGACAGGGAGCAATCAG	CASRSGTGSNQ
TGTGCTAGTGGCCCCGAGACAGGGATCTATGGCTACACCTTC	CASGPETGIYGYTF
TGTGCCAGCAGC TTCAAGGTTATACCCAGTAC	CASSFQGYTQY
TGTGCCAGCAGCCTTAGCGGTCAAGTTATTATAGAC	CASSLSGQVIID
TGTGCCAGCAGTTCGGGCCTGCTTGATCAGCCCCAGCATTTT	CASSSGLLDQPQHF
TGTGCCAGCAGCTCCCTTTACTCTAGACGGAACACTGAAGCTTTC	CASSSLYSRRNTEAF
TGTGCCAGCAGTACCCCAACGGGACTATCAGACACAGATACGCAG	CASSTPTGLSDTDTQ
TGTGCCAGCAGCGTAGGACAGGGTCTCGACGAGCAG	CASSVGQGLDEQ
TGTGCCAGCAGCGTTGTTTACGGATCTATTCGCAGATCG	CASSVVGYSIRRS
TGTGCCAGCAGCTACCCAGAAGGACAGGGAGCCTACGAG	CASSYPEGQGA YE
TGTGCCAGCAGTTACTCCCCGGGGGAACACTGAAGCTTTCTTT	CASSYSPGGNTEAFF
TGTGCCAGCTGGGACGCGATTGTTGGTTCAAGATATTT	CASWDAIVGSRY

Таким образом, была определена аминокислотная структура наиболее представленных CDR3-участков для β -цепи TCR, представленность которых в пораженной коже была

значительно выше, чем в непораженной коже и которые отсутствовали в коже здоровых добровольцев. Знание аминокислотной структуры, определяющей пространственную конфигурацию CDR3-участков, приближает нас к пониманию природы антигенов, на которые реагируют Т-клетки при псориазе.

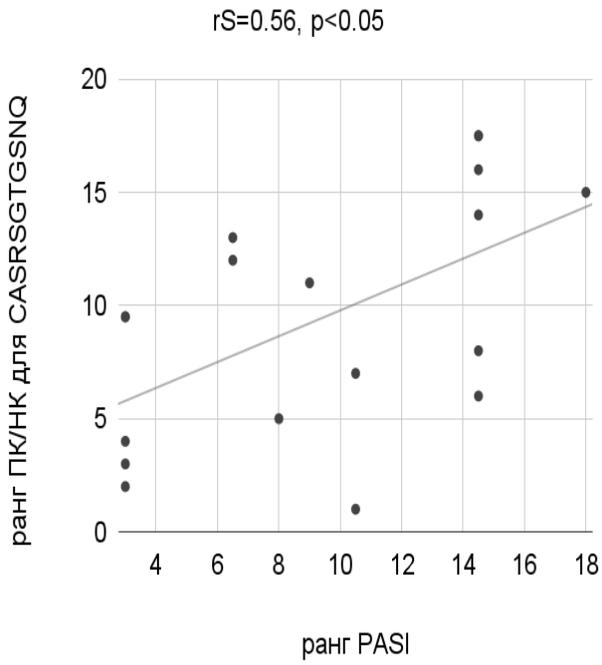
В Таблице 3 представлены доли содержания обнаруженных последовательностей в пораженной (ПК) и непораженной коже (НК) у больных псориазом. Для некоторых последовательностей превышение их содержания в пораженной коже (ПК/НК) доходило до нескольких тысяч раз.

Таблица 3 – Доли наиболее представленных нуклеотидных последовательностей CDR3-участков для β -цепи TCR представленность которых в пораженной коже была значительно выше, чем в непораженной коже и которые отсутствовали в коже здоровых добровольцев (Me [Q25; Q75])

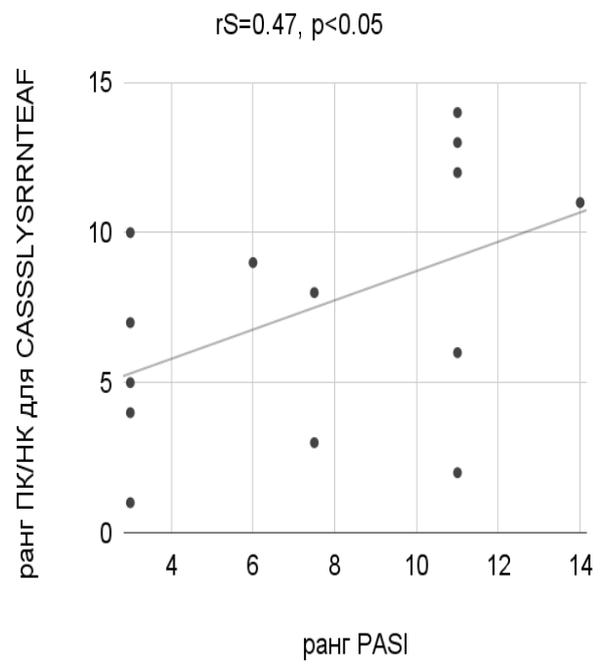
Доля в образце		Отношение ПК/НК	Аминокислотная последовательность
Пораженная кожа (ПК)	Непораженная кожа (НК)		
0,00782 [0,00212; 0,01378]	6,98E-05 [1,21E-05; 2,32E-04]	112	CASRSGTGSNQ
0,00757 [0,00652; 0,01371]	1,22E-06 [8,34E-07; 4,21E-05]	6204	CASGPETGIYGYTF
0,00738 [0,00323; 0,0137]	9,89E-07 [1,35E-07; 4,43E-05]	7462	CASSFQGYTQY
0,00522 [0,00147; 0,08324]	7,69E-06 [2,47E-08; 7,11E-04]	678	CASSLSGQVIID
0,005 [0,00376; 0,09478]	3,95E-07 [1,34E-08; 3,56E-06]	12658	CASSSGLLDQPQHF
0,00486 [0,00156; 0,08341]	1,67E-06 [8,34E-07; 4,21E-05]	2910	CASSSLYSRRNTEAF
0,0046 [0,00223; 0,009348]	8,38E-07 [8,34E-07; 4,21E-05]	5489	CASSTPTGLSDTDTQ
0,00283 [0,00067; 0,01328]	4,45E-06 [2,54E-07; 8,54E-04]	635	CASSVGQGLDEQ
0,00211 [0,002; 0,0137]	3,84E-06 [8,34E-07; 4,21E-05]	549	CASSVYGSIRRS
0,00198 [0,00094; 0,0137]	8,55E-07 [7,33E-07; 5,87E-06]	2310	CASSYPEGQGAYE
0,00123 [0,00032; 0,01084]	6,67E-07 [1,31E-07; 8,13E-05]	1844	CASSYSPGGNTEAFF
0,00110 [0,00047; 0,00561]	3,35E-07 [8,65E-08; 5,88E-06]	3283	CASWDAIVGSRY

На следующем этапе была предпринята попытка поиска взаимосвязей между уровнем содержания обнаруженных нуклеотидных последовательностей, кодирующих Т-клеточные рецепторы, количество которых было повышено в пораженной коже и клинической картиной данного заболевания по индексу PASI. Результаты представлены на Рисунке 2.

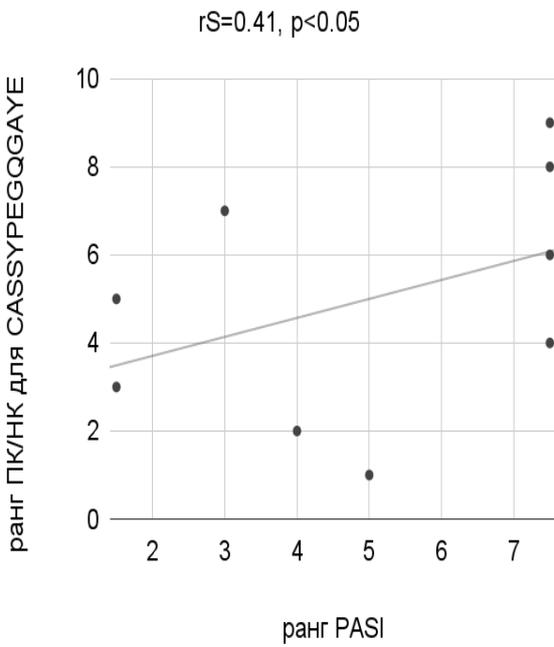
А)



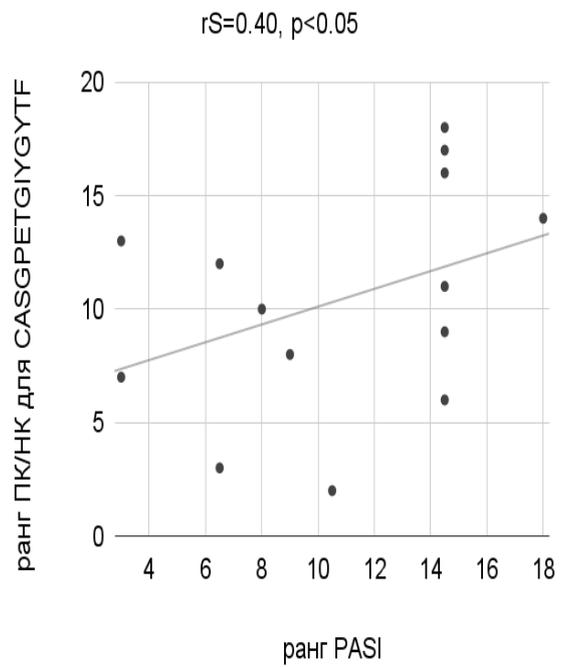
Б)



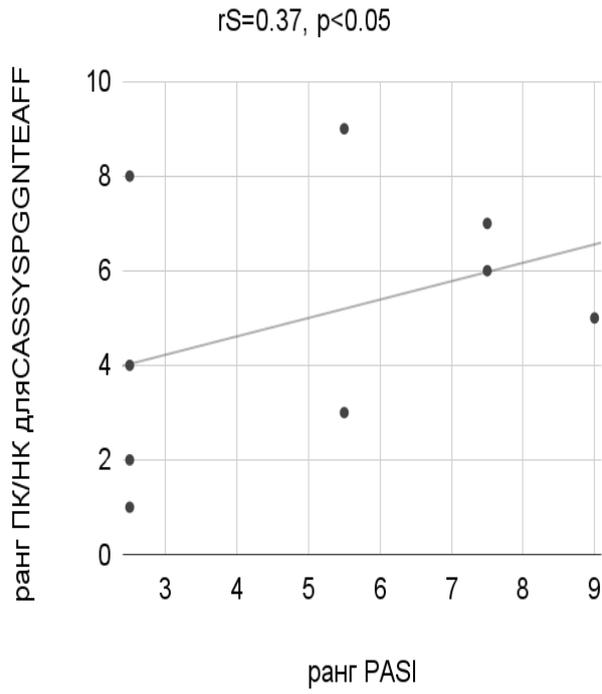
В)



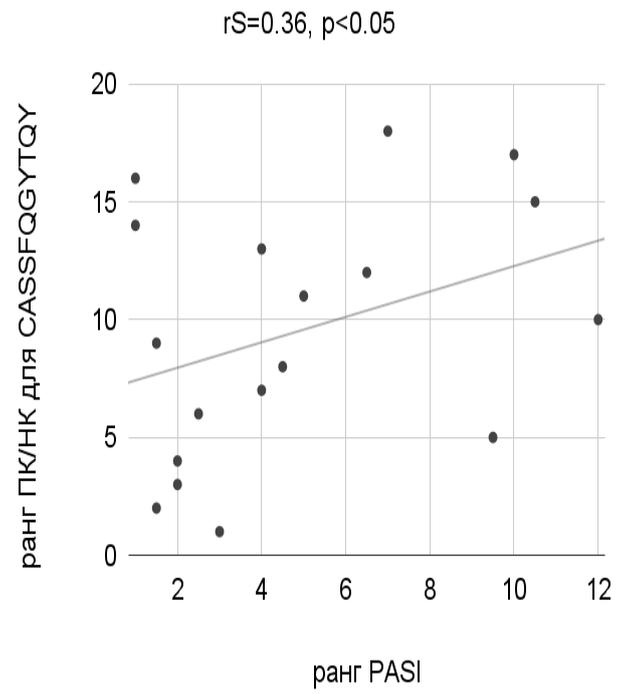
Г)



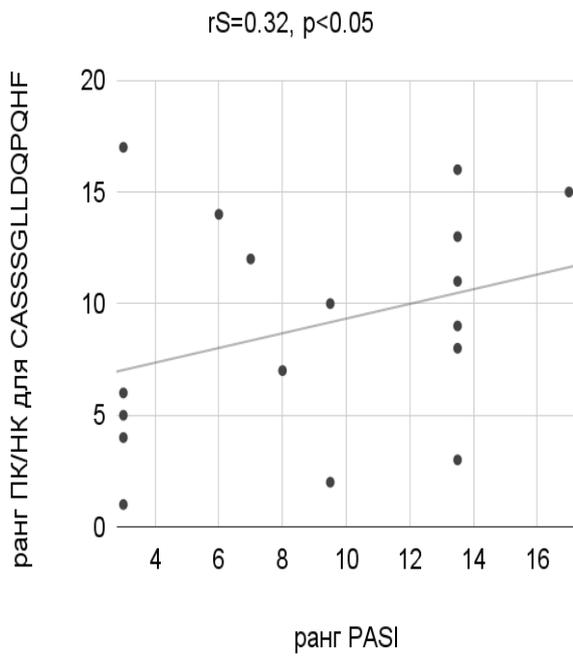
Д)



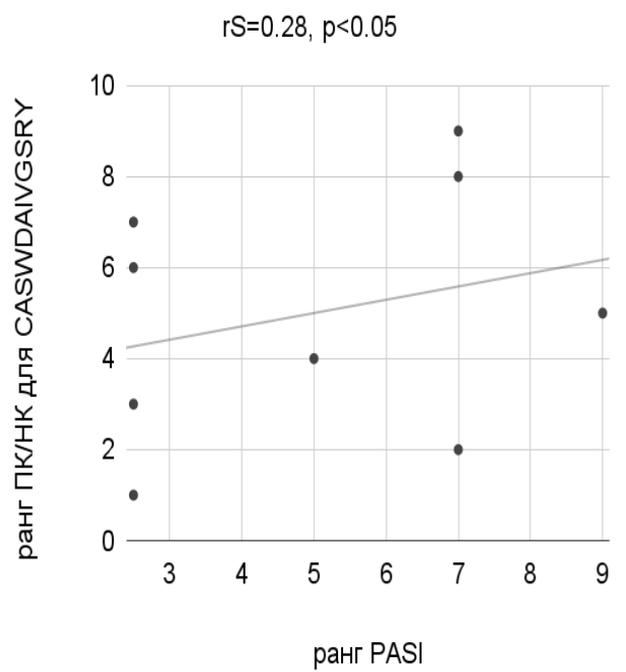
Е)



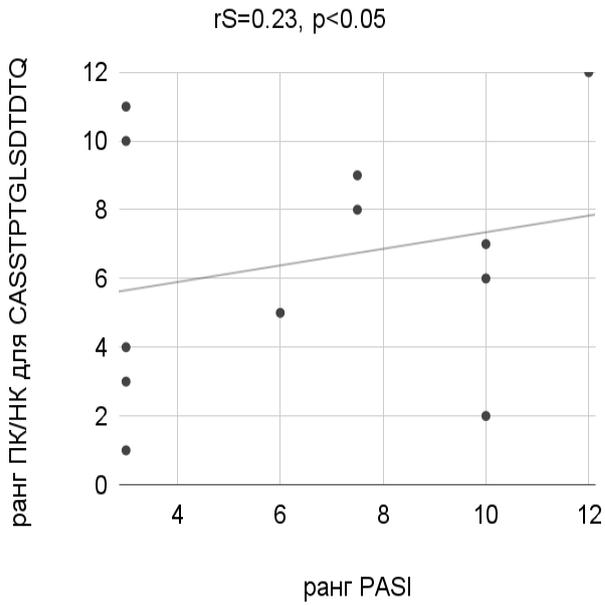
Ж)



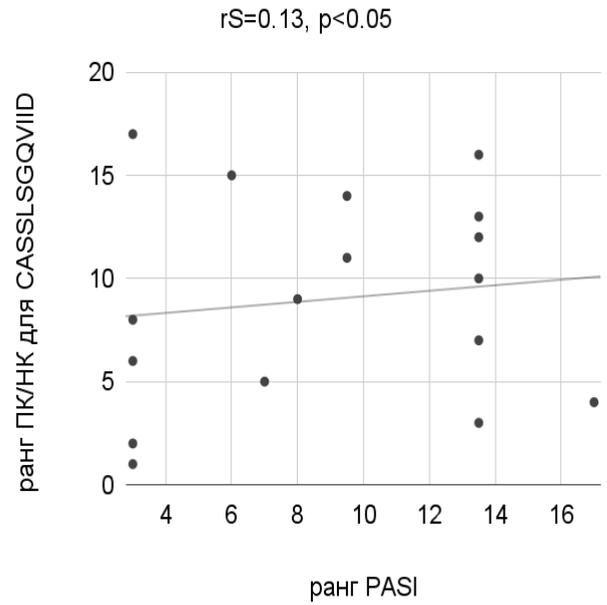
З)



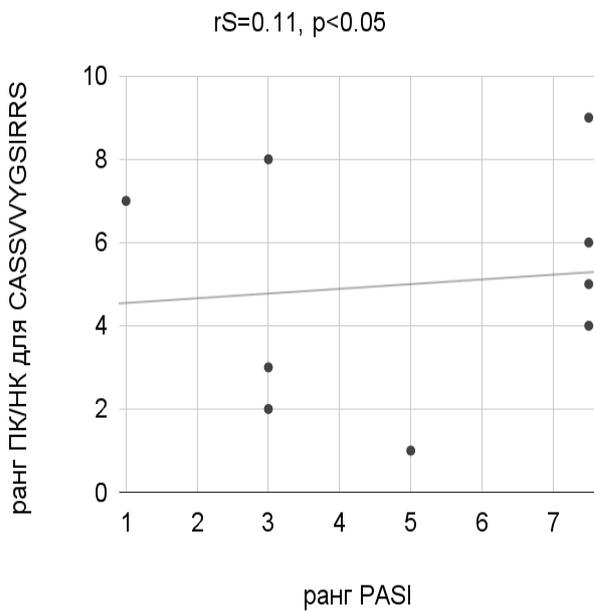
И)



К)



Л)



М)

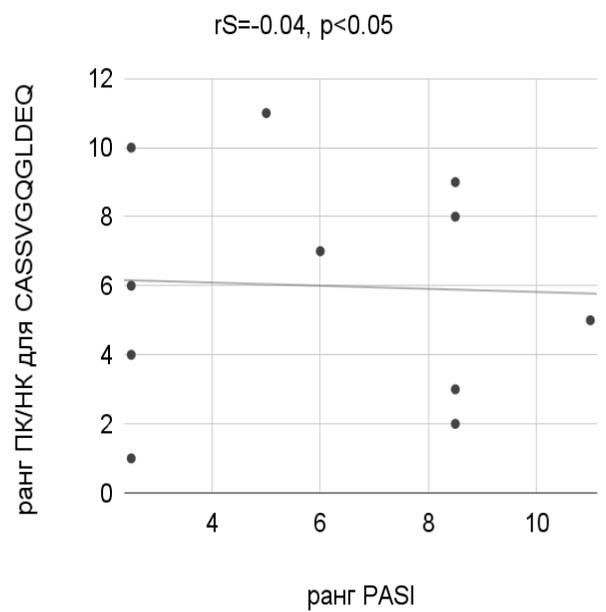


Рисунок 2 – Результаты поиска взаимосвязей между превышением содержания нуклеотидных последовательностей в пораженной коже (ПК/НК) и значением индекса PASI (представлены значимые ($p<0,05$) коэффициенты корреляции Спирмена для обнаруженных последовательностей:

А) CASRSGTGSNQ, Б) CASSLYSRRNTEAF, В) CASSYPEGQGAYE, Г) CASGPETGIYGYTF, Д) CASSYSPGGNTEAFF, Е) CASSFQYTY, Ж) CASSGLLDQPQHF, З) CASWDAIVGSRY, И) CASSTPTGLSDTDQ, К) CASSLSGQVIID, Л) CASSVYGSIRRS, М) CASSVGQGLDEQ

В результате были обнаружены корреляции для некоторых последовательностей с индексом PASI: чем выше было превышение доли содержания нуклеотидной последовательности в пораженной коже по сравнению с непораженной, тем выше было значение индекса PASI. Данные наблюдения дополнительно подтверждают связь обнаруженных последовательностей с развитием и поддержанием воспаления при псориазе.

Динамика клинических и иммунологических показателей при разных подходах к лечению

Изучение иммунного статуса больных псориазом (n=68) и группы здоровых добровольцев (n=22) показало ряд изменений, характеризующихся дисбалансом содержания основных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови. Анализ уровней Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови больных псориазом выявил, что их относительное количество у больных псориазом было почти в 2 раза ниже ($p<0,05$), чем у здоровых обследуемых, составив соответственно $3,80\pm 0,46$ и $6,79\pm 1,15$ %. Абсолютный уровень Т-регуляторных лимфоцитов у пациентов с псориазом также был значимо ниже ($p<0,05$), чем в контрольной группе, составив соответственно $0,062\pm 0,008$ ($\times 10^3$) /мкл и $0,111\pm 0,019$ ($\times 10^3$) /мкл.

Анализ динамики показателя PASI в процессе лечения в группах больных псориазом показал, что если до начала терапии различий отмечено не было, то спустя 6 недель в группе 1 - его уровень несколько снизился и составил $13,9\pm 1,3$ балла, в группе 2 снижение было более выраженным - до $9,6\pm 1,5$ балла. Значение этого показателя во 2 группе было статистически значимо ниже ($p<0,05$), чем в первой группе.

Спустя 12 недель у больных первой группы PASI составил $12,4\pm 2,2$ балла, тогда как во второй группе был достоверно ниже ($p<0,05$) - $6,7\pm 1,7$ балла. Через 24 недели от начала лечения значение показателя активности заболевания в группе 1 практически не изменилось относительно предыдущего срока, составив соответственно $13,8\pm 1,6$, в группе 2 - $5,7\pm 1,3$ балла. При этом последнее значение было достоверно ниже ($p<0,05$), чем в 1 группе.

Оценка уровня показателя ДИКЖ в группах больных показала, что, как и было установлено выше, до лечения уровень качества жизни у пациентов с псориазом был существенно снижен. Через 6 недель от начала лечения значение этого показателя снизилось у больных всех групп, в частности, в группе 1 уровень ДИКЖ был оценен на $11,4\pm 1,2$ балла, у больных второй группы был ниже достоверно ниже ($p<0,05$), чем в группе 1 и составлял $6,2\pm 1,4$ балла. Спустя 12 недель уровень ДИКЖ в группе 1 снизился соответственно до $10,2\pm 2,4$, а в группе 2 составил $3,7\pm 0,7$ балла и был значимо ниже такового ($p<0,05$) в первой группе. Через 24 недели у обследуемых первой группы значение данного параметра оставалось на том же уровне, тогда как у больных группы 2 наблюдалось дальнейшее снижение показателя ДИКЖ. В

группе 1 его уровень составил $11,7 \pm 1,9$ балла, тогда как в группе 2 уровень его оценки составил $2,8 \pm 0,5$ балла, что было достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в группе 1.

Анализ результатов лечения показал, что клиническое выздоровление наблюдалось у 28 пациентов (41,2 %), значительное улучшение - в 16 случаях (23,5 %). Улучшение после проведенного лечения было отмечено у 13 больных (19,1 %) псориазом, незначительное улучшение - в 11 случаях (16,2 %). Клиническое выздоровление в первой группе наблюдалось менее чем у трети пациентов - в 10 случаях (31,2 %). В группе 2 этот результаты был отмечен у половины больных (50 %) - в 18 случаях. Последнее значение было статистически достоверно выше ($p < 0,05$) соответствующего уровня в первой группе. Значительное улучшение наблюдалось в группе 1 - у 7 больных 21,9 %, в группе 2 - в 9 случаях (25,0 %). Результат лечения был квалифицирован как улучшение у 8 (25,0 %) больных из группы 1, в 5 случаях (13,9%) среди пациентов из группы 2. Незначительное улучшение после проведенного лечения отмечено у 7 пациентов (21,9%) группы 1 и в 4 случаях (11,1 %) во второй группе.

Анализ содержания в крови Т-клеток различных рецепторных фенотипов показал, что через 24 недели после начала лечения процентное содержание регуляторных Т-клеток у больных из группы 1 оставалось значимо ($p < 0,05$) сниженным - $3,42 \pm 0,28$ %, у пациентов второй группы уровень данного показателя увеличился до $5,06 \pm 1,14$ % и приближался к уровню контрольного значения, которое составило $6,79 \pm 1,15$ %.

Данный факт наводит нас на мысль о том, что комбинация УФБ-311 нм и метотрексата приводит к более быстрой нормализации баланса Т-клеток и, как следствие, более значимому подавлению воспаления при псориазе и уменьшению клинических проявлений.

Результаты проведенного анализа свидетельствовали также о наличии ряда значимых корреляционных связей умеренной силы между показателями активности процесса у больных псориазом, с одной стороны, и иммунологическими характеристиками - с другой. В частности, относительным количеством Т-регуляторных лимфоцитов с индексом PASI ($R = -0,35$) и уровнями показателя ДИКЖ ($R = -0,38$).

ВЫВОДЫ

1. Выявлены отдельные последовательности Т-клеточных рецепторов, представленность которых в пораженной коже значимо выше ($p < 0,05$), чем в непораженной коже, при корреляции умеренной силы ($r_s = 0,56$, $r_s = 0,47$) с показателями индекса PASI: чем больше превышение представленности данных последовательностей в пораженной коже по сравнению с непораженной, тем выше тяжесть кожных проявлений заболевания, оцениваемая по индексу PASI, что свидетельствует об ассоциации данных последовательностей с псориазом.

2. Репертуар Т-клеточных рецепторов больных вульгарным псориазом характеризуется большим разнообразием по сравнению с таковым у здоровых добровольцев ($p < 0,05$): обнаруженное количество уникальных клонов в пораженной коже у пациентов с псориазом достигло 3725, в то время как у здоровых добровольцев оно не превышало 765, что свидетельствует о тенденции к формированию поликлонального воспалительного инфильтрата при псориазе.

3. У наблюдаемых больных среднетяжелым и тяжелым псориазом (PASI $23,2 \pm 6,2$) установлено значительное возрастание концентраций провоспалительных цитокинов - ИЛ-1 β , 2, 6 и ФНО- α ($19,3 \pm 2,0$ пг/мл, $16,8 \pm 3,4$ пг/мл, $19,5 \pm 4,1$ пг/мл, $6,8 \pm 1,9$ пг/мл соответственно) и снижение уровня ИФН- γ до $29,7 \pm 4,4$ пг/мл в ассоциации со сниженным показателем регуляторных Т-клеток до уровня $0,062 \pm 0,008 \times 10^3$ /мкл по сравнению с группой контроля ($0,111 \pm 0,019 \times 10^3$ /мкл). Выявлена выраженная прямая взаимосвязь между уровнем ИЛ 2 ($R = 0,52$), ФНО- α ($R = 0,57$) и индексом PASI: чем выше показатель корреляции, тем больше влияние уровней выработки цитокинов на значение индекса PASI. Установлены также обратные корреляции умеренной силы между уровнем регуляторных Т-клеток ($R = -0,35$), уровнем ИФН- γ ($R = -0,46$) и индексом PASI: чем ниже уровень регуляторных Т-клеток и экспрессия ИФН- γ , тем выше тяжесть кожных проявлений заболевания, оцениваемая по индексу PASI, что в целом отражает фенотипичность патофизиологии тяжелого псориаза.

4. Эффективность комбинированного лечения оказалась выше по сравнению с монотерапией УФБ-311 нм (PASI 75 у 75% больных против PASI 75 у 53,1% соответственно), а повышение уровня регуляторных Т-клеток при комбинированном лечении составило $5,06\% \pm 1,14$ против $3,42\% \pm 0,28$ при монотерапии УФБ-311 нм, что свидетельствует о более высокой эффективности комбинированной терапии как в клиническом, так и в иммунологическом аспекте с восстановлением иммунного паттерна в виде увеличения количества регуляторных Т-клеток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Созданный банк биопсийного материала пораженной и непораженной кожи больных псориазом может быть использован для дальнейших молекулярно-генетических исследований.
2. Определение особенностей репертуара Т-клеточных рецепторов может стать основой для разработки новых стратегий терапии и персонализированного подхода к лечению больных.
3. Метод секвенирования нового поколения может быть применен при молекулярно-генетических исследованиях других дерматозов.
4. Схема комбинированного лечения при среднетяжелом и тяжелом псориазе эффективна как в клиническом, так и в иммунологическом аспекте и может быть рекомендована в клинической практике.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Парамонов А.А.** Репертуар Т-клеточных рецепторов при некоторых иммунозависимых дерматозах. / **А.А. Парамонов**, Л.Н. Каюмова, С.А. Брускин, Н.Г. Кочергин, О.Ю. Олисова, М.Н. Острцова // **Российский журнал кожных и венерических болезней.** – 2015. – № 4. – С. 34–41.
2. **Парамонов А.А.** Особенности репертуара Т-клеточных рецепторов при псориазе. / **А.А. Парамонов**, Н.Г. Кочергин // **Российский журнал кожных и венерических болезней.** – 2017. – № 2. – С. 97.
3. **Парамонов А.А.** Генетические маркеры терапевтического ответа при псориазе. / **А.А. Парамонов**, Н.Г. Кочергин // **Национальное здоровье.** – 2018. – № 3. – С. 76–78.
4. **Парамонов А.А.** Характеристика Т-лимфоцитов различных рецепторных фенотипов у больных псориазом в процессе лечения / **А.А. Парамонов**, Н.Г. Кочергин // **Российский журнал кожных и венерических болезней.** – 2020. – № 2. – С. 35–38.
5. **Парамонов А.А.** Клинико-генетические ассоциации репертуара Т-клеточных рецепторов при псориазе / О.Ю. Олисова, Н.Г. Кочергин, **А.А. Парамонов**, В.И. Логинов, А.М. Бурденный, Л.Н. Каюмова // **Патогенез.** – 2023. – № 2. – С. 47–54.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ДИКЖ (Dermatology Life Quality Index, DLQI) - дерматологический индекс качества жизни
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИЛ (IL) – интерлейкин
- ИФН (IFN) – интерферон
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- УФБ 311 нм – узкополосное ультрафиолетовое излучение диапазона Б спектра 311 нм
- ФНО- α – фактор некроза опухоли- α
- CD (кластер дифференцировки) – маркер лимфоцитов
- CDR (complementarity determining region) - гипервариабельный участок
- CDR3 - гипервариабельный участок 3, формирующий поверхность, распознающую эпитоп
- HLA – человеческий лейкоцитарный антиген
- МНС (Major Histocompatibility Complex) - главный комплекс гистосовместимости
- NGS (next generation sequencing) - секвенирование нового поколения
- НК – натуральный киллер
- PASI (Psoriasis Area and Severity Index) - индекс определения площади поражения и оценки тяжести течения псориаза
- TCR (T-cell receptor) - Т-клеточный рецептор
- Th (Th) – Т-хелпер