

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

КУПЦОВА ДАРЬЯ ГЕННАДЬЕВНА

**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ
ПСОРИАЗА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ
ПРЕПАРАТАМИ В ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ**

3.2.7. Иммунология (медицинские науки)

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
Мурашкин Николай Николаевич

доктор биологических наук, профессор
Петричук Светлана Валентиновна

Москва, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	21
1.1. Эпидемиология, этиология и клинические особенности псориаза в детском возрасте	21
1.2. Особенности диагностики псориаза у детей	23
1.3. Принципы лечения и оценка эффективности терапии псориаза в детском возрасте	24
1.4. Современные представления об иммунопатогенезе псориаза	28
1.5. Цитокиновый дисбаланс при псориазе	31
1.6. Роль клеточного иммунитета при псориазе	33
1.7. Иммунометаболизм популяций лимфоцитов при псориазе	39
1.8. Пуринергическая регуляция функционирования Т-клеток у детей с псориазом	42
1.9. Транскрипционный ядерный фактор κB (NF- κB) в патогенезе псориаза	44
1.10. Резюме	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1. Клинико-лабораторная характеристика обследованных больных	46
2.2. Лабораторные методы исследования	50
2.2.1. Иммунофенотипирование основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови	50
2.2.2. Определение содержания субпопуляций $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-клеток памяти	53
2.2.3. Оценка содержания клеток-супрессоров миелоидного происхождения и их функциональной активности	54

2.2.4. Определение количества субпопуляций CD4 ⁺ -Т-клеток с экспрессией CD39 ⁺ - и CD73 ⁺ -эктонуклеотидаз	57
2.2.5. Иммуноцитохимический метод определения активности дегидрогеназ в популяциях лимфоцитов	59
2.2.6. Анализ ядерно-плазматического переноса фактора транскрипции NF-κB методом проточной цитометрии с визуализацией	61
2.2.7. Метод мультиплексного определения уровня циркулирующих цитокинов в периферической крови	64
2.3. Статистические методы исследования	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	68
3.1. Показатели клеточного иммунитета у детей с псориазом	68
3.1.1. Содержание основных и малых популяций лимфоцитов у детей с вульгарным псориазом	68
3.1.2. Содержание основных и малых популяций лимфоцитов на разных типах терапии псориаза у детей	85
3.1.3. Содержание клеток-супрессоров миелоидного происхождения в периферической крови детей с псориазом	90
3.1.4. Содержание популяций CD4 ⁺ - и CD8 ⁺ -Т-клеток памяти при псориазе у детей	95
3.2. Метаболическая активность клеток периферической крови при псориазе у детей	102
3.2.1. Оценка метаболизма популяций лимфоцитов при псориазе у детей	102
3.2.2. Оценка экспрессии CD39 ⁺ - и CD73 ⁺ -эктонуклеотидаз в субпопуляциях CD4 ⁺ -Т-клеток у детей с псориазом	113
3.2.3. Оценка экспрессии внутриклеточного фермента аргиназы-1 в популяции MDSCs у детей с псориазом	121

3.3. Активность ядерного фактора транскрипции κВ в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом	126
3.4. Уровень циркулирующих цитокинов у детей с псориазом	140
3.5. Прогностические критерии эффективности биологической терапии псориаза у детей	150
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	182
4.1. Зависимость показателей клеточного иммунитета от клинических характеристик детей с вульгарным псориазом	184
4.2. Изменение метаболизма лимфоцитов при псориазе у детей	189
4.3. Роль ядерного фактора транскрипции κВ в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом	193
4.4. Информативность определения уровня циркулирующих цитокинов в сыворотке крови у детей с псориазом	195
4.5. Значение прогностических критериев в оценке эффективности ГИБП у детей с псориазом	197
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	203
ВЫВОДЫ	205
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	208
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	209

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ – аденозиндифосфат
- АМФ – аденозинмонофосфата
- АПК – антигенпрезентирующие клетки
- АТФ – аденозинтрифосфат
- ВЗК – воспалительные заболевания кишечника
- ГИБП – генно-инженерные биологические препараты
- ГФДГ – глицерол-3-фосфат дегидрогеназа
- ИМТ – индекс массы тела
- МАТ – моноклональное антитело
- МНК – мононуклеарные клетки периферической крови
- НМК – незрелые миелоидные клетки
- ПС – псориаз
- СДГ – сукцинатдегидрогеназа
- ТГКС – топические глюкокортикостероиды
- Breg (regulatory B cells) – регуляторные В-клетки
- BSA (body surface area) – общая площадь поражения тела псориазом
- CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки
- CD39 (E-NTPD1 - ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1) – эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза-1
- CD73 (Ecto5'NTase - ecto-5'-nucleotidase) – экто-5'-нуклеотидаза
- DAMP (damage-associated molecular pattern) – молекулярный паттерн, связанный с повреждениями
- DDC (dermal dendritic cells) – дермальные дендритные клетки
- DLQI (children's dermatology life quality index) – детский дерматологический индекс качества жизни
- eATP (extracellular ATP) – внеклеточный АТФ
- FSC (forward side scatter) – прямое светорассеяние

GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) – гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора

G-MDSCs (granulocytic myeloid-derived suppressor cells) – гранулоцитарные клетки-супрессоры миелоидного происхождения

IDO (indoleamin 2,3-deoxygenase) – индоламин-2,3-диоксигеназу

IL (interleukin) – интерлейкин

iNOS (inducible nitric oxide synthase) – индуцибельная NO-синтаза

MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) – клетки-супрессоры миелоидного происхождения

MFI (medium intensity fluorescence) – средняя интенсивность флуоресценции

M-MDSCs (monocytic myeloid-derived suppressor cells) – моноцитарные клетки-супрессоры миелоидного происхождения

NF-κB (nuclear factor κB) – ядерный фактор κB

OXPPOS (oxidative phosphorylation) – окислительное фосфорилирование

PASI (psoriasis area severity index) – индекс тяжести и распространенности псориаза

SSC (side scatter) – боковое светорассеяние

TCR (t-cell receptor) – Т-клеточный рецептор

TGFβ (transforming growth factor beta) – трансформирующий фактор роста бета

Th (T-helper) – Т-хелпер

Thact (T activated helper cells) – активированные Т-хелперы

TLR (toll-like receptor) – толл-подобный рецептор

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

Treg (T regulatory cells) – регуляторные Т-клетки

UVB - узкополосная средневолновая фототерапия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Псориаз (ПС) является хроническим воспалительным заболеванием кожи с наследственной предрасположенностью, характеризующееся повышенной пролиферацией эпидермальных клеток, нарушением кератинизации и воспалительной реакцией в дерме, обусловленной активацией Т-лимфоцитов и синтезом провоспалительных цитокинов [22, 99]. Распространенность псориаза в различных странах колеблется от 0,5% до 3,8% населения мира [31, 270]. В педиатрической практике распространенность патологии занимает второе место после атопического дерматита и составляет от 0,1% до 1,4% населения мира [32, 77, 183]. Вульгарный, обыкновенный псориаз является наиболее распространенной клинической формой псориаза у детей, составляющий до 80% случаев заболеваемости.

Диагностика псориаза основывается на визуальном осмотре кожных покровов пациента, с выявлением симптомов псориатической триады - феномен стеаринового пятна, кровавой росы, терминальной пленки, с учетом жалоб больного и анамнеза заболевания. Для исключения других заболеваний кожи и гистологического подтверждения диагноза, а также при активном, прогрессирующем псориазе может быть необходимо проведение биопсии кожи [22, 73, 221].

Для лечения псориаза у детей разработаны алгоритмы наружной и системной терапии, основанные на физикальном обследовании и клинической оценке характерных признаков и изменений на коже пациента [21, 22, 91, 204]. При среднетяжелом и тяжелом течении заболевания, а также при неэффективности ранее применяемой терапии показано назначение генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП) [10, 231, 242]. Таргетное действие ГИБП основано на блокаде основных

провоспалительных цитокинов патогенеза заболевания, таких как фактор некроза опухоли-альфа (TNF α), интерлейкин (IL) -17, IL-12 и IL-23 [22, 46, 115]. За последнее десятилетие применение биологической терапии у детей с псориазом показало свою эффективность, увеличив продолжительность ремиссии и значительно улучшив качество жизни пациентов [85, 120, 274]. Однако в последнее время все чаще встречаются случаи развития резистентности к проводимой терапии ГИБП в детском возрасте, требующие замены или отмены препарата [53, 105, 114, 138 148]. Одним из факторов потери ответа на терапию ГИБП является выработка антител к биологическим препаратам и мониторингирование их уровня признано необходимым критерием контроля проводимого лечения [18, 147, 254]. Тем не менее, отмечается недостаток информации и руководств по тактике переключения биопрепаратов, а также полное отсутствие четких лабораторных маркеров эффективности ГИБП у детей с псориазом.

Степень разработанности темы

Известно, что центральную роль в развитии характерных клинических признаков при псориазе играют Т-клетки. Гиперактивированные реакции Th1- и Th17-лимфоцитов наблюдаются в крови и коже пациентов с псориазом и считаются ответственными за псориатические проявления на коже [80, 126, 222]. Различные провоспалительные цитокины (TNF α , IFN γ , IL-6, IL-17, IL-21, IL-23), вовлеченные в это иммуноопосредованное заболевание, продуцируются Т-клетками, миелоидными клетками, включая дендритные клетки, макрофаги и эпидермальные кератиноциты [99, 111, 234]. Повышенное содержание провоспалительных цитокинов является важным фактором формирования псориатических поражений кожи. Отличительной чертой псориаза является устойчивое воспаление, которое приводит к неконтролируемой пролиферации кератиноцитов и их дисфункциональной дифференцировке [103, 111].

Патофизиология псориаза связана не только с активацией провоспалительных реакций, но и с инактивацией противовоспалительных функций иммуносупрессивных клеток. В частности показано, что регуляторные Т-лимфоциты (Treg), регуляторные В-клетки (Breg) и клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSCs) не выполняют свои классические гомеостатические функции при псориазе [154, 188, 193, 199]. Treg необходимы для поддержания иммунного гомеостаза в силу их способности подавлять функцию других лимфоцитов, тем самым снижая иммунный ответ, воспаление и разрушение тканей [25, 141]. В настоящее время считается, что псориаз также связан с нарушением супрессорной способности Treg. Предполагается, что нарушение функции Treg способствует развитию псориаза за счет неэффективного противодействия провоспалительным Т-клеткам, в частности Th1- и Th17-лимфоцитам [167, 195, 253].

Обсуждается роль MDSCs в патогенезе псориаза. MDSCs представляют собой популяцию незрелых миелоидных клеток с иммунорегуляторной ролью [104, 203]. MDSCs происходят из общих миелоидных предшественников в костном мозге и при нормальных условиях дифференцируются в эндотелиальные клетки, макрофаги, дендритные клетки или нейтрофилы [174, 255]. Однако в условиях воспаления, aberrantный устойчивый миелопоэз может привести к накоплению незрелых миелоидных клеток. MDSCs подавляют пролиферацию Т-клеток, ингибируют цитотоксичность естественных клеток киллеров (NK-клеток), влияют на поляризацию макрофагов и индуцируют развитие регуляторных Т-клеток [140, 225, 226, 237]. MDSCs модулируют иммунный ответ при различных заболеваниях, включая многочисленные типы рака, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), травматическая болезнь, ожоги, инфекции и трансплантационные реакции [97, 225, 277]. Показано, что содержание MDSCs в периферической крови увеличивается у взрослых пациентов с

псориазом по сравнению со здоровыми и связано с тяжестью и длительностью заболевания [13, 42, 104, 157, 255].

Важную роль в иммунном ответе при воспалении играет пуриnergическая регуляция функционирования Т-клеток [136, 285]. Внеклеточный аденозинтрифосфат (еАТФ), как основной компонент пуриnergической системы, относится к DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern), обладает провоспалительным эффектом и модулирует иммунный ответ [150, 285]. Конечный продукт расщепления АТФ – аденозин – играет важную роль в ограничении воспалительного ответа [11, 180]. После разрушения клеток и выброса АТФ в межклеточное пространство происходит дефосфорилирование данной молекулы. Основными нуклеотидазами, участвующими в этом процессе, являются эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза-1 (CD39, E-NTPD1) и экто-5'-нуклеотидаза (CD73, Ecto5'NTase) [76, 279]. CD39 метаболизирует АТФ до аденозиндифосфата (АДФ), пирогосфата и аденозинмонофосфата (АМФ). АМФ расщепляется с помощью поверхностного рецептора CD73 до аденозина и фосфата [121, 279]. Показано, что ферменты CD39 и CD73 экспрессируются на мембране многих иммунных клеток [54, 55, 247, 285]. За счет продукции аденозина, эктонуклеотидазы CD39 и CD73 создают иммуносупрессивную среду [75, 228, 236]. Наиболее изучена экспрессия этих ферментов в популяции регуляторных Т-клеток [54, 55, 142, 247]. Таким образом, активность CD39⁺- и CD73⁺-экзонуклеотидаз обеспечивает баланс провоспалительного АТФ и противовоспалительного аденозина в очаге воспаления.

Результаты недавних исследований указывают на высокую значимость определения уровней экспрессии CD39⁺ и CD73⁺ на Treg в диагностике, мониторинге эффективности терапии и прогнозе многих заболеваний [11, 121, 136, 263]. Показано снижение экспрессии CD39⁺ на Treg при обострении

аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, рассеянный склероз и ВЗК [75, 76, 228, 263, 264].

В патогенезе ранней стадии псориаза D. Ferrari и соав. показали значимую роль внеклеточного АТФ, который высвобождается в результате повреждения клеток кожи [125]. Результаты исследований по изучению пуринергической регуляции у взрослых пациентов с псориазом выявили снижение экспрессии CD73⁺ на Treg по сравнению со здоровыми людьми [143, 271, 280]. Yan K. и Bosse M. в своих исследованиях показали, что лечение метотрексатом у пациентов с вульгарным псориазом и псориатическим артритом восстанавливает иммуносупрессивную функцию Treg посредством усиления регуляции CD73⁺-эктонуклеотидазы [90, 272]. Однако исследования пуринергической регуляции в поддержании хронического воспаления при псориазе у детей не проводились.

Иммунометаболизм является важнейшим регулятором функций иммунных клеток при физиологических и патологических состояниях. В перепрограммировании состояния активации и дифференцировки иммунных клеток показан основной вклад различных метаболических путей, а именно процессов гликолиза, глутаминолиза, цикла окисления жирных кислот, пентозофосфатного цикла и окислительного фосфорилирования (OXPHOS) [214, 239, 262].

Известно, что каждый этап иммунного ответа характеризуется определенным метаболическим профилем лимфоцитов [94, 229]. Так, в наивных Т-клетках преобладают процессы OXPHOS, в пролиферирующих клетках преобладают процессы гликолиза и глутаминолиза [133, 282]. Дифференцировка Т-лимфоцитов связана с активацией разных метаболических путей. Для Th1, Th2 и Th17 клеток – это гликолиз, а для регуляторных Т-клеток – цикл окисления жирных кислот [79, 83, 87, 94]. Показано, что процессы производства аденозинтрифосфата (АТФ) в митохондриях имеют важное значение для быстрой индукции аэробного

гликолиза в ответ на активацию клетки [79, 83, 239]. Метаболические фенотипы В-лимфоцитов отличаются от таковых у Т-клеток: циркулирующие В-лимфоциты имеют низкий уровень OXPHOS и гликолиза, тогда как пролиферирующие клетки имеют очень высокий уровень гликолиза, а долго и короткоживущие плазматические клетки характеризуются высоким уровнем OXPHOS, гликолиза и метаболизма аминокислот [127, 262].

Изменения в путях передачи внутриклеточных сигналов, влияющих на активацию иммунных клеток, пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов при псориазе, могут объяснить сложный патогенез заболевания [187, 212, 243]. Одним из путей передачи внутриклеточных сигналов является сигнальный путь ядерного фактора транскрипции κB (NF- κB), относящийся к универсальным факторам, контролирующим экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла [175, 212, 268]. Стимулирующий агент активизирует сигнальный путь NF- κB , что приводит к высвобождению NF- κB от ингибирующего комплекса и транслокации его в ядро клетки, где NF- κB активирует транскрипцию контролируемых генов [81, 175, 187]. Как стержневой элемент для регуляции воспалительного процесса, NF- κB модулирует продукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов, молекул адгезии и ферментов [185, 232].

Нарушению регуляции NF- κB отводится важная роль в патогенезе псориаза [78, 172, 243]. Активация NF- κB влияет на дифференцировку и пролиферацию кератиноцитов в псориатической коже [172, 190, 211, 243]. Показано, что при псориазе наблюдается активация NF- κB , причем определение данного показателя информативно в оценке активности воспалительного процесса и в мониторинге иммуносупрессивной терапии [51, 78, 193, 276]. Проточная цитометрия с визуализацией (технология Amnis) – современный иммунологический метод, позволяющая количественно оценить уровень транслокации NF- κB в разных популяциях лимфоцитов [51, 82, 181].

Учитывая рост заболеваемости псориазом у детей, наличие тяжелых форм заболевания, развитие резистентности к терапии, изучение механизмов регуляции иммунного ответа и оценка комплекса иммунологических параметров является перспективным направлением поиска потенциальных критериев своевременного прогноза эффективности ГИБП при данной патологии.

Цель исследования

Разработать информативные иммунологические критерии прогноза эффективности применения генно-инженерных биологических препаратов при псориазе у детей.

Задачи исследования:

1. Оценить показатели клеточного иммунитета (основные и малые популяции лимфоцитов, Т-клетки памяти, клетки-супрессоры миелоидного происхождения) в зависимости от клинических характеристик детей с вульгарным псориазом.
2. Выявить особенности метаболизма лимфоцитов различных субпопуляций (активность митохондриальных дегидрогеназ и эктонуклеотидаз) и клеток-супрессоров миелоидного происхождения (аргиназа-1) у детей с псориазом при разной тяжести заболевания и эффективности лечения.
3. Определить концентрации комплекса циркулирующих цитокинов, регулирующих аутоиммунные реакции, у детей с псориазом в зависимости от тяжести заболевания и эффективности терапии ГИБП.
4. Изучить уровень транслокации ядерного фактора транскрипции κB (NF- κB) в основных и малых популяциях лимфоцитов у детей с псориазом в зависимости от типа терапии и эффективности применения ГИБП.

5. Установить ранние прогностические критерии эффективности ГИБП у детей с псориазом на основе выявленных информативных иммунологических показателей.

Научная новизна

Впервые у детей с псориазом описана возрастная динамика основных и малых популяций лимфоцитов, а также $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-клеток памяти в периферической крови. Выявлена информативность показателей клеточного иммунитета (Th17, Thact, Treg, MDSCs) в качестве дополнительных лабораторных критериев, отражающих активность заболевания. Определены пороговые значения показателей клеточного иммунитета (Th17, Thact, Treg, Т-клеток памяти), позволяющие прогнозировать эффект ГИБП при вульгарном псориазе у детей.

Впервые проведена оценка клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом и показано увеличение содержания популяции MDSCs и их функциональной активности, особенно у детей с хорошим эффектом ГИБП.

Впервые в педиатрической практике при псориазе применен иммуноцитохимический метод определения активности митохондриальных дегидрогеназ в основных и малых популяциях лимфоцитов. Показана информативность определения метаболической активности клеток иммунной системы (СДГ в Treg) в оценке и прогнозе эффективности проводимого лечения ГИБП.

Впервые у пациентов с псориазом и условно здоровых детей проведена оценка ферментов пуринергической регуляции - $CD39^{+}$ - и $CD73^{+}$ -эктонуклеотидаз - в малых популяциях $CD4^{+}$ -Т-клеток (Th17, Thact, Treg). У детей с псориазом показано снижение супрессорной популяции Th17-лимфоцитов ($CD39^{+}Th17$). Выявлена информативность содержания $CD39^{+}Treg$ в качестве дополнительного лабораторного маркера оценки

тяжести псориаза у детей и эффективности проводимой биологической терапии блокаторами TNF α и IL-12/23.

Впервые проведена оценка широкого комплекса циркулирующих цитокинов и хемокинов в сыворотке крови у детей с псориазом. Выявлено существенное увеличение уровней провоспалительных цитокинов (IL-23, IL-22, IL-12p70, IL-27, IL-17E, IL-17F, TNF α), что подтверждает целесообразность назначения антицитокиновой терапии. Определены наиболее информативные цитокины и их пороговые значения, позволяющие прогнозировать эффективность биологической терапии псориаза у детей.

Впервые у пациентов с псориазом и здоровых детей методом проточной цитометрии с визуализацией проведен анализ транскрипционного фактора NF- κ B в популяциях лимфоцитов. У детей с псориазом установлено существенное повышение активности NF- κ B в Т-хелперах, Thact, Treg, Th17 и Tc17. Показана информативность оценки данного показателя и определены пороговые значения NF- κ B для прогноза эффективности ГИБП. Выявлена обратная зависимость уровня транслокации NF- κ B и активности митохондриальных дегидрогеназ (СДГ, ГФДГ) в популяциях лимфоцитов как у детей с псориазом, так и в группе сравнения.

Впервые на основании клинических и иммунологических показателей установлены ранние лабораторные маркеры эффективности биологической терапии псориаза в детском возрасте. Определены пороговые значения иммунологических показателей, позволяющие прогнозировать эффект ГИБП при вульгарном псориазе у детей.

Теоретическая и практическая значимость

При исследовании клеточного иммунитета у детей с вульгарным псориазом получены новые данные о содержании основных и малых популяций лимфоцитов, а также клеток-супрессоров миелоидного происхождения. Прогресс заболевания и неэффективность проводимой

биологической терапии характеризуются нарастанием нарушений субпопуляционного состава. Содержание активированных Т-хелперов и отношение Th17/Treg позволяет оценить степень воспалительного процесса при псориазе и прогнозировать эффект проводимой терапии ГИБП.

В работе отработаны и подробно описаны новые современные иммунологические методы исследования клеточного иммунитета, путей передачи внутриклеточных сигналов в иммунных клетках, показана информативность оценки метаболической активности иммунных клеток и уровня циркулирующих цитокинов в прогнозе эффективности ГИБП у детей с вульгарным псориазом.

Исследованы закономерности изменения количественных характеристик иммунологических параметров при разной эффективности проводимой терапии псориаза у детей. Определены дополнительные лабораторные критерии и их пороговые значения, позволяющие персонафицировано и своевременно проводить коррекцию биологической терапии в детском возрасте.

Методология и методы исследования

Методология исследования спланирована в соответствии с поставленной целью с использованием современных аналитических методов и системного подхода, которые обеспечили достоверность и обоснованность полученных результатов и полностью соответствовали принципам доказательной медицины. Научная работа проводилась с соблюдением всех правил научных исследований, основывалась на принципах биоэтики и одобрена Локальным этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (протокол № 2 от 14 февраля 2020 г.).

Теоретическая и методологическая основа работы состояла в поиске и анализе фундаментальных и прикладных исследований по изучаемой проблеме, подтверждающих предположение об информативности

исследования иммунологических показателей в прогнозе эффективности биологической терапии псориаза у детей. Для реализации поставленной цели были использованы клинические и современные лабораторные методы исследования клеточного иммунитета, позволяющие объективно оценить диагностическую и прогностическую значимость иммунологических параметров в анализе эффективности терапии блокаторами TNF α и IL-12/23 у детей с вульгарным псориазом. Выполнен сбор и систематизация материалов исследования, проведен адекватный статистический анализ данных, позволяющий сделать обоснованные выводы.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается достаточным количеством пациентов в исследуемых группах, значительным объемом современных лабораторных методов исследования и имеет высокий уровень статистической значимости. В работе применялись стандартизированные лабораторные методы исследования и разработанные автором протоколы иммунологических исследований. Используемые современные методы статической обработки позволили сделать выводы и рекомендации, имеющие высокую степень достоверности.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в практику отделения дерматологии с группой лазерной хирургии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, а также в учебный процесс кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации и в учебный процесс кафедры педиатрии и детских инфекционных болезней Клинического института детского здоровья имени Н.Ф. Филатова ФГАОУ

ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

Автором проанализированы современные данные литературы по теме диссертации, сформулированы цели и задачи работы, выбраны методы и подходы, отвечающие реализации поставленных задач.

Автором выполнен сбор, анализ клинических и лабораторных данных, проведены иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, оценка содержания субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти, оценка количества MDSCs и их функциональную активность, оценка содержания субпопуляций Т-хелперов (Th17, Thact, Treg) с экспрессией CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидазы, определение активности митохондриальных ферментов (СДГ, ГФДГ) в популяциях лимфоцитов, определение количества клеток с транслокацией NF-κB и определение уровня циркулирующих цитокинов в сыворотке крови, ведение баз данных результатов исследований, осуществлена статистическая обработка полученных данных и их описание. Автором самостоятельно написан текст диссертации и автореферата.

Апробация работы

Апробация работы состоялась 26 апреля 2023 года на заседании проблемной комиссии Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения диссертации были доложены на научно-практических конференциях: XVI Всероссийский научный форум «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017), IX Всероссийская школа по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» (Пушкинские Горы, 2018), 5th European Congress of Immunology

(Амстердам, 2018), научно-практический семинар «Визуализирующая проточная цитометрия в клинической практике и научных исследованиях» (Москва, 2019), XXVI Всероссийская научно-практическая конференция «Клиническая лаборатория: от аналитики к диагнозу» (Москва, 2021), VIII Российский конгресс лабораторной медицины (Москва, 2022), 17 Всероссийская конференция с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2022), 8 научно-практическая школа-конференция Аллергология и клиническая иммунология для практикующих аллергологов-иммунологов, инфекционистов, педиатров, терапевтов и гинекологов (Сочи, 2022), V Всероссийский Съезд Ассоциации детских аллергологов и иммунологов России (Москва, 2022), XXVIII Всероссийской научно-практической конференции «Наукоемкие лабораторные технологии для клинической практики» (Москва, 2023), Международная научно-практическая конференция «Современные тенденции развития инфектологии, медицинской паразитологии, эпидемиологии и микробиологии» (Ургенч, 2023), XVII Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2023).

Публикации по теме работы

По теме диссертации опубликовано 23 печатных работ, из которых 14 статей в научных журналах, включенных в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций и 9 публикаций в материалах конгрессов и конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 240 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов и объема

проведенных исследований, глав собственных исследований, обсуждения результатов исследования, заключения, основных выводов по работе, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 286 источников, среди которых 73 отечественных и 213 иностранных. Работа иллюстрирована 40 таблицами и 85 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У детей с псориазом выявлены нарушения в состоянии клеточного иммунитета, прогрессирующие с возрастом и тяжестью заболевания. Выявлено увеличение содержания эффекторных Т-клеток и клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом.

2. У детей с псориазом повышен уровень транслокации NF-κB в популяциях Т-хелперов, Thact, Th17, Treg и Tc17, которая уменьшается при эффективной терапии ГИБП.

3. Метаболическая активность клеток иммунной системы у детей с псориазом информативна в оценке тяжести состояния и эффективности проводимой терапии и должна учитываться наряду с количественным содержанием клеток в периферической крови.

4. Ранними иммунологическими критериями прогноза эффективности биологической терапии псориаза у детей являются уровень циркулирующих цитокинов в сыворотке крови (IFNγ, IL-12p70, IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNFα), содержание активированных Т-хелперов, отношение Th17/Treg и уровень эффекторных Т-клеток памяти в периферической крови до назначения ГИБП.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпидемиология, этиология и клинические особенности псориаза в детском возрасте

Псориаз является хроническим иммуноопосредованным многофакторным воспалительным заболеванием кожи с наследственной предрасположенностью в котором, согласно кодированию МКБ-10 (L40), выделяют несколько форм заболевания: псориаз обыкновенный или вульгарный, генерализованный пустулезный псориаз, псориаз каплевидный, стойкий акродерматит, псориаз артропатический, ладонный и подошвенный пустулез, сгибабельный инверсный псориаз и псориаз неуточненный [22, 99]. Распространенность псориаза в различных странах колеблется от 0,51% до 3,8% населения мира [31]. В педиатрической практике патология занимает второе место после атопического дерматита среди дерматологических заболеваний, и составляет от 0,1% до 1,37% населения мира [32, 77, 183]. На территории Российской Федерации (РФ) заболеваемость псориазом у детей в возрасте от 0 до 14 лет составила 74,5 на 100 тысяч детей, в возрасте от 15 до 17 лет 326,0 на 100 тысяч и за последнее десятилетие заболеваемость увеличилось на 10% с 30288 в 2010 г. до 33191 - в 2019 г., при этом тенденция к увеличению заболеваемости в последние годы сохраняется [12, 32]. Данные эпидемиологических исследований о дебюте псориаза у детей показали 2 пика заболеваемости: первый от 6 до 7 лет, а второй в пубертатном периоде в возрасте до 16 лет [43].

Наиболее распространенная клиническая форма псориаза у детей является вульгарная (бляшечная, обыкновенная), занимающая до 80% случаев заболеваемости. В развитии вульгарного псориаза выделяют три основных периода – прогрессирующий, стационарный и регресс [1, 156, 221]. К основным клиническим проявлениям бляшечного псориаза относят эритематозные папулы и бляшки, округлой или неправильной формы, с

четкими границами, покрытые серебристо-белыми чешуйками. Псориатические бляшки, как правило, сопровождаются зудом различной интенсивности, особенно в период периферического роста папул [29, 156]. При бляшечном псориазе высыпания имеют симметричный характер и локализуются на различных участках кожи. Чаще всего папулы располагаются на коже волосистой части головы, поверхностях крупных разгибательных суставов и туловище [29, 71, 160]. Стоит отметить, что данные участки наиболее подвержены микротравматизации из-за особенностей анатомии данных зон, однако, существуют и другие, типичные для детей и несвойственные для взрослых, места локализации бляшечного псориаза [45]. У детей, особенно младенческого возраста, высыпания могут быть локализованы в области естественных складок кожи (подмышечной, паховой, пупочной) [119]. В последние годы у детей сохраняется рост тяжелых инвалидизирующих форм бляшечного псориаза, таких как ладонно-подошвенный псориаз, распространённый бляшечный псориаз с поражением функциональных зон и псориатическая эритродермия [30, 43, 45].

Согласно современным знаниям, псориаз является многофакторным заболеванием, вызванным взаимодействием генетических факторов и факторов окружающей среды [9, 191]. Основными триггерами псориаза, как для взрослых, так и для детей, являются: наследственная предрасположенность (участки предрасположенности - PSORS1-9, CARD14, IL36RN, антигены HLA-Cw6 и HLA-DR7), ожирение, травмы кожи (феноменом Кебнера), инфекционные заболевания (стрептококковая инфекция), физические и психоэмоциональные стрессы, курение, лекарственные препараты (вальпроевая кислота, нестероидные противовоспалительные препараты, β -блокаторы, противомаларийные препараты) и недавно установленные аутоантигены псориаза - кателицидин LL-37, меланоцитарный ADAMTSL5, липидный антиген PLA2G4D и кератин 17 [40, 59, 92, 135, 245, 258].

1.2. Особенности диагностики псориаза у детей

Диагностика псориаза основывается на визуальном осмотре кожных покровов пациента, с выявлением симптомов псориатической триады - феномен стеаринового пятна, кровяной росы, терминальной пленки, с учетом жалоб больного и анамнеза заболевания [29, 191]. Для исключения других заболеваний кожи и гистологического подтверждения диагноза, а также при активном, прогрессирующем псориазе может быть необходимо проведение биопсии кожи [22, 73, 221]. Патоморфологические изменения при бляшечном псориазе зависят от стадии заболевания: наибольшие наблюдаются в прогрессирующем периоде, затрагивают эпидермис и верхнюю часть дермы [156, 160]. Гистологические изменения в основном представлены акантозом (утолщением шиповатого слоя эпидермиса), папилломатозом (удлинением сосочков дермы в эпидермис или наоборот, удлинением эпидермальных тяжей в папиллярную дерму), гипогранулезом (истончением зернистого слоя эпидермиса), гиперпаракератозом (нарушением процесса ороговения эпидермиса, при котором клетки рогового слоя сохраняют ядра) и формированием микроабсцессов Мунро (скопления нейтрофильных лейкоцитов) [71, 117].

Клинические проявления псориаза в детской популяции могут различаться по морфологии, локализации, в зависимости от возраста ребенка и отличаться от клинической картины у взрослых пациентов [1, 4, 21, 22, 30].

Лабораторная диагностика при псориазе используется для оценки общего состояния пациентов, контроля коморбидной патологии, перед назначением системной терапии и/или физиотерапии. Лабораторная диагностика включает: клинический анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (определение уровня общего белка, триглицеридов, общего холестерина, мочевины, липопротеидов высокой и низкой плотности, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, гаммаглутамилтранспептидазы, билирубина общего, С-реактивного белка,

ревматоидного фактора) [21, 22, 71]. Для подтверждения диагноза также может быть рекомендовано проведение молекулярно-генетического исследования для выявления мутаций в генах восприимчивости к псориазу: PSORS1-9, CARD14, IL36RN [151, 159, 219].

У пациентов с псориазом степень тяжести и активности заболевания оценивается по площади пораженной кожи с учетом интенсивности эритемы, шелушения и инфильтрации. Оценку тяжести псориаза проводят с использованием общепринятых инструментов: индекса оценки тяжести и распространенности псориаза (PASI - Psoriasis Area Severity Index) и общей площади поражения тела псориазом (BSA - Body Surface Area) [22, 33, 38, 183]. На основании результатов оценки этих показателей рассчитывается степень тяжести псориаза. Легкая степень соответствует значениям PASI менее 10 баллов и BSA<5%, средняя степень – PASI от 10-20 баллов, BSA<10%, тяжелая – PASI>20 баллов, BSA>10% поражения кожи [22]. Данные индексы, PASI и BSA, также являются инструментом для оценки эффективности проводимого лечения у пациентов с псориазом.

1.3. Принципы лечения и оценка эффективности терапии псориаза в детском возрасте

Лечение псориаза у детей предусматривает применение последовательных алгоритмов наружной терапии, системной терапии в комбинации с фототерапией и терапии генно-инженерными биологическими препаратами. Назначение терапии основывается на результатах комплексного обследования пациента, включающее осмотр кожных покровов, выявление формы заболевания, оценку стадии и индексов активности заболевания, оценку возраста ребенка, наличия коморбидной патологии и эффективности предыдущего метода лечения [22, 91, 204].

При легком течении псориаза у детей алгоритм базисной наружной терапии включает применение эмоленов, кератолитиков, топических

глюкокортикостероидов (ТГКС), калиципотриола, ингибиторов кальциневрина, а также мази, содержащие нафталанскую нефть, ихтиол, деготь березовый [2, 22, 37].

Ультрафиолетовая терапия (фототерапия) является эффективным методом лечения псориаза в комбинации с ТГКС, аналогами витамина D3 и метотрексатом [22, 113, 205]. Фототерапия у детей с псориазом применяется в виде узкополосной средневолновой (UVB с длиной волны 311 нм) и длинноволновой (PUVA-терапия) фототерапии, разрешенной с 12 летнего возраста [155, 231]. Перед назначением системной и фототерапии, а также мониторинга безопасности лечения, показано проведение лабораторной диагностики для оценки общего состояния пациентов и консультации специалистов педиатрического профиля [22, 106].

Алгоритм системной терапии включает применение метотрексата, ароматических ретиноидов (ацитретин), циклоспорина и ГИБП (адалимумаб, этанерцепт, устекинумаб), обладающей противовоспалительными и иммуносупрессивными свойствами [10, 113, 231, 242]. Показаниями к назначению ГИБП при псориазе у детей является наличие следующих критериев: $PASI \geq 10$, детский дерматологический индекс качества жизни (DLQI) ≥ 10 , $BSA \geq 10\%$, отсутствие эффекта первых линий традиционной системной и фототерапии, противопоказания к препаратам системной терапии [10, 28, 112, 145, 221, 231].

В настоящее время в Российской Федерации для лечения псориаза у детей зарегистрированы следующие ГИБП: блокаторы TNF (анти-TNF α), к которым относятся адалимумаб и этанерцепт (первая линия биологической терапии) и блокатор IL-12/23 – устекинумаб [22, 46, 115]. Этанерцепт – гибридная молекула, состоящая из рецептора TNF α , соединенного с Fc-фрагментом человеческого IgG1, конкурентно ингибирующая связывание TNF α с его рецептором на поверхности клетки [131, 138]. Данный препарат одобрен Европейской комиссией в 2009 году для лечения тяжелых форм

псориаза у детей старше 6 лет. В 2016 году управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration – FDA, США) одобрило применение этанерцепта для детей старше 4 лет [46, 122, 131, 138]. Адалимумаб представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело (МАТ), относящееся к изотипу IgG1-антител, пептидная последовательность которого идентична человеческому IgG1. Препарат селективно связывается с TNF α и блокирует его биологические функции [155, 269]. Применение адалимумаба для детей старше 6 лет с 2008 года разрешено FDA и Европейской комиссией, в 2017 году в РФ препарат был зарегистрирован для лечения бляшечного псориаза для детей с 4 лет [46, 202]. Устекинумаб – это полностью человеческие МАТ класса IgG1k, обладающие специфичностью к субъединице p40 интерлейкинов 12/23. Препарат блокирует биологическую активность IL-12 и IL-23, предотвращая их связывание с рецептором IL12R- β 1 на поверхности клеток [27, 43]. Клинические испытания применения устекинумаба для детей от 12 до 18 лет проведенные в рандомизированном многоцентровом, двойном слепом, плацебо-контролируемом клиническом исследовании 3-й фазы (CADMUS) и на территории РФ показали свою эффективность и безопасность, препарат зарегистрирован в качестве третьей линии для лечения псориаза у детей старше 12 лет [28, 43, 122, 138].

Критериями эффективности терапии ГИБП являются сроки наступления клинического эффекта, уменьшение индекса PASI более чем на 50-75% от исходного значения (достижение PASI $\geq$ 50, PASI<75), длительность ремиссии, улучшение качества жизни пациента (DLQI $\leq$ 5) [28, 43, 112]. Минимальной эффективностью проводимой терапии ГИБП принято считать достижение PASI 75 и DLQI $\leq$ 5 [4, 28].

За время применения биологической терапии у детей с псориазом она показала свою эффективность, позволила достичь стойкую продолжительную ремиссию и значительно улучшить качество жизни

пациентов [85, 120, 274]. Однако последние годы в повседневной практике для врачей-дерматологов встала необходимость оценки показателя «выживаемости терапии», отражающего временной промежуток от начала до отмены ГИБП, с развитием первичной и вторичной неэффективности, ведущей к замене препарата, нежелательных побочных явлений, плохой переносимости препаратов и пр. [27, 105, 114, 138, 148, 275].

В результате ретроспективного исследования ГИБП для лечения псориаза у детей (BiPe) в 2018 г. и 2022 г., Phan С. и соавт. показали, что из 134 участников в 19,2% случаев наблюдалась потеря эффективности, 22% пациентов, продолжавшие лечение ГИБП, перешли с препарата первой линии на вторую [207, 208]. Также Bayarag и соавт. сообщили, что основной причиной замены ГИБП (в 36,5% случаев, из 211 пациентов) была вторичная потеря эффективности [84]. Gooderham M.J. и соавт., на основании ретроспективного исследования 1149 пациентов с псориазом выявили, что при применении адалимумаба отмечалось самое длительное время до первой смены препарата. Приблизительно у половины пациентов была изменена тактика лечения: в 75% случаев был скорректирован интервал введения препарата, либо проводили переключение на другой ГИБП и только у 6,7% пациентов наблюдалось развитие нежелательных явлений, как следствие применения препарата [139]. Результаты когортного исследования о выживаемости ГИБП у детей с псориазом, проведенные на базе ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, показали, что из 105 участников лишь 13 имели стойкую потерю эффективности анти-TNF терапии и только у 3 участников развились нежелательные явления (туберкулезная инфекция, токсический гепатит) [15, 16, 17]. Авторы также показали, что наилучший показатель выживаемости биологической терапии наблюдался у детей, получавших устекинумаб, относительно пациентов, получавших этанерцепт и адалимумаб, вследствие чего устекинумаб может быть рекомендован препаратом первой линии терапии псориаза у детей [15, 16, 17, 43].

Актуальность поиска предикторов отмены ГИБП и изучение эффективности биологической терапии при псориазе у детей основано на развитии резистентности к проводимому лечению, ведущему к замене препарата. Кроме этого, одним из факторов потери ответа на терапию является высокий индекс массы тела (ИМТ), отягощенный семейный анамнез и выработка антител к биологическим препаратам [18, 147, 244, 254]. Тем не менее, в настоящее время имеется мало информации и руководств по тактике переключения биопрепаратов, а также полное отсутствие четких лабораторных критериев эффективности ГИБП у детей с псориазом.

1.4. Современные представления об иммунопатогенезе псориаза

Патогенетическая модель псориаза за последнее десятилетие была пересмотрена в соответствии с более широким и глубоким пониманием иммунных механизмов, ведущих к образованию характерных клинических проявлений заболевания [80, 126, 222].

В основе иммунопатогенеза псориаза лежат нарушения процессов обработки и презентации антигенов дендритными клетками кожи и выработка ими провоспалительных цитокинов таких как, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\alpha$, IL-12, IL-23 и IL-15 [99, 182]. Повышенное содержание этих провоспалительных цитокинов является важным фактором формирования псориазных поражений кожи. В псориазных очагах повышено количество определенных подтипов дендритных клеток (плазмацитоидных, CD11c^+ и эпидермальных дендритных клеток), стимулирующих пролиферацию Т-клеток [192, 258]. Под воздействием факторов внешней среды, у индивидуумов, несущих локусы предрасположенности к псориазу, происходит инициация заболевания (Рисунок 1.1).

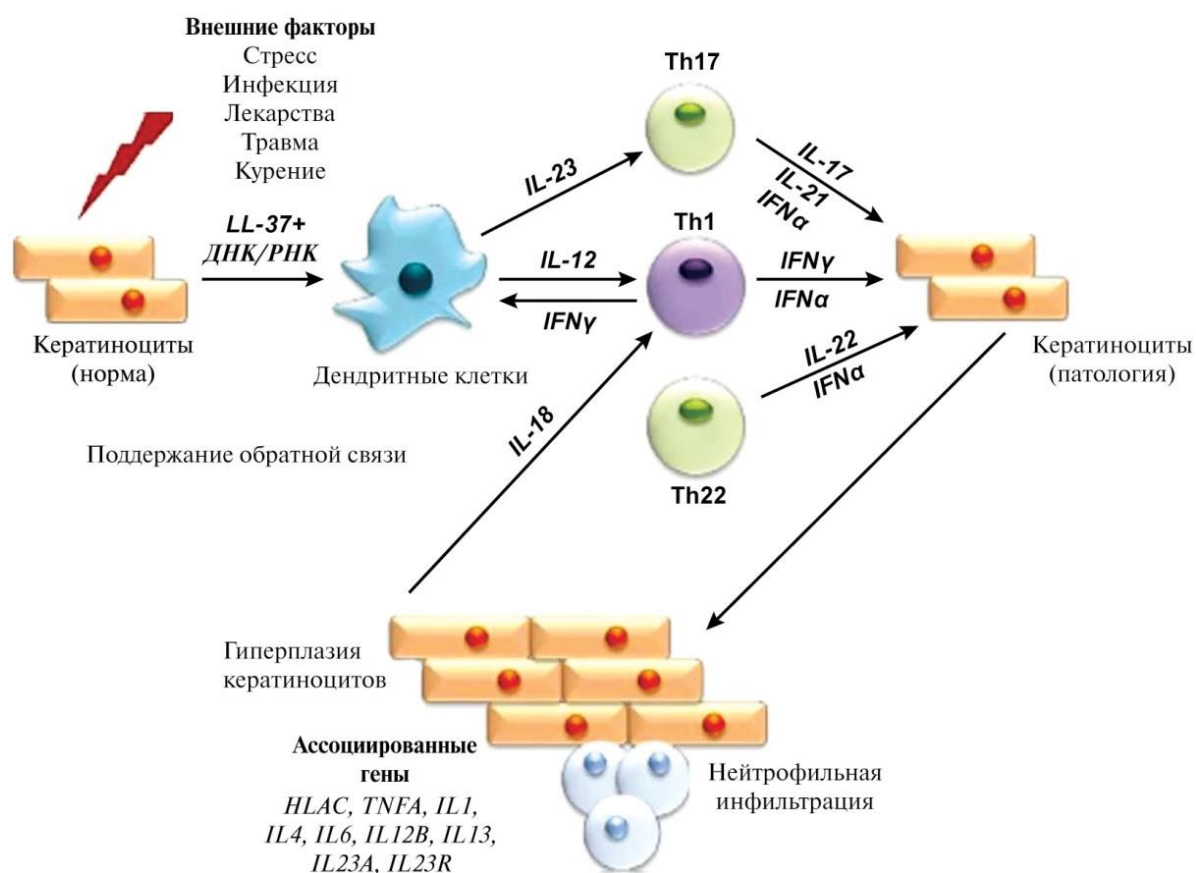


Рисунок 1.1 - Модель иммунопатогенеза псориаза (цитируется по Барило А.А. [6])

Антимикробный пептид LL-37, продуцируемый кератиноцитами в ответ на травму или на другие провоцирующие факторы, связываются с фрагментами собственной ДНК или РНК, которые выделяют умирающие или находящиеся под воздействием стресса клетки [6, 132, 153]. Комплексы LL-37 с нуклеиновыми кислотами распознаются рецепторами плазмочитарных дендритных клеток (pDC) и транспортируются в эндосомные компартменты pDCs, где активируют рецепторы врожденного иммунитета - толл-подобный рецептор 9 (TLR9) и TLR7 и запускают продукцию IFN α [41, 132, 153]. Кроме того, продуцируемые кератиноцитами цитокины IL-1 β , IL-6, TNF α , комплексы LL-37 с нуклеиновыми кислотами, а также IFN α , активируют дермальные дендритные клетки (DDC), которые начинают активно продуцировать TNF α и IL-6 [222, 258]. Часть активированных DDC мигрирует в лимфоузлы, а остальные становятся провоспалительными дермальными дендритными клетками (iDDC), продуцирующие IL-23 и TNF α

[40, 215]. Активированные DDC продуцируют большое количество оксида азота - NO, который играет важную роль в подавлении активности бактериальных и опухолевых клеток, но при этом усиливают воспалительное окружение, образуя большое количество свободных радикалов [132, 153, 222]. Одновременно в очаге воспаления накапливается супероксид, который вызывает повреждение белков и липидов клеточных мембран, оказывая цитотоксическое действие на клетки [215, 258]. Под воздействием провоспалительного окружения моноциты, циркулирующие в крови, мигрируют в кожу. Эти моноциты являются потенциальными предшественниками дендритных клеток, и под воздействием гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), продуцируемого кератиноцитами, нейтрофилами, макрофагами, тучными клетками, лимфоцитами и фибробластами, могут развиваться в дендритные клетки (moDCs). Этому процессу способствует IFN α , продуцируемый pDC, а также комплексы ДНК и РНК с LL37, которые ускоряют фенотипическое и физиологическое созревание moDCs [132, 153].

Активированные DDC в лимфоузлах презентируют антиген наивным Т-лимфоцитам, вызывая их дифференцировку в популяции Т-хелперов 1, 17 и 22 типов (Th1, Th17, Th22), а также цитотоксических Th17-лимфоцитов (Tc17). Кератиноциты выделяют хемокины CCL20 и CCL17, что вызывает миграцию Th17- и Tc17-лимфоцитов в псориатическую дерму. Продуцируемый клетками iDDC IL-23A активирует Th17- и Tc17-лимфоциты, активно вырабатывающие в ответ провоспалительные цитокины – IL-17A, IL-17F, IL-22 и IFN γ . Эти цитокины влияют на кератиноциты, которые начинают активно продуцировать хемокины и антимикробные пептиды, которые еще больше привлекают нейтрофилы, Th1, Th17, Th22 клетки и цитотоксические Т-лимфоциты (CD8) в очаг воспаления [70, 192, 249, 258]. Продуцируемые лейкоцитами цитокины индуцируют эпидермальную гиперплазию, нарушая дифференцировку кератиноцитов [99,

132, 194]. Описанная последовательность взаимодействий различных типов клеток приводит к образованию характерных псориатических поражений кожи.

1.5. Цитокиновый дисбаланс при псориазе

Основными клетками эффекторами в патогенезе псориаза считаются популяции Th1- и Th17-лимфоцитов и синтез ими провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-6, IL-17, IL-21, IL-23) [19, 111, 132, 234]. Показано, что Th17-лимфоциты усиливают иммунный ответ Th1 клеток, в основном, за счет секреции IL-17A, который отвечает за рекрутирование нейтрофилов, активацию клеток врожденного иммунитета, усиление функций В-клеток и высвобождение провоспалительных цитокинов [61, 62, 99, 184]. IL-17A, наиболее значимый цитокин семейства IL-17 (IL-17A, IL-17E, IL-17F и др.), обладающий самой высокой провоспалительной биологической активностью и является ключевым эффекторным цитокином, опосредующий патогенез псориаза [129]. Решающая роль IL-17A при псориазе была доказана положительным клиническим ответом на таргетную терапию, снижающую уровень IL-17A в поврежденной коже [88, 89, 111].

IL-21 - аутокринный цитокин, способствующий дифференцировке и усилению функций Th17 клеток и ингибирующий образование Treg [132, 177]. IL-21 продуцируется CD4⁺ Т-клетками, такими как Th17, фолликулярные хелперные Т-клетки, а также CD3⁺CD56⁺ Т-клетки. Повышенный уровень IL-21 часто обнаруживается в тканях и/или сыворотках пациентов с аутоиммунным заболеванием [177, 223]. В работе Shi Y. и др. (2019) также показано, что уровень IL-21 был значительно повышен как в пораженной коже, так и в периферической крови пациентов с псориазом [235].

В эпидермальном иммунитете при псориазе важную роль отводят популяции Th22 клеток и продукции ими IL-13, IL-22 и IL-26 [99, 111]. Среди этих цитокинов, IL-22, относится к классу мощных медиаторов клеточных

воспалительных реакций, использует IL-10R2 в клеточной передаче сигналов, вызывая пролиферацию кератиноцитов, увеличение толщины эпидермиса, подавление путей дифференцировки, а также усиленную миграцию кератиноцитов при псориазе [116, 152, 178]. Реакция кератиноцитов, опосредованная IL-22 и провоспалительное действие этого цитокина, усиливаются благодаря его синергизму с другими цитокинами, такими как IFN α , IL-17 и TNF α [178]. У пациентов с псориазом наблюдались более высокие уровни IL-22 в сыворотке крови по сравнению со здоровыми людьми, а также прямая корреляция с показателями PASI [147, 178, 240].

Решающее значение для выживания и пролиферации Th17 и Th22 клеток при псориазе играет синтез IL-23 (член семейства цитокинов IL-12), имеющий гомологию с IL-12 в ассоциации с субъединицей p40 [98, 134, 144]. Выявленная повышенная экспрессия IL-23 и IL-12p40 в псориатических поражениях указывает на важную роль сигнального пути IL-23 при псориазе [111, 166, 195].

TNF α был первым цитокином, на который успешно нацелены терапевтические препараты моноклональных антител для лечения иммуноопосредованных заболеваний [95, 100, 230, 252]. Как провоспалительный цитокин, TNF α действует синергически с другими медиаторами воспаления, включая IL-17 и играет важную роль, как в начальной, так и в хронической стадиях псориаза [88, 234]. Для взрослых пациентов с псориазом показаны повышенные уровни TNF α и его рецепторов, как в бляшках, так и в сыворотке крови [50, 60, 98, 184, 197, 251].

В эпидермальных кератиноцитах высоко экспрессируется комплекс рецепторов IFN γ , что делает эти клетки главной мишенью передачи сигналов для IFN γ [107]. Роль IFN γ патогенном каскаде, связанном с псориазом, в основном характеризует раннюю фазу заболевания, о чем свидетельствует его способность активировать антигенпрезентирующие клетки (АПК) [86, 241]. IFN γ усиливает экспрессию приблизительно 400 генов, кодирующих

медиаторы воспаления, типичные для псориаза [86, 271]. В исследования показано, что при каплевидном и бляшечном псориазе регистрируются высокие уровни IFN γ продуцируемые различными популяциями Т-клетками [86, 162, 184, 271].

Диагностическая значимость циркулирующих цитокинов в прогнозе эффективности биологической терапии при псориазе у детей на сегодняшний день находится в стадии изучения. Ранее у взрослых пациентов с псориазом показаны корреляции ведущих провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-17) с активностью заболевания [26, 98, 197, 184]. Однако, основной проблемой на сегодняшний день для пациентов с псориазом является невозможность предсказать ответ на лечение ГИБП. Lam C. Tsoi и др. (2022) в своей работе методом РНК-секвенирования показали, что ответ на анти-TNF терапию сопровождается подавлением экспрессии генов IL-17, TNF α , а контроль уровня IL-17, TNF α может являться, по мнению авторов, предиктором клинического ответа на этанерцепт [252].

1.6. Роль клеточного иммунитета при псориазе

Исследования патофизиологии псориаза в настоящее время позволили рассматривать его как системное хроническое воспалительное заболевание с иммуногенетической основой тесных взаимодействий между компонентами адаптивной и врожденной иммунных систем [132, 164, 233]. Адаптивные иммунные клетки при псориазе активируются aberrантной сигнализацией врожденных иммунных клеток и, впоследствии, высвобождают медиаторы воспаления, которые усиливают псориатическое воспаление [62]. В развитии и поддержании воспаления при псориазе преимущественно вовлечено клеточное звено иммунитета [103, 111].

После первичного контакта наивных Т-клеток с антигеном в иммунной системе формируется большое количество различных субпопуляций короткоживущих эффекторных клеток, часть из которых подвергается

клеточной гибели, а часть выживших Т-клеток, в конечном итоге, остается в организме, формируя иммунологическую память [103, 217]. Долгоживущие Т-клетки памяти в присутствии вторичного воздействия антигена начинают интенсивно пролиферировать и развивать более устойчивый и сильный иммунный ответ [23, 72, 163]. После дебюта псориаза показано сохранение Т-клеток памяти в коже пациентов, что может объяснять его неизлечимость и рецидивирующее течение [248]. Т-клетки памяти представляют собой гетерогенную популяцию клеток, классически отличающихся экспрессией изоформы CD45R0⁺ взамен CD45RA⁺ [124, 217]. Подмножества CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти в периферической крови характеризуются экспрессией СС-хемокинового рецептора 7 (CCR7 - CD197) и L-селектина (CD62L). Клетки памяти представлены тремя основными субпопуляциями: циркулирующими эффекторными и центральными Т-клетками памяти, а также тканерезидентными клетками памяти [34, 198]. Считается, что при псориазе резидентные CD4⁺-Т-клетки, продуцируя провоспалительные цитокины IL-17 и IL-22, вовлекают кератиноциты в процесс воспаления, а CD8⁺-Т-клетки памяти усиливают воспаление в очагах поражения, привлекая в кожу другие иммунные клетки [163, 198, 248]. При обострении заболевания высыпания часто возникают там, где недавно были псориазные бляшки, и именно на этих участках количество CD45R0⁺ клеток памяти в несколько раз больше, чем у здоровых людей [93, 270].

Особая роль при псориазе отводится Th17-лимфоцитам и цитотоксическим Т-лимфоцитами, поскольку они в значительной степени продуцируют IL-17, тем самым стимулируя пролиферацию кератиноцитов [171, 235, 261]. Th17-лимфоциты являются одной из трех хорошо охарактеризованных подтипов Т-хелперов: Th1, Th2 и Th17 [67, 284]. Первоначально Th1-клетки считались решающим подтипом в стимулировании псориазных поражений из-за продукции ими TNF α , IL-2 и IFN γ . При псориазе важность функций Th1 подтверждается влиянием

блокаторов $\text{TNF}\alpha$ и метотрексата на снижение экспрессии цитокинов Th1-клетками у пациентов с псориазом [130, 213, 220]. Aguilar-Flores С. и др. (2020) в пораженной коже взрослых пациентов с псориазом обнаружили высокую инфильтрацию Th17 и установили прямую корреляцию между количеством клеток и PASI [74]. Важность Th17-лимфоцитов при псориазе подтверждается эффективностью анти-IL-23 терапии. Блокада IL-23 снижает дифференцировку Th17-лимфоцитов у пациентов с псориазом [144].

Цитотоксические Т-лимфоциты при псориазе могут выделять множество провоспалительных цитокинов, включая IL-17, IL-21, IL-22, $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$ [34, 67]. Повышение содержания CD8^+ клеток в псориатических бляшках коррелирует с длительностью и тяжестью заболевания, что еще раз подтверждает их важность при данной патологии [258, 261]. В исследовании Kurihara К. и др. (2019) показано, что CD8^+ клетки из пораженной кожи обладают повышенной цитотоксической способностью и активно пролиферируют при ингибировании Treg [161].

Патофизиология псориаза связана не только с активацией провоспалительных реакций, а также с инактивацией противовоспалительных функций иммуносупрессивных клеток. В частности показано, что Treg, Breg и MDSCs не выполняют свои классические гомеостатические функции при псориазе [48, 154, 188, 193, 199]. Treg являются наиболее охарактеризованными иммуносупрессивными клетками, способными подавлять активацию и пролиферацию эффекторных клеток посредством выработки трансформирующего фактора роста бета ($\text{TGF}\beta$) и IL-10 [66, 141]. $\text{TGF}\beta$ имеет решающее значение для поддержания иммунологической толерантности посредством вмешательства в дифференцировку, пролиферацию и выживание лимфоцитов [24, 25]. IL-10 не только индуцирует подавление патогенных ответов Th17-клеток, но также необходим для поддержания подавляющей активности Treg [68, 167, 195]. Увеличение содержания Th17 и уменьшение доли Treg в периферической

крови пациентов с псориазом приводят к дисбалансу Th17/Treg, при этом соотношение Th17/Treg коррелирует с тяжестью заболевания [158, 173, 200, 281, 283].

MDSCs - клетки костного мозга миелоидного происхождения, присутствующие в крови, селезенке, лимфатических узлах, а также в опухолях и в тех тканях, где имеются иммунокомпетентные клетки [104, 203]. Популяция MDSCs образуется в результате изменения дифференцировки гемопоэтического пути, ведущей к накоплению гетерогенной популяции незрелых миелоидных клеток [174, 255]. В костном мозге миелоидные клетки-предшественники дифференцируются в незрелые миелоидные клетки (НМК). В физиологических условиях НМК покидают костный мозг и мигрируют в периферические лимфоидные органы, где дифференцируются в дендритные клетки, макрофаги и гранулоциты [174, 255]. При различных патологических состояниях (сепсис, инфекции, травмы, онкологические заболевания) дифференцировка НМК в нормальные зрелые миелоидные клетки блокируется, эти клетки активируются и становятся MDSCs [13, 42, 104, 157, 255].

Механизм возникновения иммуносупрессорных MDSCs до настоящего времени полностью не изучены. Вместе с тем известно, что повышение факторов роста (GM-CSF и VEGF) и цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6 и TGF β) ускоряет экспансию MDSCs в костном мозге и приводит к накоплению этих клеток на периферии [97, 225, 277]. MDSCs обладают поверхностными маркерами, характерными для миелоидных клеток, но не имеют специфических маркеров, характерных для лимфоцитов, дендритных клеток, естественных клеток-киллеров и макрофагов [226, 256]. В настоящее время охарактеризованы две основные популяции MDSCs: моноцитарные (M-MDSCs) и гранулоцитарные (G-MDSCs) [140, 226, 238]. MDSCs экспрессируют маркеры миелоидных клеток CD11b⁺ и CD33⁺, но негативны

по антигенам HLA-DR и линейным специфическим антигенам (Lin), таким как CD3, CD19 и CD56 [102, 146, 169].

У здоровых людей незрелые миелоидные клетки с фенотипом MDSCs составляют приблизительно 0,5% от числа мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) [257]. Количество MDSCs увеличивается в несколько раз при опухолевом росте, воспалительных процессах, аутоиммунных заболеваниях и связано со стадией, тяжестью и длительностью заболеваний [13, 42, 104, 157, 255]. К факторам, стимулирующим экспансию MDSCs, относятся циклооксигеназа 2, простагландин E2, IL-6, GM-CSF и фактор роста эндотелия сосудов (опосредованно опухолевой iNOS) [169, 225, 226, 277]. Для активации супрессивной активности MDSCs требуются такие факторы, как IFN γ , лиганды для Т-клеточного рецептора (TCR), TGF β , IL-4, IL-12 [140, 277]. Результаты исследований показали, что содержание MDSCs увеличивается у взрослых пациентов с псориазом по сравнению с условно здоровыми [97, 102]. Кроме того, установлено, что MDSCs способны продуцировать различные молекулы, включая матриксную металлопротеиназу-9, IL-1, IL-8 и др. Эти молекулы могут влиять на другие клетки иммунной системы, участвующие в патогенезе заболевания, и способствовать хроническому воспалительному процессу кожи [97, 102, 157]. Предполагается, что MDSCs имеют различные иммуносупрессивные регуляторные функции и могут участвовать в патогенезе аутоиммунных заболеваний, включая псориаз [102, 157, 237].

Существует несколько механизмов воздействия MDSCs на иммунную систему, часть из которых находится на этапе изучения [225, 226, 255, 256]. Иммуносупрессорная активность MDSCs реализуется как при прямом контакте клетка-клетка, так и посредством формирования иммуносупрессорного микроокружения. Показано, что MDSCs могут взаимодействовать с другими клетками, в частности с Treg через CD40-

CD40L [174, 257]. Описана способность MDSCs продуцировать $TGF\beta$ и IL-10 для привлечения и поддержки Treg клеток в микроокружении опухоли [104, 157].

Одним из механизмов развития иммуносупрессии служит истощение питательных веществ для Т-лимфоцитов. MDSCs продуцируют фермент аргиназа-1, которая разрушает аргинин, вызывает повреждение ζ -цепи TCR и, тем самым, блокирует активацию и пролиферацию Т-клеток [104, 203]. MDSCs также лишают среду L-цистеина за счет его потребления и поглощения. Эта аминокислота необходима для активации Т-клеток. В окружающей среде она находится в форме цистина. Т-клетки не имеют возможности поглощать цистин и зависят от цистеина, который обычно производят зрелые дендритные клетки и макрофаги во время презентации антигена. Эти клетки поглощают цистин, расщепляют до цистеина и частично передают его Т-клеткам. MDSC поглощают цистин, но не передают его Т-клеткам [140, 210].

MDSCs могут экспрессировать иммуносупрессивный внутриклеточный фермент индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO). Супрессорное действие IDO на Т-клетки связывают, в основном, с истощением незаменимой аминокислоты триптофана, при отсутствии которой наблюдается остановка клеточного цикла. В последнее время высказано предположение, что механизм IDO более сложен и супрессивными свойствами обладают метаболиты триптофана [201, 246].

MDSCs производят активные формы кислорода и азота с помощью ферментов NADPH-оксидазы и индуцибельной NO-синтазы (iNOS). Хотя экспрессия iNOS в M1-макрофагах является отличительной чертой противоопухолевого фенотипа, у моноцитарной субпопуляции MDSCs экспрессия iNOS способствует увеличению супрессивной деятельности [265]. Этот сдвиг в активности iNOS, вероятно, отражает взаимодействие его с другими ферментами, производимыми MDSCs, такими как аргиназа-1 и

NADPH-оксидаза. Совместная деятельность этих ферментов способствует производству пероксинитритов, которые катализируют нитрование TCR и, тем самым, предотвращают взаимодействие TCR с МНС-пептидом [140].

Помимо этого показано, что MDSCs препятствуют перемещению лимфоцитов, снижая экспрессию рецептора L-селектина (CD62L) на Т-клетках, необходимого для их миграции к лимфатическому узлу [110, 165]. На поверхности MDSCs также может экспрессироваться лиганд запрограммированной смерти 1 (PDL1), ингибирующий Т-клетки. Эта молекула связывается со своим рецептором PD1 на Т-клетках, препятствуя их активации [140, 226, 237].

MDSCs оказывают супрессорное влияние на NK-клетки. В экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что MDSCs вызывали анергию NK-клеток через мембраносвязанный TGF β или подавляли цитотоксичность NK-клеток через экспрессию NKG2 лектиноподобного рецептора С-типа (NKG2D) и производство IFN γ [140, 260, 267]. Подавление цитотоксичности зависит от клеточного контакта MDSCs с NK-клетками посредством взаимодействия с рецептором NKp30 [140, 267]. Таким образом, MDSCs проявляют супрессорную активность в отношении клеток врожденного и адаптивного иммунитета, используя разные механизмы иммуносупрессии [140, 174, 225, 277].

1.7. Иммунометаболизм популяций лимфоцитов при псориазе

Иммунометаболизм является важнейшим регулятором иммунных клеток при физиологических и патологических состояниях. Перепрограммирование иммунных клеток в состояние активации и дифференцировки показало вклад различных метаболических путей, а именно процессов гликолиза, глутаминолиза, цикла окисления жирных кислот, пентозофосфатного цикла и OXPHOS в эти процессы [214, 239, 262].

Известно, что каждый этап иммунного ответа характеризуется определенным метаболическим профилем лимфоцитов [94, 229]. Наивные Т-клетки могут метаболизировать глюкозу, аминокислоты и липиды для выработки АТФ в митохондриях. В наивных Т-клетках преобладают процессы OXPHOS, но в результате взаимодействия с АПК происходит изменение их метаболизма и активированные Т-клетки резко увеличивают метаболизм глюкозы и глутамина [128, 133, 282]. В процессе дифференцировки Т-хелперов образуются популяции Th1, Th2, Th17-лимфоцитов, которые получают энергию в основном за счет аэробного гликолиза (эффект Варбурга), в отличие от регуляторных Т-клеток, у которых энергетический метаболизм основан не только на гликолизе и OXPHOS, но и на окислении жирных кислот [87, 94, 108]. Показано, что процессы производства АТФ в митохондриях имеют важное значение для быстрой индукции аэробного гликолиза [8, 79, 83, 239]. Интенсивность метаболических процессов зависит от популяции лимфоцитов. Метаболические фенотипы В-лимфоцитов отличаются от таковых у Т-клеток: циркулирующие В-лимфоциты имеют низкий уровень OXPHOS и гликолиза, тогда как пролиферирующие клетки имеют очень высокий уровень гликолиза, а долго и короткоживущие плазматические клетки характеризуются высоким уровнем OXPHOS, гликолиза и метаболизма аминокислот [79, 127, 262].

Недостаток или нарушение дифференцировки клеток иммунной системы лежит в основе многих патологических процессов. Метаболические изменения могут быть основной причиной этих нарушений. Метаболические сдвиги могут быть результатом нарушения транскрипции, продукции цитокинов окружающими клетками и изменений в самих метаболических путях [79, 266]. Важной особенностью митохондрий является то, что они могут регулировать активацию, дифференцировку и жизнеспособность иммунных клеток. Кроме того, митохондриальная ДНК (мтДНК) и

митохондриальные активные формы кислорода (мТАФК), способны регулировать процессы транскрипции в иммунных клетках. Известно, что митохондрии могут регулировать иммунитет по-разному [79, 108, 286].

Во-первых, изменения в метаболических путях (цикл трикарбоновых кислот, OXPHOS и окисление жирных кислот) и митохондриях, индуцированные транскрипционными изменениями, могут привести к совершенно различным результатам в иммунных клетках. Например, М1-макрофаги с нарушением цикла трикарбоновых кислот играют провоспалительную роль, а М2-макрофаги, напротив, подвергаются β -окислению жирных кислот и принимают участие в противовоспалительных реакциях [266]. Кроме того, метаболизм аминокислот, особенно аргинина, глутамина, серина, глицина и триптофана, имеет решающее значение для дифференцировки Т-клеток [79, 266].

Во-вторых, митохондрии могут активировать воспалительный ответ. Например, противовирусная защита с участием Nod-подобного рецептора - криопирин (NLRP3), может быть активирована митохондриями [79]. В-третьих, деление и слияние митохондрий могут влиять на их массу и подвижность, изменяя тем самым иммунные функции клеток. Наконец, митохондрии располагаются вблизи эндоплазматической сети (ЭПС) в иммунных клетках, таким образом, участвуют в сигнализации митохондрий и ЭПС-переходов также может влиять на метаболизм иммунных клеток. Митохондриальные механизмы, такие как метаболические пути, метаболизм аминокислот, антиоксидантные системы, митохондриальная динамика, мтДНК, митофагия (аутофагия митохондрий) и мТАФК, имеют решающее значение для иммунных функций [108, 266, 286]. Изменения митохондриальных процессов способствуют изменению иммунных реакций [79].

В клинических исследованиях показана информативность оценки метаболизма клеток на основе определения активности дегидрогеназ [35, 52,

65, 186]. Маркерным ферментом митохондрий, отражающим их функциональное состояние, является сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Фермент катализирует реакции цикла Кребса, а также является II комплексом в дыхательной цепи митохондрий и прочно связан с внутренней митохондриальной мембраной [52, 65, 218]. Глицерол-3-фосфат дегидрогеназа митохондриальная (ГФДГ) локализована на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий. ГФДГ – фермент, отражающий работу глицерофосфатного челночного механизма по транспорту электрон-эквивалентов из цитоплазмы в митохондрии, участвующий в обмене фосфолипидов и отражающий сопряженность процессов гликолиза и OXPHOS [34, 52, 224].

Накопленные данные указывают на то, что пути метаболизма Т-клеток лежат в основе aberrantных функций Т-клеток, тем самым регулируя патогенез аутоиммунных заболеваний, включая ВЗК, системную красную волчанку, ревматоидный артрит и псориаз [23, 101, 239, 260, 273,]. В исследованиях показана информативность оценки интенсивности метаболизма клеток иммунной системы для прогноза эффективности биологической терапии [64]. У детей с псориазом исследований по изучению иммунометаболизма не проводилось.

1.8. Пуринергическая регуляция функционирования Т-клеток у детей с псориазом

Важную роль в иммунном ответе при воспалении играет пуринергическая регуляция функционирования Т-клеток [136, 285]. Внеклеточный АТФ, относится к DAMP, является сильным провоспалительным сигналом и важной частью пуринергической регуляции [136, 150, 285]. Внеклеточный АТФ включает активацию пуринергических рецепторов в клетке и/или в близлежащих клетках, тем самым регулируя клеточные функции [228, 236]. Антагонистом внеклеточного АТФ является

внеклеточный аденозин, обладающий иммуносупрессивными свойствами [11, 180]. Уровень внеклеточного АТФ регулируется каталитическими эффектами CD39 и CD73, которые ответственны за превращение внеклеточного АТФ в аденозин [76, 279]. После выхода во внеклеточное пространство, внеклеточный АТФ гидролизуется до АДФ и АМФ с помощью CD39, тогда как CD73 отвечает за превращение АМФ в аденозин [121, 279]. Показано, что ферменты CD39 и CD73 экспрессируются на плазматической мембране многих иммунных клеток [54, 247, 285]. За счет продукции аденозина, эктонуклеотидазы CD39 и CD73 считаются ответственными за создание иммуносупрессивной среды [75, 228, 236]. Наиболее изучена экспрессия этих ферментов в популяции регуляторных Т-клеток [55, 142, 247].

Пуринергическая передача сигналов модулирует системные и местные воспалительные реакции при иммуноопосредованных и аутоиммунных заболеваниях [11, 55, 121, 136, 263, 264]. Изменение экспрессии CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидаз может снижать продукцию аденозина и приводить к активации функций Th17 и активированных Т-хелперов (Thact) при хроническом воспалении [176, 263]. Показано снижение экспрессии CD39⁺ на Tregs при обострении аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, рассеянный склероз и ВЗК [55, 75, 76, 228, 264].

В патогенезе ранней стадии псориаза D. Ferrari и соав. описали роль внеклеточного АТФ, который высвобождается в результате повреждения клеток кожи [125]. Ранее проведенные исследования по изучению пуринергической регуляции у взрослых пациентов с псориазом выявили снижение экспрессии CD73⁺ в популяции Tregs по сравнению со здоровыми людьми [143, 271, 280]. Yan K. и Bossennec M. в своих исследованиях показали, что лечение метотрексатом у пациентов с вульгарным псориазом и псориатическим артритом восстанавливает иммуносупрессивную функцию Treg посредством усиления регуляции CD73⁺-эктонуклеотидазы [90, 272].

Однако, исследования пуриnergической регуляции в поддержании хронического воспаления при псориазе у детей не проводились.

1.9. Транскрипционный ядерный фактор κB в патогенезе псориаза

Сложный патогенез псориаза может быть объяснен изменением путей передачи внутриклеточных сигналов в иммунных клетках [187, 212, 243]. Нарушение регуляции в этих путях передачи влияет на активацию иммунных клеток, пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов при псориазе [175, 212, 243, 268]. Одним из путей передачи внутриклеточных сигналов является сигнальный путь NF-κB, который впервые был открыт R. Sen и D. Baltimore в зрелых В-лимфоцитах [81, 187]. NF-κB обладает свойством связываться с геном-промотором, кодирующим легкую цепь иммуноглобулинов kappa. Ядерный фактор κB представляет собой семейство структурно связанных транскрипционных факторов, включая RelA (p65), NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), c-Rel и RelB. Члены семейства NF-κB функционируют как различные гетеро- и гомодимеры (p50-p65; RelB-p100), за исключением RelB [185, 232]. Главная активная форма NF-κB представляет собой комплекс субъединицы p65 в ассоциации с субъединицей p50 или p52, которые связаны с белком-ингибитором I-κB [81, 175]. В физиологических условиях данный комплекс NF-κB/I-κB является саморегулирующейся системой [187, 232]. Активация NF-κB наступает под влиянием широкого спектра стимулов [81, 172]. Стимулирующий агент активизирует сигнальный путь NF-κB, что приводит к высвобождению NF-κB от ингибирующего комплекса и транслокации его из цитоплазмы в ядро клетки [81, 175, 187]. Современный метод проточной цитометрии с визуализацией – Amnis ImageStream^x позволяет оценить процент клеток с транслокацией NF-κB (% активированных клеток, в которых NF-κB локализуется в ядре) в различных популяциях [51, 82, 181].

NF-κB участвует в регуляции большого количества провоспалительных генов и влияет на продукцию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, непосредственно участвующих в развитии псориаза [78, 172, 243]. Исследования подтвердили нарушение регуляции путей передачи сигнала NF-κB при псориазе в экспериментальных моделях *in vitro*, моделях на животных, а также при изучении биопсий кожи у больных псориазом [72, 190, 211, 243]. Помимо этого, показано, что действие анти-TNF терапии и глюкокортикостероидов снижает уровень активного NF-κB и связанных с ним элементов пути передачи сигнала [51, 78, 193, 276]. Влияние других таргетных биологических препаратов на изменение количества клеток с транслокацией NF-κB в настоящее время находится в стадии изучения, однако хроническое ингибирование пути NF-κB может приводить к снижению эффективности терапии иммунозависимых заболеваний [206, 211, 216]. Следовательно, определение количества клеток с транслокацией NF-κB может быть перспективным инструментом в оценке тяжести заболевания и эффективности проводимого лечения у пациентов с псориазом.

1.10. Резюме

Таким образом, псориаз характеризуется сложными взаимодействиями между кератиноцитами и иммунными клетками, играющие определенную роль в потенцировании воспаления. Современное понимание патологии псориаза позволило выявить потенциальные иммунологические маркеры для прогноза эффективности терапии псориаза. К таким маркерам относятся: показатели клеточного иммунитета (Th17, Treg, MDSCs, клетки памяти), показатели функциональной активности клеток иммунной системы (активность митохондриальных ферментов, CD39⁺ и CD73⁺-эктонуклеотидаз), уровень циркулирующих цитокинов и уровень транслокации NF-κB в лимфоцитах. Выявление информативности данных показателей в прогнозе эффективности биологической терапии псориаза у детей является актуальной и практически значимой задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клинико-лабораторная характеристика обследованных больных

Исследование проводили в период с 2016 по 2022 год в отделении дерматологии с группой лазерной хирургии (заведующий – д.м.н., профессор Н.Н. Мурашкин), в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии (заведующая – к.м.н., О.В. Курбатова) и клинико-диагностической лаборатории с группой экспресс диагностики (заведующая – к.м.н., С.С. Акулова) лабораторного отдела (заведующая – д.м.н., Е.Л. Семикина) НИИ Педиатрии Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – д.м.н., профессор А.П. Фисенко).

Работа выполнена в рамках НИР «Разработка иммунологических предикторов эффективности терапии блокаторами TNF α при иммуноопосредованных заболеваниях у детей на примере воспалительных заболеваний кишечника и псориаза» (номер регистрационной карты в ЕГИСУ НИОКР АААА-А19-119013090093-2). Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России протокол № 2 от 14 февраля 2020 года.

В исследование включено 277 детей с обыкновенным вульгарным псориазом разной степени тяжести, часть из которых обследованы в динамике (число наблюдений, $n=390$). Возраст детей с псориазом составил от 1,5 до 18 лет. В группу сравнения вошли 90 здоровых детей ($n=90$) в возрасте от 1,4 до 18 лет (Рисунок 2.1).



Рисунок 2.1 – Схема дизайна исследования

Всем пациентам был проведен сбор анамнеза заболевания, включающий возраст, длительность заболевания псориазом, физикальное обследование, оценку тяжести течения псориаза, тип и длительность проводимого лечения, наличие и/или отсутствие коморбидных состояний. Длительность заболевания псориазом на момент обследования пациентов составила от 1 месяца до 16 лет.

Тяжесть течения псориаза оценивали по индексам распространенности и тяжести псориатических поражений – Psoriasis Area and Severity Index (PASI) и площади поверхности тела – Body Surface Area (BSA, %). Значение PASI изменялось от 0 до 68 (Me 14,0 (9,0-19,9)), BSA – от 0 до 100 % (Me 20,0 (12,0-30,0)). При PASI <10 баллов степень тяжести псориаза определяли как легкую, при PASI 10-19 как среднетяжелую и при PASI >20 баллов -тяжелую.

Клиническая характеристика детей вошедших в исследование, представлена в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Клинические данные участников исследования

Признак		Значение
Диагноз	вульгарный псориаз	число пациентов – 277 число наблюдений – 390
	группа сравнения	число детей и наблюдений – 90
Возраст, год	вульгарный псориаз	12,5 (8,5-15,3) лет
	группа сравнения	12,2 (10,3-17,3) лет
Активность заболевания по PASI	PASI <10	число наблюдений – 147
	PASI 10-19	число наблюдений – 148
	PASI >20	число наблюдений – 95
Длительность заболевания псориазом	года	4,0 (2,0-7,0) года

Дети с псориазом получали разную патогенетическую терапию, согласно клиническим рекомендациям и степени тяжести заболевания. В группу 1 вошли дети с псориазом, получавшие терапию наружными кортикостероидами и эмолентами с кератолитическим действием (n=105), в группу 2 – находящиеся на терапии метотрексатом (n=62), в группу 3 – пациенты, получавшие биологическую терапию блокаторами TNF α (адалимумаб и этанерцепт, n=59), в группу 4 – пациенты, которым назначена терапия блокатором IL-12/23 (устикинумаб, n=51).

Критериями назначения биологической терапии являлись PASI ≥ 10 и/или BSA $\geq 10\%$. Эффективность биологической терапии псориаза определяли по общепринятому критерию PASI 75, отражающему снижение PASI на 75% и более, относительно значений индекса PASI до назначения терапии [23]. Если после года терапии ГИБП PASI 75 не достигался, терапия считалась неэффективной. Оценку индексов PASI и BSA у пациентов на биологической терапии проводили на 0, 16, 52 неделях.

Длительность наблюдения детей с псориазом составила от 0 месяцев до 6 лет.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Возраст участника старше 18 лет
2. Другие формы псориаза у детей (псориатический артрит и др.)
3. Наличие тяжелых инфекционных заболеваний
4. Сопутствующие заболевания или изменения инструментальных и лабораторных показателей, которые являются противопоказаниями к проведению биологической терапии
5. Наличие других аутоиммунных заболеваний
6. Несоблюдение схемы лечения для пациентов получавших ГИБП
7. Невозможность наблюдения и получения образца крови участника исследования

Учитывая особенности патогенеза псориаза, всем участникам провели комплексное иммунологическое исследование, включающее клинический анализ крови, иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, оценку количества MDSCs и их функциональную активность, оценку содержания субпопуляций CD4⁺-Т-клеток с экспрессией CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидаз, определение активности митохондриальных ферментов (СДГ, ГФДГ) в основных и малых популяциях лимфоцитов, определение количества клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов и определение уровня противо- и провоспалительных цитокинов в сыворотке крови (Таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Количество проведенных лабораторных исследований

Вид исследования	Количество образцов		Всего исследований
	Псориаз	Группа сравнения	
Клинический анализ крови	390	90	480
Иммунофенотипирование основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови	2148	540	2688
Определение содержания субпопуляций CD4 ⁺ - и CD8 ⁺ -Т-клеток памяти	228	-	1824
Оценка количества MDSCs и их функциональной активности	398	122	2600
Определение содержания субпопуляций CD4 ⁺ -Т-клеток с экспрессией CD39 ⁺ - и CD73 ⁺ -эктонуклеотидаз	138	32	1530
Оценка активности СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов	1012	124	3699
Оценка количества клеток с транскрипцией NF-κB методом проточной цитометрии с визуализацией	195	23	2398
Определение уровня циркулирующих цитокинов в периферической крови (панель Human Th17)	88	-	2200

2.2. Лабораторные методы исследования

Для проведения исследований использовали периферическую кровь и сыворотку крови. Забор крови пациентов проводили из локтевой вены, натошак, в утренние часы, взятую в пробирки BD Vacutainer (BD, США) с соответствующим антикоагулянтом. Клинический анализ крови выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XT 1000i (Япония).

2.2.1. Иммунофенотипирование основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови

Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences, США). Пробоподготовка образцов включала в себя инкубирование в течение 20 минут в темном месте 100 мкл цельной крови с 10 мкл МАТ, меченных флуорохромами. Лизис

эритроцитов выполняли на станции пробоподготовки TQ-PREP с использованием набора IMMUNOPREP (Beckman Coulter, США), или с помощью лизирующего раствора BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences, США), длительность инкубации с которым составляла 10-12 минут.

Панель использованных МАТ фирм «Beckman Coulter» и «Sony Biotechnology», США представлена в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Панель использованных моноклональных антител для иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови

Популяция	Флуоресцентная метка			
	FITS	PE	PerCP или PC5	PC7 или PE-Cy7
В-лимфоциты, CD5 ⁺ В-клетки, CD5 ⁻ В-клетки	CD3	CD19	CD45	CD5
Т-лимфоциты, Т-хелперы, цитотоксические Т - лимфоциты	CD4	CD8	CD3	CD45
НК-клетки, CD3 ⁺ CD56 ⁺ Т-клетки	CD3	CD16/56	CD45	-
Активированные Т-лимфоциты	HLA-DR	-	CD3	CD45
Активированные Т-хелперы, Регуляторные Т-лимфоциты	CD4	CD127	CD45	CD25
Th17- лимфоциты	CD4	CD 161	CD3	CD45
Th2- лимфоциты	CD4	CD 294	CD3	CD45

Стандартным методом пошагового гейтирования определяли содержание основных и малых популяций лимфоцитов в регионе CD45⁺: CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперы), CD3⁺CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD3⁻CD19⁺ (В-лимфоциты), CD3⁻CD16⁺/CD56⁺ (НК-клетки), CD3⁺CD16⁺/CD56⁺ (CD3⁺CD56⁺ Т-клетки), CD3⁺HLA-DR⁺ (активированные Т-лимфоциты), CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} (Treg), CD4⁺CD25⁺CD127^{high} (Thact), CD3⁺CD4⁺CD161⁺ (Th17) и CD3⁺CD4⁺CD294⁺ (Th2-лимфоциты, Рисунок 2.2) [14, 25, 69]. Для построения компенсационной матрицы использовали образцы, окрашенные одиночными флуорохромами, построение

компенсационной матрицы выполнялось автоматически на проточном цитофлуориметре.

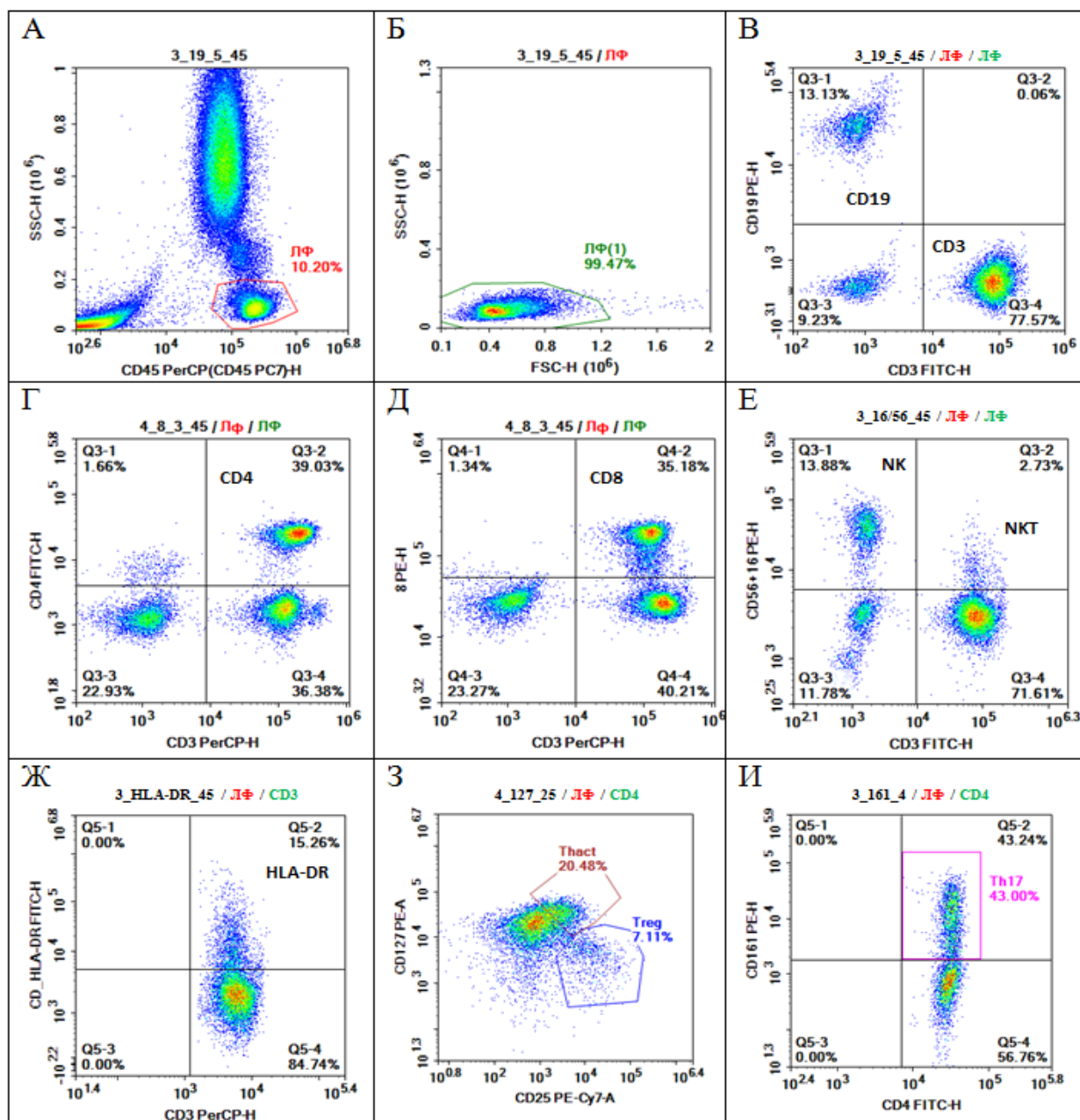


Рисунок 2.2 – Последовательность определения содержания основных и малых популяций лимфоцитов методом пошагового гейтирования: А – выделение лимфоидного региона по CD45, Б – выделение лимфоцитов по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, В-Е – определение популяций Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов, цит.Т-лимфоцитов, NK-клеток по экспрессии CD3, CD19, CD4, CD8, CD56 соответственно, Ж – выделение популяции активированных Т-лимфоцитов по макроерам HLA-DR и CD3, З-И – определение популяций CD4⁺-Т-клеток Thact, Treg, Th17 по экспрессии CD25, CD127 и CD161

2.2.2. Определение содержания субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти

Для анализа содержания субпопуляций Т-клеток памяти использовали следующие МАТ: CD4, CD8 - FITC (Beckman Coulter, США); CD45R0 - PE, CD197 - APC, CD3 - PerCP (Sony Biotechnology, США).

Методом пошагового гейтирования проводили выделение следующих субпопуляций клеток памяти (Рисунок 2.3):

- CD3⁺CD4⁺CD45R0⁻CD197(CCR7)⁺ - наивные Т-хелперы (T_{NAIVE});
- CD3⁺CD4⁺CD45R0⁺CD197(CCR7)⁺ - центральные Т-клетки памяти (T_{CM});
- CD3⁺CD4⁺CD45R0⁺CD197(CCR7)⁻ - эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM});
- CD3⁺CD4⁺CD45R0⁻CD197(CCR7)⁻ - терминально-дифференцированные эффекторные Т-клетки (T_{EMRA});
- CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD197(CCR7)⁺ - наивные цитотоксические Т-лимфоциты (T_{cytNAIVE});
- CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD197(CCR7)⁺ - центральные цитотоксические Т-лимфоциты (T_{cytCM});
- CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD197(CCR7)⁻ - эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты (T_{cytEM});
- CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD197(CCR7)⁻ - терминально-дифференцированные эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты (T_{cytEMRA}).

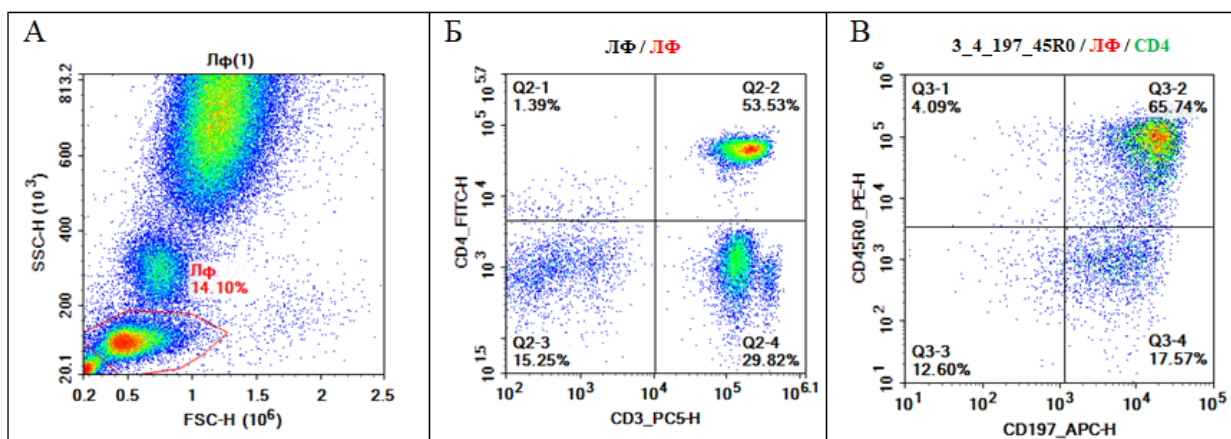


Рисунок 2.3 – Метод последовательного гейтирования для определения субпопуляций CD4⁺-Т-клеток памяти: А – выделение лимфоидного региона по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, Б – определение популяции Т-хелперов по экспрессии CD3 и CD4, В – оценка содержания популяций CD4⁺-Т-клеток памяти по CD197 и CD45R0 (для популяции CD8⁺-Т-клеток анализ строился аналогично)

2.2.3. Оценка содержания клеток-супрессоров миелоидного происхождения и их функциональной активности

Количество MDSCs определяли методом пошагового гейтирования, включающий выделение «лимфоидно-моноцитарного» региона, выделение популяции клеток, не несущих на себе линейные лимфоцитарные маркеры CD3, CD19, CD56 с флуорохромом PE и негативные по HLA-DR – FITC, выделение двойной позитивной популяции по маркерам CD11b – APC-Cy7 и CD33 – PE-Cy7, разделение популяции MDSCs по экспрессии CD14 – PerCP и CD15 – APC на субпопуляции M-MDSCs и G-MDSCs. При фенотипировании субпопуляций MDSCs выделяют:

- M-MDSCs имеющие фенотип CD11b⁺CD14⁺CD33⁺HLA-DR^{-low},
- G-MDSCs – CD11b⁺CD15⁺CD33⁺HLA-DR^{-low} и
- (M⁻G⁻)-MDSCs, негативную по маркерам CD14 и CD15 с фенотипом CD11b⁺CD33⁺HLA-DR^{-low}CD14⁻CD15⁻ (Рисунок 2.4).

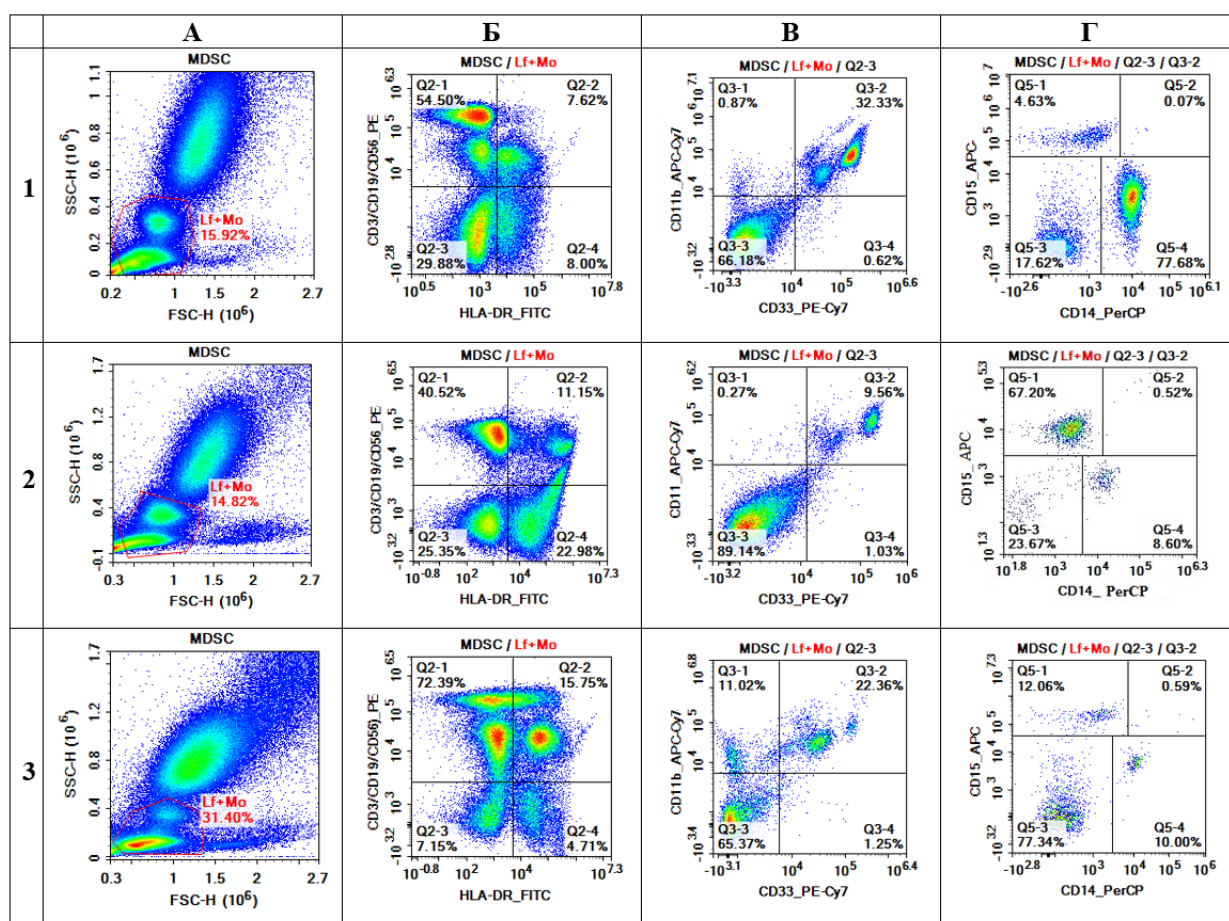


Рисунок 2.4 – Алгоритм определения MDSCs и субпопуляций M-MDSCs, G-MDSCs и MDSCs-(M+G⁻): А - выделение «лимфоидно-моноцитарного» региона по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; Б - выделение популяции клеток, не несущих на себе линейные лимфоцитарные маркеры CD3, CD19, CD56 и негативные по HLA-DR; В - выделение двойной позитивной популяцию по маркерам CD11b и CD33; Г - разделение популяции MDSCs на субпопуляцию M-MDSCs и G-MDSCs по экспрессии CD14 и CD15. Варианты определения MDSCs у обследованных пациентов в случае существенного увеличения популяции M-MDSCs (Г-1), увеличения популяции G-MDSCs (Г-2) и преобладания популяции с фенотипом MDSCs-M+G⁻ (Г-3)

Иммуносупрессивную способность популяции MDSCs оценивали по экспрессии внутриклеточного фермента аргиназы-1. Протопоподготовка включала в себя выделение МНК из периферической крови пациентов. Цельную кровь разбавляли теплой средой «RPMI 1640» в соотношении 1:3 и наслаивали на 2 мл фикола 1,077 г/см³ и центрифугировали 20 минут при 2000 RPM. Лейкоцитарное кольцо собирали в 15 мл пробирки Falcon и проводили отмывку средой «RPMI 1640» в течение 8 минут при тех же

условиях. К выделенной суспензии клеток (100 мкл) добавляли 10 мкл МАТ, согласно следующей панели: CD3, CD19, CD56, HLA-DR – FITC (коктейль), CD11b – APC-Су7 и CD33 – PE-Су7. Клетки инкубировали с МАТ в течение 20 минут в темном месте. Пермеабелизацию клеток проводили с использованием набора «BDCytofix/Cytoperm»(США), согласно инструкции производителя. После пермеабелизации клеток добавляли 10 мкл МАТ аргиназы-1 – PE и инкубировали 20 минут в темном месте. Запись образца выполняли на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences, США). Экспрессию фермента аргиназы-1 определяли по средней интенсивности флуоресценции (MFI; Рисунок 2.5).

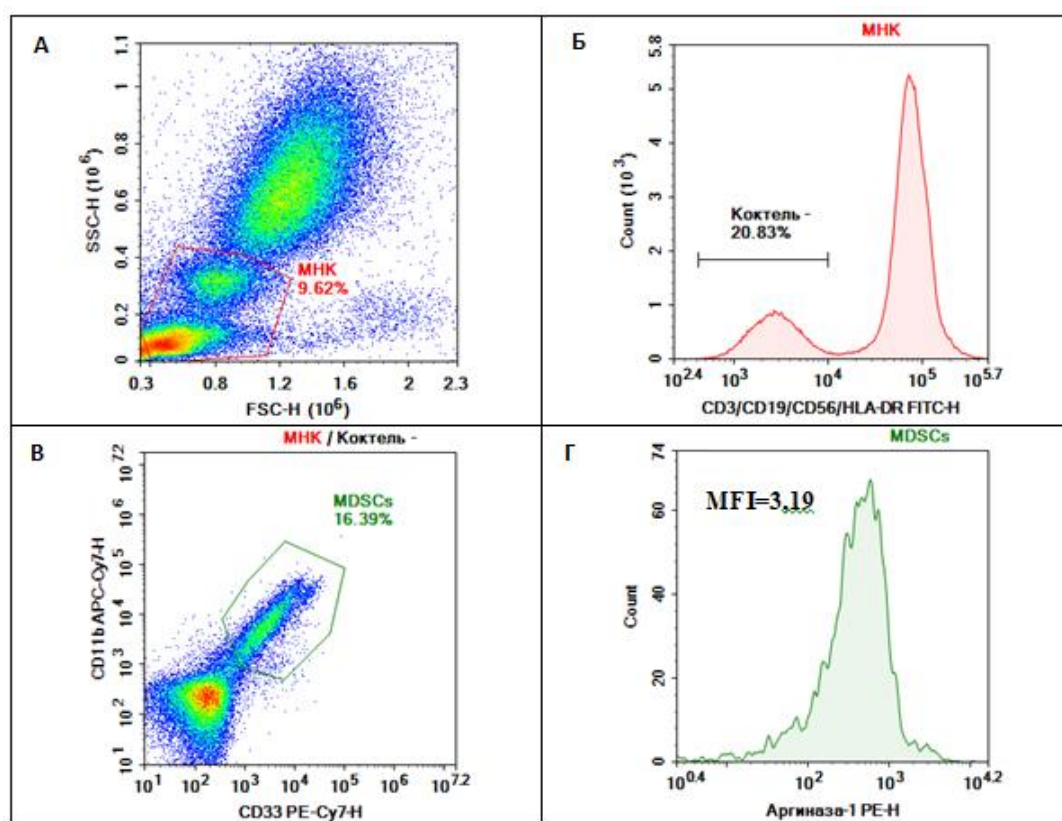


Рисунок 2.5 – Алгоритм определения уровня экспрессии аргиназы-1 в популяции MDSCs: А – выделение мононуклеарных клеток по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; Б – выделение популяции клеток, не несущих на себе линейные лимфоцитарные маркеры CD3, CD19, CD56 и негативные по HLA-DR; В – выделение MDSCs по маркерам CD11b и CD33; Г – оценка экспрессии внутриклеточного фермента аргиназы-1 по интенсивности флуоресценции PE

2.2.4. Определение количества субпопуляций CD4⁺-Т-клеток с экспрессией CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидазы

Панель МАТ для оценки субпопуляций CD4⁺-Т-клеток, экспрессирующих CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидазы включала антитела, конъюгированные с флуорохромами: CD3 – PerCP, CD4 – FITC, CD127 – PE, CD161 – PE, CD25 – PE-Cy7, CD39 – APC и CD73 – APC-Cy7 (Beckman Coulter, Sony Biotechnology, США).

Методом пошагового гейтирования проводили выделение следующих популяций клеток: CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} - Treg, CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} - Thact, CD3⁺CD4⁺CD161⁺ - Th17, с последующей оценкой доли клеток, экспрессирующих CD39 и CD73: CD39⁺Tregs, CD73⁺Tregs, CD39⁺Thact, CD73⁺Thact, CD39⁺Th17, CD73⁺Th17 и коэкспрессирующих CD39 и CD73: CD39⁺CD73⁺Tregs, CD39⁺CD73⁺Thact, CD39⁺CD73⁺Th17 (Рисунок 2.6, Рисунок 2.7).

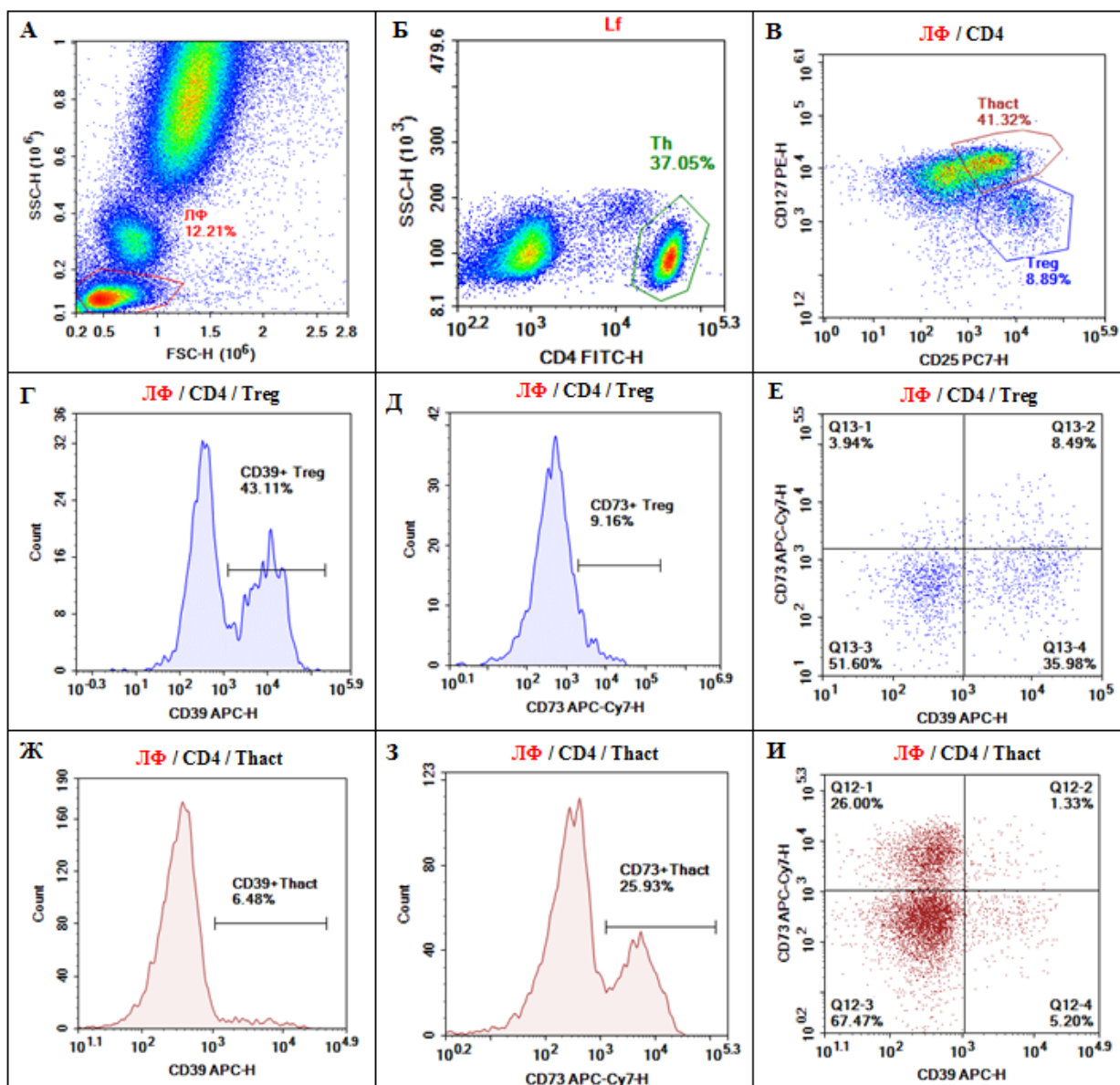


Рисунок 2.6 – Определение содержания Thact и Treg, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73 методом пошагового гейтирования: А – выделение лимфоидного региона по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; Б – выделение популяции Т-хелперов по маркеру CD4; В – выделение популяций Thact и Treg по маркерам CD25 и CD127; Г-Д, Ж-З – оценка доли популяций Treg и Thact, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73; Е, И – определение содержания Treg и Thact, коэкспрессирующих CD39 и CD73

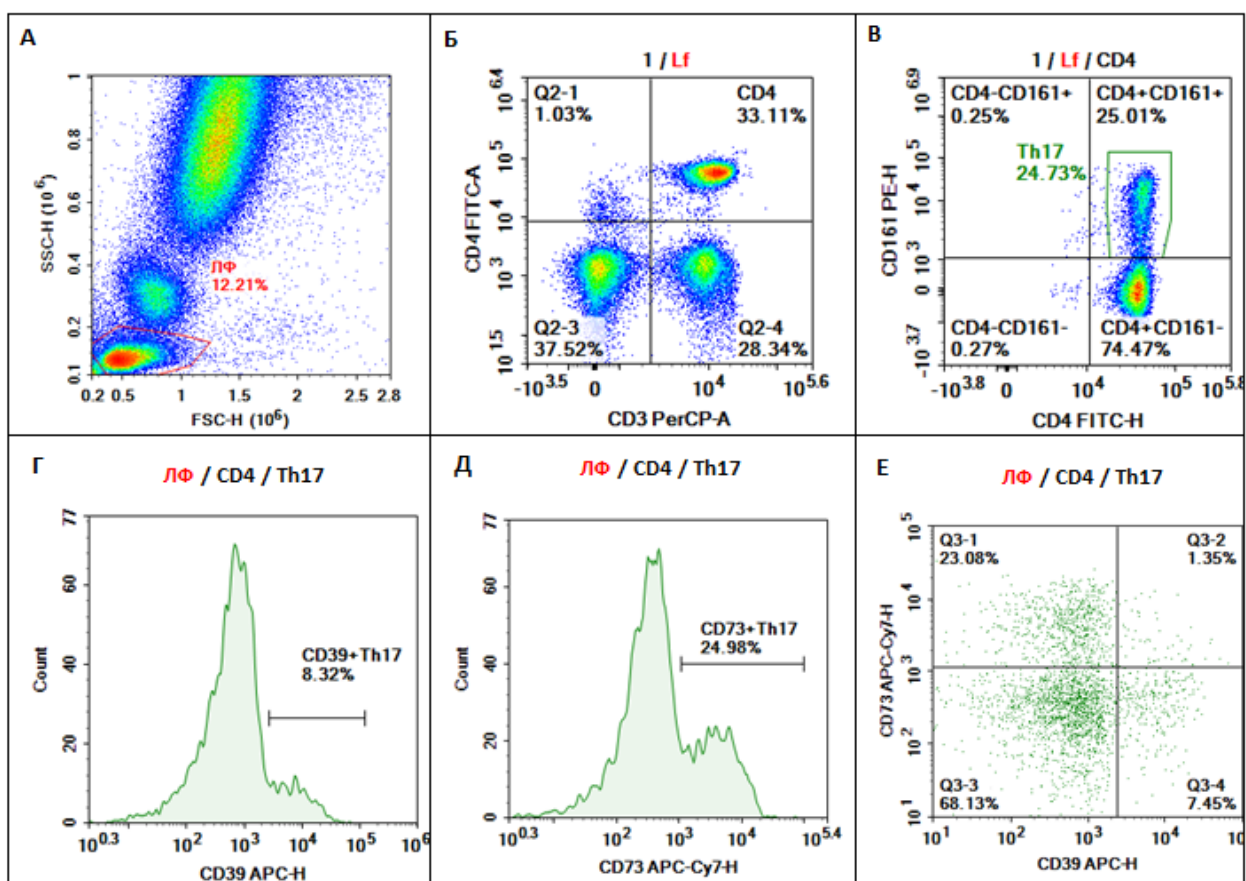


Рисунок 2.7 – Определение количества Th17-лимфоцитов экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73 методом пошагового гейтирования (аналогично методу, представленному на Рисунке 2.5)

2.2.5. Иммуноцитохимический метод определения активности дегидрогеназ в популяциях лимфоцитов

Активность метаболизма в популяциях лимфоцитов определяли по активности митохондриальных дегидрогеназ: СДГ и ГФДГ иммуноцитохимическим методом, объединяющим возможности иммуфенотипирования лимфоцитов и количественного цитохимического анализа [63].

Иммуноцитохимический метод определения активности дегидрогеназ основывается на измерении показателей гранулярности клетки до и после проведения цитохимической реакции. Реакция проводится на пермеабиллизированных клеткам лимфоконцентрата. Образование водонерастворимых гранул в процессе цитохимической реакции приводит к

изменению показателя бокового светорассеяния (SSC), отражающего гранулярность клетки. Активность фермента оценивали отношением показателя SSC после проведения реакции к SSC до проведения реакции, умноженным на 100 (Рисунок 2.8).

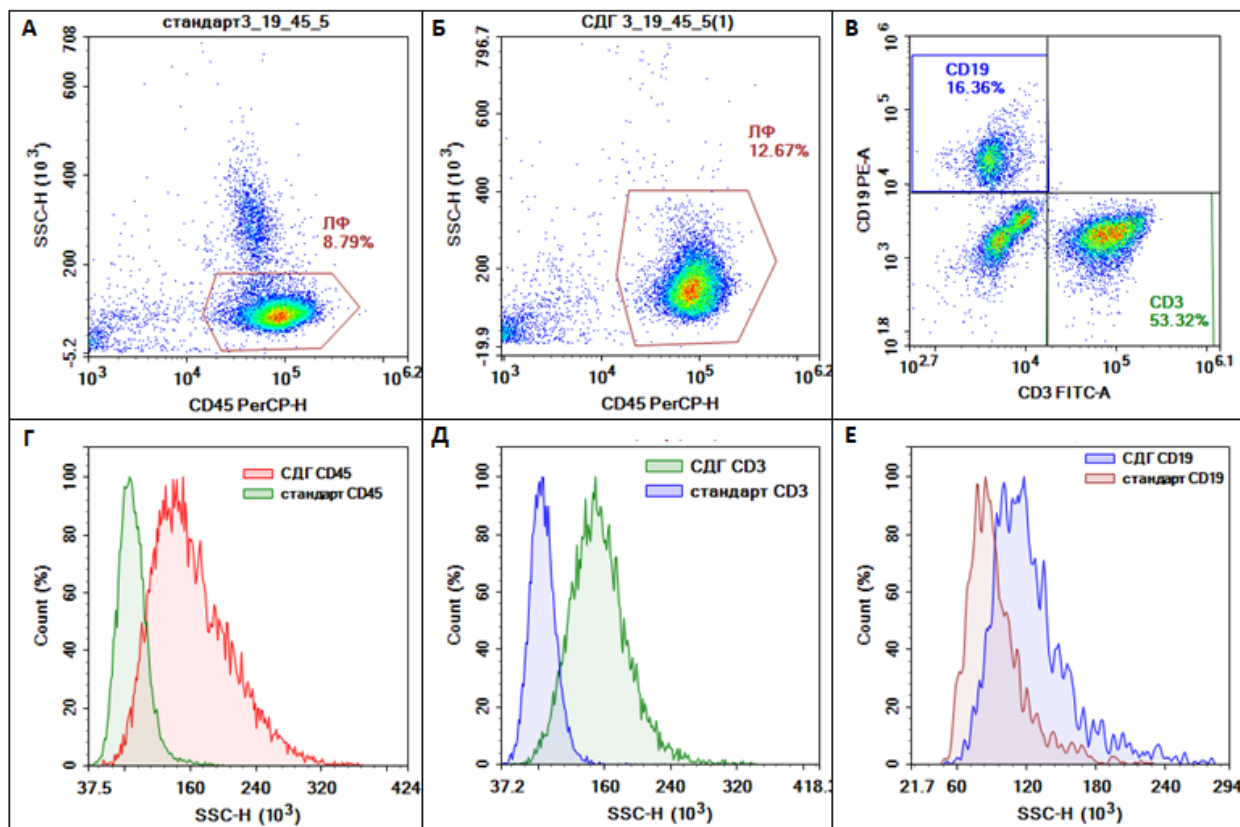


Рисунок 2.8 – Этапы определения активности СДГ иммуноцитохимическим методом с использованием метода проточной цитометрии: А-Б – распределение лимфоцитов (CD45) по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния до (А) и после (Б) проведения цитохимической реакции; В-Г – выявление популяции В-лимфоцитов (CD19) и Т-лимфоцитов (CD3) по параметрам флуоресценции; Д-Е – распределения популяций лимфоцитов по параметру SSC до (стандарт) и после (СДГ) проведения реакции

Иммуноцитохимическое исследование лимфоцитов проводили с использованием наборов для определения СДГ и ГФДГ (НИЦ «Курчатовский институт» - ИРЕА, Россия), согласно инструкции производителя. Активность СДГ исследовали в основных и малых популяциях лимфоцитов периферической крови. Для идентификации популяций лимфоцитов использовали МАТ фирм Beckman Coulter и Becton Dickinson (США). Анализ

и выделение популяций лимфоцитов проводили методом последовательного гейтирования описанным выше.

Основные этапы проведения иммуноцитохимического исследования:

1. Стандартное выделение МНК из цельной крови на градиенте фиколла 1,077 г/см³.
2. Инкубация клеток с МАТ для иммунофенотипирования популяций лимфоцитов.
3. Пермеабилзация клеток с использованием набора BDCytofix/Cytoperm (США) согласно инструкции производителя.
4. Проведение цитохимической реакции на выявление активности фермента в инкубационной среде, состоящей из субстрата реакции – янтарно-кислого натрия или глицеролфосфата натрия, фосфатного буфера и п-нитротетразолия фиолетового.
5. Анализ результатов на проточном цитометре: в процессе ферментативной реакции п-нитротетразолий фиолетовый восстанавливается с образованием нерастворимых в воде круглых гранул формазана, что приводит к увеличению коэффициента бокового светорассеяния (Рисунок 2.8).

2.2.6. Анализ ядерно-плазматического переноса фактора транскрипции NF-κB методом проточной цитометрии с визуализацией

Анализ проводился на выделенных моноклеарных клетках периферической крови. Для выделения МНК использовали 5 мл цельной крови, взятой утром натощак в пробирки с ЭДТА, и обрабатывали в тот же день. Цельную кровь разбавляли теплой средой «RPMI-1640» без глутамата (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:3 и осторожно наслаивали на 2 мл Histopaque 1,077 г/см³ (Sigma-Aldrich; США), далее центрифугировали 20 минут при 2000 RPM при комнатной температуре. Лейкоцитарное кольцо собирали в 15 мл пробирки Falcon (BD; США) и проводили отмывку средой RPMI в течение 8 минут при тех же условиях. Затем аккуратно сливали

надосадочную жидкость и разбавляли клетки средой RPMI-1640 до необходимого объема.

Для выделения клеточных популяций методом пошагового гейтирования использовали МАТ меченные флуорохромами производства Beckman Coulter (США): CD19-PE, CD4-PE, CD8-PE, CD (16/56)-PE, CD127-PE, CD161-PE, CD3-ECD, CD4-PB, CD25 PE-Cy7. Оценку количества клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с визуализацией «Amnis ImageStream^X Mk II» с применением набора «Amnis NF-κB Translocation Kit» (Luminex, США), включающего конъюгированные антитела Anti-Hu NF-κB (p50) - Alexa Fluor 488 для обнаружения NF-κB и ядерный краситель – 7-AAD.

В пробирки со 100 мкл МНК добавляли по 10 мкл МАТ и инкубировали 20 минут в темном месте, далее проводился анализ уровня транслокации NF-κB согласно инструкции набора. Исследовали следующие популяции клеток: CD3⁺ (Т-лимфоциты); CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперы); CD3⁺CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты); CD3⁺CD19⁺ (В-лимфоциты); CD3⁺CD16⁺/CD56⁺ (NK-клетки); CD3⁺CD16⁺/CD56⁺ (CD3⁺CD56⁺ Т-клетки); CD3⁺CD4⁺CD8⁺ (незрелые Т-лимфоциты); CD4⁺CD25⁺CD127^{high} (Thact); CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (Treg); CD4⁺CD161⁺CD3⁺ (Th17), CD3⁺CD8⁺CD161⁺ (Tc17).

Визуализацию и запись клеток выполняли на проточном цитофлуориметре ImageStream Mk II с использованием программного обеспечения INSPIRE™ (Luminex, США) при 40-кратном увеличении и низкой скорости потока. Запись изображений для каждого образца включала не менее 20000 событий в лимфоидном регионе для основных популяций лимфоцитов и не менее 40000 событий для популяций Treg, Thact, Th17 и Tc17.

Собранные изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения IDEAS® ImageStream^X (Luminex, США) по алгоритму, представленному на Рисунок 2.9.

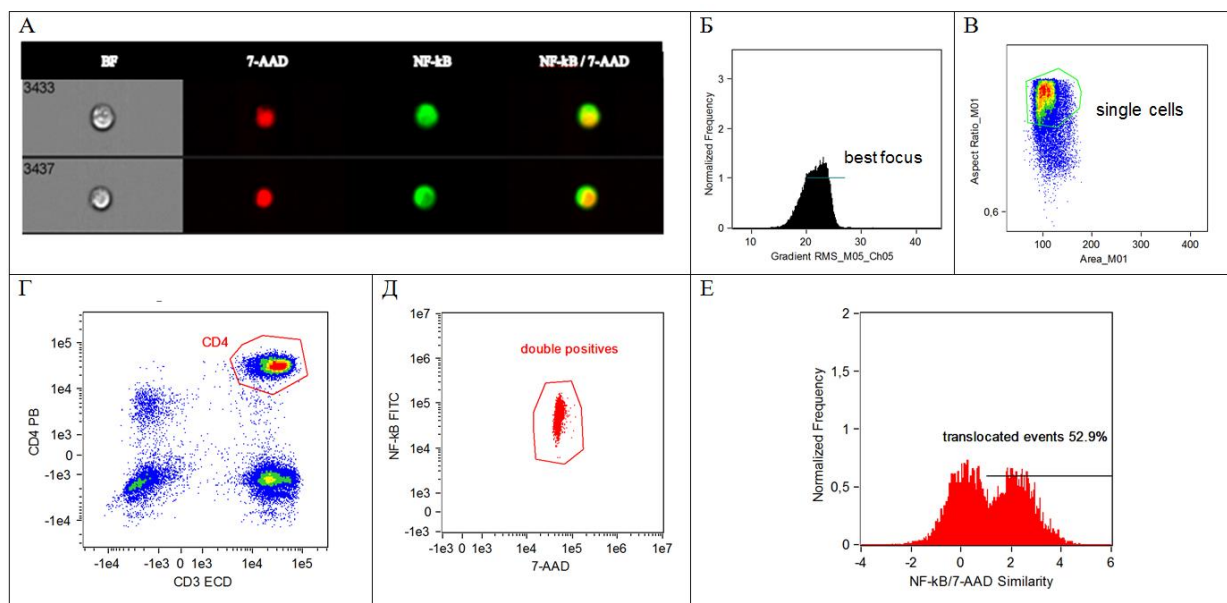


Рисунок 2.9 – Последовательность этапов анализа при оценке количества клеток с транслокацией NF-κB: А – галерея записанных изображений клеток; Б – выделение клеток в хорошем фокусе по параметру Gradient RMS; В – выделение одиночных событий; Г – выделение исследуемой популяции лимфоцитов – в частности, Т-хелперы - CD3⁺CD4⁺ (CD3_ECD - канал 4; CD4_PB - канал 3); Д – выделение двойных-позитивных клеток - NF-κB⁺/7-AAD⁺ (NF-κB_FITC - канал 2; 7-AAD - канал 5); Е – выделение процента клеток с транслокацией NF-κB по параметру Similarity>1

Перед анализом собранных изображений проводилось создание матрицы спектральной компенсации в программе IDEAS. Для этого использовали одноцветные контроли, записанные без освещения для светопольной визуализации. Анализ данных для каждого изображения клеток начинался с применением матрицы спектральной компенсации. После чего проводился анализ клеток в хорошем фокусе и выделение одиночных событий (Рисунок 2.9 Б, В). Последующий алгоритм анализа изображений включал выделение исследуемой популяции лимфоцитов и двойных-позитивных клеток по интенсивности свечения NF-κB⁺/7-AAD⁺ (Рисунок 2.9 Г, Д). На следующем этапе проводилась оценка показателя подобия/сходства (Similarity), отражающего степень совместной локализации NF-κB и 7-AAD в

клетках (Рисунок 2.9Е). Показатель подобия рассчитывается из коэффициента корреляции Пирсона с применением аналитической надстройки в программе IDEAS (Luminex, США). Гистограмма показателя Similarity отражает наложение двух флуоресцентных сигналов для конкретной популяции клеток. При Similarity больше 1 вычисляется процент активированных клеток с транслокацией NF-κB в анализируемой популяции.

2.2.7. Метод мультиплексного определения уровня циркулирующих цитокинов в периферической крови

У 88 детей с вульгарным псориазом оценили уровень цитокинов в сыворотке крови. Образцы сыворотки получали методом центрифугирования цельной крови и хранили при температуре -70°C.

В работе использован набор MILLIPLEX MAP Human Th17 (Millipore, Германия), позволяющий одновременно количественно определить уровень 25 цитокинов и хемокинов: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31, IL-33, GM-CSF, IFNγ, CCL20/MIP-3α, TNFα и TNFβ. Протокол исследования соответствовал инструкции производителя. Считывание образцов и анализ данных выполняли на приборе Bio-plex 200 (Bio-Rad, США).

Мультиплексный анализ предназначен для одновременного количественного определения концентрации нескольких аналитов (цитокинов) в одном биологическом образце. Технология мультиплексного анализ (Luminex xMAP) основана на использовании полистироловых микросфер диаметром 5,6 мкм. Микросферы маркированы красным и инфракрасным флуорофорами в различной концентрации, имеют уникальные спектральные характеристики («спектральный адрес») (Рисунок 2.10).

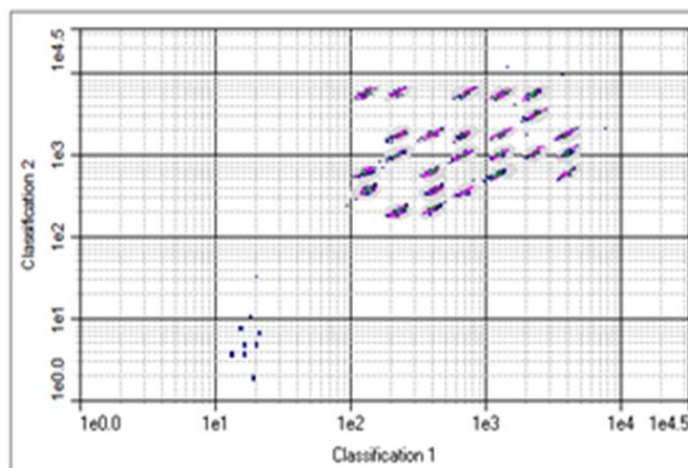


Рисунок 2.10 – Идентификация микросфер в наборе Human Th17 для 25 аналитов на основе наполнения разными концентрациями красителей

На поверхности полистироловых микросфер расположены флуоресцентные репортеры, специфически взаимодействующие с исследуемыми аналитами. Для выявления того или иного аналита проводят инкубацию микросфер с образцом. Для проявления реакции используют конъюгат, в составе которого входит флуоресцентная метка фикоэритрин. Интенсивность свечения фикоэритрина пропорциональна концентрации искомого аналита. Во время измерения каждая микросфера подвергается облучению двумя лазерами с разной длиной волны и сигнал, испускаемый флуорофорами, регистрируется датчиками прибора. Одновременно анализируется тип микросферы и концентрация искомого аналита на соответствующем типе частиц.

При анализе данных для каждого исследуемого цитокина выполняется построение калибровочной кривой, на основании которой вычисляется значение концентрации цитокина в образце (Рисунок 2.11).

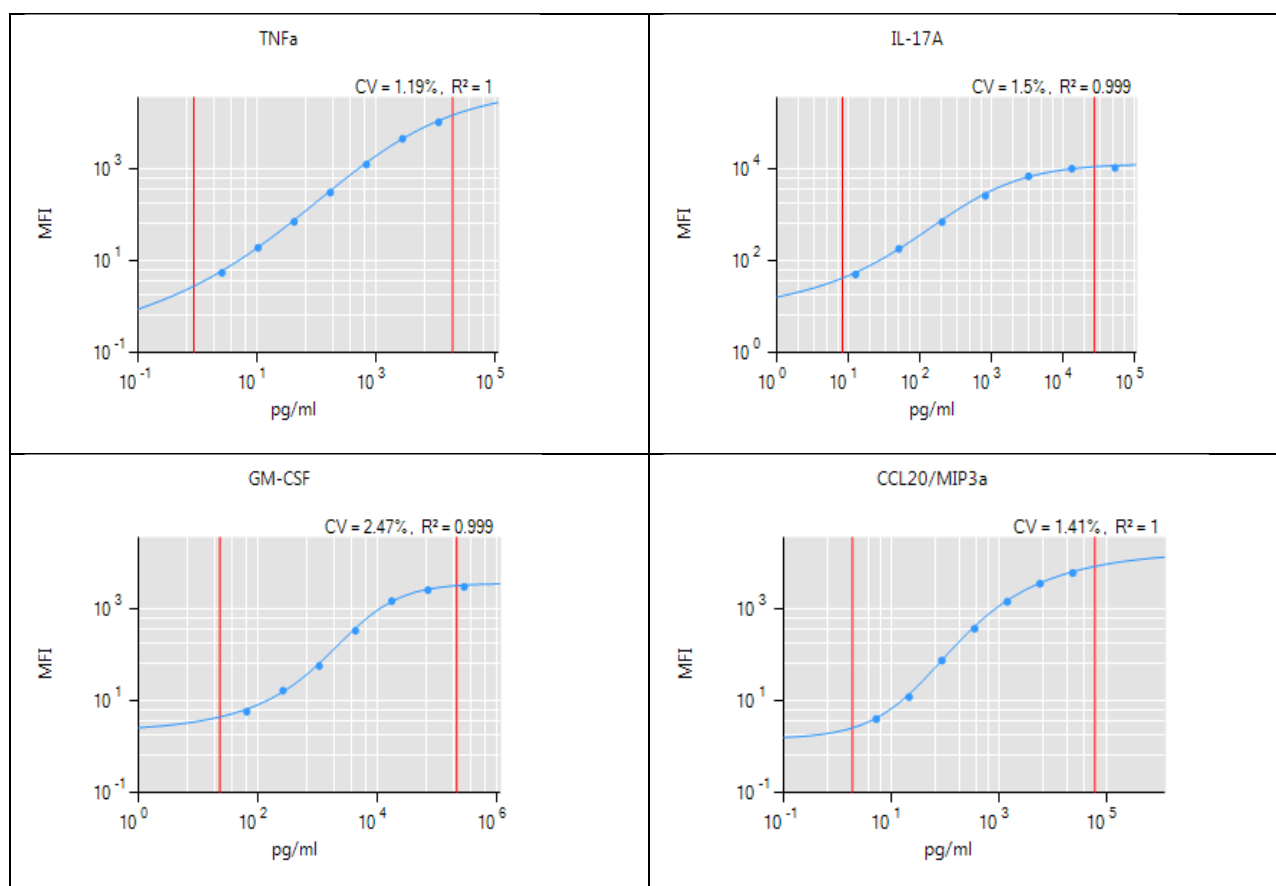


Рисунок 2.11 – Примеры калибровочных кривых для определения концентрации цитокинов: по оси ординат – MFI – среднее значение интенсивности флуоресценции, по оси абсцисс – концентрация цитокинов, пг/мл

2.2.8. Статистические методы исследования

Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с помощью пакета Statistica 13.0 (StatSoft, США). Построение точечных графиков выполнено с использованием Prism Graphpad 9 (США). Описательная статистика количественных признаков в таблицах и на графиках представлена в виде медианы (нижний – верхний квартили) – Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$).

В связи с тем, что в исследование включены дети разного возраста, для оценки изменений в основных и малых популяциях лимфоцитов, рассчитывали отклонения индивидуальных показателей от уровня возрастной нормы по формуле:

$$X_n = (X_{\min} - X) / 0,01 * (X_{\max} - X_{\min}), \text{ где}$$

X_n – значение индивидуального показателя, нормированное на возрастную норму; X – значение изучаемого показателя; $X_{\max}$ – верхняя граница возрастной нормы; $X_{\min}$ – нижняя граница возрастной нормы. Диапазон возрастной нормы принимали за 100%.

Достоверность различий между группами оценивали непараметрическим U-критерием Манна-Уитни, критерием Вилкоксона для сопряженных пар, критерием Фишера (F-критерий), различия распределений оценивали критерием χ -квадрат. Различия при $p < 0,05$ считались достоверными. Корреляционный анализ был выполнен методом множественной пошаговой регрессии с исключением. Анализ диагностической и прогностической значимости исследуемых параметров, а также оценку уровня пороговых значений показателей, осуществляли методом характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-анализ) с использованием программы «SPSS 16.0» («SPSS: An IBM Company», США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Показатели клеточного иммунитета у детей с псориазом

3.1.1. Содержание основных и малых популяций лимфоцитов у детей с вульгарным псориазом

На первом этапе работы оценивали показатели клеточного иммунитета у 277 детей с вульгарным псориазом и у 90 здоровых детей (группа сравнения). В связи с тем, что показатели иммунного статуса зависят от возраста детей, необходимо было учитывать возрастную динамику показателей. В зависимости от возраста дети с псориазом были разделены на 4 возрастные группы согласно [66]: от 2 до 6 лет (группа 1, $n=28$), от 6 до 9 лет (группа 2, $n=45$), от 9 до 12 лет (группа 3, $n=61$), старше 12 лет (группа 4, $n=143$).

Проведенный анализ количественных характеристик основных популяций лимфоцитов у детей с вульгарным псориазом в разных возрастных группах показал достоверное снижение абсолютного количества общей популяции лимфоцитов ($p_{1-4}<0,000$), Т-лимфоцитов ($p_{1-4}<0,000$), Т-хелперов ($p_{1-4}<0,000$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($p_{1-4}<0,000$), активированных Т-лимфоцитов ($p_{1-4}=0,031$) в группе детей старше 12 лет (4 группа) относительно детей младшего возраста (1 группа, 2-5 лет; Таблица 3.1). Корреляционный анализ также показал достоверное снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов ($r=-0,46$; $p<0,000$), Т-хелперов ($r=-0,42$; $p<0,000$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($r=-0,34$; $p<0,000$) с возрастом детей с псориазом. В группе сравнения выявлено аналогичное снижение абсолютного количества этих популяций с возрастом: Т-лимфоцитов ($r=-0,30$; $p=0,04$), Т-хелперов ($r=-0,44$; $p=0,003$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($r=-0,38$; $p=0,008$; Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Возрастная динамика относительного и абсолютного содержания популяций Т-лимфоцитов у детей с вульгарным псориазом и в группе сравнения. * - $p < 0,05$ достоверные отличия между показателями детей с псориазом и группой сравнения соответствующего возраста, критерий Манна-Уитни

Показатель	Группа	Возрастная группа, возрастной диапазон			
		1	2	3	4
		2-5 лет	6-8 лет	9-11 лет	12-18 лет
Лимфоциты, абс	Псориаз	3091 (2445-4610)	2795 (2153-2990)	2355 (1820-3091)	2132 (1718-2767)
	Группа сравнения	3542 (2948-4272)	2373 (2292-2791)	2041 (1813-2493)	2081 (1919-2402)
Т-лимфоциты, %	Псориаз	72,9 (65,8-75,1)	71,2 (70,5-77,9)	74,3 (68,9-78,0)	74,5* (70,4-78,8)
	Группа сравнения	67,8 (62,3-73,3)	73,1 (70,3-77,0)	73,6 (67,9-78,6)	72,2 (67,3-75,9)
Т-лимфоциты, кл/мкл	Псориаз	2353 (1803-3075)	2450* (1942-2792)	1699 (1315-2393)	1604 (1358-2035)
	Группа сравнения	2438 (1774-3088)	1806 (1639-2041)	1611 (1230-1829)	1498 (1278-1914)
Т-хелперы, %	Псориаз	38,9 (32,2-43,8)	40,6 (35,7-45,5)	40,8* (36,4-46,3)	41,8 (36,4-45,4)
	Группа сравнения	38,5 (35,0-42,9)	39,1 (34,9-44,5)	36,9 (31,6-39,8)	40,9 (36,9-45,7)
Т-хелперы, кл/мкл	Псориаз	1261 (988-1568)	1250* (1011-1641)	958* (722-1315)	883 (762-1092)
	Группа сравнения	1312 (1095-1478)	868 (812-1185)	727 (606-1016)	848 (762-1018)
Цитотоксические Т-лимфоциты, %	Псориаз	27,6* (24,6-30,7)	28,6 (22,5-31,5)	28,2 (23,5-32,0)	29,1* (25,1-34,0)
	Группа сравнения	22,6 (20,8-26,7)	26,7 (22,6-33,3)	30,5 (26-35)	25,9 (23,9-30,1)
Цитотоксические Т-лимфоциты, кл/мкл	Псориаз	992 (696-1148)	877* (681-1106)	648 (505-889)	591* (504-768)
	Группа сравнения	866 (616-951)	745 (558-911)	633 (493-800)	556 (452-728)
CD4/CD8	Псориаз	1,5* (1,2-1,7)	1,5 (1,2-1,8)	1,4* (1,2-2,1)	1,5* (1,2-1,8)
	Группа сравнения	1,7 (1,5-1,8)	1,5 (1,1-1,8)	1,2 (0,9-1,4)	1,6 (1,3-1,8)
Двойные негативные Т-лимфоциты, %	Псориаз	6,2 (5,1-6,8)	5,3 (4,1-7,8)	4,9* (3,3-6,0)	5,0 (4,0-6,8)
	Группа сравнения	5,6 (4,9-6,7)	5,3 (4,5-6,5)	6,9 (6,3-12,0)	5,2 (3,2-7,1)
Двойные негативные Т-лимфоциты, кл/мкл	Псориаз	218 (156-255)	153 (145-261)	105* (90-168)	116 (71,5-165,5)
	Группа сравнения	201 (136-236)	163 (149-187)	133 (109-236)	126 (87-178)

Продолжение таблицы 3.1

Активированные Т-лимфоциты (CD3+HLA-DR+),%	Псориаз	5,4 (4,2-11,8)	4,3 (3,1-6,5)	5,3* (3,6-9,1)	5,8 (3,5-8,6)
	Группа сравнения	4,9 (3,3-5,6)	6,8 (2,9-9,3)	7,6 (5,3-10,5)	6,4 (3,5-7,1)
Активированные Т-лимфоциты, кл/мкл	Псориаз	189 (107-272)	136 (89-215)	153 (71-227)	132 (78-196)
	Группа сравнения	156 (106-230)	151 (82-213)	165 (113-202)	124 (73-159)

Анализ относительного количества Т-лимфоцитов у детей с псориазом не выявил достоверных различий от возраста, в то время как в группе здоровых детей процент Т-лимфоцитов достоверно увеличивается с возрастом ($p_{1-4}=0,028$; Таблица 3.1) за счет увеличения популяции цитотоксических Т-лимфоцитов ($p_{1-4}=0,028$). В группе детей с псориазом существенных возрастных изменений в относительном количестве популяций Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов не выявлено. Корреляционный анализ показал слабую зависимость относительного количества Т-лимфоцитов ($r=0,13$; $p=0,019$), Т-хелперов ($r=0,11$; $p=0,005$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($r=0,14$; $p=0,016$) от возраста.

Сравнение содержания популяций Т-лимфоцитов у детей с псориазом относительно группы сравнения в разных возрастных группах показало достоверное увеличение абсолютного количества Т-лимфоцитов во 2 возрастной группе (6-8 лет), Т-хелперов в возрастных группах 2 и 3, цитотоксических Т-лимфоцитов в группах 2 и 4, а также достоверное снижение абсолютного количества популяции двойных негативных Т-лимфоцитов в возрастной группе 3 (Таблица 3.1). Получено значимое увеличение иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) относительно показателей группы сравнения во всех возрастных группах, за исключением группы 2 (Таблица 3.1). Анализ относительного количества популяций лимфоцитов относительно группы сравнения показал достоверное увеличение Т-лимфоцитов в 4 возрастной группе, Т-хелперов в группе 3, CD8⁺ Т-клеток в группах 1 и 4, при этом содержание двойных негативных Т-

лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов в группе 3 было снижено (Таблица 3.1).

Оценка содержания общей популяции В-лимфоцитов у детей с псориазом показала достоверное увеличение абсолютного количества в возрастной группе 2 и 3 относительно группы сравнения (Таблица 3.2). Относительное количество CD5⁺ В-клеток достоверно снижено при всех возрастах, а абсолютное количество лишь в возрастной группе 1 и 4. При этом абсолютное количество CD5⁻ В-клеток у детей с псориазом было увеличено в возрастных группах 2, 3 и 4, а относительное - во всех исследуемых возрастных группах относительно показателей условно-здоровых детей (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Возрастная динамика относительного и абсолютного количества В-лимфоцитов, CD5⁺- и CD5⁻ В-клеток у детей с вульгарным псориазом и в группе сравнения. * - p<0,05 достоверные отличия между показателями детей с псориазом и группой сравнения соответствующего возраста, критерий Манна-Уитни

Показатель	группа	Возрастная группа, возрастной диапазон			
		1	2	3	4
		2-5 лет	6-8 лет	9-11 лет	12-18 лет
В-лимфоциты, %	Псориаз	17,0 (14,6-20,4)	15,4 (13,3-20,8)	15,2 (12,0-18,9)	14,6 (10,9-17,7)
	Группа сравнения	20,5 (15,6-24,8)	14,2 (12,1-16,9)	12,7 (11,2-15,8)	13,7 (12,4-17,5)
В-лимфоциты, кл/мкл	Псориаз	486 (427-740)	458* (381-674)	346* (261-499)	292 (215-411)
	Группа сравнения	662 (474-944)	389 (321-478)	287 (251-335)	301 (230-389)
CD5 ⁺ В-клетки, % CD19	Псориаз	37,1* (24,1-46,1)	25,4* (16,4-44,9)	34,9* (20,4-48,3)	22,9* (13,8-34,8)
	Группа сравнения	49,0 (37,4-56,8)	43,1 (31,5-48,7)	42,0 (36,9-52,7)	35,3 (25,2-49,4)
CD5 ⁺ В-клетки, кл/мкл	Псориаз	194* (118-233)	135 (75-197)	122 (61-160)	62* (35-118)
	Группа сравнения	306 (183-478)	143 (134-190)	140 (83-153)	102 (59-181)
CD5 ⁻ В-клетки, % CD19	Псориаз	62,9* (53,9-75,9)	75,2* (55,9-84,8)	65,4* (51,7-79,6)	77,9* (76,3-87,0)
	Группа сравнения	51,0 (43,2-59,6)	56,9 (51,3-68,5)	58,0 (47,3-63,1)	64,7 (50,6-74,8)

Продолжение таблицы 3.2

CD5 ⁺ В-клетки, кл/мкл	Псориаз	305 (230-457)	361* (346-561)	204* (148-388)	218* (157-289)
	Группа сравнения	375 (239-522)	176 (160-310)	146 (129-212)	174 (135-246)

Анализ возрастной динамики содержания В-лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения показал достоверное снижение абсолютного (ПС: $p_{1-4}=0,011$; гр.срав.: $p_{1-4}=0,001$) и относительно (ПС: $p_{1-4}<0,001$; гр.срав.: $p_{1-4}=0,001$) количества популяции с возрастом (Таблица 3.2). При этом корреляционный анализ также показал достоверное снижение относительного ($r=-0,23$; $p<0,001$) и абсолютного количества ($r=-0,44$; $p<0,001$) В-лимфоцитов с возрастом. Абсолютное количество CD5⁺ В-клеток (ПС: $p_{1-4}<0,000$; гр.срав.: $p_{1-4}<0,001$) и CD5⁺ В-клеток снижается с возрастом (ПС: $p_{1-4}<0,001$; гр.срав.: $p_{1-4}<0,001$), как у детей с псориазом, так и в группе сравнения, а относительное количество CD5⁺ В-клеток снижается с возрастом (ПС: $p_{1-4}<0,001$; гр.срав.: $p_{1-4}=0,017$), при увеличении CD5⁺ В-клеток (ПС: $p_{1-4}<0,001$; гр.срав.: $p_{1-4}=0,012$; Таблица 3.2).

У детей с псориазом выявлено значительное и достоверное увеличение абсолютного и относительного количества CD3⁺CD56⁺ Т-клеток в возрастных группах 1 и 3, относительно показателей здоровых детей (Таблица 3.3). Возрастная динамика популяции НК-клеток у детей с псориазом и в группе сравнения совпадают: абсолютное количество снижается с возрастом (ПС: $p_{1-4}<0,001$; гр.срав.: $p_{1-4}=0,011$), а относительное количество не зависит от возраста (Таблица 3.3). У детей с псориазом корреляционный анализ показал достоверное снижение абсолютного количества НК-клеток с возрастом ($r=-0,23$; $p<0,001$).

Таблица 3.3 - Возрастная динамика относительного и абсолютного содержания NK-клеток и CD3⁺CD56⁺ Т-клетки у детей с вульгарным псориазом и в группе сравнения. * - p<0,05 достоверные отличия между показателями детей с псориазом и группой сравнения соответствующего возраста, критерий Манна-Уитни

Показатель	группа	Возрастная группа, возрастной диапазон			
		1	2	3	4
		2-5 лет	6-8 лет	9-11 лет	12-18 лет
NK-клетки, %	Псориаз	10,9 (7,5-15,5)	7,9 (6,6-11,0)	9,5 (6,4-15,0)	10,1 (6,7-15,0)
	Группа сравнения	12,6 (8,4-14,7)	10,0 (7,2-14,8)	11,9 (8,2-18,4)	12,9 (8,2-16,3)
NK-клетки, кл/мкл	Псориаз	395 (264-510)	273 (190-358)	226 (148-361)	239 (132-330)
	Группа сравнения	374 (243-564)	225 (163-358)	232 (170-394)	243 (160-380)
CD3 ⁺ CD56 ⁺ Т-клетки, %	Псориаз	5,4* (2,1-7,9)	1,9 (1,3-3,4)	2,1* (1,2-4,0)	2,9 (1,4-5,7)
	Группа сравнения	1,6 (1,2-3,2)	2,5 (1,3-5,1)	1,6 (0,9-2,0)	2,3 (1,2-4,1)
CD3 ⁺ CD56 ⁺ Т-клетки, кл/мкл	Псориаз	176* (76-273)	72 (40-116)	62* (29-93)	69 (31-133)
	Группа сравнения	51 (24-94)	59 (29-156)	36 (18-47)	41 (25-92)

Анализ отклонения содержания основных популяций лимфоцитов от показателей возрастной нормы позволил объединить детей с вульгарным псориазом разных возрастных групп. У детей с псориазом выявлено увеличение относительного количества Т-хелперов в 47% случаев и снижение цитотоксических Т-лимфоцитов в 37% случаев, что привело к увеличению иммуннорегуляторного индекса в 52% случаев, при этом в 51% случаев наблюдалось снижение относительного количества NK-клеток (Рисунок 3.1А).

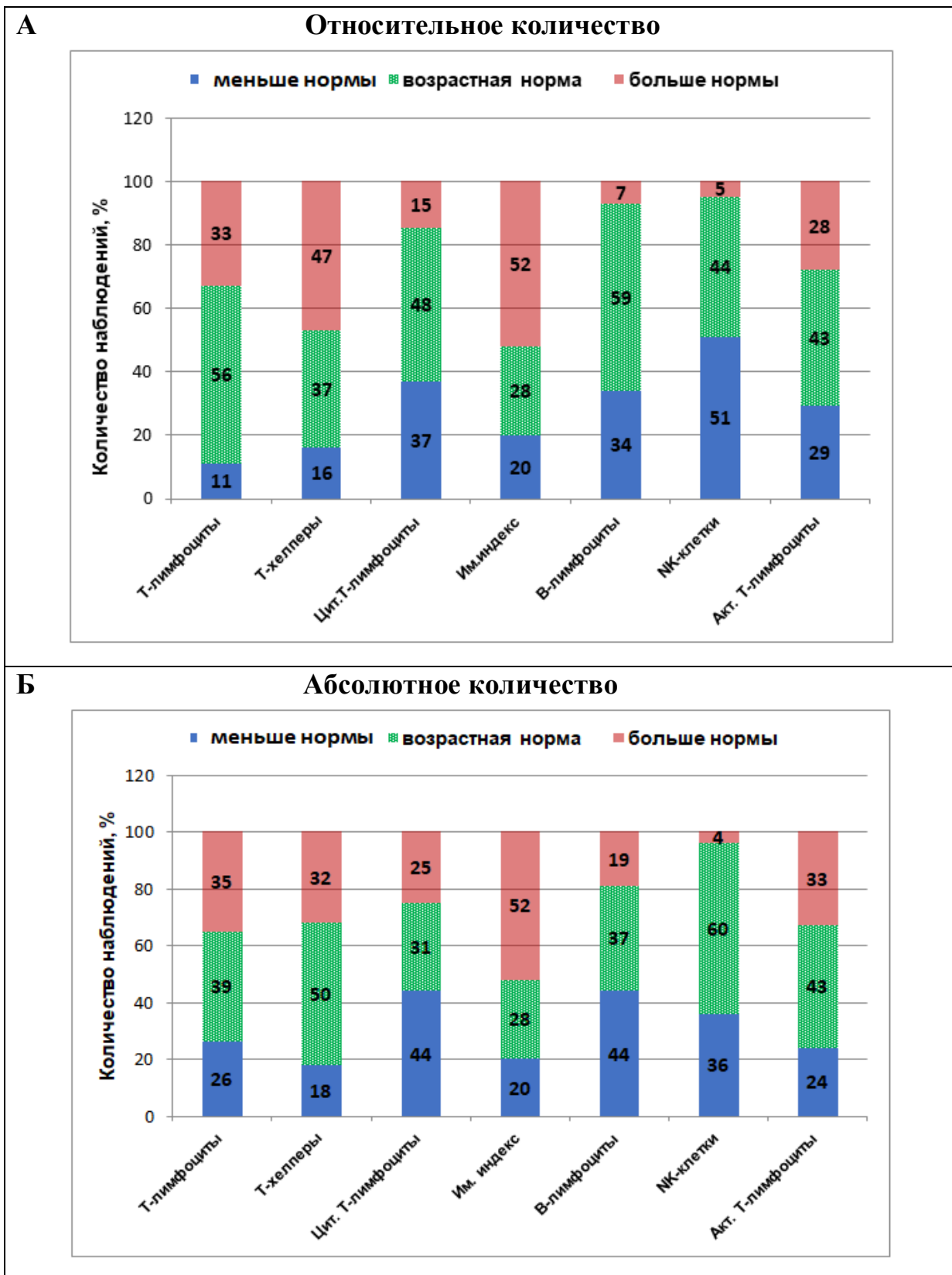


Рисунок 3.1 – Распределение пациентов по отклонению относительного (А) и абсолютного (Б) количества основных популяций лимфоцитов у детей с псориазом

При анализе отклонения абсолютного количества клеток выявлено снижение В-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов в 44% случаев, а НК-клеток в 36 % случаев, при повышении Т-лимфоцитов, Т-хелперов и активированных Т-лимфоцитов более 30% случаев, что привело к увеличению иммунорегуляторного индекса в 52% случаев (Рисунок 3.1Б).

Анализ отклонения относительного количества $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-лимфоцитов в зависимости от возраста показал достоверное увеличение популяции Т-хелперов в возрастных группах 2, 3 и 4 относительно группы детей с псориазом в возрасте 2-6 лет (группа 1), при этом количество цитотоксических Т-лимфоцитов не имело достоверных отличий между возрастными группами (Рисунок 3.2). Также стоит отметить больший разброс показателей Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов в группах у детей старше 6 лет.

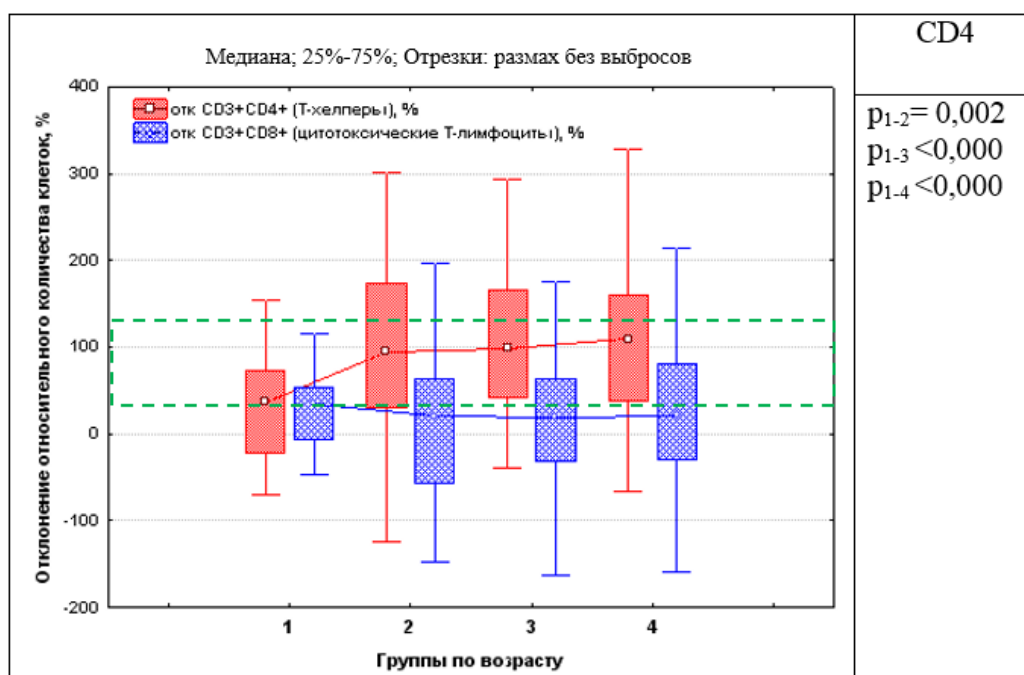


Рисунок 3.2 – Отклонение относительного количества Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов от показателей возрастной нормы у детей с псориазом разных возрастных групп. Диапазон нормативных значений выделен зеленой линией

У детей с псориазом анализ отклонения содержания В-лимфоцитов и НК-клеток по возрастным группам выявил, что во всех возрастных группах

показатели популяций приближены к нижней границе нормы (Рисунок 3.3). В группе детей с псориазом в возрасте от 2 до 6 лет относительное количество В-лимфоцитов достоверно ниже, чем в возрастных группах 2, 3, 4 и значительно ниже показателей нормы. При этом количество НК-клеток в возрастной группе 1 соответствует нормативным значениям, а в других возрастных группах ниже или на нижней границе нормы (Рисунок 3.3).

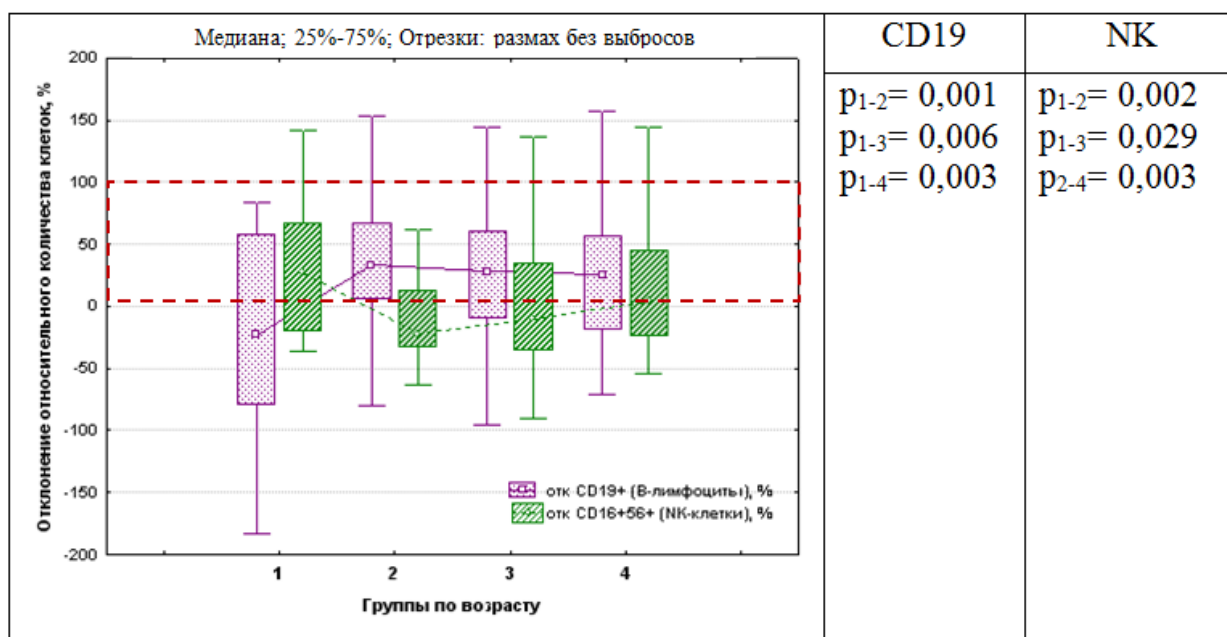


Рисунок 3.3 - Отклонение относительного количества В-лимфоцитов и НК-клеток от показателей возрастной нормы у детей с псориазом разных возрастных групп. Диапазон нормативных значений выделен красной линией

Анализ количественных характеристик малых популяций $CD4^+$ -Т-клеток у детей псориазом показал достоверное увеличение относительного и абсолютного количества Th_{act} во всех возрастах относительно группы сравнения (Таблица 3.4). Получено достоверное увеличение относительного количества Th_{17} -лимфоцитов в возрастных группах 2 и 4, а абсолютного количества только во 2 группе. При этом значимо увеличено относительное и абсолютное количество Th_2 -лимфоцитов в группах 1, 3 и 4 относительно показателей условно-здоровых детей соответствующего возраста (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Возрастная динамика относительного и абсолютного содержания малых популяций лимфоцитов у детей с вульгарным псориазом и в группе сравнения. * - $p < 0,05$ достоверные отличия между показателями детей с псориазом и группой сравнения соответствующего возраста, критерий Манна-Уитни

Показатель	Группа	Возрастная группа, возрастной диапазон			
		1	2	3	4
		2-5 лет	6-8 лет	9-11 лет	12-18 лет
Регуляторные Т-лимфоциты, % CD4	Псориаз	8,1 (7,0-9,6)	8,4 (6,5-10,2)	7,3 (6,6-10,3)	8,0 (6,5-9,7)
	Группа сравнения	8,8 (7,1-11,3)	9,6 (8,4-10,2)	8,0 (7,3-11,1)	7,4 (6,7-8,8)
Регуляторные Т-лимфоциты, кл/мкл	Псориаз	114 (80-142)	101 (75-154)	80 (56-107)	70 (51-100)
	Группа сравнения	127 (112-156)	87 (68-122)	65 (53-87)	67 (53-82)
Активированные Т-хелперы, % CD4	Псориаз	13,8* (9,6-16,8)	15,4* (13,2-18,7)	17,8* (15,4-21,6)	20,8* (17,9-25,1)
	Группа сравнения	6,9 (4,4-8,0)	10,3 (9,1-12,8)	12,6 (7,7-17,1)	15,4 (12,7-19,4)
Активированные Т-хелперы, кл/мкл	Псориаз	174* (110-239)	195* (150-260)	173* (138-224)	182* (140-247)
	Группа сравнения	78 (69-132)	101 (80-150)	96 (70-110)	133 (105-216)
Th17-лимфоциты, % CD4	Псориаз	12,9 (11,1-16,9)	15,3* (12,7-19,9)	17,9 (14,3-21,5)	20,2* (15,6-25,9)
	Группа сравнения	11,4 (9,9-13,4)	11,8 (9,8-16,0)	19,3 (13,1-22,5)	17,6 (15,2-22,4)
Th17-лимфоциты, кл/мкл	Псориаз	175 (126-194)	186* (154-253)	156 (121-270)	172 (134-223)
	Группа сравнения	163 (145-170)	139 (79-154)	142 (108-174)	162 (121-200)
Th2-лимфоциты, % CD4	Псориаз	8,1* (4,2-11,8)	6,7 (5,7-9,0)	6,8* (5,1-7,9)	6,7* (5,4-8,6)
	Группа сравнения	0,8 (0,4-2,4)	6,7 (2,5-8,9)	2,8 (2,2-8,8)	4,5 (2,5-8,4)
Th2-лимфоциты, кл/мкл	Псориаз	232* (154-260)	147 (112-206)	136* (90-175)	116* (86-147)
	Группа сравнения	13 (8-61)	149 (21-187)	25 (16-124)	87 (15-152)

Проведенный корреляционный анализ у детей с псориазом показал достоверное снижение абсолютного количества Treg с возрастом ($r=-0,34$; $p<0,001$), в то время как относительное количество Treg не зависело от возраста (Рисунок 3.4 А, Б).

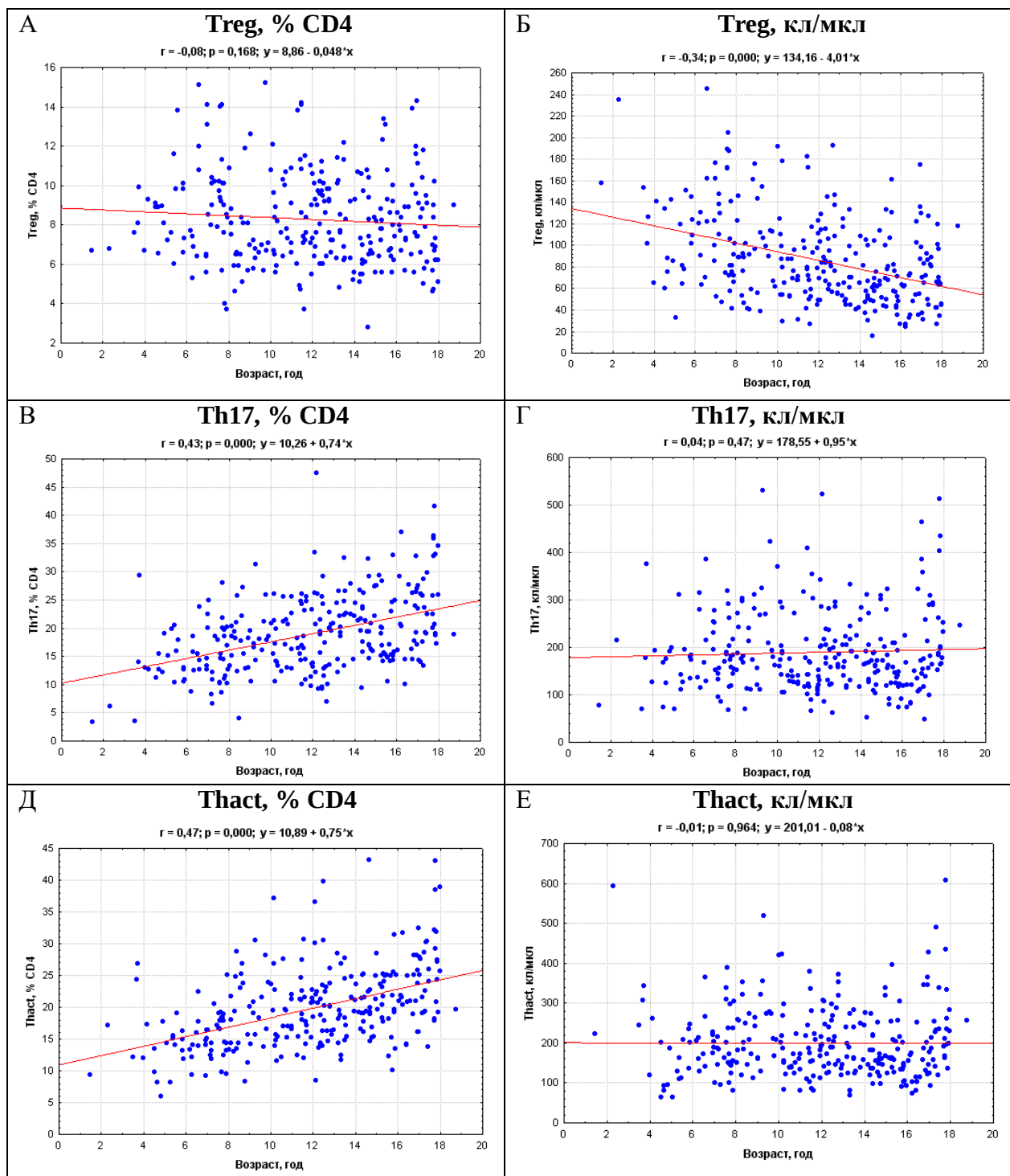


Рисунок 3.4 - Зависимость относительного и абсолютного количества Treg (А,Б), Th17 (В,Г) и Thact (Д,Е) от возраста детей с псориазом

Получено достоверное увеличение относительного количества Th17 ($r=0,43$; $p<0,001$) и Thact ($r=0,47$; $p<0,001$) с возрастом, в то время как абсолютное количество Th17 и Thact не зависело от возраста (Рисунок 3.4 В-Е). Полученный результат повторяет зависимость содержания популяций Treg, Th17 и Thact от возраста у здоровых детей.

Анализ отклонений показателей малых популяций CD4⁺-Т-клеток от возрастной нормы показал существенное увеличение абсолютного и относительного количества Thact, в 77% случаев и в 80% случаев соответственно (Рисунок 3.5). Анализ содержания Treg выявил как снижение, так и повышение данного показателя. Абсолютное и относительное количество Th17-лимфоцитов было повышено в 47% и в 36% случаев соответственно. Абсолютное и относительное количество Th2-клеток было в 33% и 40% случаев выше нормы, при этом наибольший процент наблюдений соответствовал показателям возрастной нормы (Рисунок 3.5).

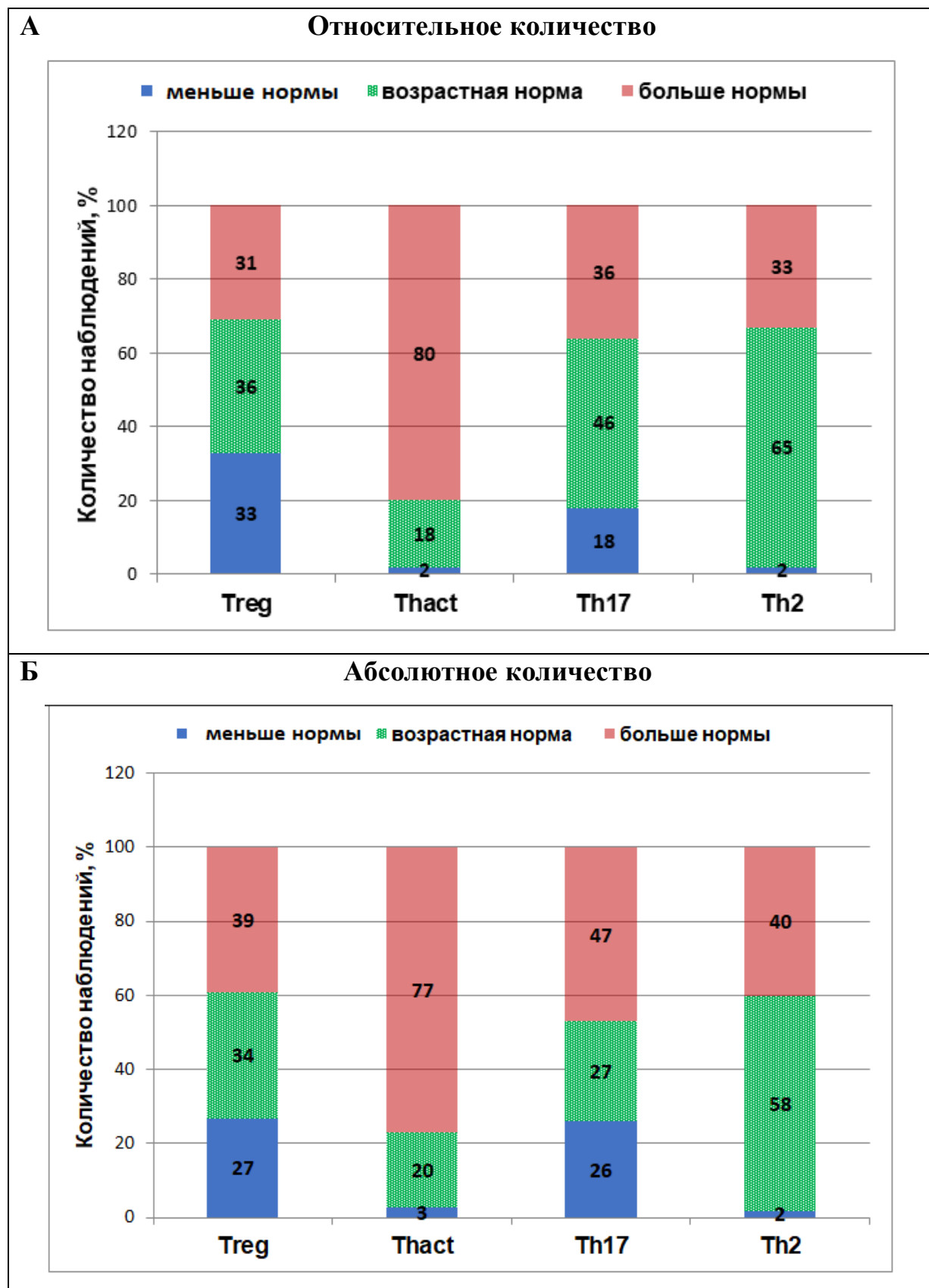


Рисунок 3.5 – Распределение пациентов по отклонению относительного (А) и абсолютного (Б) количества малых популяций лимфоцитов у детей с псориазом

Возрастная динамика отклонений относительного количества Thact, Treg и Th17 у детей с псориазом представлена на Рисунок 3.6. Проведенный анализ показал, что процент отклонения относительного количества Thact был выше нормы в любом возрасте, причем в 1 группе (2-6 лет) наблюдался наибольший разброс показателя (Рисунок 3.6). При этом показатели Treg и Th17 по медиане укладываются в диапазон возрастной нормы, однако обращает на себя внимание большой разброс показателей внутри возрастных групп (Рисунок 3.6). В возрастной группе 3 процент отклонения Thact достоверно выше, чем в группах 2 и 4, а также увеличен процент Th17 в группе 4 относительно 3 возрастной группы. В группе 2, отклонение относительного количества Treg достоверно ниже, чем в группах 3 и 4 (Рисунок 3.6).

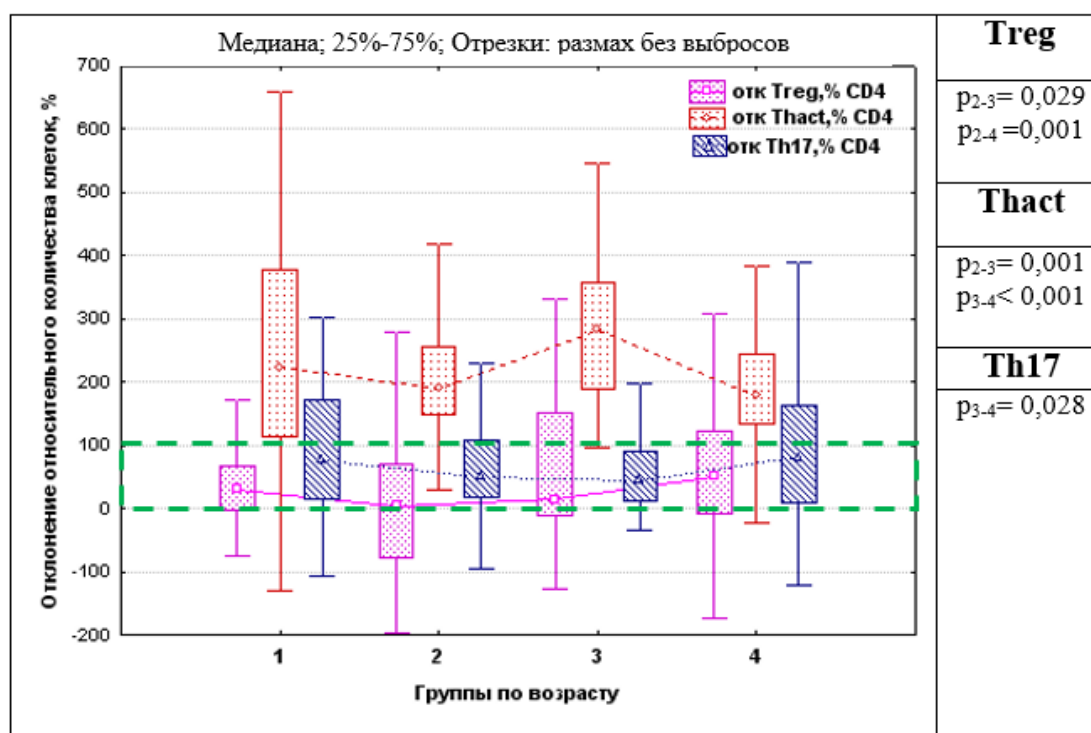


Рисунок 3.6 - Отклонение относительного количества Thact, Treg и Th17 от показателей возрастной нормы у детей с псориазом разных возрастных групп. Диапазон нормативных значений выделен зеленой линией

На следующем этапе работы проводили анализ зависимости длительности заболевания псориазом от показателей иммунного статуса и возраста детей. Корреляционный анализ выявил прямую зависимость

длительности заболевания от возраста детей ($r=0,48$; $p<0,001$) и тем самым показал, что дебют заболевания может произойти в любом возрасте (Рисунок 3.7).

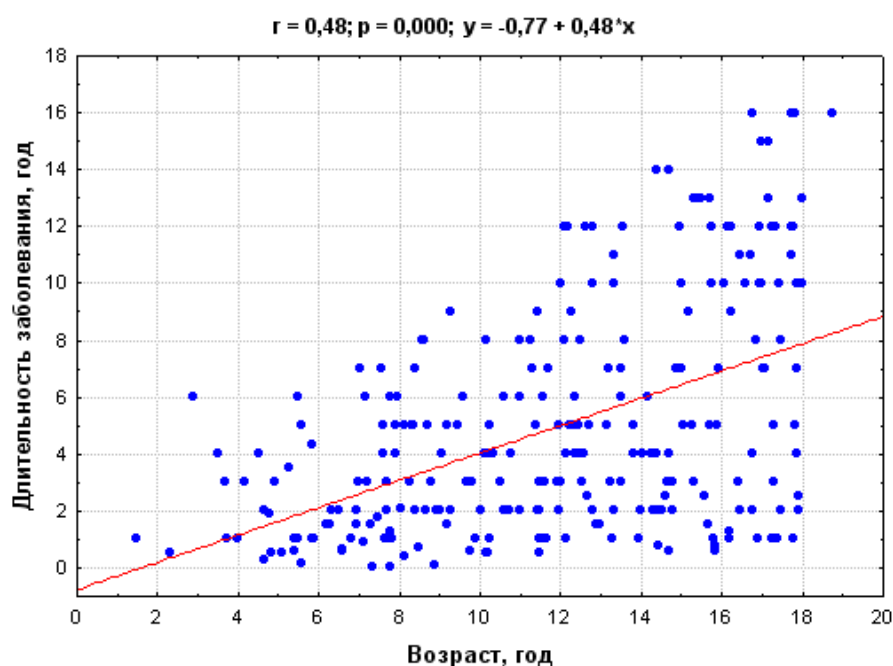


Рисунок 3.7 – Зависимость длительности заболевания от возраста детей с псориазом

Получено достоверное увеличение относительного ($r=0,33$; $p<0,001$) и абсолютного количества ($r=0,21$; $p<0,001$) Th17-лимфоцитов с увеличением длительности заболевания: чем дольше болеет ребенок, тем больше Th17 выявляется в циркуляции (Рисунок 3.8А). Корреляционный анализ также показал достоверное увеличение содержания Thact (%: $r=0,29$; $p=0,001$; абс.: $r=0,16$; $p=0,003$) и снижение содержания $CD5^+$ В-клеток (%: $r=-0,18$; $p=0,002$; абс.: $r=-0,19$; $p=0,001$) с длительностью заболевания псориазом у детей (Рисунок 3.8Б).

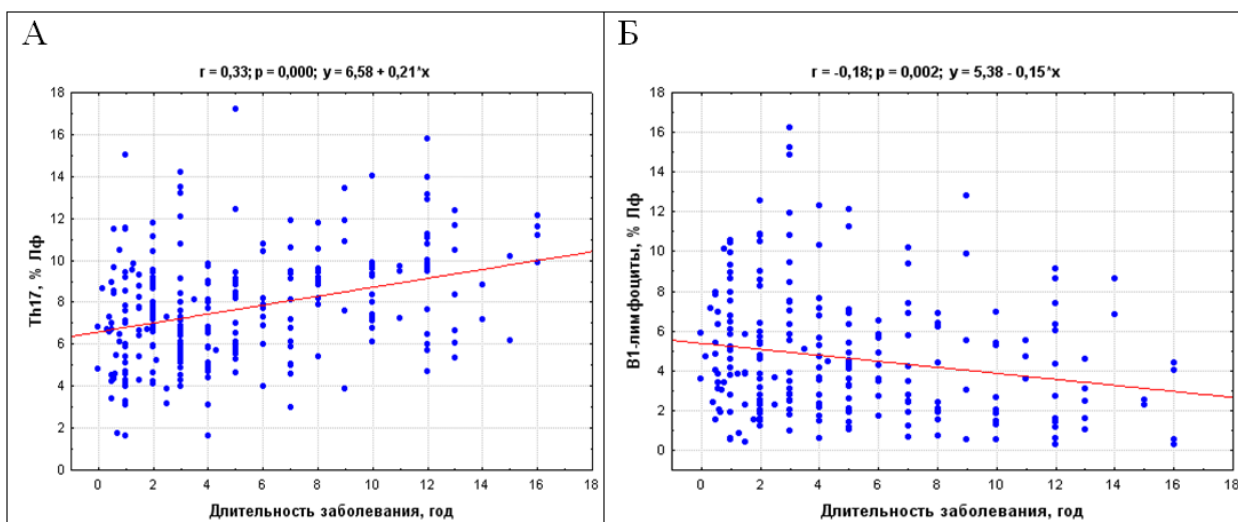


Рисунок 3.8 - Зависимость относительного количества Th17 и CD5⁺ В-клеток от длительности заболевания псориазом у детей

Стоит отметить, что при любой длительности заболевания псориазом у детей наблюдался большой разброс показателей клеточного иммунитета. Корреляционный анализ не выявил достоверной зависимости основных популяций лимфоцитов от длительности заболевания псориазом.

Тяжесть течения псориаза у детей по индексу PASI изменялась от 0 до 68 баллов (Me 14 (9-19,9)). Среди обследованных детей 38% имели легкое течение заболевания, 41% - средне-тяжелое и 21% - тяжелое течение псориаза (Рисунок 3.9). Зависимости индекса PASI от возраста ($r = -0.09$; $p = 0.128$) и длительности заболевания ($r = 0.03$; $p = 0.644$) не выявлено.

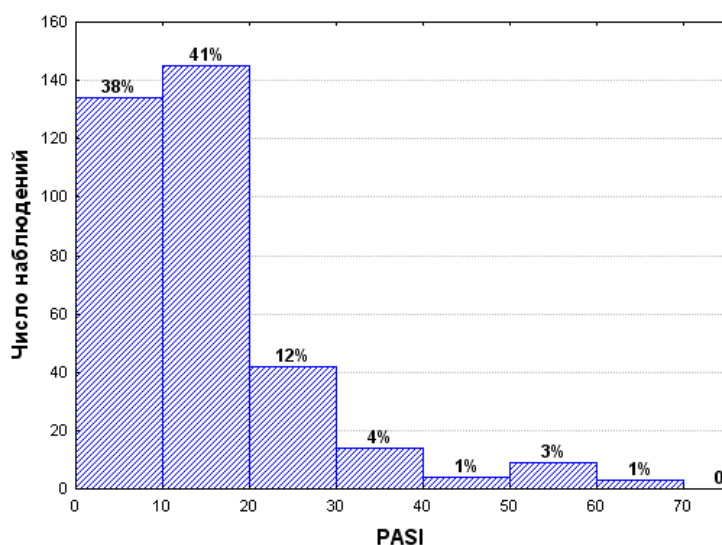


Рисунок 3.9 – Распределение пациентов с псориазом по индексу PASI

У детей с псориазом получена прямая зависимость показателей клеточного иммунитета и индекса PASI. При увеличении тяжести псориаза увеличивается относительное количество популяции $CD8^+$ Т-клеток ($r=0,19$; $p=0,002$), Th_{act} ($r=0,25$; $p<0,001$) и абсолютное количество цитотоксических Т-лимфоцитов ($r=0,16$; $p=0,008$), активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+HLA-DR^+$; $r=0,12$; $p=0,005$), Th_{act} ($r=0,18$; $p=0,003$). У детей с псориазом наибольшие коэффициенты корреляции выявлены для популяции Th_{17} -лимфоцитов: при увеличении индекса PASI увеличивается как абсолютное ($r=0,28$; $p<0,001$), так и относительное количество клеток ($r=0,35$; $p<0,001$; Рисунок 3.10).

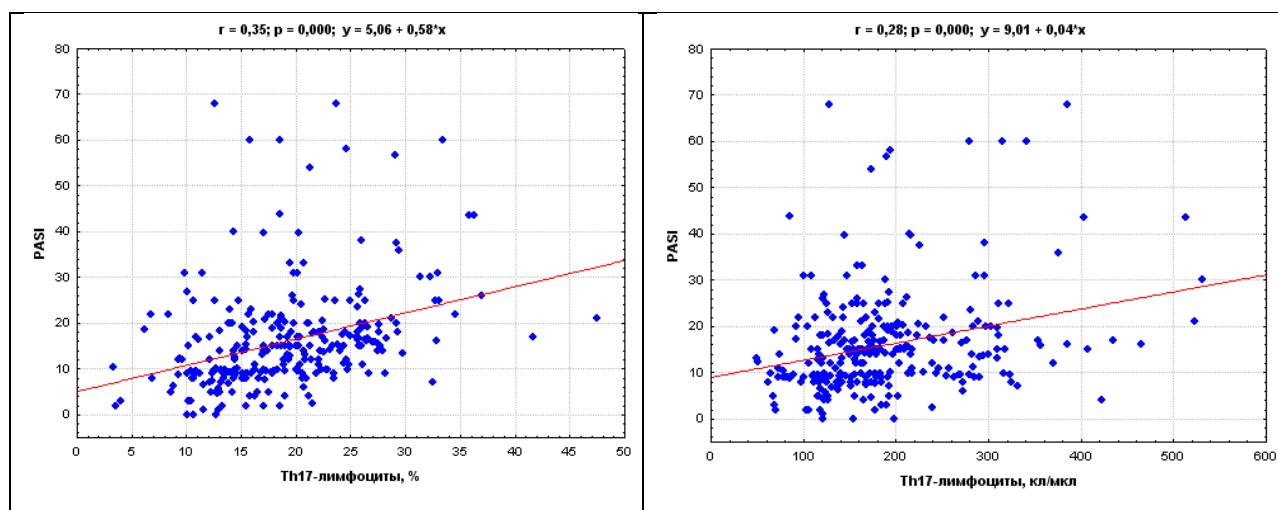


Рисунок 3.10 - Зависимость содержания Th_{17} -лимфоцитов от PASI у детей с псориазом

Проведение множественного пошагового регрессионного анализа позволило определить наиболее информативные показатели клеточного иммунитета для оценки тяжести поражения кожного покрова псориазом у детей по индексам PASI. Анализ коэффициентов регрессии показал, что индекс PASI увеличивается при повышении относительного количества активированных Т-хелперов, Th_{17} -лимфоцитов, $CD3^+CD56^+$ Т-клеток и $CD5^+$ В-клеток (Рисунок 3.11).

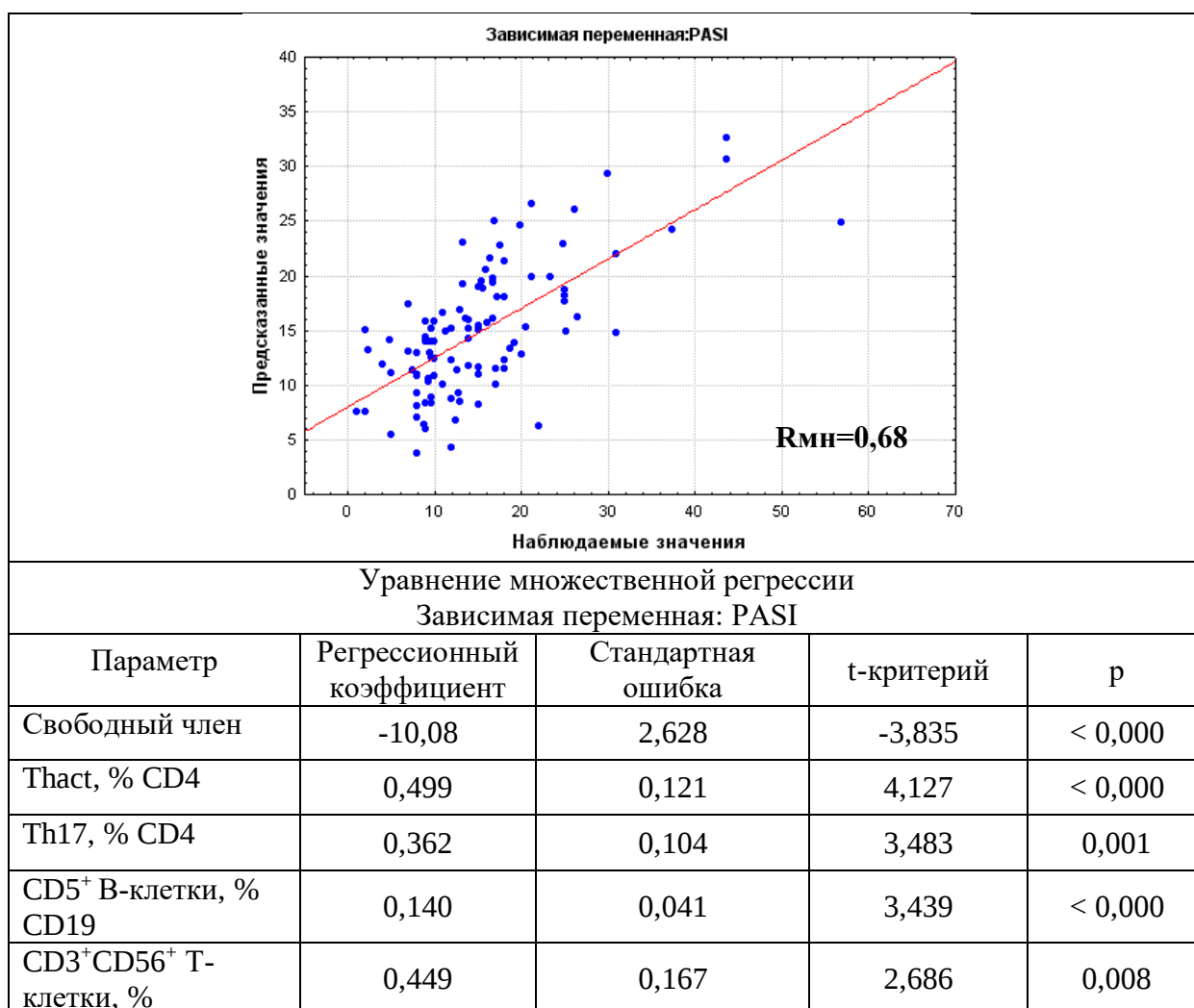


Рисунок 3.11 – Зависимость индекса PASI от показателей клеточного иммунитета у детей с псориазом

3.1.2. Содержание основных и малых популяций лимфоцитов на разных типах терапии псориаза у детей

Все обследованные дети с псориазом получали разную патогенетическую терапию, согласно клиническим рекомендациям и степени тяжести заболевания. В зависимости от типа терапии дети были разделены на группы. В группу 1 (n=105) вошли дети, получавшие терапию наружными кортикостероидами и эмолентами с кератолитическим действием, в группу 2 (n=62) - терапию метотрексатом. Пациенты, получавшие биологическую терапию блокаторами TNF α составили группу 3 (n=59), в группу 4 вошли пациенты, получавшие анти-IL-12/23 терапию (n=51).

В связи с тем, что в исследуемые группы вошли дети разного возраста, анализировали не истинные показатели клеточного иммунитета, а отклонения показателей от возрастной нормы.

Наибольшие отклонения показателей основных популяций лимфоцитов у детей с псориазом выявлены в группе 3, у пациентов получавших биологическую терапию блокаторами TNF α (Таблица 3.5). В группе 3 получено достоверное увеличение абсолютного количества общей популяции лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов и снижение НК-клеток относительно других групп (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Отклонения показателей иммунофенотипа лимфоцитов у детей с псориазом, находящихся на разных типах терапии

Показатель		Группы по типу терапии				Уровень достоверности (p)
		Группа 1 (n=105)	Группа 2 (n=62)	Группа 3 (n=59)	Группа 4 (n=51)	
Лимфоциты	кл/мкл	29 (-10-125)	13 (-40-91)	144 (37-252)	19 (-13-94)	p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001 p ₃₋₄ <0,001
Т-лимфоциты	%	64 (30-117)	77 (43-110)	88 (25-111)	74 (53-125)	-
	кл/мкл	47 (-5-126)	18 (-23-93)	111 (35-219)	43 (9-112)	p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ <0,001 p ₃₋₄ =0,001
Т-хелперы	%	57 (-1-123)	81 (36-161)	119 (47-175)	96 (60-159)	p ₁₋₂ =0,050 p ₁₋₃ =0,001 p ₁₋₄ =0,001
	кл/мкл	36 (1-89)	36 (-10-66)	138 (53-241)	46 (29-107)	p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001 p ₂₋₄ =0,028 p ₃₋₄ <0,000
Цитотоксические Т-лимфоциты	%	36 (-6-83)	19 (-16-66)	-4 (-57-40)	31 (-31-73)	p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ =0,017 p ₃₋₄ =0,027
	кл/мкл	31 (-21-90)	-6 (-39-68)	38 (-23-115)	16 (-32-56)	p ₁₋₂ =0,040 p ₂₋₃ =0,019
CD4/CD8	%	47 (-10-170)	115 (22-190)	143 (74-343)	115 (35-240)	p ₁₋₂ =0,041 p ₁₋₃ <0,001 p ₁₋₄ =0,005 p ₂₋₃ =0,030

Продолжение таблицы 3.5

В-лимфоциты	%	14 (-22-45)	5 (-23-36)	39 (24-78)	31 (-27-71)	p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ <0,001 p ₃₋₄ =0,015
	кл/мкл	-6 (-43-58)	-24 (-60-34)	84 (17-164)	16 (-40-53)	p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001 p ₃₋₄ <0,001
CD5 ⁺ В-клетки	% CD19	29 (-36-98)	29 (-36-109)	-29 (-83-39)	-13 (-48-38)	p ₁₋₃ =0,001 p ₁₋₄ =0,007 p ₂₋₃ =0,002 p ₂₋₄ =0,010
	кл/мкл	35 (-38-126)	3 (-32-69)	43 (-33-88)	-17 (-58-38)	p ₁₋₄ =0,004 p ₃₋₄ =0,008
CD5 ⁻ В-клетки	% CD19	73 (-1-142)	78 (-6-139)	131 (62-181)	122 (-60-161)	p ₁₋₃ =0,001 p ₁₋₄ =0,015 p ₂₋₃ =0,004 p ₂₋₄ =0,026
	кл/мкл	36 (-7-125)	27 (-37-82)	18 (97-353)	87 (3-190)	p ₁₋₃ <0,001 p ₁₋₄ =0,049 p ₂₋₃ <0,001 p ₂₋₄ =0,006 p ₃₋₄ <0,001
NK-клетки	%	12 (-21-48)	12 (-17-52)	-25 (-38-11)	-4 (-25-33)	p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001 p ₃₋₄ =0,012
	кл/мкл	16 (-7-43)	23 (-4-40)	2 (-9-33)	20 (-2-51)	p ₃₋₄ =0,008

В группе на анти-TNF терапии выявлено достоверное снижение относительного количества NK-клеток, В-лимфоцитов, CD5⁺ В-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов относительно других групп (Рисунок 3.12), при этом процент Т-хелперов и CD5⁻ В-клеток был увеличен и находился выше нормативных значений (Таблица 3.5, Рисунок 3.13А). Во всех группах содержание В-лимфоцитов было в пределах нормативных значений при большом разбросе показателей (Рисунок 3.12А). Содержание NK-клеток в группах 1 и 2 было на нижней границе референсного диапазона, а в группах 3 и 4 ниже нормативных значений (Рисунок 3.12Б).

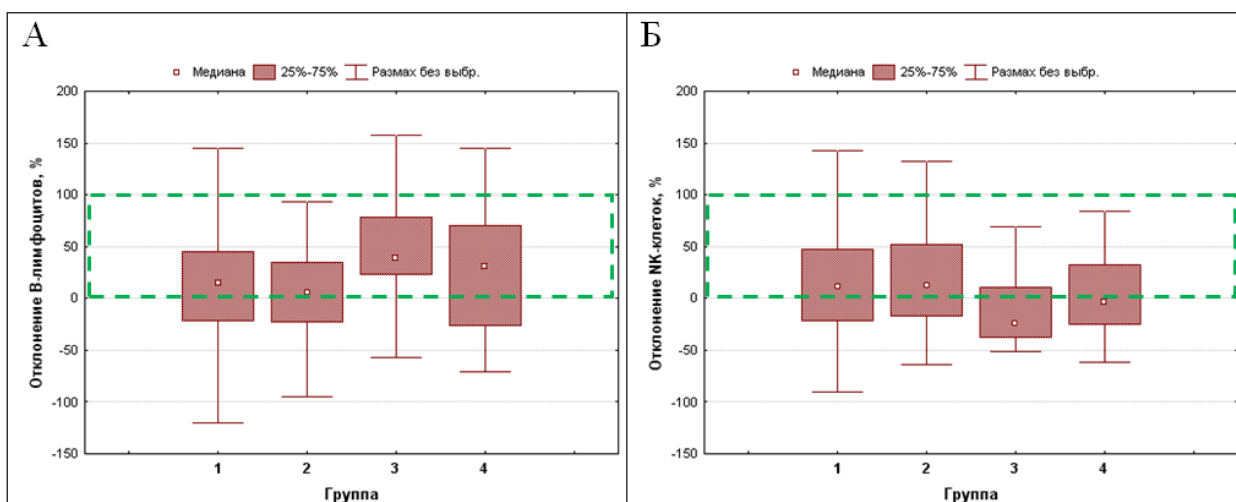


Рисунок 3.12 - Отклонение относительного количества В-лимфоцитов (А) и НК-клеток (Б) у детей с псориазом на разных типах терапии. Диапазон нормативных значений выделен зеленой линией

Анализ отклонения относительного и абсолютного количества Thact у детей с псориазом во всех группах по типу терапии показал достоверное увеличение популяции клеток, причем наибольшее отклонение показателей от референсных значений выявлено в группе 1, 2 и 3 (Таблица 3.6, Рисунок 3.13Б). Выявлено достоверное увеличение абсолютного количества Treg у детей с псориазом на биологической терапии (группа 3,4; Таблица 3.6). У детей в группе 4, получавших анти-IL12/23 терапию показано достоверное увеличение относительного количества Treg, тогда как в группе 3 значение показателя было снижено, а в группе 1 и 3 в пределах диапазона нормы (Рисунок 3.13В, Таблица 3.6).

Таблица 3.6 - Отклонения показателей малых популяций лимфоцитов у детей с псориазом, находящихся на разных типах терапии

Показатель		Группы по типу терапии				Уровень достоверности (p)
		Группа 1 (n=105)	Группа 2 (n=62)	Группа 3 (n=59)	Группа 4 (n=51)	
Регуляторные Т-клетки	% CD4	25 (-16-84)	-3 (-45-74)	30 (-35-85)	105 (36-155)	p ₁₋₄ <0,001 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ <0,001
	кЛ/мкл	47 (-21-116)	14 (-28-67)	139 (36-296)	103 (37-190)	p ₁₋₃ <0,001 p ₁₋₄ =0,001 p ₂₋₃ <0,001 p ₂₋₄ <0,001

Продолжение таблицы 3.6

Активированные Т-хелперы	% CD4	207 (144-294)	224 (114-301)	186 (129-253)	161 (102-202)	$p_{1-3}=0,002$ $p_{1-4}<0,001$ $p_{2-4}=0,011$
	кЛ/мкл	211 (123-382)	200 (93-307)	298 (147-458)	170 (87-280)	$p_{1-3}=0,044$ $p_{1-4}=0,018$ $p_{2-3}=0,001$ $p_{3-4}<0,001$
Th17-лимфоциты	% CD4	65 (13-136)	64 (13-137)	71 (27-116)	55 (-12-156)	-
	кЛ/мкл	59 (-4-177)	74 (-26-145)	194 (81-352)	47 (-39-128)	$p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}<0,001$ $p_{3-4}<0,001$

Оценка отклонения показателей Th17-лимфоцитов показала, что в 3 группе абсолютное количество данной популяции было достоверно выше диапазона нормы (Таблица 3.6). Однако, относительное количество Th17 во всех группах было в пределах нормативного диапазона, при этом отмечен большой разброс показателей (Рисунок 3.13Г).

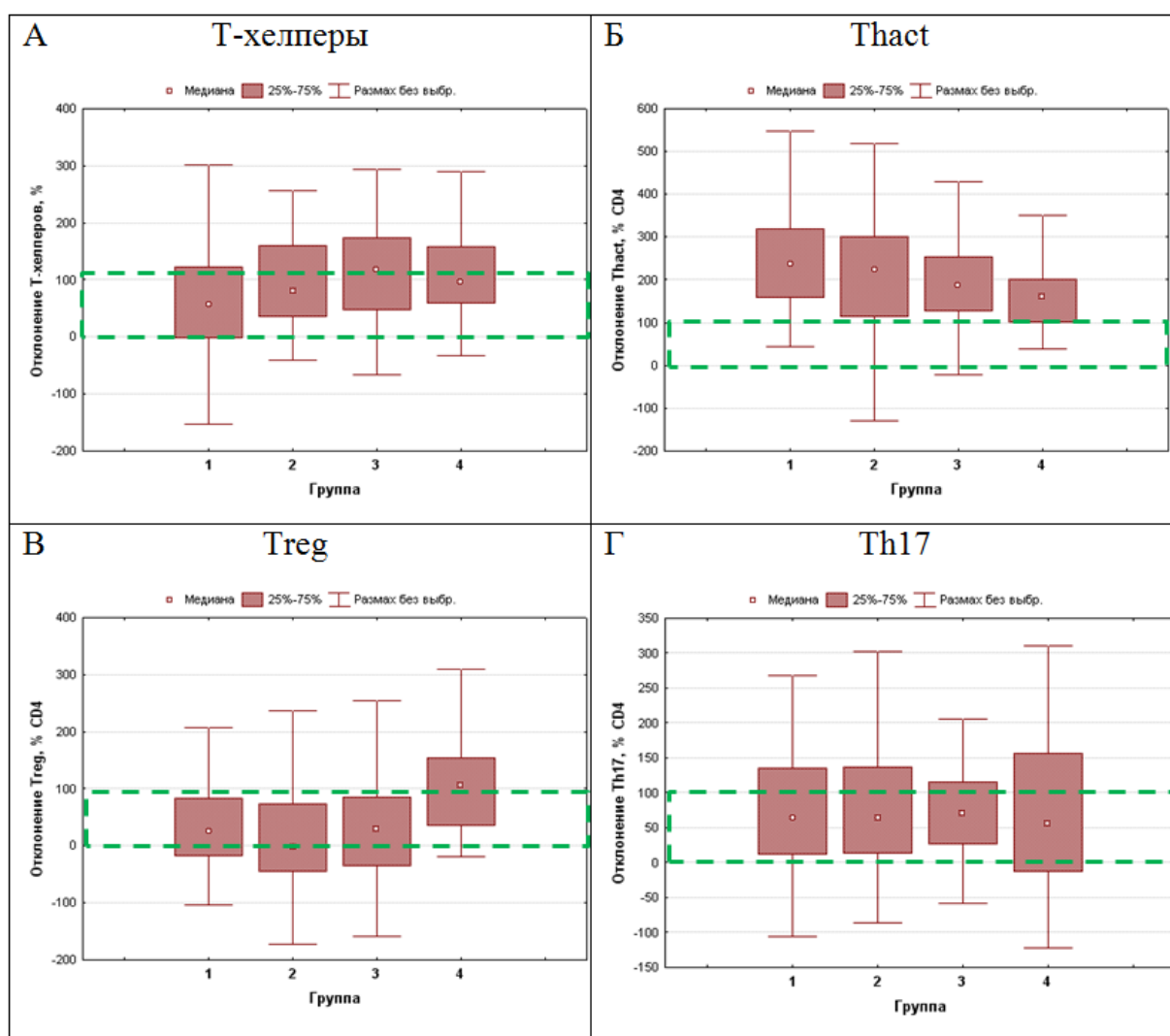


Рисунок 3.13 - Отклонение относительного количества Т-хелперов, Thact, Treg и Th17 у детей с псориазом на разных типах терапии. Диапазон нормативных значений выделен зеленой линией

3.1.3. Содержание клеток-супрессоров миелоидного происхождения в периферической крови детей с псориазом

В развитии псориазического воспаления, наряду с изучением баланса Th17/Treg, важная роль отводится клеткам-супрессорам миелоидного происхождения. Оценка содержания популяции MDSCs у детей с псориазом показала достоверное увеличение данной популяции относительно группы сравнения (Таблица 3.7). Увеличение относительного количества популяции MDSCs происходит, в основном, за счет моноцитарной субпопуляции MDSCs (M-MDSCs). Для детей с псориазом выявлено достоверное

увеличение и абсолютного и относительного количества M-MDSCs, а также абсолютного количества G-MDSCs и M⁺G⁺-MDSCs, при уменьшении относительного количества недифференцированных MDSCs (M⁻G⁻-MDSCs), относительно соответствующих показателей группы сравнения (Таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Относительное и абсолютное количество MDSCs и их субпопуляций, у детей с псориазом и в группе сравнения

Популяция клеток		Псориаз (n = 277)	Группа сравнения (n = 90)	Уровень достоверности и (p)
MDSCs	кл/мкл	75 (48-114)	41 (25-53)	<0,001
	% МНК	2,7 (1,6-3,9)	1,4 (0,9-1,7)	<0,001
M-MDSCs	кл/мкл	10 (4-26)	3 (1-8)	<0,001
	% MDSCs	14,5 (5,7-29,1)	9,7 (6,6-16,1)	0,006
G-MDSCs	кл/мкл	15 (6-32)	8 (4-16)	0,001
	% MDSCs	21,0 (10,9-36)	25,2 (12,6-43,8)	0,339
M ⁺ G ⁺ -MDSCs	кл/мкл	39 (25-58)	21 (9-35)	<0,001
	% MDSCs	54,7 (38,9-70,1)	66,3 (43,2-77,2)	0,032

Анализ содержания MDSCs и их субпопуляций не выявил достоверных зависимостей от возраста и от длительности заболевания у детей с псориазом. Во всех возрастных группах отмечался большой разброс показателей MDSCs. Прямой зависимости содержания MDSCs и их субпопуляций от тяжести заболевания псориазом по PASI у детей также не выявлено. Показана слабая тенденция к увеличению относительного количества M-MDSCs с увеличением PASI ($r = 0,11$; $p = 0,081$).

Проведение множественного пошагового регрессионного анализа позволило определить наиболее информативные показатели популяций MDSCs и клеточного иммунитета для оценки тяжести поражения кожного покрова псориазом у детей по индексам PASI и BSA. Анализ регрессионного уравнения показал, что индекс PASI увеличивается при повышении относительного количества Th17-лимфоцитов, MDSCs, M-MDSCs, Treg и при снижении возраста детей с псориазом (Рисунок 3.14).

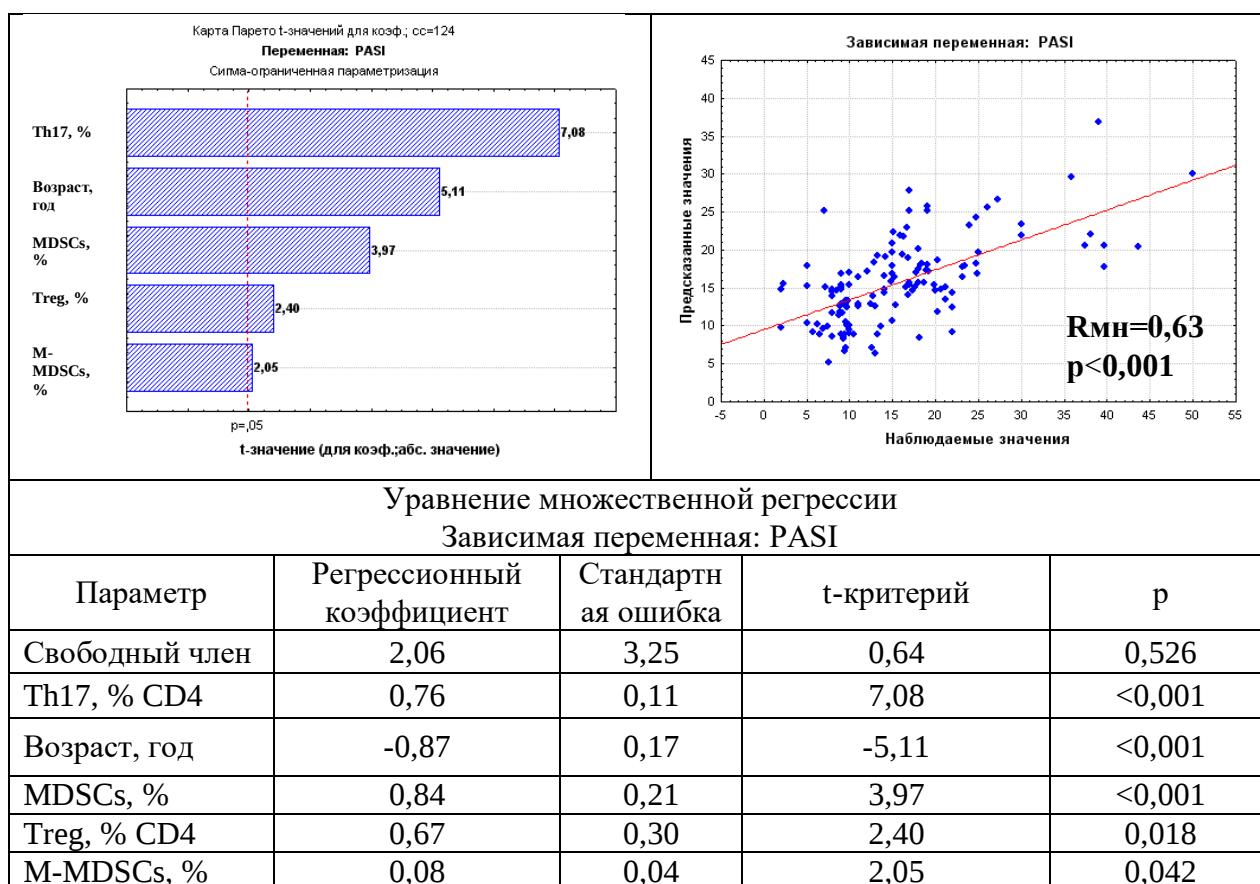


Рисунок 3.14 – Зависимость индекса PASI от показателей MDSCs и клеточного иммунитета у детей с псориазом

Из полученного уравнения регрессии следует увеличение индекса BSA при повышении относительного количества активированных Т-хелперов, Th17-лимфоцитов и при снижении возраста пациентов с псориазом (Рисунок 3.15).

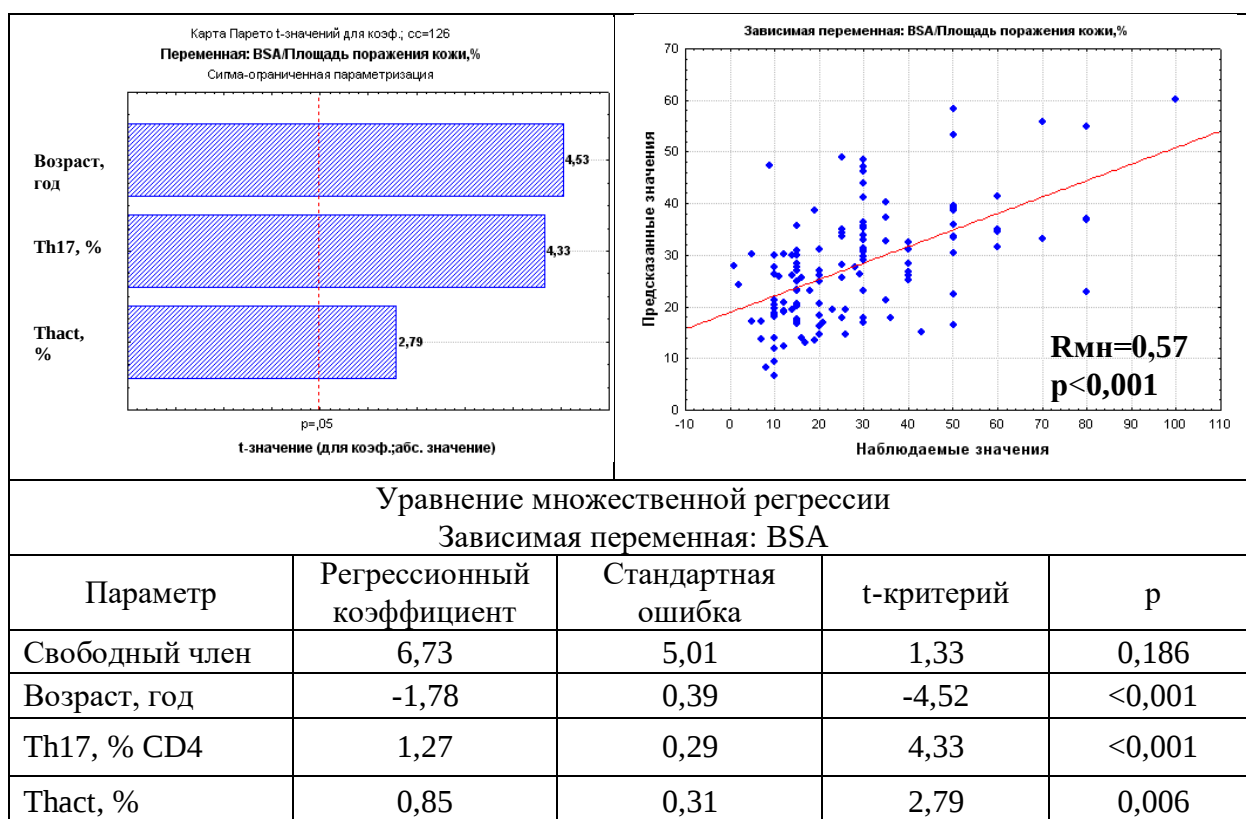


Рисунок 3.15 – Зависимость индекса BSA от показателей MDSCs и клеточного иммунитета у детей с псориазом

Анализ содержания MDSCs у детей с псориазом на разных типах терапии показал достоверное увеличение абсолютного и относительного количества MDSCs в группах детей на биологической терапии (Таблица 3.8). Получено существенное увеличение относительного количества M-MDSCs 2,2 раза у пациентов 3 группы и в 1,8 раз в группе 4 относительно группы сравнения (Таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Содержание MDSCs и их субпопуляций у детей с псориазом, находящихся на разных типах терапии. * - $p<0,05$ достоверные отличия между показателями детей с псориазом и группой сравнения соответствующего возраста, критерий Манна-Уитни

Популяция		Группы по типу терапии (n =256)				Уровень достоверности (p)
		Группа 1 (n =89)	Группа 2 (n =57)	Группа 3 (n =59)	Группа 4 (n =51)	
MDSCs	кл/мкл	52 (39- 83)	62 (43- 88)	121 (69- 175)	78 (55- 110)	$p_{13}<0,001$ $p_{14}=0,017$ $p_{23}<0,001$ $p_{34}=0,023$

Продолжение таблицы 3.8

	% МНК	1,7 (1,3- 2,6)	2,5 (1,5-3,1)	3,7 (1,8-5,8)	2,7 (1,8-4,1)	$p_{12}=0,039$ $p_{13}<0,001$ $p_{14}=0,002$ $p_{23}<0,001$
M-MDSCs	кЛ/МКЛ	4,0 (2- 11)	7 (3-14)	17 (7-46)	18 (6-30)	$p_{13}<0,001$ $p_{14}=0,001$ $p_{23}=0,001$ $p_{24}=0,01$
	% MDSCs	8,1 (3,1- 15,9)	12,3 (4,7-23,2)	21,2 (6,2-40,3)	17,2 (11,1-32,9)	$p_{13}=0,008$ $p_{14}=0,002$ $p_{24}=0,038$
G-MDSCs	кЛ/МКЛ	8,0 (5-21)	12 (4-23)	28 (9-47)	15 (8-27)	$p_{13}=0,001$ $p_{14}=0,009$ $p_{23}=0,006$
	% MDSCs	15,1 (8,7-27,2)	17,9 (8,3-35,1)	23,7 (11,5-41,9)	23,6 (13,4-36,1)	$p_{14}=0,037$
M+G-MDSCs	кЛ/МКЛ	34 (26-51)	36 (22-53)	54 (29-72)	41 (25-66)	$p_{13}=0,015$ $p_{23}=0,027$
	% MDSCs	66,5 (53,5-79,9)	63,5 (46,2-75,3)	46,4 (26,2-60,3)	55,2 (45-59)	$p_{13}<0,001$ $p_{14}=0,001$ $p_{23}<0,001$ $p_{24}=0,025$

Следует отметить, что достоверное повышение абсолютного и относительного количества MDSCs относительно группы сравнения наблюдалось у пациентов при всех типах терапии псориаза (Рисунок 3.16).

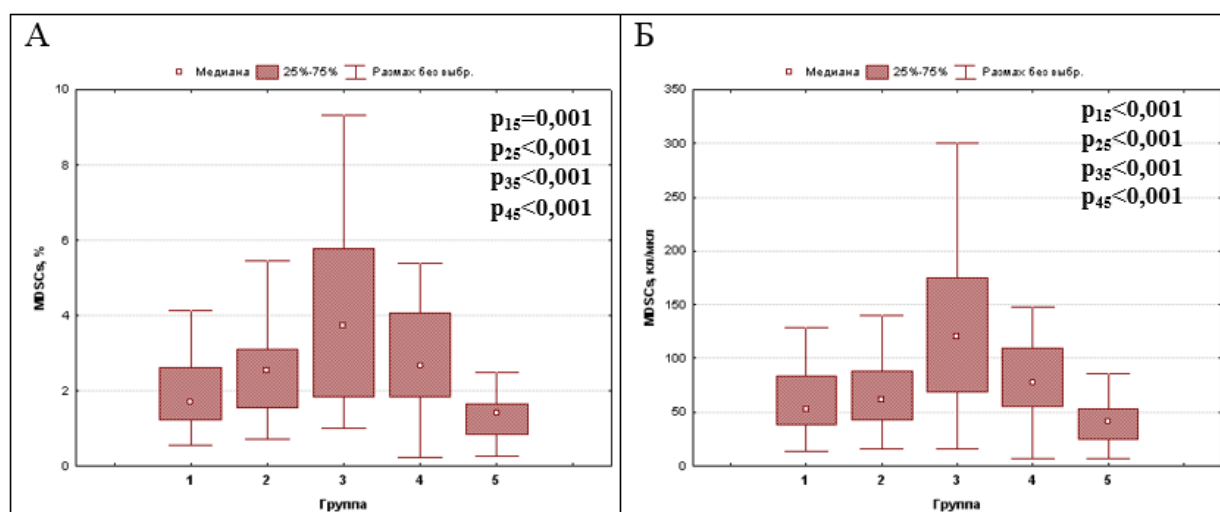


Рисунок 3.16 – Абсолютное (А) и относительное (Б) количество MDSCs у детей с псориазом на разных типах терапии и в группе сравнения (5 группа)

3.1.4. Содержание популяций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти при псориазе у детей

При псориазе резидентные CD4⁺-Т-клетки памяти, продуцируя провоспалительные цитокины IL-17 и IL-22, вовлекают кератиноциты в процесс воспаления, а CD8⁺-Т-клетки памяти усиливают воспаление в очагах поражения, рекрутируя в кожу другие иммунные клетки. Долгоживущие Т-клетки памяти в присутствии вторичного воздействия антигена начинают интенсивно пролиферировать и развивать более устойчивый и сильный иммунный ответ. Сохранение Т-клеток памяти после дебюта заболевания может объяснять рецидивирующее течение псориаза.

Оценка относительного количества популяций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти в периферической крови у детей с псориазом показала наибольшее содержание популяций наивных клеток памяти (Таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Относительное количество популяций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти у детей с псориазом в периферической крови. р – уровень достоверности между содержанием популяций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти

Популяция клеток	Фенотип клеток		Уровень достоверности (р)
	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	
Наивные клетки памяти (T _{NAIVE})	60,7 (51,5-69,6)	53,3 (41,2-63,4)	< 0,001
Центральные клетки памяти (T _{CM})	21,7 (17,9-26,3)	3,4 (2,4-4,9)	< 0,001
Эффекторные клетки памяти (T _{EM})	12,3 (9-17,4)	19,0 (12,4-26,6)	0,001
Терминально-дифференцированные эффекторные клетки памяти (T _{EMRA})	2,8 (1,9-4,5)	20,7 (16,2-27,7)	< 0,001

У детей с псориазом доля наивных и центральных CD4⁺-Т-клеток памяти достоверно выше, чем аналогичных популяций цитотоксических Т-клеток памяти (Таблица 3.9). При этом получено, что содержание цитотоксических эффекторных клеток памяти (T_{cytEM}) и терминально-

дифференцированных эффекторных клеток памяти ($T_{scf_{EMRA}}$) у детей с псориазом достоверно выше содержания тех же популяций $CD4^+$ -Т-клеток памяти (Таблица 3.9, Рисунок 3.17).

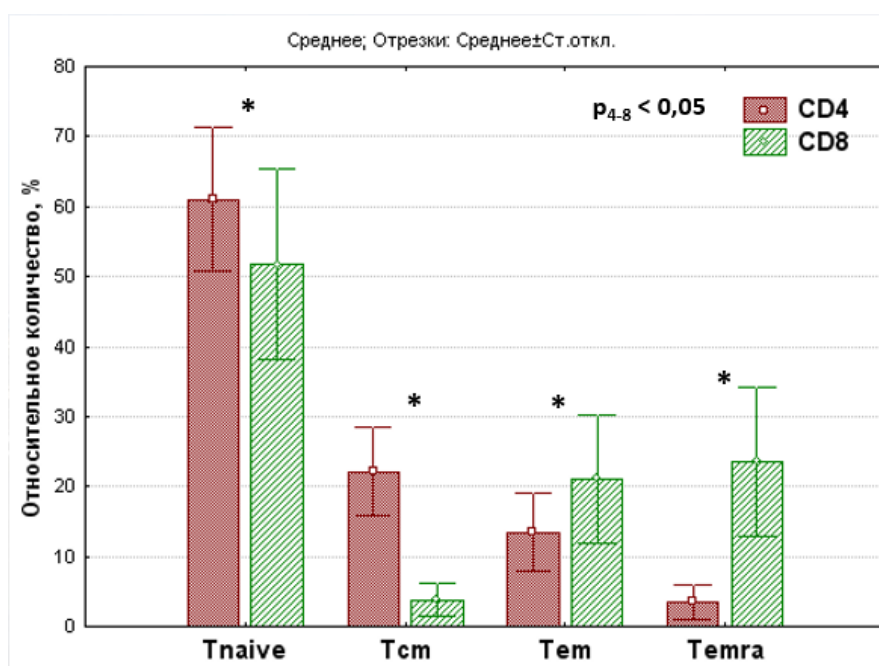


Рисунок 3.17 – Относительное количество популяций $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток памяти у детей с псориазом

Корреляционный анализ содержания популяций $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток памяти у детей с псориазом в зависимости от возраста показал достоверное снижение относительного количества T_{NAIVE} ($r=-0,049$; $p<0,001$), при увеличении содержания T_{CM} ($r=0,35$; $p=0,001$), T_{EM} ($r=0,44$; $p<0,001$) и цитотоксических центральных клеток памяти ($r=0,41$; $p<0,001$) с возрастом (Рисунок 3.18).

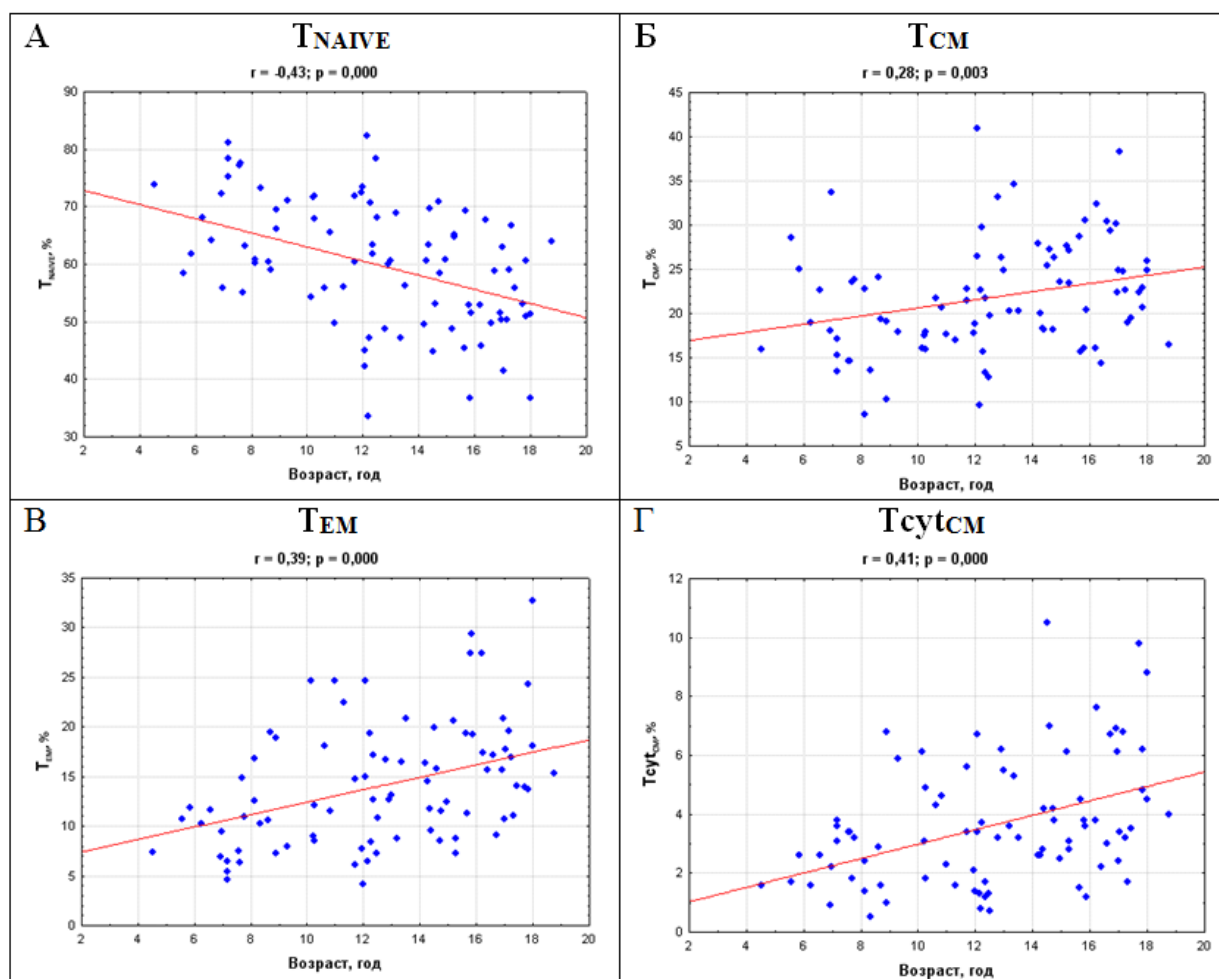


Рисунок 3.18 – Зависимость относительного количества T_{NAIVE} (А), T_{CM} (Б), T_{EM} (В) и T_{cytCM} (Г) от возраста детей с псориазом

При оценке содержания CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти в зависимости от длительности заболевания псориазом получено достоверное снижение T_{NAIVE} ($p=0.005$), T_{cytNAIVE} ($p=0.04$) и увеличение относительного количества T_{CM} ($p=0.009$) и T_{cytCM} ($p=0.004$) при увеличении длительности заболевания (Рисунок 3.19).

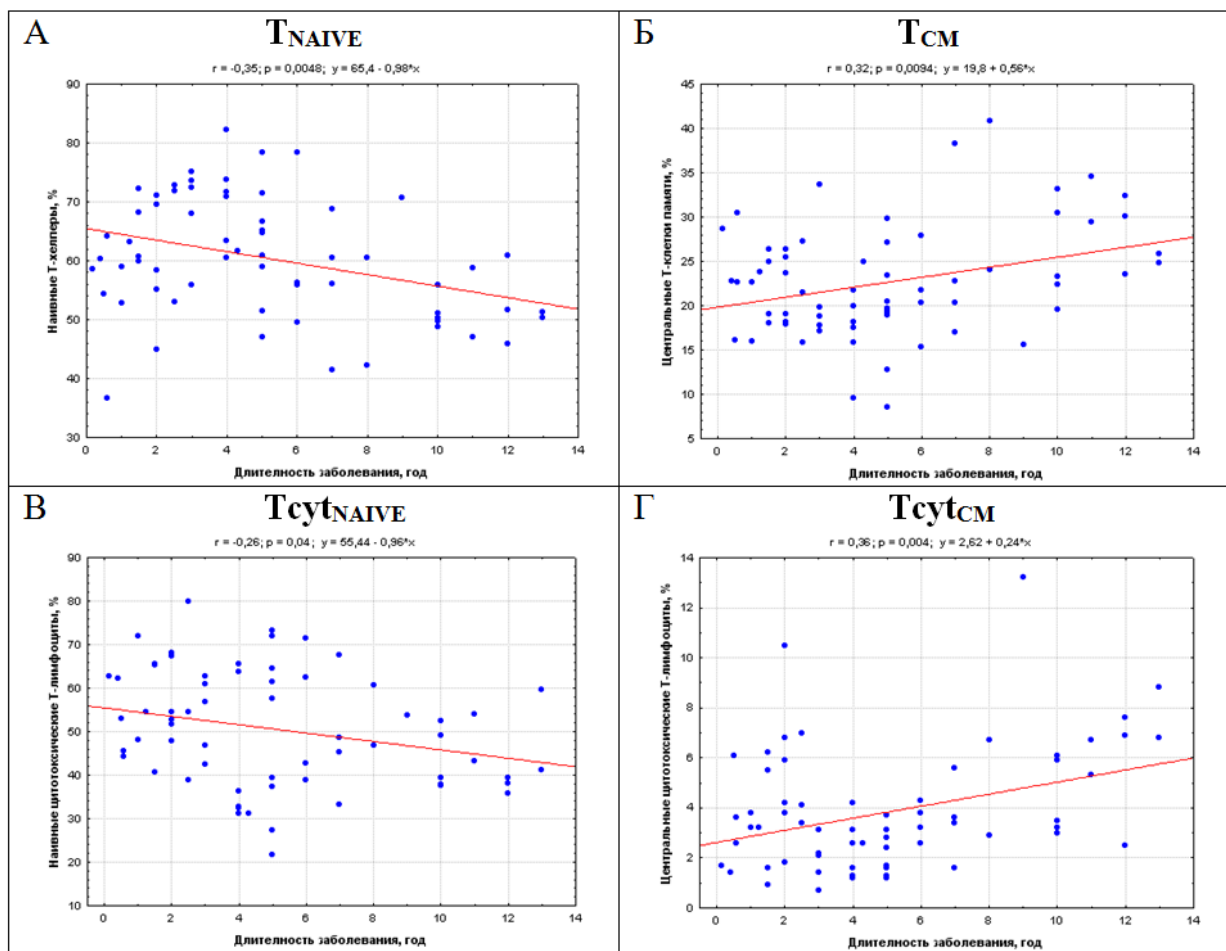


Рисунок 3.19 - Зависимость относительного количества наивных, центральных $CD4^+$ - (А, Б) и $CD8^+$ -Т-клеток памяти (В, Г) от длительности заболевания псориазом у детей

Прямой корреляционной зависимости индекса PASI и содержания популяций $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток памяти в периферической крови на данной выборке пациентов не выявлено.

Для оценки влияния терапии псориаза на содержание клеток памяти в периферической крови мы анализировали количество клеток у детей с псориазом старше 12 лет для исключения влияния возраста, получавших терапию наружными кортикостероидами (группа 1), системную терапию метотрексатом (группа 2) и генно-инженерные биологические препараты – блокаторы $TNF\alpha$ (группа 3) и IL-12/23 (группа 4).

Относительное количество T_{NAIVE} у детей с псориазом 1 группы составило – Ме 50,3 (49-58) %, 2 группы – Ме 66,3 (52-70) %, 3 группы – Ме 57,6 (51-68) %, 4 группы – Ме 60,6 (52-68) %. Содержание наивных $CD4^+$ -Т-клеток было достоверно выше у детей 2 группы относительно группы 1 ($p=0,012$). Количество наивных $CD8^+$ -Т-клеток памяти ($T_{cytNAIVE}$) у детей 1 группы составило – Ме 45,6 (38-61) %, 2 группы – Ме 60,5 (52-67) %, 3 группы – Ме 46,1 (39-61) %, 4 группа – Ме 40,7 (39-53) % . И также содержание наивных $CD8^+$ -Т-клеток было достоверно выше детей 2 группы относительно группы 1 ($p=0,005$). Достоверных различий по содержанию центральных $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток памяти у детей на разных типах терапии не выявлено.

Анализ относительного количества популяций эффекторных клеток, T_{EM} и T_{EMRA} , на разных типах терапии показал, что наибольшее содержание популяции T_{EM} получено в группе детей на терапии наружными кортикостероидами (группа 1) и достоверно выше, чем в группах детей на биологической терапии (Рисунок 3.20 А). Содержание T_{EMRA} в группе детей на терапии блокаторами $TNF\alpha$ достоверно ниже, чем в группе 1, при этом у детей на терапии блокатором $IL-12/23$ получен наибольший разброс показателя (Рисунок 3.20 Б).

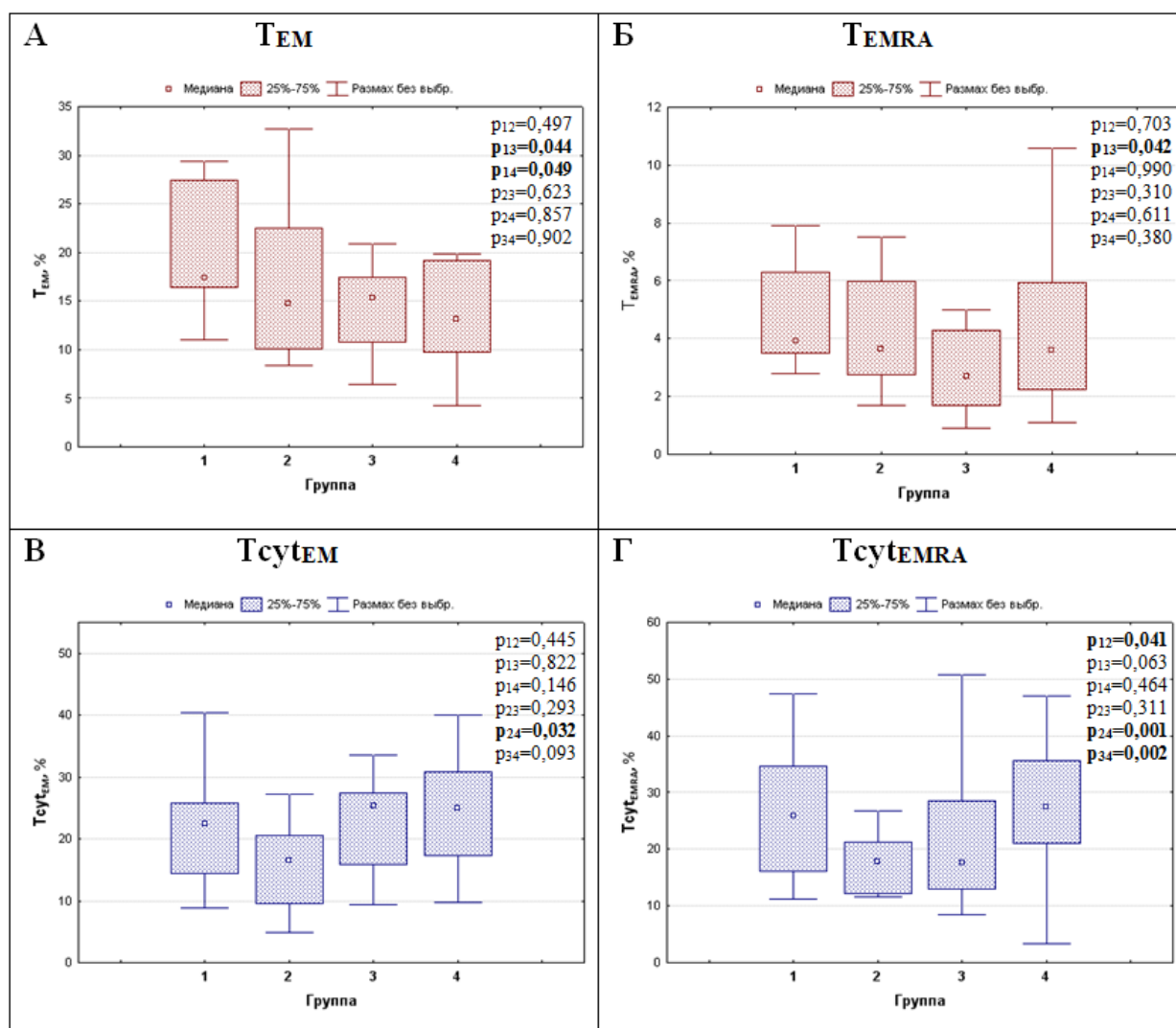


Рисунок 3.20 – Относительное количество эффекторных $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток памяти у детей с псориазом на разных типах терапии

Оценка относительного количества эффекторных $CD8^+$ -Т-клеток памяти показала достоверно более низкое содержание T_{cytEM} в группе детей на терапии метотрексатом относительно группы 4, на терапии анти-IL-12/23 (Рисунок 3.20В). Относительное количество $T_{cytEMRA}$ у детей на терапии метотрексатом также было достоверно ниже, чем в группе 1 и 4 (Рисунок 3.20Г). На биологической терапии блокаторами $TNF\alpha$ (группа 3) получено достоверное снижение $T_{cytEMRA}$ относительно группы детей на анти-IL-12/23 терапии ($p=0,002$).

Таким образом,

1. Возрастная динамика содержания основных популяций лимфоцитов у детей с вульгарным псориазом соответствовала таковой у здоровых детей: абсолютное количество клеток в основных популяциях снижалось с возрастом на фоне повышения относительного содержания Т-лимфоцитов. Выявлена прямая зависимость относительного количества Th17 и Thact с возрастом, при этом абсолютное количество этих популяций не зависело от возраста. Относительное количество Treg не зависело от возраста детей, а абсолютное снижалось с возрастом, повторяя динамику абсолютного содержания Т-хелперов.

2. У детей с псориазом выявлено значительное повышение относительного количества (% CD4) Thact в 80% случаев и Th17-лимфоцитов в 36% случаев в периферической крови, а также абсолютного количества Thact в 77% случаев и Th17-лимфоцитов в 47% случаев, при этом уровень Treg не отличался от показателей группы сравнения. Увеличение популяции Thact выявлено на всех типах терапии у детей с псориазом.

3. Количество клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом достоверно повышено относительно группы сравнения и зависит от типа терапии: наибольшее количество MDSCs относительно группы сравнения выявлено у детей на терапии блокаторами TNF α .

4. У детей с псориазом показано увеличение популяции центральных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти, эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти и снижение наивных CD4⁺-Т-клеток памяти с возрастом. Относительное содержание клеток памяти отличалось на разных типах терапии: наибольшее количество эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти наблюдалось у детей на наружной терапии, а наименьшее количество эффекторных CD8⁺-Т-клеток памяти – на терапии метотрексатом.

5. Степень изменения показателей клеточного иммунитета у пациентов с псориазом определялась возрастом, длительностью заболевания, тяжестью

заболевания. Индекс PASI коррелирует с повышением относительного количества Th17, Treg, MDSCs и M-MDSCs ($R_{\text{мн}}=0,63$; $p<0,001$), а индекс BSA - с увеличением содержания Thact и Th17 ($R_{\text{мн}}=0,57$; $p<0,001$).

3.2. Метаболическая активность клеток периферической крови при псориазе у детей

3.2.1. Оценка метаболизма популяций лимфоцитов при псориазе у детей

Метаболизм иммунных клеток имеет большое значение для регуляции гомеостаза, активации, пролиферации и дифференцировки клеток врожденной и адаптивной иммунных систем. Наивные Т-клетки для выработки энергии используют в основном процессы OXPHOS. В пролиферирующих клетках интенсифицируются процессы гликолиза, причем этапы дифференцировки Т-клеток сопровождаются активацией различных метаболических путей.

Метаболизм провоспалительных $CD4^+$ -Т-клеток (Th1, Th2, Th17) характеризуется интенсивными процессами гликолиза и OXPHOS. Регуляторные Т-клетки обладают смешанным метаболизмом с участием OXPHOS, гликолиза и процессов окисления липидов. Метаболические изменения в эпителиальных и других стромальных клетках в ответ на различные стимулирующие сигналы также имеют решающее значение при воспалении, в том числе при аутоиммунных заболеваниях, включая псориаз.

В нашей работе интенсивность метаболизма в популяциях лимфоцитов определяли по активности митохондриальных дегидрогеназ: СДГ и ГФДГ методом проточной цитометрии. СДГ – фермент, отражающий интенсивность цикла Кребса и II этапа OXPHOS, а ГФДГ - фермент, отражающий работу глицерофосфатного челночного механизма по транспорту электрон-эквивалентов из цитоплазмы (с процесса гликолиза) в митохондрии (на OXPHOS).

Активность СДГ в основных и малых популяциях лимфоцитов оценивали у 277 детей с псориазом и у 90 здоровых детей, которые составили группу сравнения. В результате проведенного исследования выявлено, что у детей с псориазом активность СДГ во всех изученных популяциях лимфоцитов достоверно ниже, чем в группе сравнения, за исключением популяции активированных Т-хелперов и CD5⁺ В-клеток, причем степень снижения зависела от популяции клеток, наибольшее снижение выявлено в NK-клетках (Таблица 3.10, Рисунок 3.21).

Таблица 3.10 – Активность СДГ в популяциях лимфоцитов периферической крови у детей с псориазом и в группе сравнения (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), усл.ед.)

Популяция клеток	Псориаз	Группа сравнения	Уровень достоверности (p)
Общая популяция лимфоцитов	178,1 (164,5-192,5)	186,9 (172-193,7)	0,002
Т-лимфоциты	182,1 (171,4-193,9)	193,4 (183,1-201,1)	< 0,001
Т-хелперы	185,5 (174,4-197,2)	192,1 (181-202,2)	0,007
Цитотоксические Т-лимфоциты	183,4 (171,4-195,9)	197,7 (184,7-205)	< 0,001
В-лимфоциты	138,2 (127,8-149,3)	149,3 (138,2-160,2)	< 0,001
CD5 ⁺ В-клетки	145,3 (132,7-153,5)	158,1 (144,5-169,9)	< 0,001
CD5 ⁻ В-клетки	141,5 (130,5-153,3)	144,8 (134,4-156,5)	0,105
NK-клетки	160,5 (145,1-176)	182,2 (174-197,8)	< 0,001
Регуляторные Т-клетки	188 (175,7-200,2)	203,3 (189,1-212,9)	< 0,001
Активированные Т-хелперы	195,6 (182,7-210,1)	197,9 (186,4-206,6)	0,504
Th17-лимфоциты	180,1 (167,2-191,5)	191,3 (178,8-201,6)	< 0,001

Анализ активности СДГ в основных популяциях лимфоцитов показал, что у детей с псориазом, как и в группе сравнения, наибольшей активностью СДГ обладают популяции Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов, наименьшая активность СДГ отмечена в В-лимфоцитах (Таблица 3.10, Рисунок 3.21).

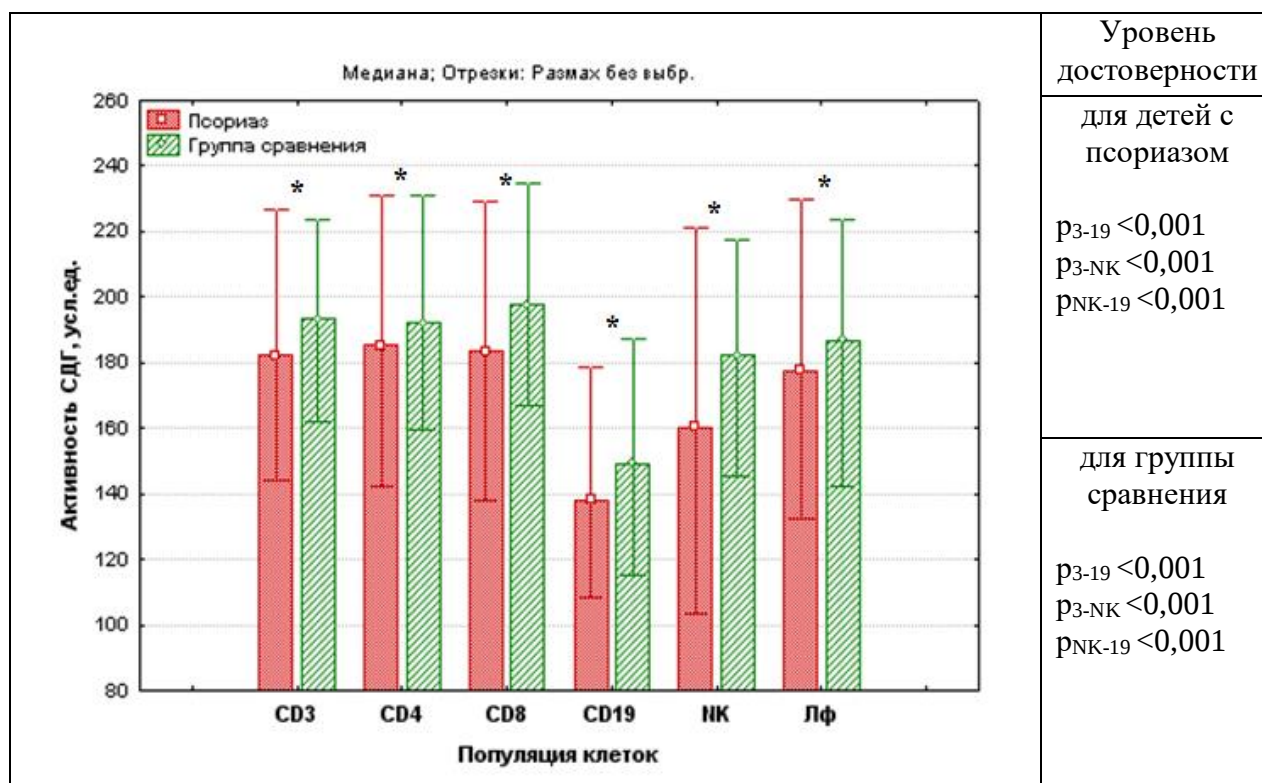


Рисунок 3.21 – Активность СДГ в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения. * - достоверность различий между группами детей по U-критерию, $p < 0,05$; Лф – общая популяция лимфоцитов (CD45)

Определение активности СДГ в субпопуляциях В-лимфоцитов показало, что достоверное снижение активности фермента наблюдалось в общей популяции В-клеток за счет снижения активности в популяции $CD5^+$ В-клеток, но не в популяции $CD5^-$ В-клеток (Рисунок 3.22).

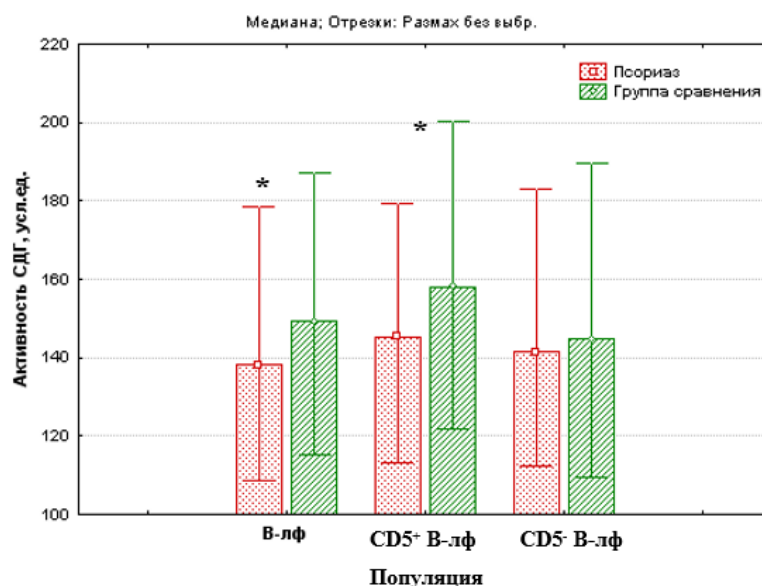


Рисунок 3.22 – Активность СДГ в популяциях В-лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения. * - достоверность различий между группами детей по U-критерию, $p < 0,05$

Оценка активности СДГ в малых популяциях $CD4^+$ -Т-клеток выявила достоверное снижение фермента в Treg и Th17 у детей с псориазом относительно группы сравнения (Рисунок 3.23). Обращает на себя внимание большой разброс показателей активности СДГ в группе детей с псориазом.

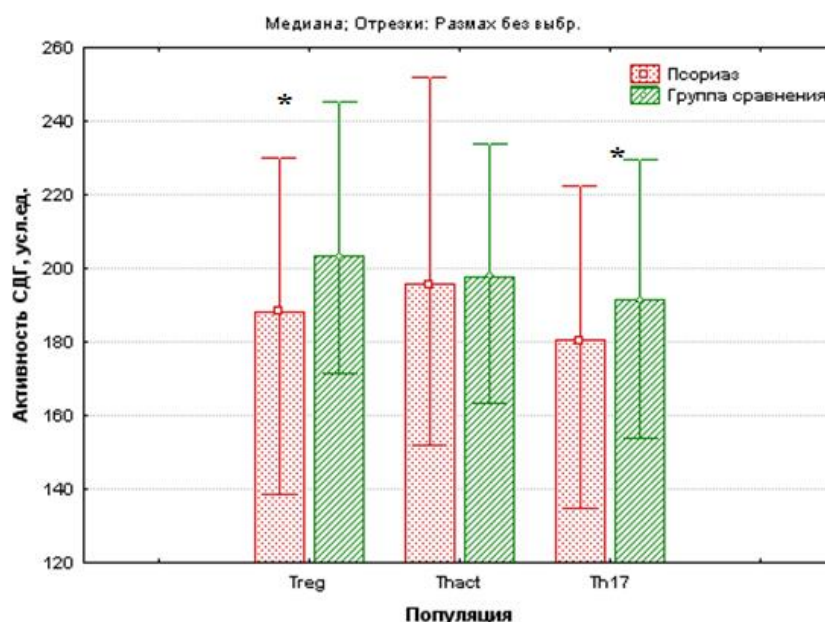


Рисунок 3.23 – Активность СДГ в Treg, Thact и Th17-лимфоцитов у пациентов с псориазом и в группе сравнения. * - достоверность различий между группами по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

Анализ активности ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом выявил достоверное снижение фермента в общей популяции лимфоцитов за счет снижения в В-лимфоцитах и в НК-клетках, при этом активность ГФДГ в Т-лимфоцитах не отличалась от уровня здоровых детей (Таблица 3.11, Рисунок 3.24).

Таблица 3.11 - Активности ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения (Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}), усл.ед.)

Популяция клеток	Псориаз	Группа сравнения	Уровень достоверности (p)
Общая популяция лимфоцитов (CD45)	159,5 (147,3-169,4)	167,3 (155,8-182,7)	0,007
Т-лимфоциты	161,4 (147,7-171,3)	161,5 (154,9-176,4)	0,131
В-лимфоциты	141,3 (130,5-153,9)	152,0 (137,3-158,1)	0,022
НК-клетки	162,4 (152,5-171,6)	175,2 (148,4-182,7)	0,031

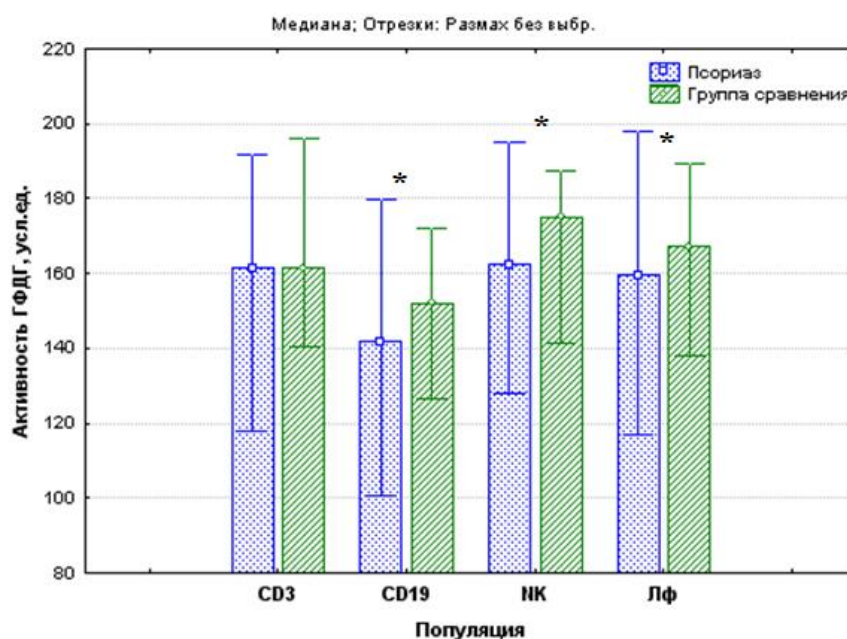


Рисунок 3.24 – Активность ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения. * - достоверность различий между группами по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

Анализ соотношения ферментов ГФДГ/СДГ показал достоверное увеличение этого показателя у детей с псориазом в основных популяциях

лимфоцитов (Таблица 3.12). Отношение ГФДГ/СДГ у детей с псориазом в NK-клетках было выше на 21%, в Т-лимфоцитах на 19% и В-лимфоцитах на 10 % относительно показателей группы сравнения. Причем, в популяции В-лимфоцитов и в NK-клетках активности ГФДГ и СДГ у детей с псориазом были одинаковы, в связи с чем, отношение ферментов равнялось 1 (Таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Отношение активности ГФДГ/СДГ в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения (Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), усл.ед.)

Популяция клеток	Псориаз	Группа сравнения	Уровень достоверности (p)
Общая популяция лимфоцитов (CD45)	0,88 (0,83-1,0)	0,84 (0,76-0,89)	< 0,001
Т-лимфоциты	0,86 (0,8-0,94)	0,72 (0,47-0,86)	< 0,001
В-лимфоциты	1,01 (0,95-1,11)	0,91 (0,64-1,00)	< 0,001
NK-клетки	1,0 (0,91-1,08)	0,82 (0,76-0,89)	< 0,001

У детей с псориазом увеличение соотношения ферментов относительно уровня здоровых детей происходит за счет более существенного снижения активности СДГ, чем ГФДГ, особенно в популяции NK-клеток (Рисунок 3.25, Рисунок 3.24, Рисунок 3.21).

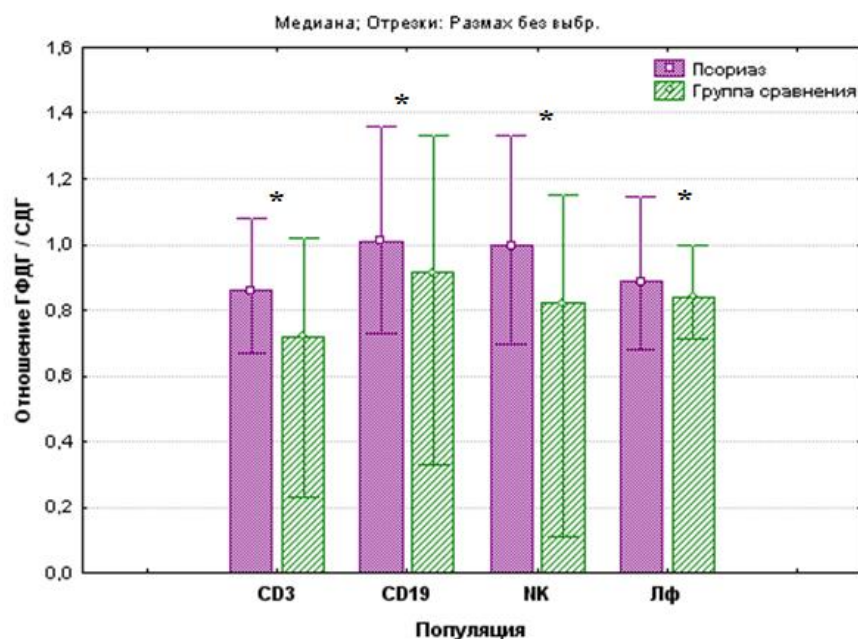


Рисунок 3.25 – Отношение ГФДГ/СДГ в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения. * - достоверность различий между группами по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

На следующем этапе работы мы оценили изменения активности ферментов СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов у детей в зависимости от возраста. Анализ не показал достоверной зависимости активности ферментов СДГ и ГФДГ во всех основных популяциях лимфоцитов от возраста, как в группе детей с псориазом, так и в группе здоровых детей.

Корреляционный анализ активности СДГ в зависимости от тяжести псориаза выявил слабую обратную зависимость фермента в Treg при увеличении PASI ($r = -0,20$; $p = 0,002$). При этом, с увеличением индекса PASI, получено достоверное снижение активности ГФДГ в общей популяции лимфоцитов ($r = -0,27$; $p < 0,001$), в Т-лимфоцитах ($r = -0,26$; $p = 0,002$) и В-лимфоцитах ($r = -0,21$; $p = 0,004$).

Сравнение пациентов с легкой (PASI < 10) и тяжелой (PASI > 20) степенью тяжести заболевания также показало достоверное снижение активности СДГ в популяции Treg ($p < 0,001$; Рисунок 3.26А). Помимо этого, получены достоверные отличия активности СДГ в Treg у пациентов с легкой и средне-тяжелой ($p < 0,001$), средне-тяжелой и тяжелой степенью тяжести

заболевания ($p=0,032$); Рисунок 3.26А). Активность ГФДГ в общей популяции лимфоцитов у пациентов с легкой степенью тяжести была достоверно выше, чем у пациентов со средне-тяжелой ($p=0,004$) и тяжелой степенью тяжести ($p<0,001$; Рисунок 3.26Б).

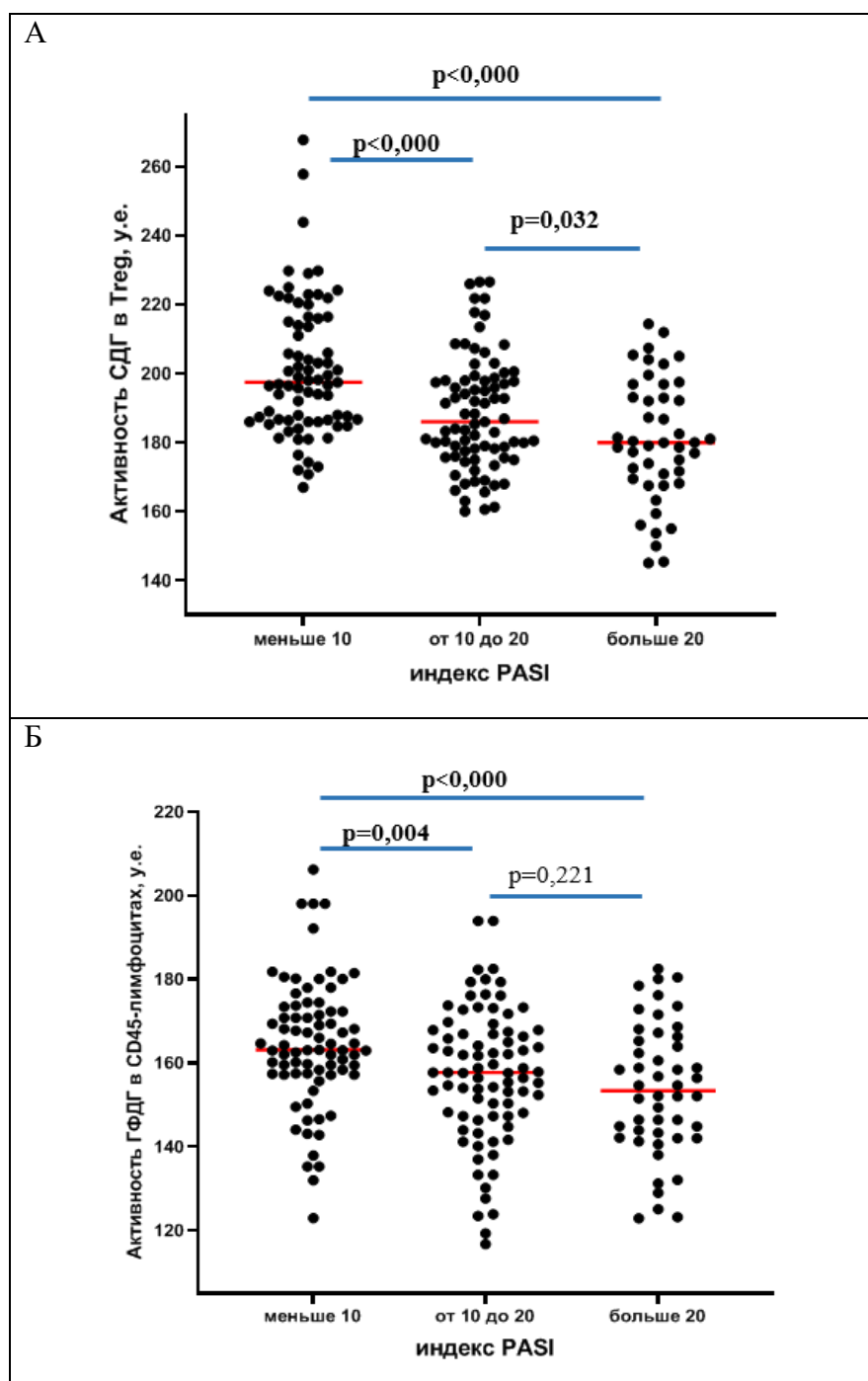


Рисунок 3.26 – Зависимость активности СДГ в Трег (А) и ГФДГ в общей популяции лимфоцитов (Б) от PASI у детей с псориазом

Для оценки влияния типа терапии на активность митохондриальных ферментов дети с псориазом были разделены на группы: в группу 1 (n=78) вошли дети, получавшие терапию наружными кортикостероидами и эмолентами с кератолитическим действием, в группу 2 (n=45) - терапию метотрексатом. Пациенты, получавшие биологическую терапию блокаторами TNF α , составили группу 3 (n=82), а в группу 4 вошли пациенты, получавшие анти-IL-12/23 терапию (n=64).

Оценка активности митохондриальных ферментов СДГ и ГФДГ у детей с псориазом, получавших разную патогенетическую терапию, показала, что у детей всех групп наблюдалось снижение активности СДГ в основных и малых популяциях лимфоцитов относительно группы сравнения, степень снижения зависела от типа терапии и популяции клеток.

Активность СДГ в популяциях Т-лимфоцитов, Т-хелперах, цитотоксических Т-лимфоцитах соответствовала нижней границе нормы у детей всех групп терапии. У детей с псориазом на терапии ГИБП получены наибольшие изменения активности ферментов: так на терапии блокаторами TNF α (группа 3) выявлено достоверное снижение активности СДГ в популяции НК-клеток относительно групп 1 ($p_{13}<0,001$) и 4 ($p_{34}=0,004$). Также наибольшее снижение активности СДГ в популяции НК-клеток относительно нормы выявлено в группе 3 (Рисунок 3.27). В популяции В-клеток показано достоверное снижение активности СДГ в группах детей на биологической терапии блокаторами TNF α (группа 3) и IL-12/23 (группа 4) относительно группы пациентов на наружной терапии, при этом активность СДГ в группах 3 и 4 была ниже нормы (Рисунок 3.27).

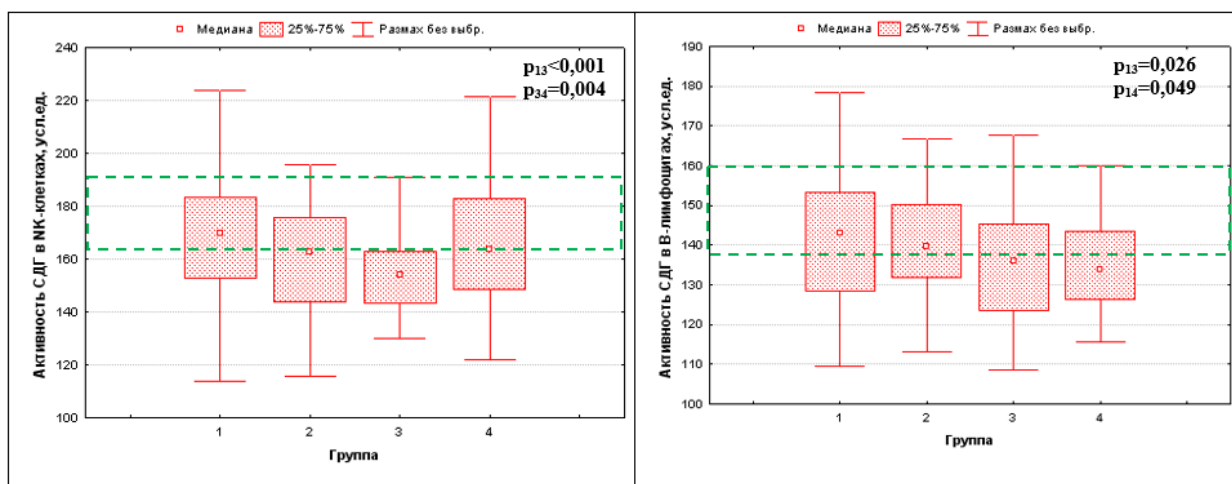


Рисунок 3.27 – Активность СДГ в НК-клетках и В-лимфоцитах у детей с псориазом на разных типах терапии. Диапазон нормы выделен зеленым цветом

Анализ активности СДГ в малых популяциях лимфоцитов показал, что в группах 1, 2, 3 активность СДГ в Treg ниже уровня нормы. Выявлено, что активность фермента в Treg и Thact у детей с псориазом в группе 4, относительно других групп терапии достоверно выше, также в этой группе отмечается наибольший разброс показателей (Рисунок 3.28).

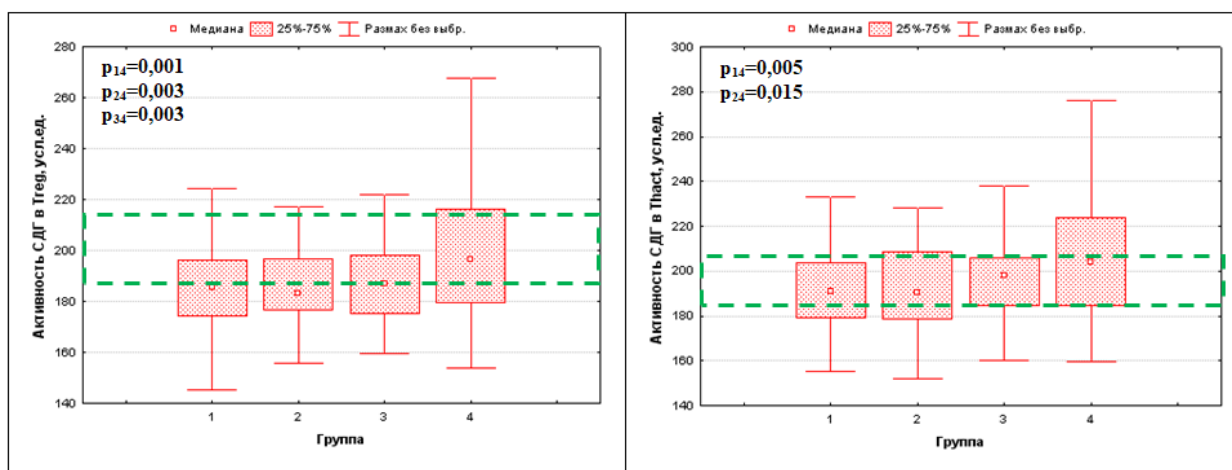


Рисунок 3.28 – Активность СДГ в Treg и Thact у детей с псориазом на разных типах терапии. Диапазон нормы выделен зеленым цветом

Анализ активности ГФДГ у детей с псориазом на разных типах терапии показал достоверное снижение активности ГФДГ относительно группы сравнения, в группе детей на терапии блокаторами TNF α в общей популяции лимфоцитов ($p = 0.006$), в Т-лимфоцитах ($p = 0.037$) и в В-лимфоцитах

($p=0,003$). Значение активности ГФДГ у детей на других типах терапии не имели достоверных отличий и находились в диапазоне нормы, однако выявлен большой разброс показателей во всех группах. В группе детей на терапии блокаторами TNF α выявлено достоверное снижение активности ГФДГ в В-лимфоцитах относительно групп 1, 2 и 4 (Рисунок 3.29). Активность ГФДГ в NK-клетках на всех типах терапии находилась в пределах значений группы сравнения, но в группе 4 активность ГФДГ достоверно превышала значение показателя в группах 1, 2 и 3 (Рисунок 3.29).

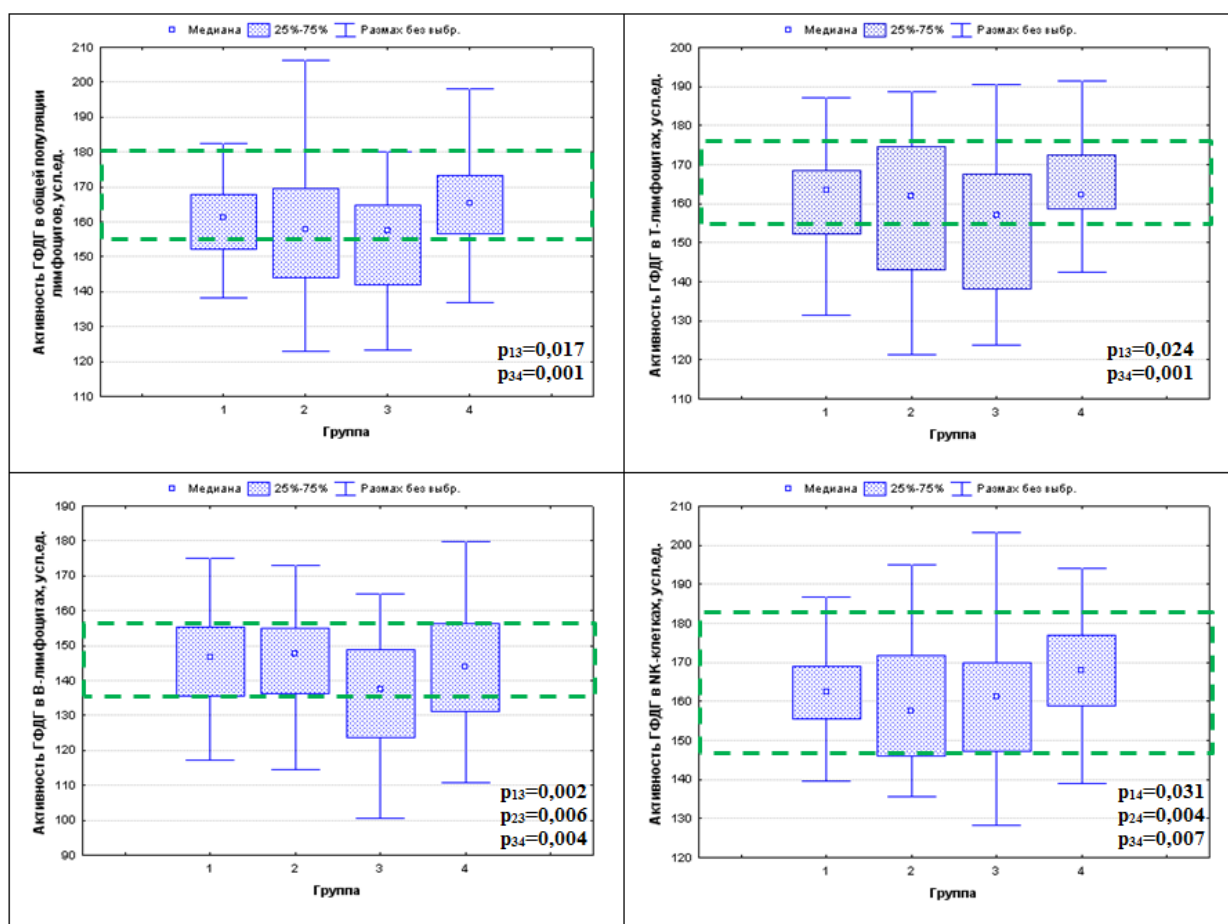


Рисунок 3.29 – Активность ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом на разных типах терапии

3.2.2. Оценка экспрессии CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидаз в субпопуляциях CD4⁺-Т-клеток у детей с псориазом

Пуринергическая передача сигналов модулирует системные и местные воспалительные реакции при иммуноопосредованных и аутоиммунных заболеваниях. Внеклеточный АТФ является сильным провоспалительным сигналом и важной частью пуринергической регуляции. Он включает активацию пуринергических рецепторов в клетке и/или в близлежащих клетках, тем самым регулируя клеточные функции. Уровень внеклеточного АТФ регулируется каталитическими эффектами CD39 и CD73, которые ответственны за последовательное превращение его в аденозин. За счет продукции аденозина CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидазы считаются ответственными за создание иммуносупрессивной среды.

В данном разделе работы оценивали содержание малых популяций CD4⁺-Т-клеток (Thact, Th17, Treg) экспрессирующих CD39⁺- или CD73⁺-эктонуклеотидазы и совместную экспрессию этих ферментов (CD39⁺CD73⁺). Группы здоровых детей и пациентов с псориазом и были сопоставимы по возрасту ($p=0,295$): для детей с псориазом медиана возраста составила – 12,5 (10,1-15,8) лет, для группы сравнения – 12,4 (7,4-16,1) года.

На предыдущем этапе работы (главе 3.1) показано увеличение доли Th17 и Thact относительно показателей здоровых детей, по содержанию Treg группы не отличались (Таблица 3.13). Оценка относительного количества популяций CD4⁺-Т-клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, выявила достоверное снижение CD39⁺Th17 ($p=0,002$) у детей с псориазом, при этом относительное количество CD73⁺Thact ($p=0,036$), CD73⁺Th17 ($p=0,011$) и CD39⁺CD73⁺Th17 ($p=0,022$) было выше, чем в группе сравнения (Таблица 3.13).

Таблица 3.13 – Относительное количество субпопуляций CD4⁺-Т-клеток с экспрессией CD39 и CD73 у детей с псориазом и в группе сравнения

Показатели	Пациенты с псориазом (n=138)	Здоровые дети (n=32)	Уровень достоверности (p)
Tregs, % CD4	7,2 (6,2-9,1)	7,3 (6,5-9,4)	0,679
CD39 ⁺ Tregs, %	32,7 (20,9-41,8)	31,5 (25,2-36,8)	0,878
CD73 ⁺ Tregs, %	7,6 (5,4-12,9)	8,6 (6,1-11,3)	0,947
Thact, % CD4	17,5 (14,2-22,5)	10,8 (8,7-18,9)	0,001
CD39 ⁺ Thact, %	6,0 (2,8-8,8)	5,0 (4,2-7,8)	0,852
CD73 ⁺ Thact, %	18,3 (14,8-24,5)	14,0 (10,1-21,4)	0,036
Th17, % CD4	20,0 (15,3-24,6)	11,4 (9,5-15,4)	< 0,001
CD39 ⁺ Th17, %	8,3 (4,6-11,4)	10,6 (9,4-14,4)	0,002
CD73 ⁺ Th17, %	11,5 (9,0-17,4)	8,7 (6,3-13,0)	0,011
CD39 ⁺ CD73 ⁺ Tregs, %	3,8 (2,3-6,2)	3,7 (2,5-5,0)	0,892
CD39 ⁺ CD73 ⁺ Thact, %	1,3 (0,8-1,9)	1,0 (0,7-1,6)	0,270
CD39 ⁺ CD73 ⁺ Th17, %	1,5 (0,5-2,7)	0,8 (0,7-1,3)	0,022

Анализ содержания клеток с экспрессией эктонуклеотидазы CD39 в изученных популяциях показал, что наибольшее количество клеток с экспрессией CD39⁺ характерно для популяции Tregs, как у детей с псориазом, так и в группе сравнения (Рисунок 3.30А). Количество CD39⁺Tregs достоверно превышало CD39⁺Thact ($p<0,001$) и CD39⁺Th17 ($p<0,001$), при этом количество CD39⁺Th17 было достоверно выше, чем CD39⁺Thact ($p<0,001$), как у здоровых детей, так и у пациентов с псориазом (Рисунок 3.30А).

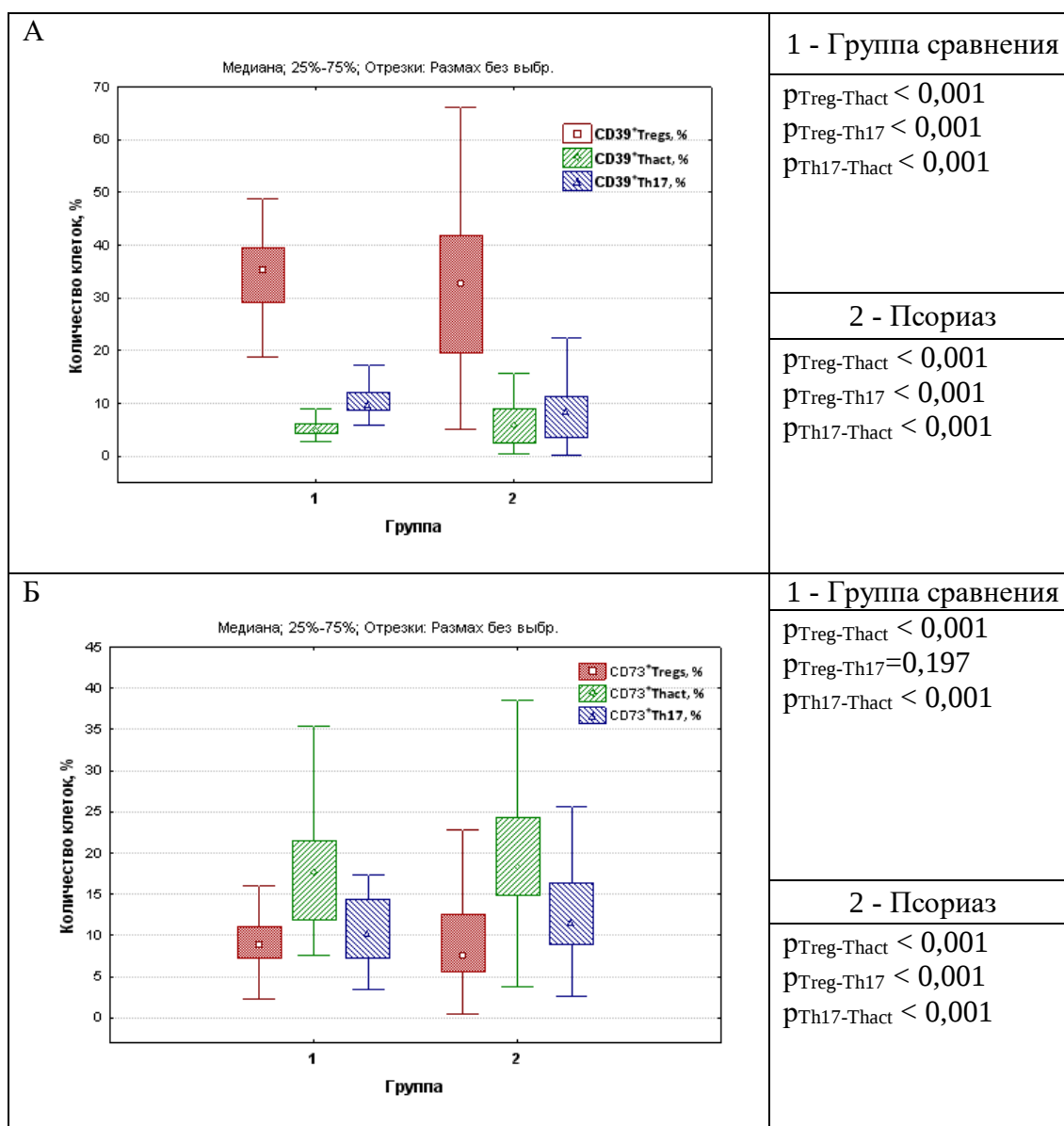


Рисунок 3.30 - Относительное количество Tregs, Thact, Th17 с экспрессией CD39 (А) и CD73 (Б) в группе сравнения (1 группа) и в группе детей с псориазом (2 группа)

Сравнение относительного количества популяций Tregs, Thact, Th17 с экспрессией CD73⁺ выявило достоверно более высокое количество CD73⁺Thact ($p < 0,001$) в обеих группах (Рисунок 3.30Б). У детей с псориазом относительное количество CD73⁺Th17 было достоверно выше CD73⁺Tregs ($p < 0,001$), в то время как в группе здоровых детей эти показатели не отличались ($p = 0,197$; Рисунок 3.30Б).

Анализ количества клеток с коэкспрессией CD39⁺ и CD73⁺ показал более высокие значения в популяции Treg по сравнению с Thact ($p < 0,001$) и

Th17 ($p < 0,001$), как у здоровых детей, так и у пациентов с псориазом. Содержание популяций $CD39^+CD73^+Thact$ и $CD39^+CD73^+Th17$ не отличались в обеих группах (Рисунок 3.31).

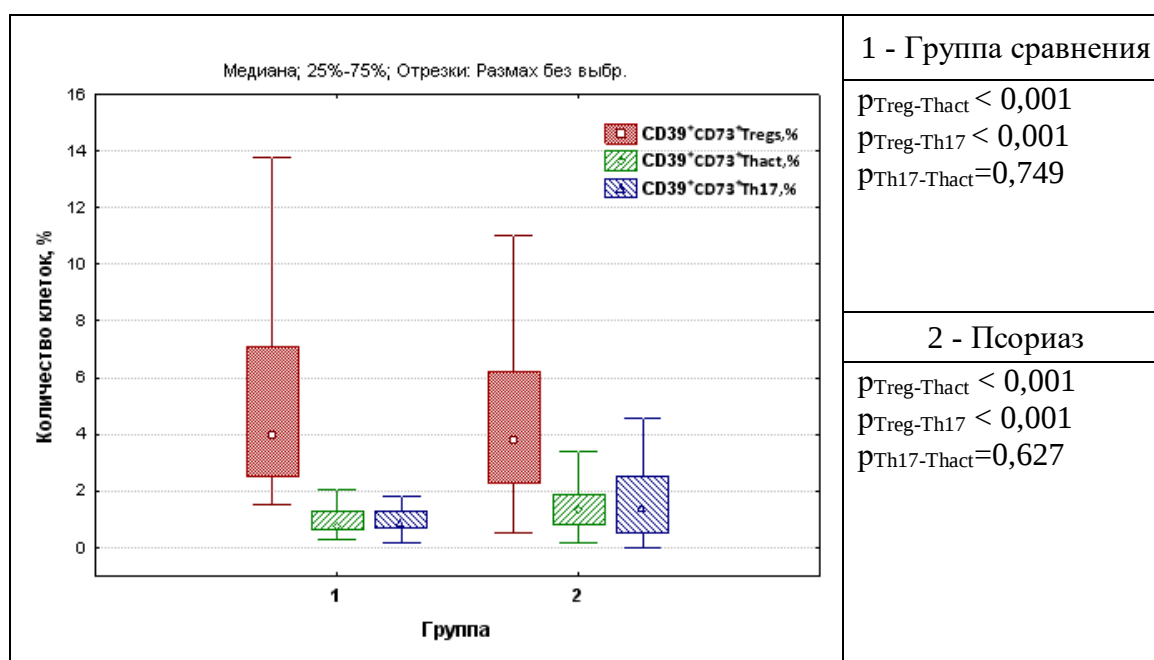


Рисунок 3.31 – Относительное количество Tregs, Thact, Th17 с коэкспрессией $CD39^+CD73^+$ в группе сравнения (1 группа) и у детей с псориазом (2 группа)

На следующем этапе был проведен анализ количества клеток с экспрессией эктонуклеотидаз $CD39^+$ и $CD73^+$ в зависимости от возраста детей и длительности заболевания псориазом. У здоровых детей получено достоверное увеличение $CD73^+Th17$ ($r=0,37$; $p=0,016$) и снижение $CD73^+Tregs$ ($r=-0,43$; $p=0,005$), $CD39^+Thact$ ($r=-0,47$; $p=0,003$), $CD39^+Th17$ ($r=-0,42$; $p=0,007$), $CD39^+CD73^+Thact$ ($r=-0,53$; $p < 0,001$) и $CD39^+CD73^+Th17$ ($r=-0,42$; $p=0,007$) с возрастом. Для детей с псориазом выявлено только увеличение относительного количества $CD73^+Th17$ с возрастом ($r=0,33$; $p=0,000$). Зависимости количества клеток с экспрессией $CD39^+$ и $CD73^+$ в популяциях Tregs, Thact и Th17 от длительности заболевания псориазом у детей не выявлено.

В группе детей с псориазом, у которых оценивали содержание $CD4^+$ -Т-клеток, экспрессирующих $CD39^+$ - и $CD73^+$ -эктонуклеотидазы, индекс PASI изменялся от 0 до 68 (Ме 13,3 (5-22)). Корреляционный анализ не выявил

прямой зависимости количества клеток, экспрессирующих CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидазы от индекса PASI.

Для более детального анализа содержания CD39⁺Tregs у детей с псориазом в зависимости от PASI, мы выделили группу пациентов в стадии регресса заболевания (PASI≤10, n=60) и в прогрессирующей стадии (PASI>10, n=78). Статистически значимых различий по количеству CD39⁺Tregs у детей с псориазом в стадии прогресса (Me 33,2 (14,3-46,2)) и регресса заболевания (Me 28,6 (24,8-36,5)) не выявлено (p=0,507), при этом отмечался большой разброс показателя в обеих группах.

Проведенный частотный анализ показал, что в стадии регресса заболевания распределение пациентов по содержанию CD39⁺Tregs не отличается от здоровых детей (критерий χ^2 ; p>0,01) и достоверно отличается от распределения пациентов в стадии прогресса заболевания (p<0,01; Рисунок 3.32). Распределение пациентов по CD39⁺Tregs в стадии прогресса заболевания псориазом представляет собой кривую с несколькими пиками, четко выделяются пациенты с низким (Me 19,6(11,8-26,1)) и высоким (Me 45,2 (36,0-51,1)) процентом CD39⁺Tregs (Рисунок 3.32). Группы пациентов с низким и высоким значением CD39⁺Tregs достоверно отличаются от группы условно здоровых детей (Me 31,5 (25,2-36,8); p<0,001).

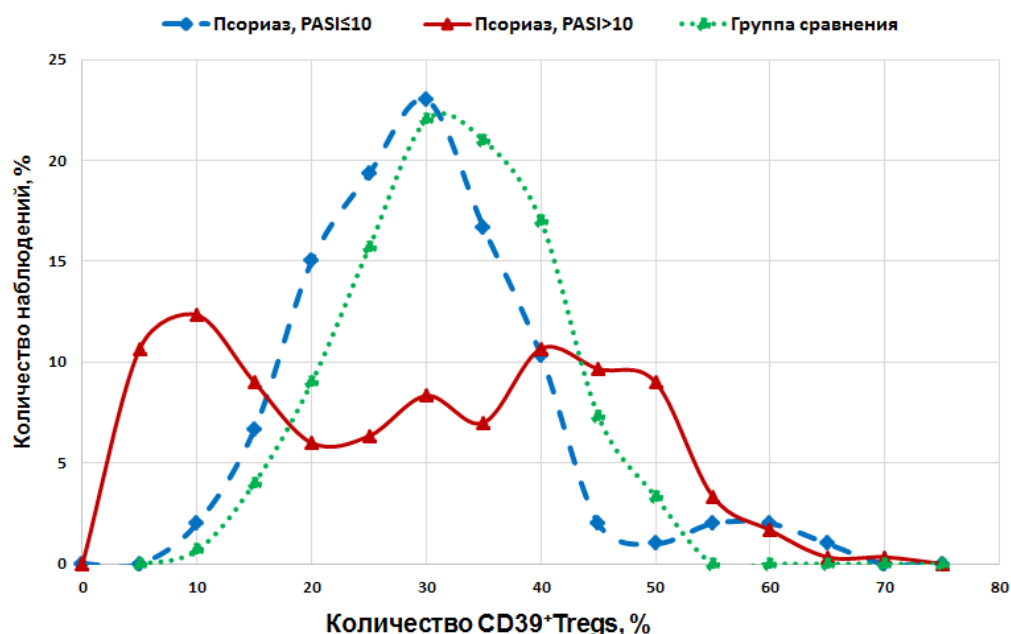


Рисунок 3.32 - Распределение здоровых детей и пациентов с псориазом в стадии регресса ($PASI \leq 10$) и прогресса ($PASI > 10$) заболевания по количеству CD39⁺Tregs

Проведенный анализ выявил особенности активности CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидаз на разных типах терапии у детей с псориазом. В группе 1, у детей на терапии наружными глюкокортикостероидами, получено наибольшее количество CD39⁺Tregs, которое достоверно превышало значение данного показателя в группах 3 (анти-TNF терапия) и 5 (группа сравнения; Рисунок 3.33). Отмечен наибольший разброс количества CD39⁺Tregs в группах 1 и 4 (анти-IL-12/23 терапия). Достоверной разницы между группами пациентов на разной терапии по количеству CD73⁺Tregs выявлено не было (Рисунок 3.33).

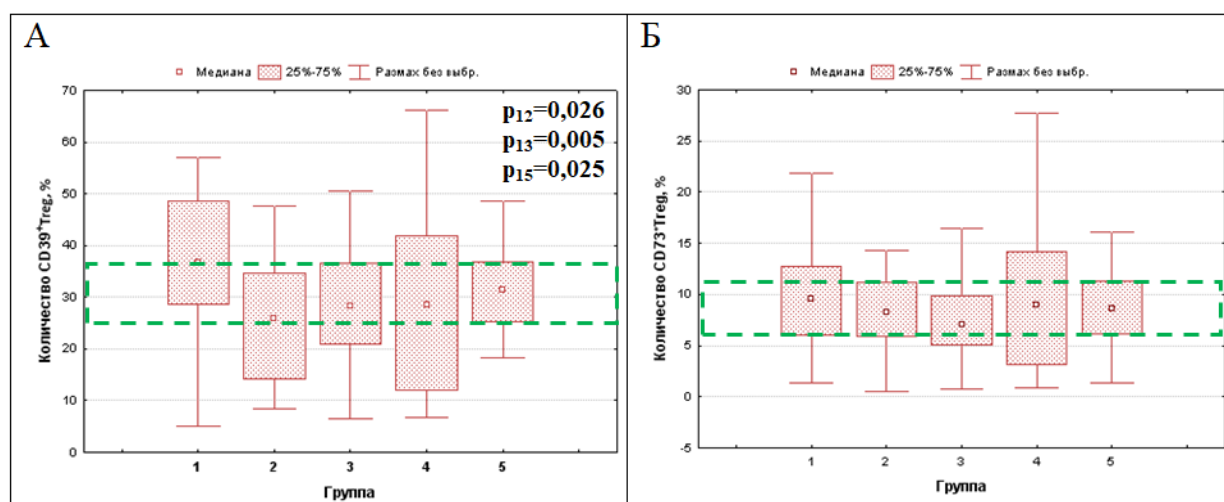


Рисунок 3.33 - Относительное количество Tregs с экспрессией CD39 (А) и CD73 (Б) у детей с псориазом на разных типах терапии и в группе сравнения. Группа 1- терапия наружными кортикостероидами, группа 2 – метотрексат, группа 3 - блокаторы TNF α , группа 4 - анти-IL-12/23 и группа 5 – группа сравнения

Анализ содержания Th17 и Thact с экспрессией CD39 и CD73 у детей с псориазом показал, что на всех типах терапии отмечается большой разброс показателей относительно уровня здоровых детей. Содержание CD39⁺Th17 достоверно было снижено в группах 2, 3 и 4 (на терапии метотрексатом и блокаторами IL-12/23 и TNF α), относительно группы сравнения (Рисунок 3.34А). У детей на биологической терапии блокатором IL-12/23 выявлено достоверное снижение CD39⁺Thact, при увеличении CD73⁺Th17 и CD73⁺Thact относительно показателей в группе 3 (блокаторы TNF α) и здоровых детей (Рисунок 3.34).

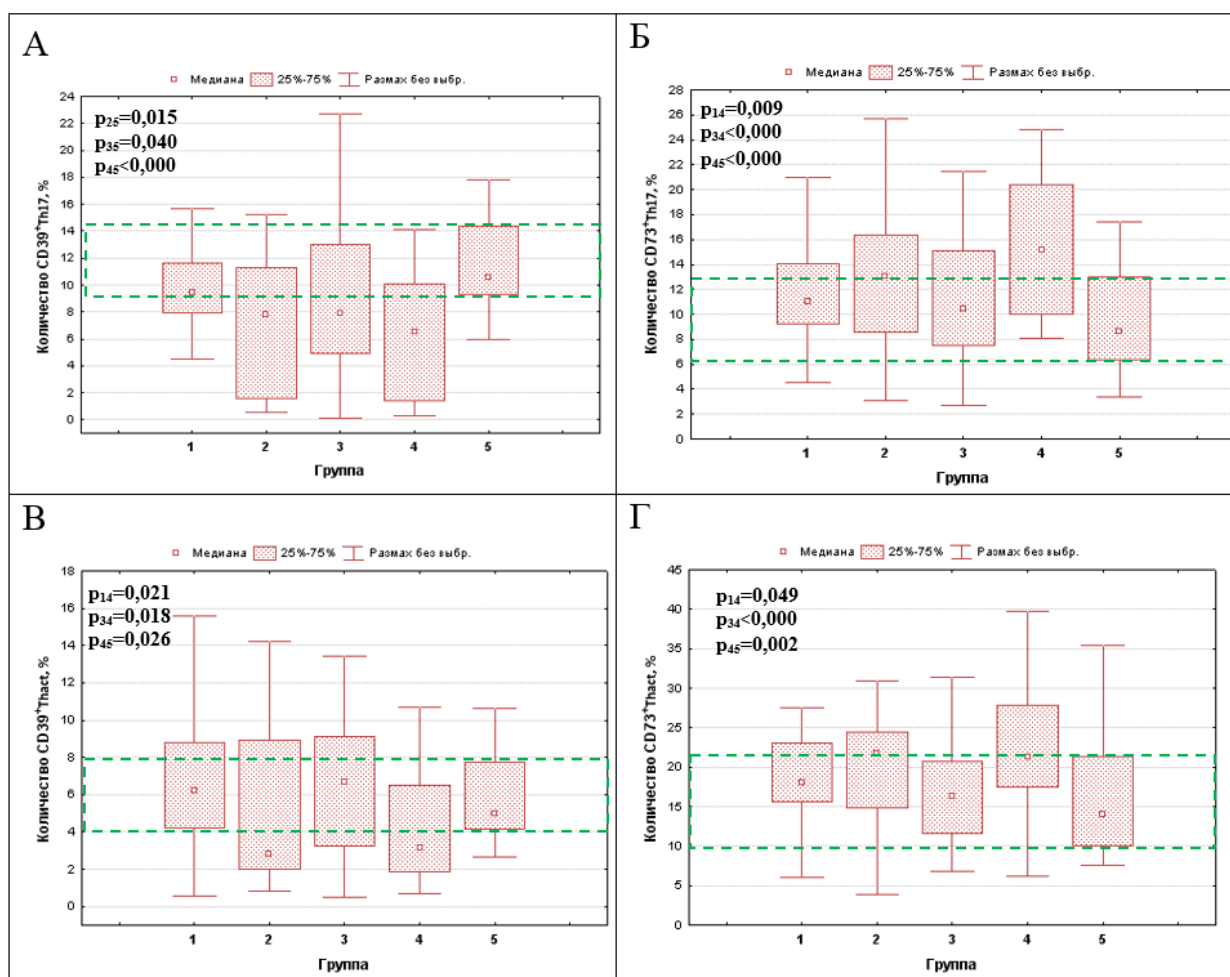


Рисунок 3.34 – Относительное количество Th17 и Thact с экспрессией CD39, CD73 у детей с псориазом на разных типах терапии и в группе сравнения. Обозначение групп см. на рисунке 3.33

Для пациентов с псориазом, получавших биологическую терапию блокаторами TNF- α и IL-12/23, оценивали содержание Tregs, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, в зависимости от длительности терапии. Пациенты были разделены на группы: группа 1 – длительность терапии от 0 до 16 недель, группа 2 – от 16 до 52 недель, группа 3 – более 52 недель терапии.

Анализ показал, что в процессе терапии и при снижении индекса PASI, содержание Tregs, экспрессирующих CD39⁺, имеет тенденцию к увеличению, хотя достоверной разницы между группами 1 и 3 по U-критерию Манна-Уитни не выявлено из-за большего разброса показателей в 1 группе (Рисунок 3.35). Однако, оценка распределения пациентов в группе 1 и 3 по экспрессии

CD39⁺ на Tregs показала, что в процессе терапии уменьшается количество пациентов со сниженной и повышенной экспрессией CD39⁺, что приводит к снижению дисперсии показателя: распределения в группе 1 и 3 различаются достоверно по критерию Фишера ($F_{13}= 22,05$; $p<0,01$).

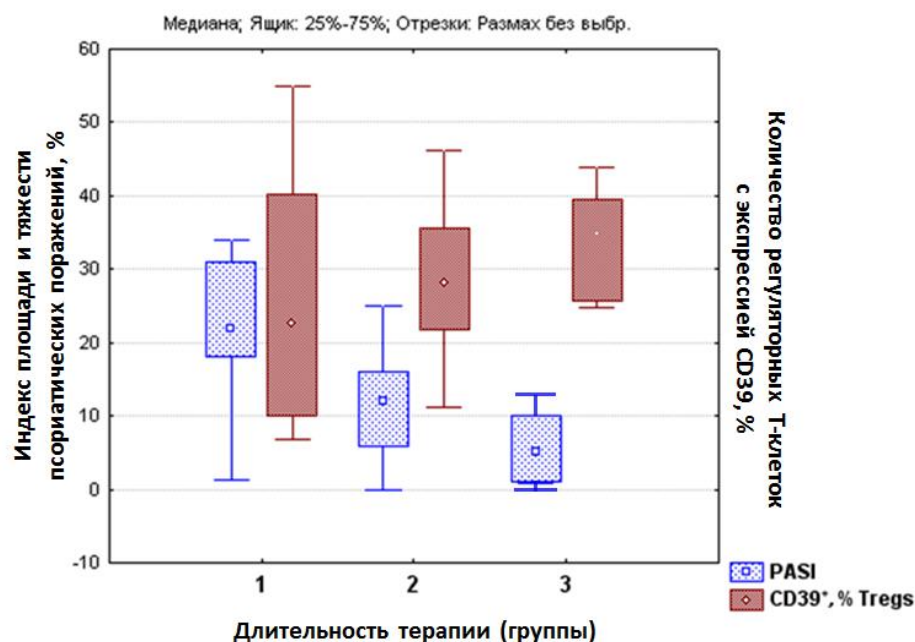


Рисунок 3.35 – Динамика экспрессии CD39⁺ на регуляторных Т-клетках и индекса PASI в зависимости от длительности терапии ГИБП. Группа 1 – длительность терапии от 0 до 16 недель, группа 2 – от 16 до 52 недель, группа 3 – более 52 недель терапии

3.2.3. Оценка экспрессии внутриклеточного фермента аргиназы-1 в популяции MDSCs у детей с псориазом

MDSCs проявляют супрессорную активность в отношении клеток врожденного и адаптивного иммунитета, используя разные механизмы иммуносупрессии. Одним из механизмов развития иммуносупрессии MDSCs служит истощение питательных веществ для Т-клеток, в частности запасов аргинина. MDSCs продуцируют фермент аргиназу-1, которая разрушает аргинин, а также вызывает повреждение ζ -цепи TCR, таким образом блокируя активацию и пролиферацию Т-клеток. Ранее мы показали, что у

детей с псориазом повышено содержание MDSCs относительно здоровых детей (см. Глава 3.1).

Для оценки иммуносупрессивных функций MDSCs на следующем этапе работы определяли количество внутриклеточного фермента аргиназы-1 у 40 детей с псориазом и у 32 детей группы сравнения.

Уровень экспрессии аргиназы-1 у детей с псориазом изменялся от 2,7 до 3,7 MFI (средняя интенсивность флуоресценции) и составил – Me 3,2 (3,0-3,4) MFI (Рисунок 3.36).

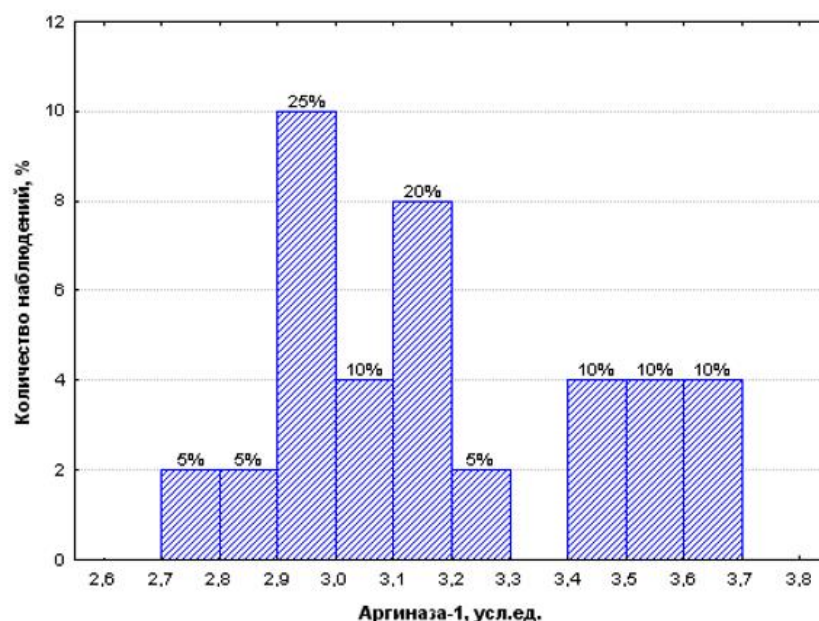


Рисунок 3.36 – Распределение пациентов с псориазом по экспрессии аргиназы-1 в популяции MDSCs

У детей с псориазом анализ экспрессии аргиназы-1 в популяции MDSCs показал достоверное увеличение уровня экспрессии фермента относительно группы сравнения (Me 2,7 (2,6-2,9) MFI; Рисунок 3.37).

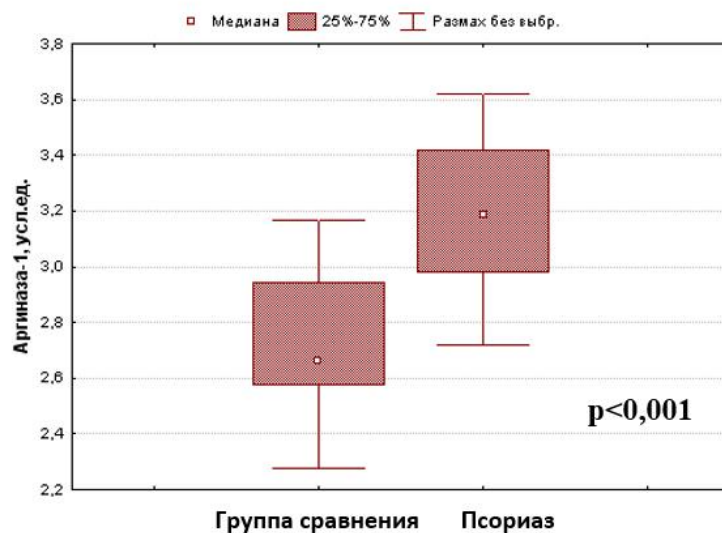


Рисунок 3.37 – Уровень экспрессии аргиназы-1 в MDSCs у детей с псориазом и в группе сравнения

Выявлена прямая корреляционная зависимость между экспрессией аргиназы-1 и относительным количеством G-MDSCs ($r=0,30$; $p<0,05$), M-MDSCs ($r=0,40$; $p<0,01$) и обратная с M⁺G⁻-MDSCs ($r=-0,54$; $p<0,01$). Прямой зависимости уровня экспрессии фермента от возраста и длительности заболевания псориазом не выявлено.

Анализ экспрессии аргиназы-1 у пациентов с псориазом в стадии регресса заболевания (PASI<10, группа 1) и в прогрессирующей стадии заболевания (PASI≥10, группа 2) и показал достоверное снижение активности фермента: Ме 3,2 (3,16-3,57) MFI против 2,98 (2,88-3,01) MFI; $p=0,001$ (Рисунок 3.38).

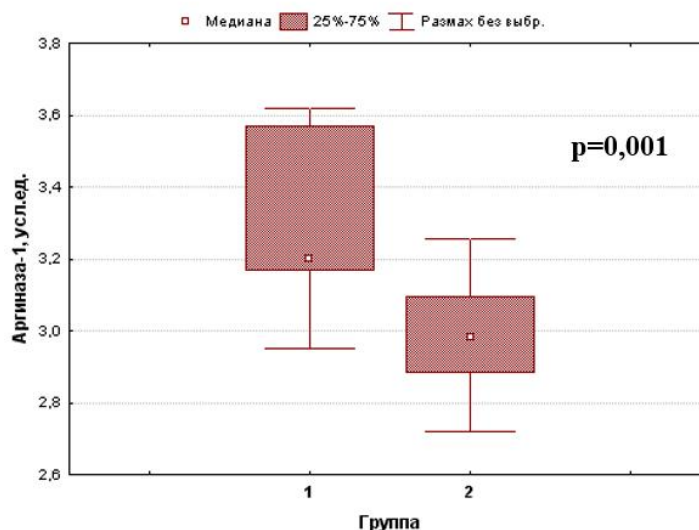


Рисунок 3.38 – Уровень экспрессии аргиназы-1 в MDSCs у детей с псориазом в стадии регресса (1) и в прогрессирующей стадии заболевания (2)

Таким образом, оценка метаболизма популяций лимфоцитов при псориазе у детей показала, что активность СДГ снижена во всех популяциях лимфоцитов, кроме популяции активированных Т-хелперов и CD5⁺ В-клеток относительно группы сравнения. Степень снижения активности СДГ определяется популяцией лимфоцитов. У детей с псориазом активность ГФДГ была достоверно снижена в общей популяции лимфоцитов, за счет снижения активности в В-лимфоцитах и NK-клетках. Соотношение активности ферментов ГФДГ/СДГ у пациентов с псориазом было увеличено в основных популяциях лимфоцитов. Тяжесть состояния пациентов по индексу PASI тем выше, чем ниже активность СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов. Степень снижения активности митохондриальных ферментов СДГ и ГФДГ у детей с псориазом получавших разную патогенетическую терапию зависела от типа терапии и популяции клеток. Наибольшее снижение активности ферментов СДГ и ГФДГ выявлено в группе детей на анти-TNF терапии.

У детей с псориазом и в группе сравнения количество клеток с экспрессией CD39⁺ и CD73⁺-эктонуклеотидаз определяется популяцией клеток. Содержание CD39⁺Tregs достоверно превышало количество клеток с

экспрессией CD39⁺ в популяциях Thact и Th17, при этом количество CD39⁺Th17 было выше, чем CD39⁺Thact. Наибольшее содержание клеток с экспрессией CD73 выявлено в популяции Thact, тогда так количество клеток с коэкспрессией CD39⁺CD73⁺ – в популяции Tregs в обеих группах.

Выявлено достоверное снижение CD39⁺Th17 у детей с псориазом, при этом относительное количество CD73⁺Thact, CD73⁺Th17 и CD39⁺CD73⁺Th17 было выше, чем в группе сравнения.

У детей с псориазом при увеличении PASI>10 наблюдается большой разброс показателя CD39⁺Tregs, выделяются пациенты как с высоким (Me 45,2 (36,0-51,1) % Treg), так и с низким (Me 19,6(11,8-26,1) % Treg) содержанием CD39⁺Tregs, достоверно отличающиеся от показателя здоровых детей (p=0,001).

На всех типах патогенетической терапии выявляется большой разброс содержания CD4⁺-Т-клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы. Получено снижение содержания CD39⁺Th17 у пациентов на биологической терапии и метотрексатом. На фоне биологической терапии и при снижении индекса PASI, уменьшается количество пациентов со сниженной и повышенной экспрессией CD39⁺ в Tregs.

Уровень экспрессии аргиназы-1 в MDSCs у детей с псориазом достоверно увеличен относительно группы сравнения. Выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем экспрессии аргиназы-1 и относительным количеством G-MDSCs, M-MDSCs и обратная с M⁺G⁻-MDSCs. У детей в прогрессирующей стадии псориаза (PASI>10) уровень экспрессии фермента аргиназы-1 достоверно ниже, чем в стадии регресса заболевания.

Таким образом, метаболическая активность клеток у детей с псориазом информативна в оценке тяжести состояния и эффективности проводимой терапии и должна учитываться наряду с количественным содержанием клеток в периферической крови.

3.3. Активность ядерного фактора транскрипции κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом

Изменения путей передачи внутриклеточных сигналов может объяснять сложный патогенез псориаза. Нарушение регуляции в этих путях влияет на активацию иммунных клеток, пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов при псориазе. Одним из наиболее изученных – путь активации ядерного фактора транскрипции κB (NF- κB), который наступает под влиянием широкого спектра стимулов. Стимулирующий агент активизирует сигнальный путь NF- κB , что приводит к высвобождению NF- κB от ингибирующего комплекса, транслокации его из цитоплазмы в ядро клетки и к стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов. В исследованиях на взрослых показано, что действие анти-TNF терапии снижает уровень активного NF- κB у пациентов с псориазом [78], однако влияние других таргетных биологических препаратов на изменение количества клеток с транслокацией NF- κB не изучено.

Современный метод проточной цитометрии с визуализацией (Amnis ImageStream^X) позволил оценить процент клеток с транслокацией NF- κB (% активированных клеток, в которых NF- κB локализуется в ядре) в различных популяциях клеток. Данная глава посвящена изучению уровня транслокации NF- κB в различных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом разной тяжести заболевания и в группе сравнения, а также оценке влияния ГИБП на уровень транслокации NF- κB при разной эффективности терапии. Кроме уже описанных популяций лимфоцитов, в данной главе оценивали уровень транслокации NF- κB в популяции цитотоксических Th17-лимфоцитов (Tc17 - CD3⁺CD8⁺CD161⁺). Популяция Tc17 показала информативность в оценке эффективности анти-TNF терапии у взрослых пациентов с псориазом.

Проведенный анализ показал, что уровень транслокации NF- κB у обследованных детей изменялся от 7,0 до 98% и зависел от популяции клеток (Рисунок 3.39, Таблица 3.14).

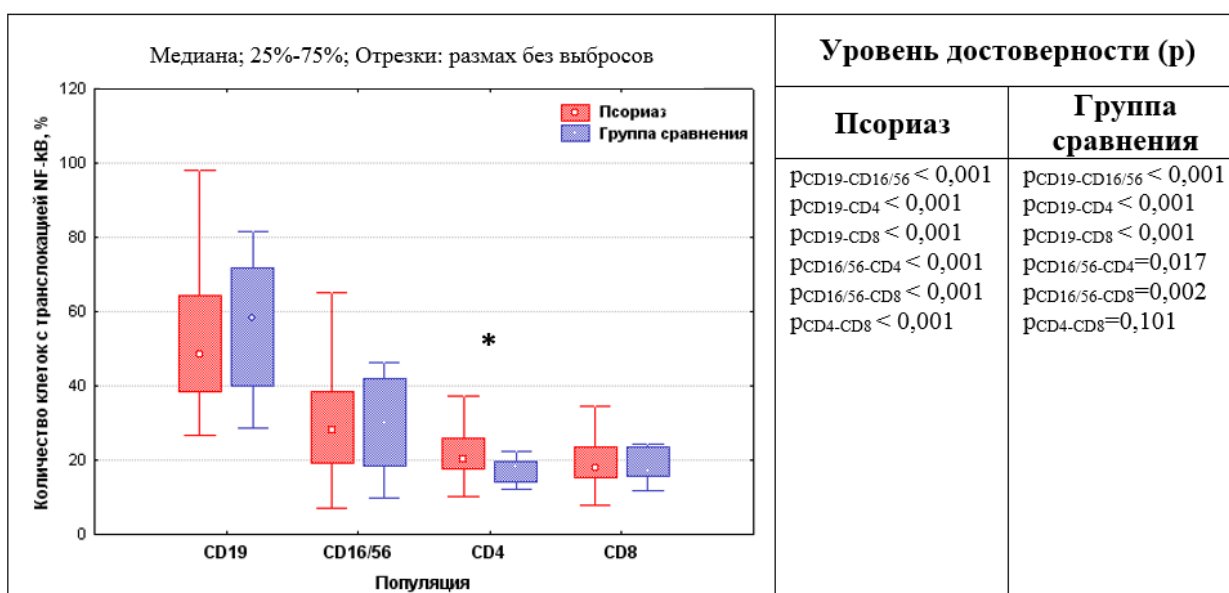


Рисунок 3.39 – Количество клеток с транслокацией NF-кВ (%) в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения. p – достоверность различий между популяциями, по критерию Вилкоксона для зависимых переменных, * - различия между псориазом и группой сравнения, $p < 0,05$

Таблица 3.14 – Процент клеток с транслокацией NF-кВ (%) в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения

Популяция	Пациенты с псориазом (n=195)	Здоровые дети (n= 34)	Уровень достоверности (p)
В-лимфоциты	46,1 (36,5-61,2)	48,5 (35,3-60,7)	0,755
Т-лимфоциты	20,0 (16,8-24,4)	17,8 (16,4-21,1)	0,109
Т-хелперы	20,1 (17,2-25,1)	15,9 (14,1-19,7)	$< 0,001$
Цитотоксические Т-лимфоциты	18,0 (15,2-23,2)	17,8 (15,6-23,5)	0,553
Незрелые Т-лимфоциты	24,4 (18-36)	23,7 (19-33)	0,473
НК-клетки	27,4 (18,7-39,9)	29,9 (20,0-42,1)	0,488
CD3 ⁺ CD56 ⁺ Т-клетки	22,1 (15,8-32,4)	21,4 (17,6-26,5)	0,599
Активированные Т-хелперы	19,3 (15,0-24,2)	15,2 (14,5-17,7)	0,005
Регуляторные Т-лимфоциты	23,4 (19,3-32,1)	20,3 (16,3-26,1)	0,014
Т-хелперы 17 типа	20,7 (17,4-27,0)	19,6 (14,6-22,9)	0,034
Цитотоксические Т-хелперы 17 типа	25,0 (16,8-34,3)	16,1 (15,4-26,4)	0,012

Максимальное количество клеток с транслокацией NF-κB выявлено в В-лимфоцитах. У детей с псориазом, как и в группе сравнения, количество клеток с транслокацией NF-κB в В-лимфоцитах было достоверно выше ($p < 0,001$), чем в NK-клетках, Т-хелперах и цитотоксических Т-лимфоцитах, а в популяции NK-клеток достоверно выше ($p < 0,001$), чем в Т-хелперах и цитотоксических Т-лимфоцитах (Рисунок 3.39). В группе здоровых детей количество клеток с транслокацией NF-κB в популяциях Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов не отличалось ($p = 0,101$). У пациентов с псориазом выявлено увеличение доли клеток с транслокацией NF-κB в Т-хелперах по сравнению с цитотоксическими Т-лимфоцитами в отличие от здоровых детей (Рисунок 3.39).

Сравнение пациентов с псориазом и здоровых детей по уровню транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов показало достоверное увеличение этого показателя у детей с псориазом в Т-хелперах ($p < 0,001$), Thact ($p = 0,005$), Treg ($p = 0,014$), Th17 ($p = 0,034$) и Tc17-лимфоцитах ($p = 0,012$; Таблица 3.14).

В группе здоровых детей выявлено, что количество клеток с транслокацией NF-κB в популяциях CD4⁺-Т-клеток, включая Treg, Th17 и Thact, в среднем составляло 15-20%. При этом, наибольший процент клеток с транслокацией NF-κB отмечен в популяции Treg (20% клеток), а наименьший – в популяции Thact (15% клеток), разница между Treg и Thact была достоверна ($p = 0,002$; Рисунок 3.40).

У детей с псориазом получено увеличение процента клеток с транслокацией NF-κB в популяциях Treg, Th17 и Thact относительно группы сравнения (Таблица 3.14; Рисунок 3.40). Также, как и у здоровых детей, наибольший процент клеток с транслокацией NF-κB в малых популяциях отмечен в Treg (23% клеток) и был достоверно выше, чем в Th17 и Thact ($p = 0,001$; Рисунок 3.40). Количество Thact с транслокацией NF-κB, также как в группе здоровых детей, достоверно ниже, чем в Т-хелперах ($p = 0,001$;

Рисунок 3.40). В отличие от здоровых детей, процент Th17 с транслокацией NF-κB был достоверно выше, чем в популяции Thact ($p=0,001$).

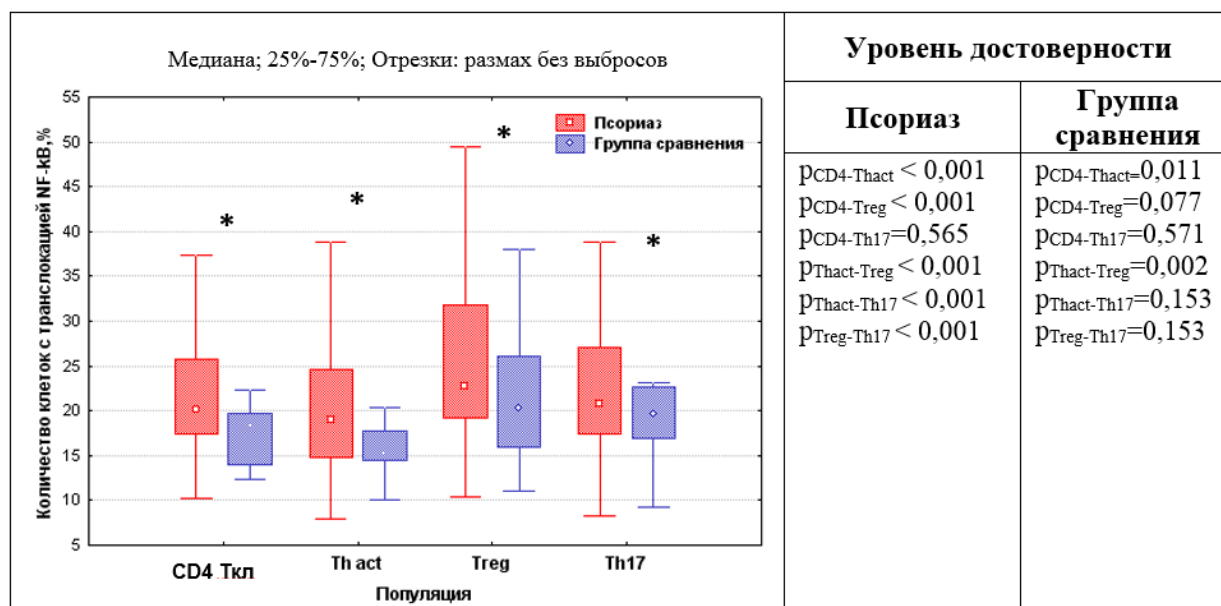


Рисунок 3.40 - Количество клеток с транслокацией NF-κB (%) в субпопуляциях CD4⁺ лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения. р – достоверность различий между популяциями, по критерию Вилкоксона для зависимых переменных, * - различия между псориазом и группой сравнения, $p<0,05$

Обращает на себя внимание то, что во всех популяциях лимфоцитов у детей с псориазом выявлен большой разброс показателей. Можно предположить, что это связано с возрастом детей, длительностью заболевания, тяжестью состояния, типом и длительностью проводимого лечения.

У детей с псориазом анализ процента клеток с транслокацией NF-κB в зависимости от возраста показал, что при увеличении возраста пациентов увеличивается содержание клеток с транслокацией NF-κB во всех популяциях за исключением В-лимфоцитов, однако полученные коэффициенты корреляции отражают слабую зависимость от возраста (Таблица 3.15). При увеличении длительности заболевания псориазом, также как при увеличении возраста детей, достоверно повышается количество

клеток с транслокацией NF-κB во всех популяциях за исключением В-лимфоцитов, Thact и Treg (Таблица 3.15).

Таблица 3.15 – Коэффициенты корреляции процента клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов от возраста детей и длительности заболевания псориазом. r – коэффициент корреляции Пирсона, p – вероятность отличия регрессионных коэффициентов от 0

Популяция	Псориаз			
	Возраст		Длительность заболевания	
	r	p	r	p
В-лимфоциты	0,11	0,131	-0,00	0,920
Т-лимфоциты	0,17	0,016	0,18	0,013
Т-хелперы	0,17	0,017	0,17	0,026
Цитотоксические Т-лимфоциты	0,16	0,022	0,20	0,007
Незрелые Т-лимфоциты	0,21	0,004	0,21	0,004
NK-клетки	0,23	0,001	0,27	< 0,001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ Т-клетки	0,17	0,016	0,18	0,016
Активированные Т-хелперы	0,17	0,020	0,12	0,105
Регуляторные Т-лимфоциты	0,18	0,016	0,14	0,070
Т-хелперы 17 типа	0,19	0,010	0,22	0,004
Цитотоксические Т-хелперы 17 типа	0,18	0,029	0,18	0,039

Из основных популяций лимфоцитов наиболее значимая зависимость от возраста получена для уровня транслокации NF-κB в NK-клетках ($r=0,23$; $p=0,001$), а из малых популяций – для Th17 ($r=0,19$; $p=0,010$) (Рисунок 3.41 А, Б). Исходя из уравнений регрессии, представленных на графиках, следует, что за 16 лет у детей с псориазом уровень транслокации в NK-клетках должен возрасти на 15%, а в Th17 – лишь на 7%. Полученный результат существенно меньше, чем изменчивость показателей в одной возрастной группе.

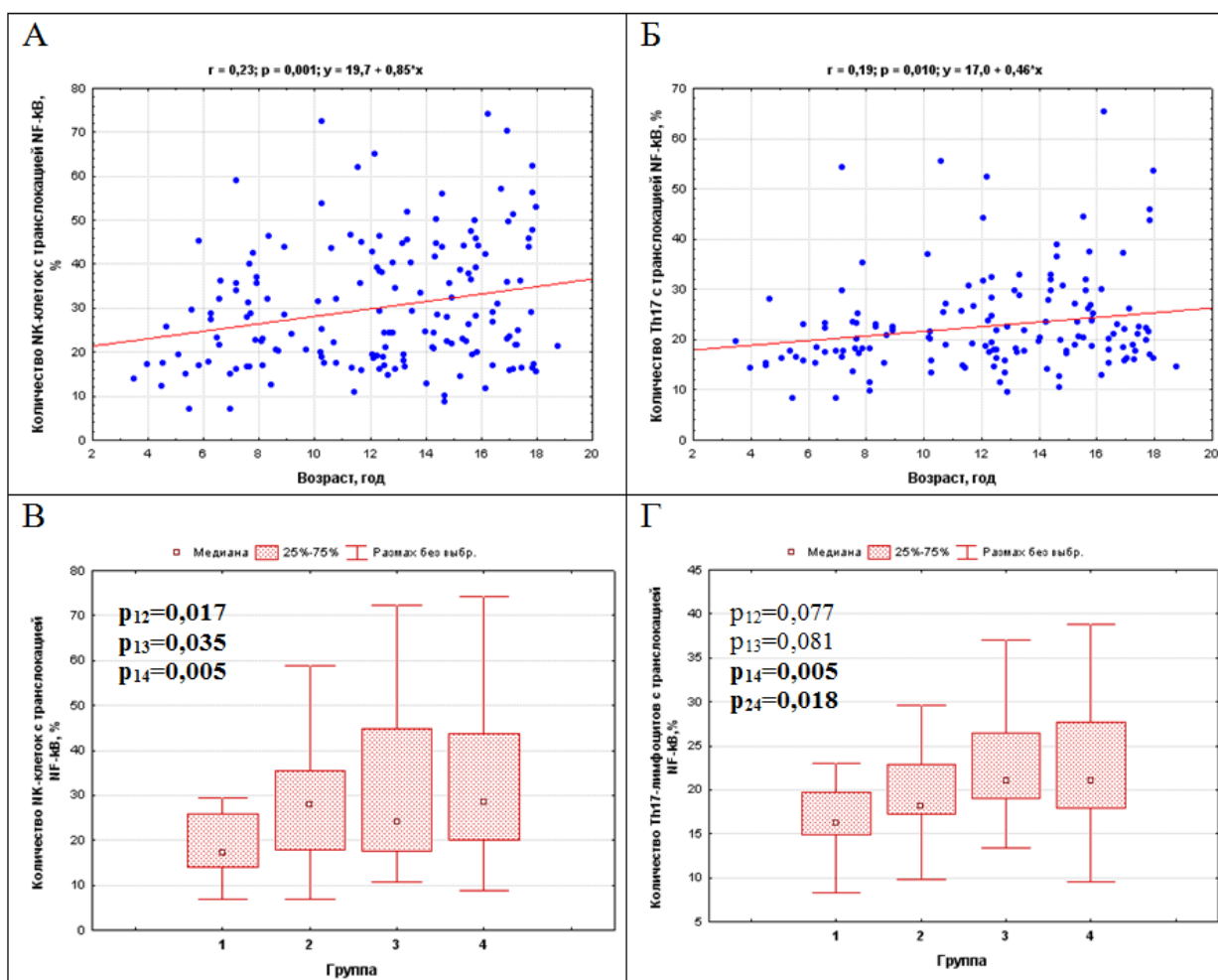


Рисунок 3.41 – Возрастная динамика относительного количества клеток с транслокацией NF-κB в НК-клетках (А, В) и Th17-лимфоцитах (Б, Г) у детей с псориазом. Обозначение групп: 1 - от 2 до 6 лет, 2 - от 6 до 9 лет, 3 - от 9 до 12 лет, 4 - старше 12 лет

У детей с псориазом получено достоверно более низкое содержание НК-клеток с транслокацией NF-κB в возрастной группе 1 (2-5 лет) относительно групп 2, 3 и 4 (Рисунок 3.41 В). При этом, по содержанию НК-клеток с транслокацией NF-κB группы 2, 3 и 4 не отличались: во всех группах наблюдался большой разброс показателя. Содержание Th17-лимфоцитов с транслокацией NF-κB было достоверно выше в группе 4 (старше 12 лет) относительно возрастных групп 1 и 2 (Рисунок 3.41 Г).

Оценка содержания клеток с транслокацией NF-κB от тяжести поражения кожного покрова псориазом по индексу PASI не показала прямой

достоверной зависимости, отмечена тенденция к увеличению содержания Tc17 с увеличением PASI ($r=0,15$; $p=0,070$).

Получена достоверная разница по содержанию В-лимфоцитов с транслокацией NF-κB между группами детей на терапии метотрексатом и анти-TNF терапией: 59,6 (42,9-82,8) % против 45,0 (37,9-55,1) %, $p=0,015$ (Рисунок 3.42А). Анализ содержания клеток с транслокацией NF-κB в других основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом не выявил достоверных отличий у детей, получавших разные типы терапии (Рисунок 3.42).

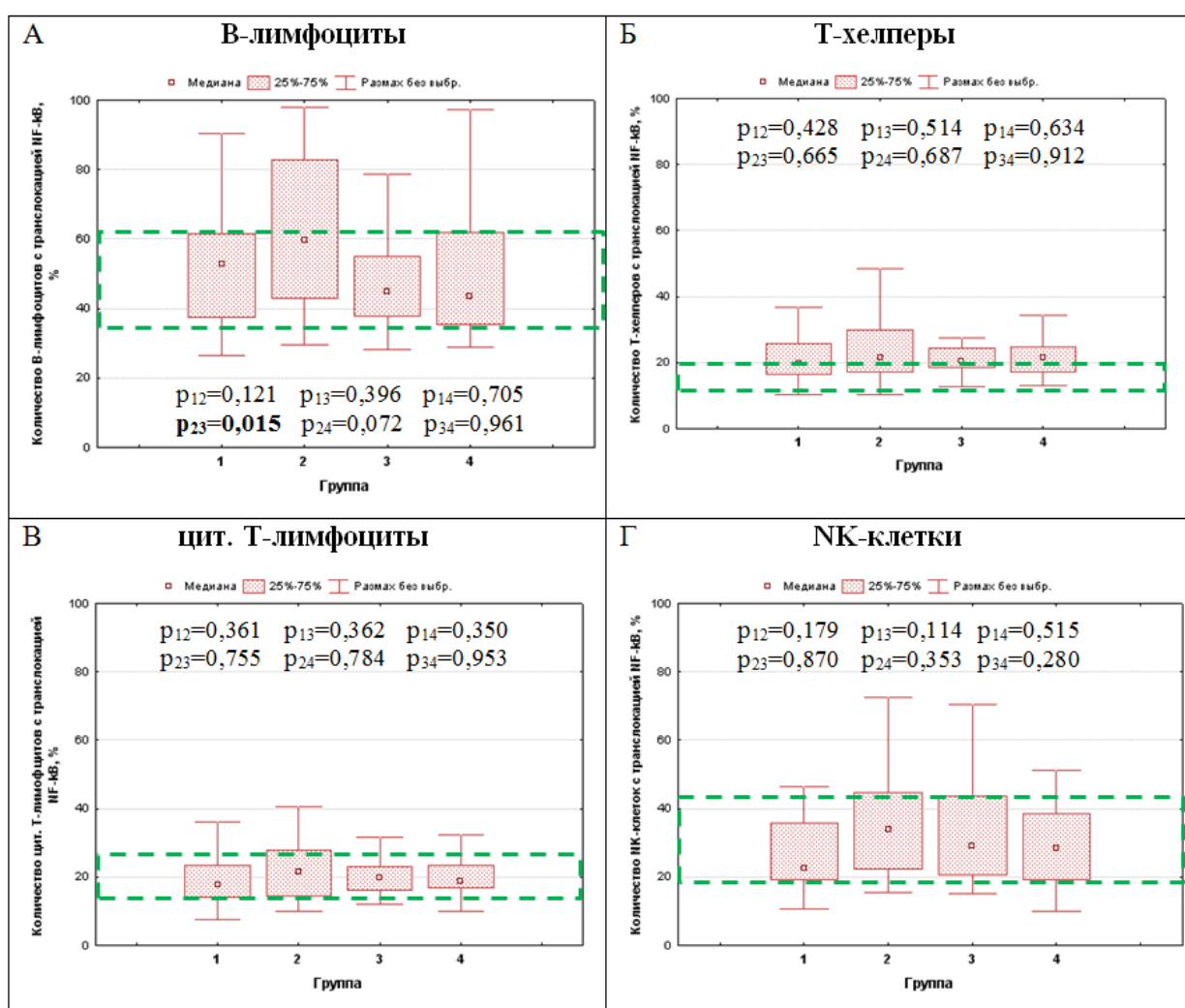


Рисунок 3.42 – Содержание клеток с транслокацией NF-κB в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом на разных типах терапии. Группа 1- терапия наружными кортикостероидами, группа 2 – метотрексат, группа 3 - блокаторы TNFα и группа 4 - анти-IL-12/23

Для оценки влияния ГИБП на активность фактора транскрипции NF-κB обследовали 42 ребенка с псориазом до и через сутки после введения препаратов: адалимумаба, этанерцепта, устекинумаба. Через сутки после введения адалимумаба получено достоверное снижение количества клеток с транслокацией NF-κB в популяциях В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и Th17 (Таблица 5.3).

Таблица 3.15 – Динамика содержания клеток с транслокацией NF-κB у детей с псориазом через сутки после введения ГИБП. р – достоверность различий между количеством клеток с транслокацией NF-κB до и через сутки после введения ГИБП, критерий Манна-Уитни

Популяция	Количество клеток с транслокацией NF-κB								
	Адалимумаб (n=24)			Этанерцепт (n=8)			Устекинумаб (n=10)		
	до	после	р	до	после	р	до	после	р
В-лимфоциты	46,0 [39;65]	38,2 [33;45]	0,002	36,7 [33;42]	28,0 [27;31]	0,004	51,7 [35;71]	44,8 [32;51]	0,217
Т-лимфоциты	20,2 [17;25]	19,5 [15;21]	0,120	17,0 [16;20]	17,6 [15;19]	0,721	24,9 [18;36]	18,2 [16;25]	0,105
Т-хелперы	20,2 [18;24]	18,3 [16;21]	0,025	19,0 [18;21]	17,5 [16;19]	0,049	24,8 [19;32]	19,6 [16;25]	0,191
Цитотоксическ ие Т- лимфоциты	19,2 [16;24]	17,2 [15;18]	0,021	16,30 [16;18]	16,6 [15;18]	0,990	23,9 [19;35]	16,6 [14;25]	0,052
Незрелые Т- лимфоциты	22,5 [16;31]	21,2 [20;38]	0,814	21,2 [19;24]	19,2 [17;23]	0,161	36,2 [30;48]	21,4 [14;30]	0,009
НК-клетки	27,7 [18;32]	26,2 [19;29]	0,574	30,6 [29;36]	30,7 [27;33]	0,721	37,9 [35;42]	25,3 [17;29]	0,018
CD3 ⁺ CD56 ⁺ Т- клетки	21,6 [15;27]	19,7 [15;24]	0,418	20,9 [18;23]	18,4 [17;21]	0,131	30,0 [26;44]	24,7 [13;31]	0,052
Активированн ые Т-хелперы	19,1 [16;21]	17,1 [14;20]	0,165	19,7 [16;24]	14,3 [14;16]	0,007	24,4 [17;34]	16,4 [13;24]	0,042
Регуляторные Т-лимфоциты	19,1 [16;21]	20,5 [19;23]	0,051	23,2 [19;28]	19,4 [19;21]	0,105	34,9 [22;48]	21,5 [15;29]	0,018
Т-хелперы 17 типа	22,4 [18;23]	18,5 [16;21]	0,032	18,6 [18;20]	17,2 [15;18]	0,021	27,3 [27;39]	19,1 [14;25]	0,011

В ответ на введение этанерцепта через сутки выявлено достоверное снижение количества клеток с транслокацией NF-κB в популяциях В-лимфоцитов, Т-хелперов, Thact и Th17. Показано достоверное снижение процента клеток с транслокацией NF-κB после введения устекинумаба в

популяциях NK-клеток, незрелых Т-лимфоцитов, Thact, Treg и Th17 (Таблица 3.15). В ответ на введение анти-TNF терапии (адалимумаб, этанерцепт) через сутки достоверно снижается процент В-лимфоцитов с транслокацией NF-κB на 20,4% и 31% соответственно, тогда как после введения устекинумаба количество активированных В-клеток снижается не достоверно. Аналогичное снижение получено в популяции Т-хелперах: при введении адалимумаба (на 10,4%) и этанерцепта (на 8,6%). Значимое изменение процента цитотоксических Т-лимфоцитов с транслокацией NF-κB наблюдалось только на введение адалимумаба (Таблица 3.15).

Содержание Thact с транслокацией NF-κB достоверно снижалось через сутки после введения этанерцепта на 38% и устекинумаба – на 49%. На введение всех биологических препаратов выявлено значимое снижение доли активированных Th17, при этом наибольшее снижение отмечено на введение устекинумаба – на 43%, а на введение адалимумаба и этанерцепта – на 21% и 8% соответственно (Таблица 3.15). Помимо этого было отмечено, что только введение устекинумаба снижало содержание активированных клеток с транслокацией NF-κB в популяциях NK-клеток на 50% и незрелых Т-лимфоцитах на 69% (Таблица 3.15).

На следующем этапе работы мы оценили изменение уровня транслокации NF-κB в лимфоцитах с активностью митохондриальных дегидрогеназ у детей с псориазом и в группе сравнения. Одновременное определение количества клеток с транслокацией NF-κB и активности СДГ в основных популяциях выявило обратную зависимость: при увеличении процента активированных клеток наблюдается снижение активности СДГ в основных популяциях лимфоцитов (Рисунок 3.43). Наименьшая активность СДГ у детей с псориазом выявлена в В-лимфоцитах, при этом количество клеток с транслокацией в данной популяции было наибольшим (Рисунок 3.43).

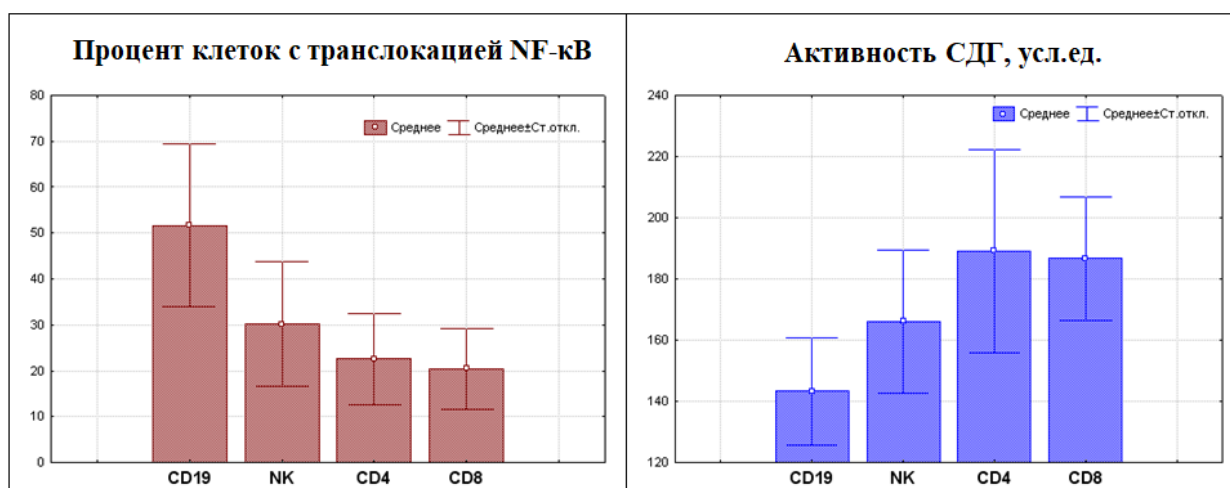


Рисунок 3.43 – Процент клеток с транслокацией NF-κB и активность СДГ в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом

Анализ активности транскрипционного фактора NF-κB и СДГ у здоровых детей также показал обратную зависимость: чем выше уровень транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов, тем ниже активность СДГ ($r=-0,49$; $p<0,001$; Рисунок 3.44). У детей с псориазом также установлена обратная корреляционная зависимость уровня транслокации NF-κB и активности СДГ в популяциях лимфоцитов ($r=-0,44$; $p<0,001$).

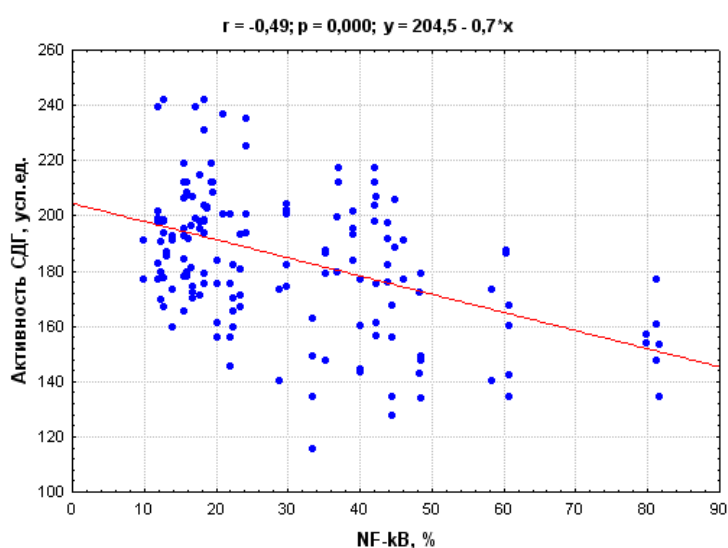


Рисунок 3.44 – Активность СДГ в зависимости от уровня транслокации NF-κB в лимфоцитах у здоровых детей

У детей с псориазом корреляционный анализ активности СДГ и транскрипционного фактора NF-κB в отдельных популяциях показал

достоверную обратную зависимость для популяции НК-клеток ($r=-0,51$; $p<0,001$), тогда как в популяции Т-лимфоцитов выявленная зависимость была менее выраженной ($r=-0,31$; $p=0,030$; Рисунок 3.45).

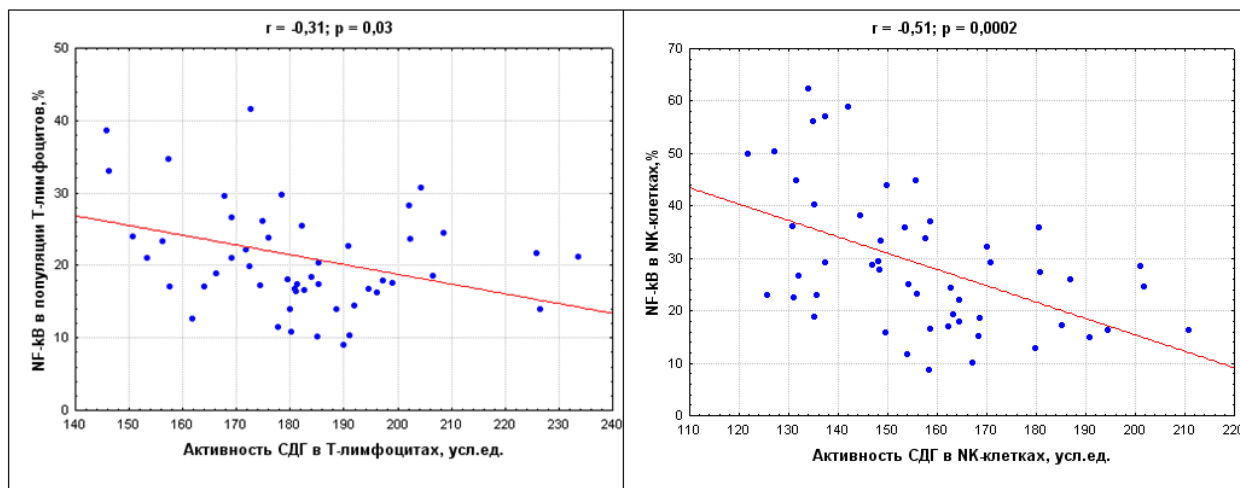


Рисунок 3.45 - Активность СДГ в зависимости от уровня транслокации NF-κB в Т-лимфоцитах и НК-клетках у детей с псориазом

Получена обратная зависимость уровня транслокации NF-κB и активности СДГ независимо от типа терапии у детей с псориазом, причем наибольший коэффициент корреляции выявлен в группе детей на терапии блокаторами TNFα ($r=-0,57$; $p<0,001$; Рисунок 3.46).

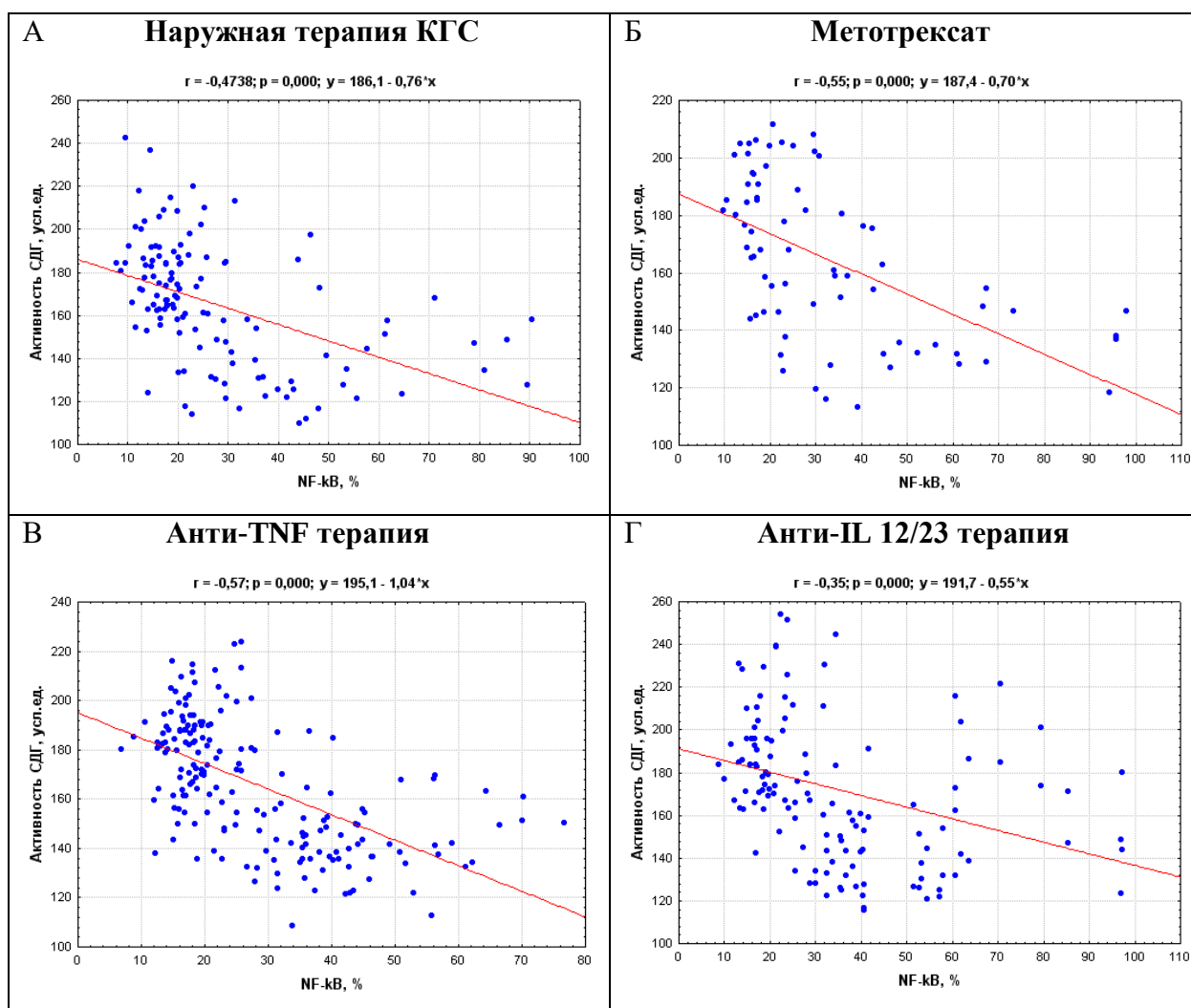


Рисунок 3.46 – Активность СДГ в зависимости от уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом на разных типах терапии

При анализе количества клеток с транслокацией NF-κB и активности другого митохондриального фермента – ГФДГ – у здоровых детей получена менее выраженная обратная зависимость ($r=-0,31; p=0,001$), чем для активности СДГ ($r=-0,49; p<0,001$), причем наблюдается большой разброс показателей активности ГФДГ (Рисунок 3.47).

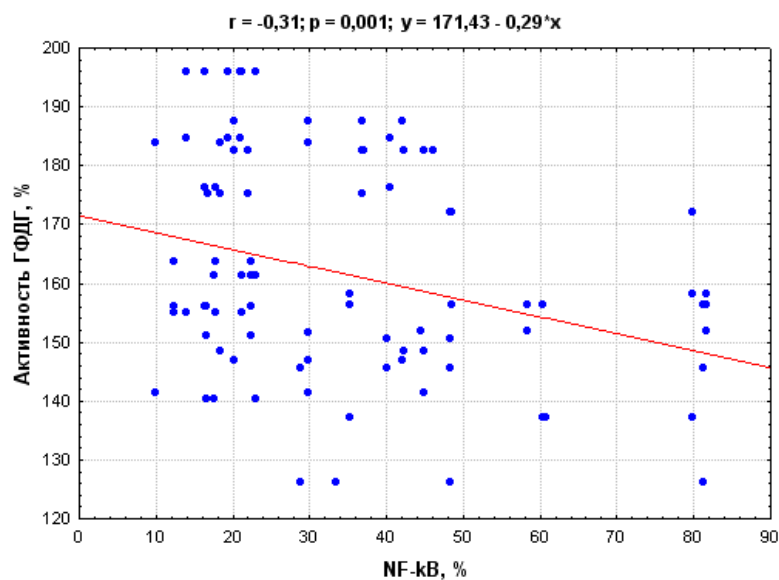


Рисунок 3.47 – Активность ГФДГ в зависимости от уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов у здоровых детей

У детей с псориазом на разных типах терапии наибольшая обратная зависимость получена для активности ГФДГ и уровня транслокации NF-κB у детей, получавших терапию наружными ГКС (Рисунок 3.48А). Также выявлена достоверная обратная корреляция между показателями в группах детей на биологической терапии и метотрексатом: чем выше активность ГФДГ, тем ниже содержание клеток с транслокацией NF-κB (Рисунок 3.48).

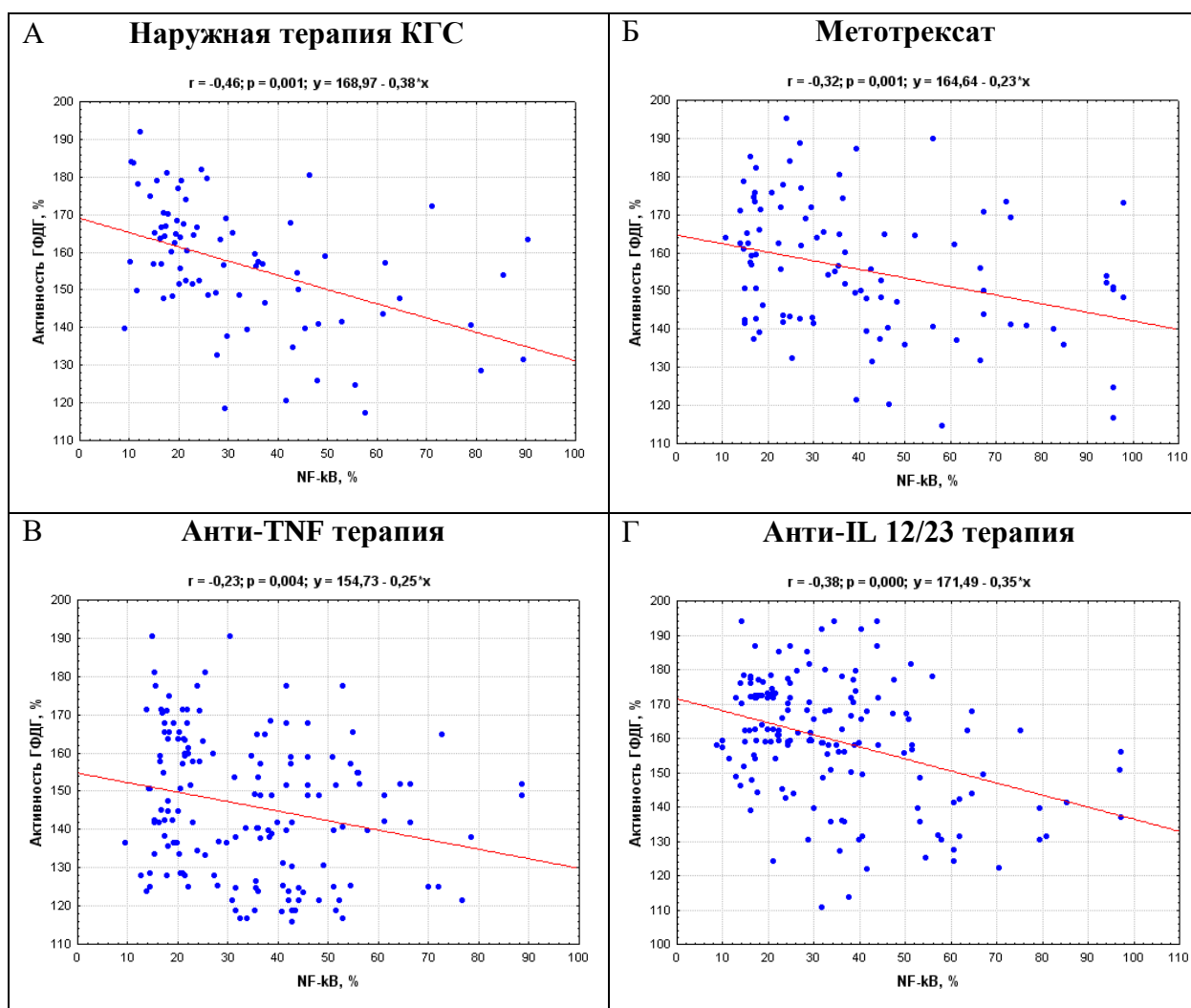


Рисунок 3.48 – Активность ГФДГ в зависимости от уровня транслокации NF-κВ в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом на разных типах терапии

Таким образом, у детей с псориазом выявлено достоверное увеличение процента активированных клеток с транслокацией NF-κВ в Т-хелперах, активированных Т-хелперах, регуляторных Т-лимфоцитах, Th17 и Tc17 относительно показателей здоровых детей. Содержание клеток с транслокацией NF-κВ у детей с псориазом незначительно увеличивается с возрастом детей и длительностью заболевания. В ответ на введение ГИБП количество активированных клеток с транслокацией NF-κВ в популяциях лимфоцитов снижается и зависит от мишени препарата. Выявлены обратные корреляционные зависимости уровня транслокации NF-κВ и активности митохондриальных дегидрогеназ (СДГ, ГФДГ) в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения. У детей с псориазом на всех типах

терапии также получена обратная зависимость уровня транслокации NF-κB и активности СДГ, причем наибольшая выявлена в группе детей на терапии блокаторами TNFα.

3.4. Уровень циркулирующих цитокинов у детей с псориазом

Иммунные клетки и продуцируемые ими провоспалительные цитокины играют ключевую роль в инициации и развитии хронического воспаления при псориазе. Основными клетками-эффекторами в патогенезе псориаза являются Th1- и Th17-лимфоциты, синтезирующие следующие провоспалительные цитокины – TNFα, IFNγ, IL-6, IL-17, IL-21 и IL-23. Функция этих цитокинов заключается в активации и привлечении иммунных клеток в пораженные участки кожи. Повреждение клеток кожи при псориазе приводит к высвобождению медиаторов воспаления и последующей активации кератиноцитов и выработке провоспалительных цитокинов, которые усиливают воспалительную реакцию в дерме. Отличительной чертой псориаза является устойчивое воспаление, которое приводит к неконтролируемой пролиферации кератиноцитов и их дисфункциональной дифференцировке.

У взрослых пациентов с псориазом показано повышение экспрессии и уровня провоспалительных цитокинов с увеличением тяжести заболевания, в частности, IL-1β, IL-6, IL-12p70, IL-15, IL-17, IL-22, IL-23, TNFα. Недавнее исследование, проведенное у взрослых пациентов с псориазом показало, что ответ на анти-TNF терапию сопровождается подавлением экспрессии генов IL-17, TNFα: контроль уровня данных цитокинов может являться предиктором клинического ответа на анти-TNF терапию [252]. Диагностическая значимость циркулирующих цитокинов в прогнозе эффективности биологической терапии псориаза у детей на сегодняшний день находится в стадии изучения.

Оценку цитокинового профиля у 88 детей с вульгарным псориазом выполняли мультиплексным методом с определением уровня 25 цитокинов и хемокинов: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31, IL-33, GM-CSF, IFN γ , CCL20/MIP-3 α , TNF α и TNF β .

Анализ показал, что у детей с псориазом уровень провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-6, IL-17, IL-21 и др.) имел большой разброс показателей и находился в пределах от 0,09 до 8300 пг/мл (Таблица 3.16). При этом уровень основных противовоспалительных цитокинов - IL-4, IL-10 и IL-13 составил от 0,79 до 1050 пг/мл (Таблица 3.16). Описательная статистика полученных результатов у детей с псориазом представлена в Таблице 3.16.

Таблица 3.16 – Уровень циркулирующих цитокинов и хемокинов в сыворотке крови у детей с псориазом (пг/мл)

Показатель	Уровень цитокинов				
	Медиана	Минимум	Максимум	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль
CCL20/MIP3 α	33,08	7,97	527,70	24,22	50,68
GM-CSF	255,03	79,17	560	190,58	316,68
IFN γ	3,61	1,23	20	3,08	3,80
TNF α	16,75	6,18	82	10,92	21,90
TNF β	10,11	4,24	230	7,96	26,49
IL-1 β	0,32	0,09	2,30	0,21	0,52
IL-2	5,31	2,02	25	4,01	8,08
IL-4	95,19	57,15	520	76,06	126,60
IL-5	4,50	1,08	40	4,10	6,07
IL-6	5,37	1,05	80	4,20	8,53
IL-9	6,86	2,12	79	4,55	13,51
IL-10	3,42	0,79	16	2,90	4,22
IL-12p70	2,39	0,77	7,50	2,21	2,92
IL-13	128,1	19,20	1050	48,59	254,20
IL-15	7,12	1,52	40	4,66	8,56
IL-17A	0,45	0,09	7	0,27	0,85
IL-17E/IL-25	19,85	8,11	280	13,99	46,94
IL-17F	29,04	5,16	250	13,10	60,66
IL-21	7,41	1,68	35	6,02	10,84
IL-22	947,26	320,20	7000	641,76	1731
IL-23	960,83	335,84	8300	706,03	2046

Продолжение таблицы 3.16

IL-27	622,11	104,01	1900	491,63	781,88
IL-28A	231,10	103,40	950	182,00	413,50
IL-31	43,84	17,14	550	30,68	91,73
IL-33	20,93	7,19	210	13,63	32,96

У детей с псориазом максимальная концентрация среди всех исследованных цитокинов выявлена для IL-23 и составила 8300 пг/мл (Рисунок 3.49; Таблица 3.16). У 6 % пациентов получены крайне высокие значения IL-23 (более 5000 пг/мл).

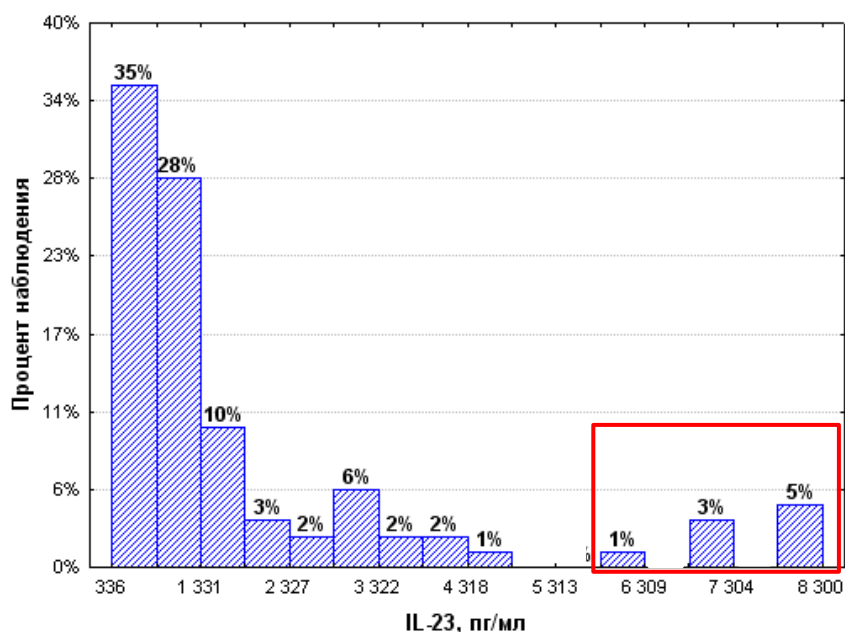
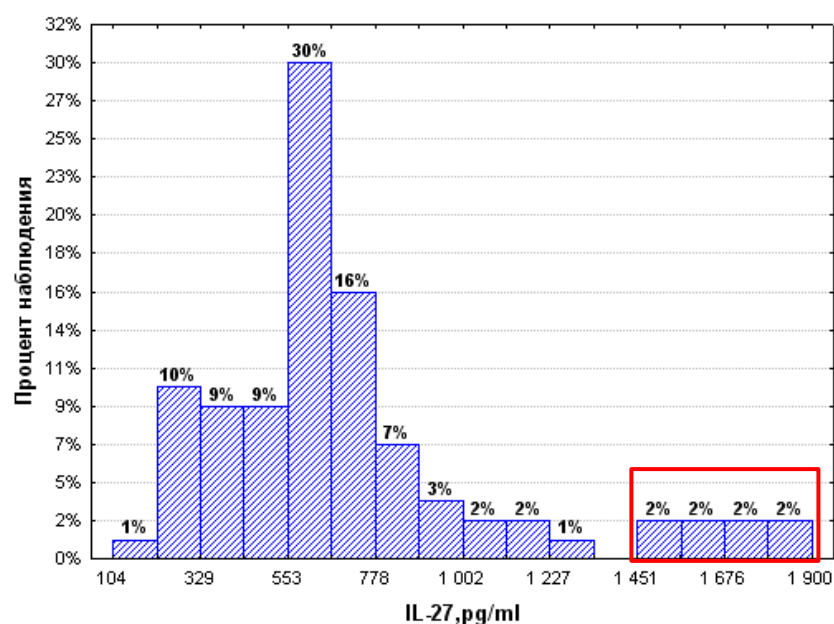


Рисунок 3.49 – Распределение пациентов по уровню IL-23 в сыворотке крови у детей с псориазом

Для детей с псориазом выявлен высокий уровень цитокинов семейства IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27), за исключением IL-12p70, который составил Ме 2,4 (2,2-2,9) пг/мл (Таблица 3.16). При анализе уровня IL-27 в сыворотке крови у 8% детей с псориазом выявлен высокий уровень цитокина – более 1300 пг/мл, достигавший 1900 пг/мл (Рисунок 3.50).



Оценка уровня циркулирующих цитокинов семейства IL-17 показала, что наибольшие значения получены для IL-17E – 280 пг/мл (Ме 20 (14-47) пг/мл), тогда как уровень IL-17F изменялся от 5,2 до 250 пг/мл (Ме 29 (13-61)) пг/мл (Рисунок 3.52). Для IL-17A получены значения от 0,1 до 7,0 пг/мл (Ме 0,45 (0,27-0,85)).

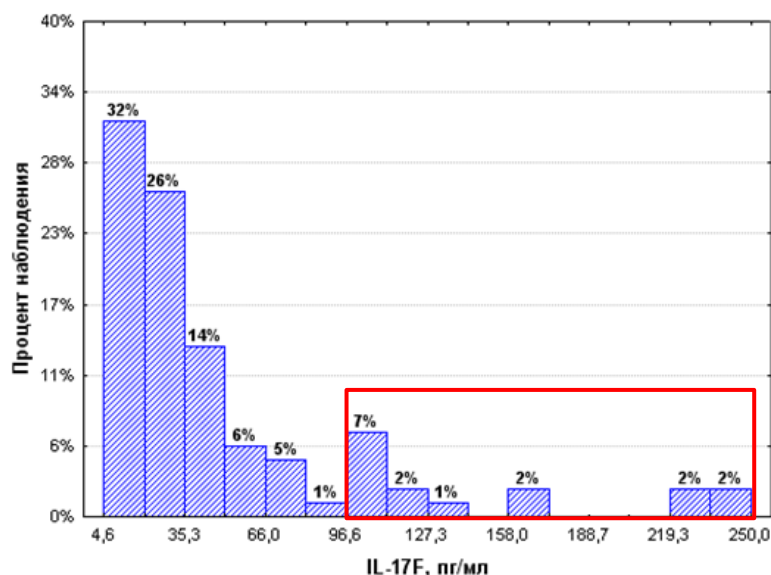


Рисунок 3.52 – Распределение пациентов по уровню IL-17F в сыворотке крови у детей с псориазом

При анализе уровня цитокинов семейства фактора некроза опухоли выявлено, что значения TNF_{β} у детей с псориазом достигали 230 пг/мл (Ме 10 (8-27) пг/мл). Уровень TNF_{α} изменялся от 6 до 82 пг/мл (Ме 17 (11-22) пг/мл) и у 82% пациентов был повышен (более 10 пг/мл; Рисунок 3.53).

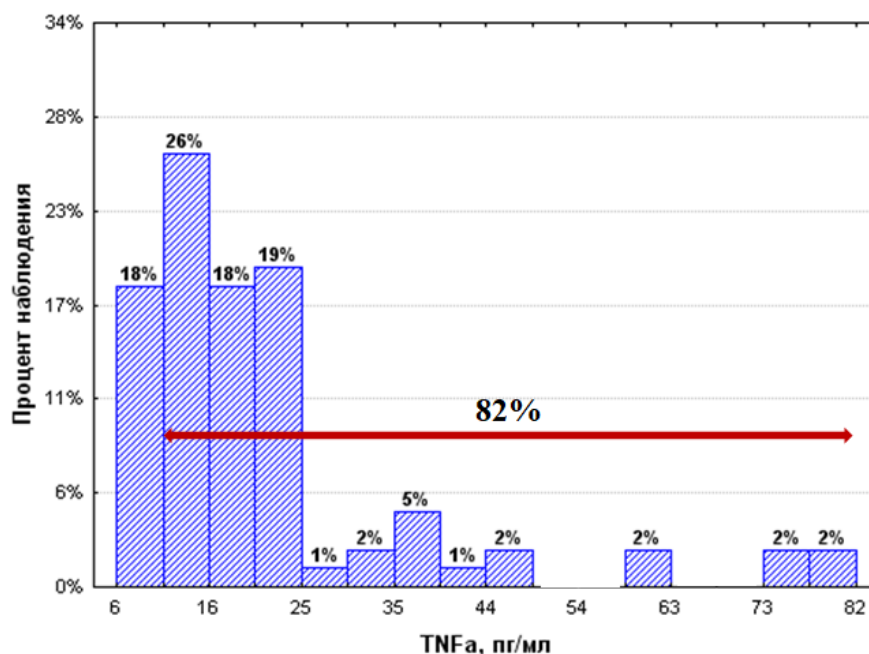


Рисунок 3.53 – Распределение пациентов по уровню TNFα в сыворотке крови у детей с псориазом

У детей с псориазом для анализа взаимосвязей в цитокиновой сети были определены ранговые коэффициенты корреляции Спирмена для исследуемых цитокинов. Анализ показал высокую ($>0,7$; $n=88$) и очень высокую ($>0,9$) силу связи для некоторых цитокинов (Рисунок 3.54). Наиболее сильные корреляционные зависимости выявлены между цитокинами семейства IL-17 (IL-17E и IL-17F) и цитокинами семейства IL-12 (IL-23 и IL-27), а также с цитокинами IL-31 и IL-33 ($r=0,86-0,93$; Рисунок 3.54). Также получены значимые корреляции между GM-CSF и цитокинами IL-2, IL-5, IL-9, IL-10, IL-15 и TNFα ($r=0,71-0,78$; Рисунок 3.54).

Показатель	CCL20	GM-CSF	IFN γ	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15	IL-17A	IL-17E/IL-25	IL-17F	IL-1b	IL-2	IL-21	IL-22	IL-23	IL-27	IL-28A	IL-31	IL-33	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	TNF α	TNF β
CCL20/MIP3a	1,00	0,43	0,41	0,41	0,23	0,11	0,47	0,64	0,22	0,29	0,32	0,47	0,31	0,31	0,28	0,31	0,48	0,32	0,29	0,11	0,36	0,37	0,49	0,52	0,38
GM-CSF	0,43	1,00	0,59	0,72	0,52	0,36	0,71	0,68	0,44	0,56	0,45	0,77	0,66	0,59	0,58	0,51	0,63	0,55	0,52	0,41	0,78	0,67	0,71	0,71	0,52
IFN γ	0,41	0,59	1,00	0,55	0,54	0,29	0,58	0,63	0,47	0,55	0,29	0,59	0,55	0,57	0,59	0,49	0,63	0,59	0,56	0,36	0,64	0,49	0,56	0,50	0,60
IL-10	0,41	0,72	0,55	1,00	0,67	0,44	0,62	0,68	0,32	0,50	0,34	0,60	0,66	0,48	0,48	0,53	0,52	0,48	0,42	0,25	0,68	0,57	0,61	0,67	0,39
IL-12p70	0,23	0,52	0,54	0,67	1,00	0,66	0,67	0,49	0,33	0,51	0,24	0,45	0,67	0,46	0,44	0,49	0,31	0,43	0,41	0,07	0,55	0,40	0,36	0,62	0,33
IL-13	0,11	0,36	0,29	0,44	0,66	1,00	0,53	0,33	0,26	0,58	0,30	0,32	0,77	0,44	0,39	0,30	0,32	0,37	0,32	0,20	0,47	0,40	0,34	0,51	0,34
IL-15	0,47	0,71	0,58	0,62	0,67	0,53	1,00	0,69	0,49	0,61	0,55	0,76	0,73	0,64	0,60	0,61	0,50	0,59	0,57	0,30	0,65	0,60	0,62	0,73	0,51
IL-17A	0,64	0,68	0,63	0,68	0,49	0,33	0,69	1,00	0,41	0,56	0,45	0,70	0,57	0,59	0,52	0,46	0,63	0,56	0,50	0,25	0,59	0,53	0,69	0,63	0,55
IL-17E/IL-25	0,22	0,44	0,47	0,32	0,33	0,26	0,49	0,41	1,00	0,83	0,24	0,43	0,56	0,87	0,89	0,74	0,37	0,89	0,90	0,52	0,45	0,58	0,44	0,36	0,62
IL-17F	0,29	0,56	0,55	0,50	0,51	0,58	0,61	0,56	0,83	1,00	0,39	0,55	0,79	0,93	0,90	0,75	0,47	0,89	0,86	0,41	0,55	0,62	0,51	0,52	0,58
IL-1b	0,32	0,45	0,29	0,34	0,24	0,30	0,55	0,45	0,24	0,39	1,00	0,58	0,36	0,37	0,26	0,27	0,36	0,26	0,23	0,37	0,41	0,44	0,43	0,44	0,33
IL-2	0,47	0,77	0,59	0,60	0,45	0,32	0,76	0,70	0,43	0,55	0,58	1,00	0,64	0,62	0,59	0,55	0,53	0,58	0,55	0,38	0,60	0,58	0,66	0,71	0,49
IL-21	0,31	0,66	0,55	0,66	0,67	0,77	0,73	0,57	0,56	0,79	0,36	0,64	1,00	0,71	0,68	0,56	0,46	0,68	0,61	0,36	0,66	0,58	0,52	0,67	0,47
IL-22	0,31	0,59	0,57	0,48	0,46	0,44	0,64	0,59	0,87	0,93	0,37	0,62	0,71	1,00	0,95	0,80	0,51	0,95	0,94	0,48	0,55	0,67	0,59	0,51	0,64
IL-23	0,28	0,58	0,59	0,48	0,44	0,39	0,60	0,52	0,89	0,90	0,26	0,59	0,68	0,95	1,00	0,81	0,50	0,96	0,96	0,46	0,57	0,69	0,58	0,50	0,65
IL-27	0,31	0,51	0,49	0,53	0,49	0,30	0,61	0,46	0,74	0,75	0,27	0,55	0,56	0,80	0,81	1,00	0,30	0,79	0,79	0,28	0,44	0,50	0,40	0,53	0,41
IL-28A	0,48	0,63	0,63	0,52	0,31	0,32	0,50	0,63	0,37	0,47	0,36	0,53	0,46	0,51	0,50	0,30	1,00	0,53	0,49	0,43	0,67	0,70	0,82	0,43	0,83
IL-31	0,32	0,55	0,59	0,48	0,43	0,37	0,59	0,56	0,89	0,89	0,26	0,58	0,68	0,95	0,96	0,79	0,53	1,00	0,97	0,44	0,57	0,66	0,60	0,46	0,66
IL-33	0,29	0,52	0,56	0,42	0,41	0,32	0,57	0,50	0,90	0,86	0,23	0,55	0,61	0,94	0,96	0,79	0,49	0,97	1,00	0,46	0,53	0,67	0,57	0,44	0,65
IL-4	0,11	0,41	0,36	0,25	0,07	0,20	0,30	0,25	0,52	0,41	0,37	0,38	0,36	0,48	0,46	0,28	0,43	0,44	0,46	1,00	0,46	0,56	0,44	0,28	0,49
IL-5	0,36	0,78	0,64	0,68	0,55	0,47	0,65	0,59	0,45	0,55	0,41	0,60	0,66	0,55	0,57	0,44	0,67	0,57	0,53	0,46	1,00	0,75	0,68	0,62	0,59
IL-6	0,37	0,67	0,49	0,57	0,40	0,40	0,60	0,53	0,58	0,62	0,44	0,58	0,58	0,67	0,69	0,50	0,70	0,66	0,67	0,56	0,75	1,00	0,79	0,59	0,76
IL-9	0,49	0,71	0,56	0,61	0,36	0,34	0,62	0,69	0,44	0,51	0,43	0,66	0,52	0,59	0,58	0,40	0,82	0,60	0,57	0,44	0,68	0,79	1,00	0,60	0,75
TNF α	0,52	0,71	0,50	0,67	0,62	0,51	0,73	0,63	0,36	0,52	0,44	0,71	0,67	0,51	0,50	0,53	0,43	0,46	0,44	0,28	0,62	0,59	0,60	1,00	0,41
TNF β	0,38	0,52	0,60	0,39	0,33	0,34	0,51	0,55	0,62	0,58	0,33	0,49	0,47	0,64	0,65	0,41	0,83	0,66	0,65	0,49	0,59	0,76	0,75	0,41	1,00

Рисунок 3.54 – Тепловые карты коэффициентов корреляции Спирмена между цитокинами у детей с псориазом. Значимые коэффициенты корреляции выделены жирным цветом, красный цвет соответствует 1, синий цвет – коэффициенту корреляции 0

Оценка уровня циркулирующих цитокинов у детей с легкой (PASI<10), средне-тяжелой (PASI 10-20) и тяжелой (PASI>20) степенью тяжести псориаза выявила наиболее значимые отличия в группе детей с PASI>20. При увеличении PASI получено достоверное увеличение провоспалительных цитокинов – IL-17A ($p=0,001$), TNF α ($p=0,019$), IL-2 ($p=0,025$), IL-6 ($p=0,029$) и IL-9 ($p=0,019$) в группе детей с PASI>20 относительно пациентов с легкой степенью тяжести псориаза (PASI<10; Рисунок 3.55).

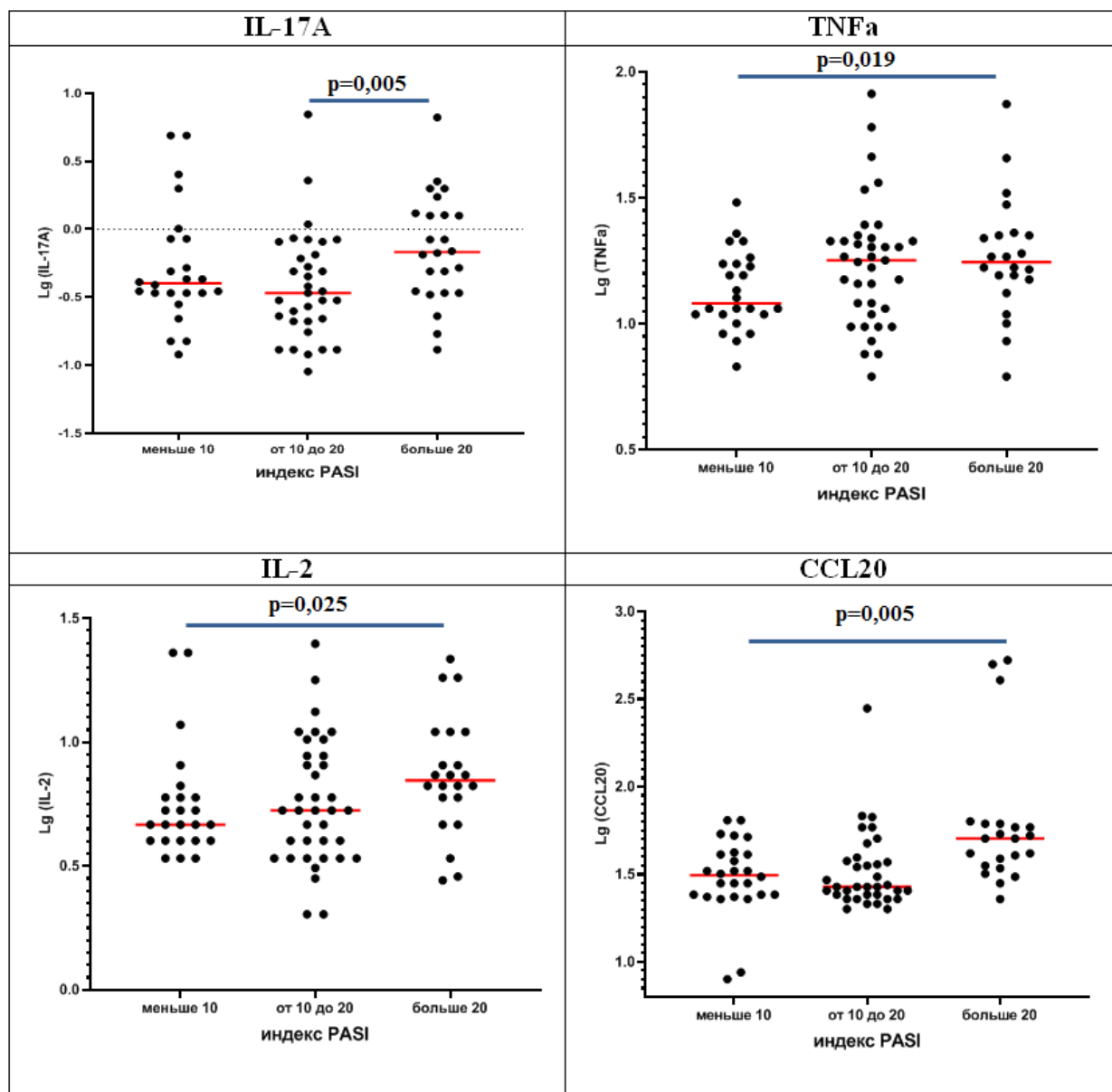


Рисунок 3.55 – Распределение пациентов с легкой (PASI<10), средне-тяжелой (PASI 10-20) и тяжелой (PASI>20) степенью тяжести псориаза по уровню циркулирующих цитокинов

На следующем этапе работы оценивали уровень циркулирующих цитокинов у детей с псориазом на разных типах терапии. Анализ показал, что наибольшая концентрация цитокинов выявлена в группе детей, находящихся на биологической терапии блокаторами TNF α и IL-12/23 (группа 3), а наименьшая – у детей на терапии наружными ГКС (группа 1). Для пациентов с псориазом на биологической терапии (группа 3) выявлено достоверное увеличение уровня противовоспалительных цитокинов – IL-12p70, GM-CSF, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1 β , IL-2, IL-21, IL-22, IL-23, IL-33, IL-6 и TNF α относительно группы детей на терапии наружными ГКС (Рисунок 3.56; Таблица 3.17).

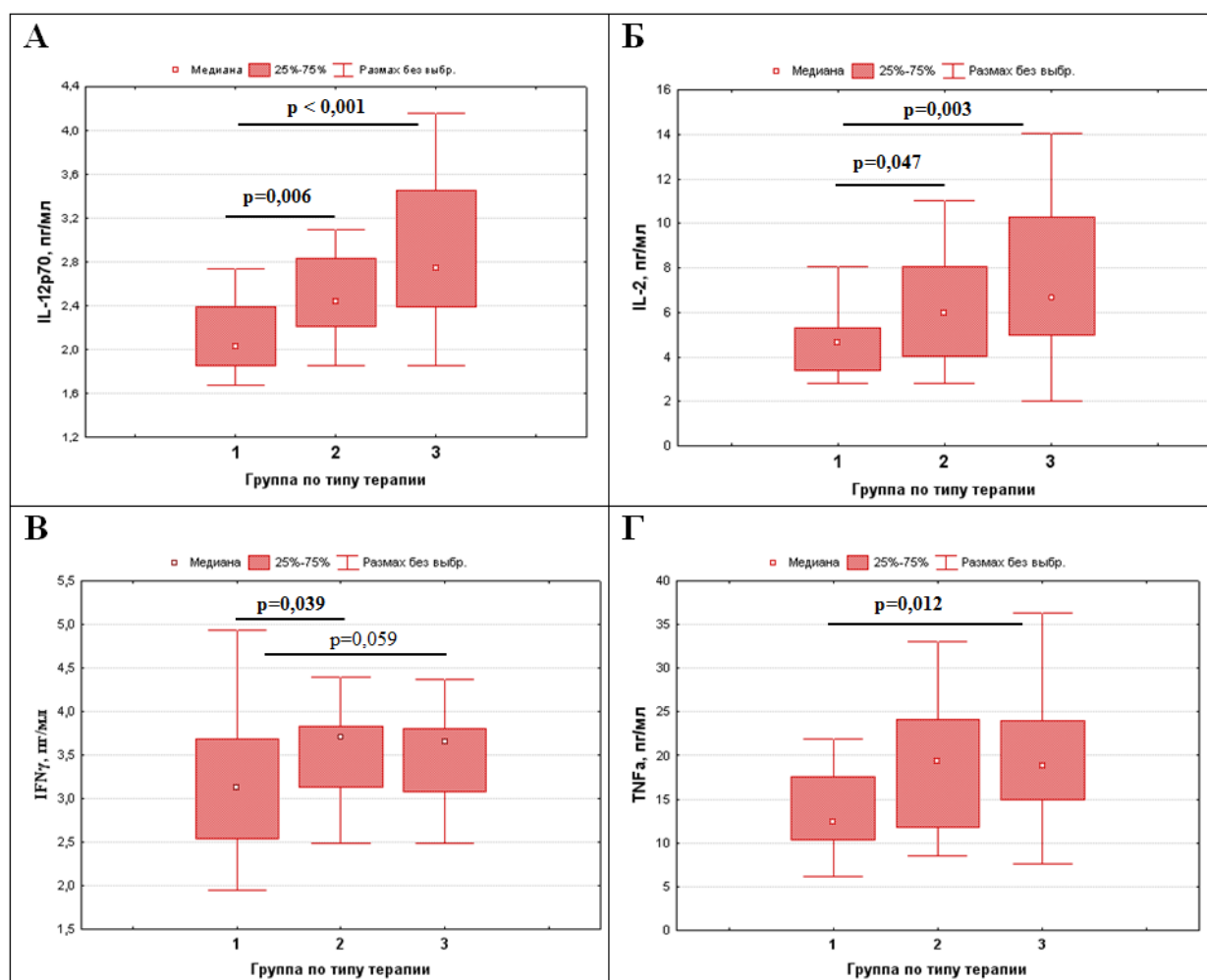


Рисунок 3.56 – Уровень IL-12p70 (А), IL-2 (Б), IFN γ (В) и TNF α (Г) у детей с псориазом на терапии наружными ГКС (группа 1), метотрексате (группа 2) и биологической терапии (группа 3)

Для детей с псориазом получавших терапию метотрексатом (группа 2) получено значимое увеличение уровня GM-CSF, IFN γ , IL-12p70, IL-15, IL-2, IL-21 и IL-5 относительно детей на наружной терапии (Рисунок 3.56; Таблица 3.17).

Таблица 3.17 – Уровень циркулирующих цитокинов и хемокинов в сыворотке крови у детей с псориазом на разных типах терапии

Показатель, пг/мл	Группа по типу терапии			Уровень достоверности (p)
	Наружная терапия ГКС (группа 1, n=22)	Метотрексат (группа 2, n=20)	Биологическая терапия (группа 3, n=44)	
CCL20/MIP3a	36,6 (26,86-53,72)	35,13 (28,77-58,6)	36,6 (26,21-46,51)	-
GM-CSF	206,94 (190,58-255,03)	255,03 (212,37-346,47)	275,89 (228,51-351,4)	p ₁₋₂ =0,012 p ₁₋₃ =0,002
IFN γ	3,12 (2,54-3,69)	3,71 (3,13-3,83)	3,65 (3,08-3,8)	p ₁₋₂ =0,039 p ₁₋₃ =0,059
TNF α	12,39 (10,33-17,62)	19,34 (11,8-24,17)	18,77 (15,01-24,02)	p ₁₋₃ =0,012
TNF β	8,01 (5,98-26,49)	12,13 (8,05-22,04)	12,15 (7,99-20,93)	-
IL-1 β	0,11 (0,00-0,32)	0,18 (0,00-0,28)	0,25 (0,11-0,55)	p ₁₋₃ =0,044
IL-2	4,65 (3,40-5,31)	5,98 (4,01-8,08)	6,67 (4,98-10,27)	p ₁₋₂ =0,047 p ₁₋₃ =0,003
IL-4	88 (76,06-124,15)	95,19 (76,06-109,64)	95,19 (83,21-125,37)	-
IL-5	4,1 (3,7-4,7)	4,9 (4,1-6,07)	4,7 (4,3-5,88)	p ₁₋₂ =0,034 p ₁₋₃ =0,002
IL-6	4,59 (3,61-6,95)	5,77 (4,4-7,94)	6,16 (4,69-9,33)	p ₁₋₃ =0,019
IL-9	6,05 (3,68-11)	8,09 (6,05-14,35)	6,86 (5,25-11)	-
IL-10	3,03 (2,64-3,82)	3,82 (2,9-5,47)	3,55 (3,16-4,22)	p ₁₋₃ =0,052
IL-12p70	2,03 (1,85-2,39)	2,44 (2,21-2,83)	2,74 (2,39-3,45)	p ₁₋₂ =0,006 p ₁₋₃ < 0,001
IL-13	61,71 (36,84-128,1)	74,68 (44,19-169,27)	198,84 (94,63-390,33)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ =0,008
IL-15	4,56 (3,85-6,71)	7,95 (5,17-9,7)	7,95 (6,71-9,18)	p ₁₋₂ =0,004 p ₁₋₃ < 0,001
IL-17A	0,22 (0,17-0,49)	0,38 (0,28-1,29)	0,52 (0,31-0,84)	p ₁₋₃ =0,011
IL-17E/IL-25	15,77 (10,53-24,56)	21,03 (14,56-54,68)	23,38 (15,8-55,86)	p ₁₋₃ =0,014

Продолжение таблицы 3.17

IL-17F	15,98 (10,23-32,39)	23,96 (14,26-55,03)	38,21 (23,13-68,63)	$p_{1-3}=0,007$
IL-21	6,37 (5,33-7,41)	8,1 (6,71-12,03)	8,96 (7,41-12,2)	$p_{1-2}=0,019$ $p_{1-3} < 0,001$
IL-22	695,49 (573,49-1077)	960,2 (655,32-1593,5)	999,24 (735,89-1903,5)	$p_{1-3}=0,013$
IL-23	737,87 (578,8-1343)	1088 (706,03-2303)	1025 (769,7-2657)	$p_{1-3}=0,041$
IL-27	583,93 (329,86-644)	671,42 (529,61-754,26)	624,85 (518,72-815,29)	$p_{1-2}=0,056$
IL-28A	231,06 (181,99-325,06)	325,06 (206,68-391,69)	255,1 (206,68-434,59)	-
IL-31	35,05 (24,18-59,47)	43,84 (38,34-79)	44,4 (32,86-129,81)	-
IL-33	16,68 (11,19-25,77)	20,93 (17,29-38,85)	20,93 (14,85-49,47)	$p_{1-3}=0,044$

Таким образом, у детей с псориазом выявлен повышенный уровень провоспалительных цитокинов – IL-23, IL-22, IL-12p70, IL-27, IL-17E, IL-17F, TNF α . Уровень IL-23 в сыворотке крови достигал 8300 пг/мл, IL-22 - 7000 пг/мл, IL-27 - 1900 пг/мл. Уровень TNF α был повышен у 82% пациентов с псориазом. У детей с псориазом выявлены сильные корреляционные зависимости между провоспалительными цитокинами IL-17E, IL-17F, IL-23, IL-27, IL-31 и IL-33. В группе детей с тяжелым течением псориаза (PASI>20) получено достоверное увеличение провоспалительных цитокинов – IL-17A, TNF α , IL-2, IL-6 и IL-9 по сравнению с пациентами с легкой степенью тяжести. Показано влияние типа проводимой терапии на уровень циркулирующих цитокинов у детей с псориазом. Наибольший уровень цитокинов выявлен у детей с псориазом, находящихся на биологической терапии блокаторами TNF α и IL-12/23.

3.5. Прогностические критерии эффективности биологической терапии псориаза у детей

При среднетяжелом и тяжелом течении псориаза у детей, а также при неэффективности ранее применяемой терапии показано назначение ГИБП. Выбор первой линии ГИБП при псориазе у детей во многом зависит от

возраста. Анти-TNF препараты этанерцепт и адалимумаб показаны для детей с 6 лет и 4 лет соответственно, тогда как блокатор IL-12/23 (устекинумаб) в настоящее время одобрен для детей старше 12 лет. Для достижения устойчивой ремиссии на терапии ГИБП требуется длительное лечение, которое, к сожалению, не гарантирует сохранение эффекта в случае отмены препарата. Чаще всего отмена или повторная инициация биологической терапии связаны с потерей эффективности, что приводит к замене препарата на другую линию ГИБП. В связи с этим, актуальным остается поиск информативных критериев эффективности биологической терапии псориаза, а также выявление факторов, приводящих к снижению или отсутствию эффекта ГИБП у пациентов с псориазом.

Для выявления иммунологических критериев эффективности ГИБП у 110 детей с вульгарным псориазом мы оценили показатели клеточного иммунитета, активность метаболизма иммунных клеток и ферментов пуринергической регуляции, уровень транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов и уровень циркулирующих цитокинов на 0, 16 и 52 неделе терапии адалимумабом, этанерцептом и устекинумабом. Эффективность проводимой биологической терапии оценивали по достижению клинического критерия PASI 75 к году терапии: в группу 1 вошли дети с недостаточным эффектом ГИБП (менее PASI 75, n=52), группу 2 составили дети с хорошим эффектом ГИБП (PASI 75 и более, n=58). По возрасту дети с псориазом 1 и 2 групп не отличались: 12,3 (7,8-16,4) года против 12,5 (8,8-15,3) лет, p=0,821.

Анализ эффективности биологической терапии у детей с псориазом, по индексу PASI, показал достоверное и значимое снижение тяжести заболевания в группе пациентов при достижении PASI 75, как на 16 неделе терапии (с 20,1 (14,0-31,0) до 11,3 (7,0-15,0), p < 0,001), так и к году лечения ГИБП – 6,1 (1,5-9,9), p=0,017. В группе детей с недостаточным эффектом биологической терапии снижение индекса PASI было менее выражено, и к году терапии PASI был выше 10 баллов (16 недель - 16,2 (15,0-21,0), 52 недели ГИБП – 10,9 (4,9-22,0); Рисунок 3.57).

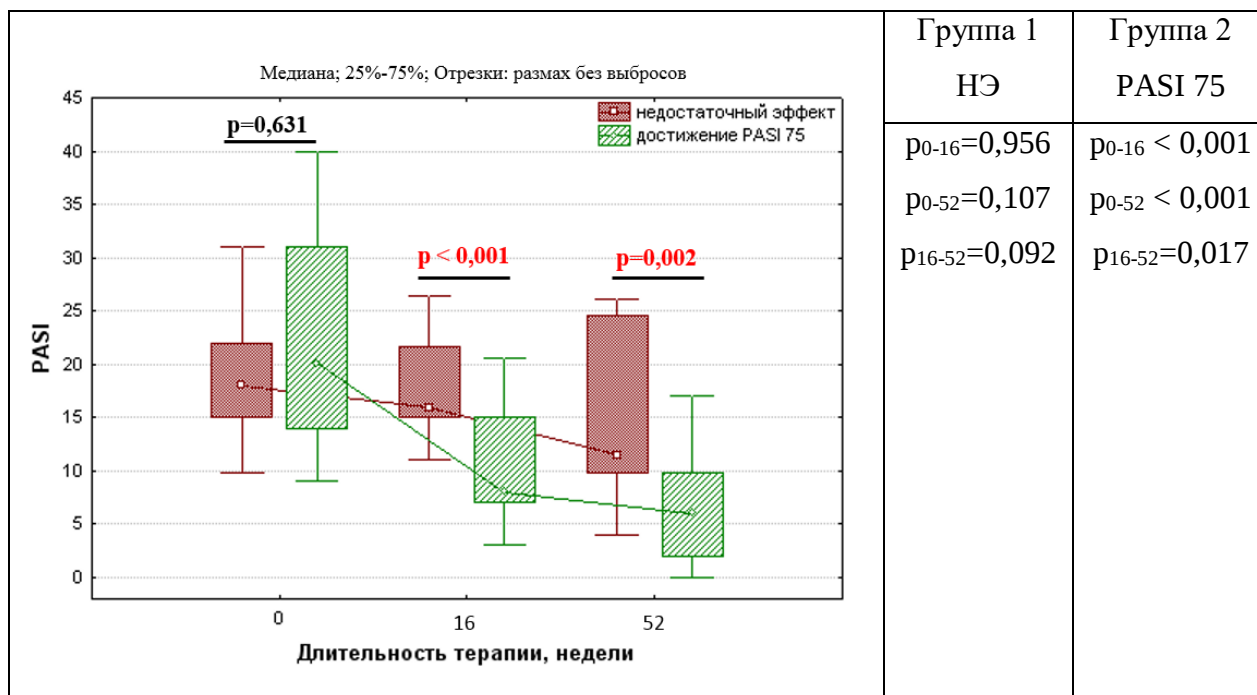


Рисунок 3.57 – Индекс PASI у детей с псориазом при разной эффективности ГИБП до назначения и на 16, 52 неделе терапии

До назначения биологической терапии группы 1 и 2 не отличались по индексу PASI ($p=0,631$), но начиная с 16 неделе терапии PASI в группе пациентов при хорошем эффекте был достоверно ниже, чем в группе с недостаточным эффектом (Рисунок 3.57).

Учитывая возрастную динамику показателей иммунного статуса, данные представлены в процентном отклонении от возрастной нормы (диапазон возрастной нормы принимали за 100%).

Анализ содержания популяций лимфоцитов показал, что в группе пациентов с недостаточным эффектом ГИБП до назначения терапии достоверно увеличен процент Thact ($p=0,005$) и Th17 ($p=0,001$) относительно показателей пациентов в группе 2 (Таблица 3.18).

Таблица 3.18 – Отклонения относительного количества (%) основных и малых популяций лимфоцитов у детей с псориазом при разной эффективности ГИБП до назначения, на 16 и 52 неделях биологической терапии

Популяция	Длительность терапии ГИБП, неделя	Группа 1 Недостаточный эффект	Группа 2 Достижение PASI 75	p
В-лимфоциты, % Лф	0	29,1 (9,7-47,9)	39,2 (12,3-66,6)	0,162
	16	31 (-33,5-65,1)	31,1 (3,7-52,1)	0,812
	52	12,5 (-20,0-36,0)	58,1 (27,4-95,5)	0,039
Т-лимфоциты, % Лф	0	96,5 (86,5-129,0)	76,8 (47,5-128,4)	0,224
	16	55,5 (-30,2-93,5)	86,1 (60,1-116,2)	0,002
	52	111,1 (89,2-138,0)	88,9 (22,7-103,3)	0,057
Т-хелперы, % Лф	0	66,7 (28,4-188,0)	116,0 (55,5-165,6)	0,528
	16	78,1 (23,1-144,4)	115,9 (89,0-155,0)	0,132
	52	112,5 (36,9-192,1)	144,0 (69,0-175,0)	0,416
Цитотоксические Т-лимфоциты, % Лф	0	33,2 (-34,0-98,8)	35,0 (-41,0-77,0)	0,256
	16	5,5 (-31,3-36,9)	26,0 (-46,3-54,8)	0,578
	52	17,0 (10,2-87,5)	-7,4 (-83,0-25,1)	0,016
NK-клетки, % Лф	0	-25,7 (-45,4- -7,4)	-18,3 (-30,7- -0,6)	0,188
	16	31,5 (-15,9-81,8)	-20,9 (-36,7-20,7)	0,005
	52	-5,4 (-35,6-4,4)	-22,5 (-35,8- -4,5)	0,902
Активированные Т-хелперы, % CD4	0	225,2 (183,3-264,1)	164,3 (114,3-235,9)	0,005
	16	181,3 (149,1-211,7)	202,3 (101,6-269,0)	0,956
	52	198,0 (125,0-246,9)	156,1 (79,7-169,0)	0,279
Регуляторные Т-лимфоциты, % CD4	0	31,8 (-12,0-82,0)	70,8 (4,5-136,0)	0,116
	16	66,2 (7,58-125,0)	67,5 (48,0-131,8)	0,359
	52	-18,4 (-68,2-19,6)	90,1 (16,0-159,1)	0,008
Т-хелперы 17 типа, % CD4	0	73,5 (51,5-135,9)	25,2 (-5,9-54,4)	0,001
	16	161,1 (109,1-177,2)	33,7 (-5,6-83,8)	< 0,001
	52	117,4 (72,0-215,0)	41,7 (-1,5-56,5)	0,003
CD5 ⁺ В-клетки, % CD19	0	-13,7 (-83,4-28,7)	-35,8 (-88,5-9,6)	0,568
	16	20,6 (-56,1-73,6)	-33,4 (-64,9- -1,1)	0,015
	52	34,6 (-100,0-71,5)	-26,1 (-93,7-82,4)	0,631
CD5 ⁻ В-клетки, % CD19	0	116,0 (75,0-187,5)	130,6 (77,6-180,6)	0,912
	16	74,5 (-6,5-148,3)	136,3 (103,5-168,5)	0,004
	52	66,5 (32,4-204,7)	128,7 (17,7-198,2)	0,630

На момент окончания индукционного курса биологической терапии (16 недель), в группе детей с недостаточным эффектом был выявлен более низкий процент Т-лимфоцитов ($p=0,002$), CD5⁻ В-клеток ($p=0,004$) и более высокий процент NK-клеток ($p=0,005$) и CD5⁺ В-клеток ($p=0,015$) относительно группы 2, при этом медианы показателей соответствовали

возрастному диапазону (Таблица 3.18). В группе 1, у пациентов с недостаточным эффектом ГИБП, на 16 неделе терапии, также как и до начала терапии, получено более высокое содержание Th17-лимфоцитов относительно группы 2 и показателей нормативных значений (более 100%, Таблица 3.18; Рисунок 3.58А).

К году лечения биологической терапией оценка иммунного статуса у детей с псориазом в группе с недостаточным эффектом показала достоверно более низкий процент В-лимфоцитов ($p=0,039$), Treg ($p=0,008$) и высокое содержание $CD8^+$ -Т-клеток ($p=0,016$) и Th17 ($p=0,003$) относительно показателей группы 2 (Таблица 3.18; Рисунок 3.58). При этом в группе с недостаточным эффектом ГИБП содержание Treg было ниже нормативных значений, а содержание Th17-лимфоцитов сохранялось на уровне выше нормы (Таблица 3.18; Рисунок 3.58).

Анализ динамики содержания Th17 и Treg в течение года биологической терапии показал, что в группе недостаточным эффектом количество Th17 было выше нормы и не снижалось, а количество Treg достоверно снижалось к 52 неделе терапии ($p=0,006$). В группе детей с хорошим эффектом (PASI 75) содержание Th17-лимфоцитов сохранялось в пределах нормы, а количество Treg к году терапии увеличивалось ($p=0,040$; Рисунок 3.58).

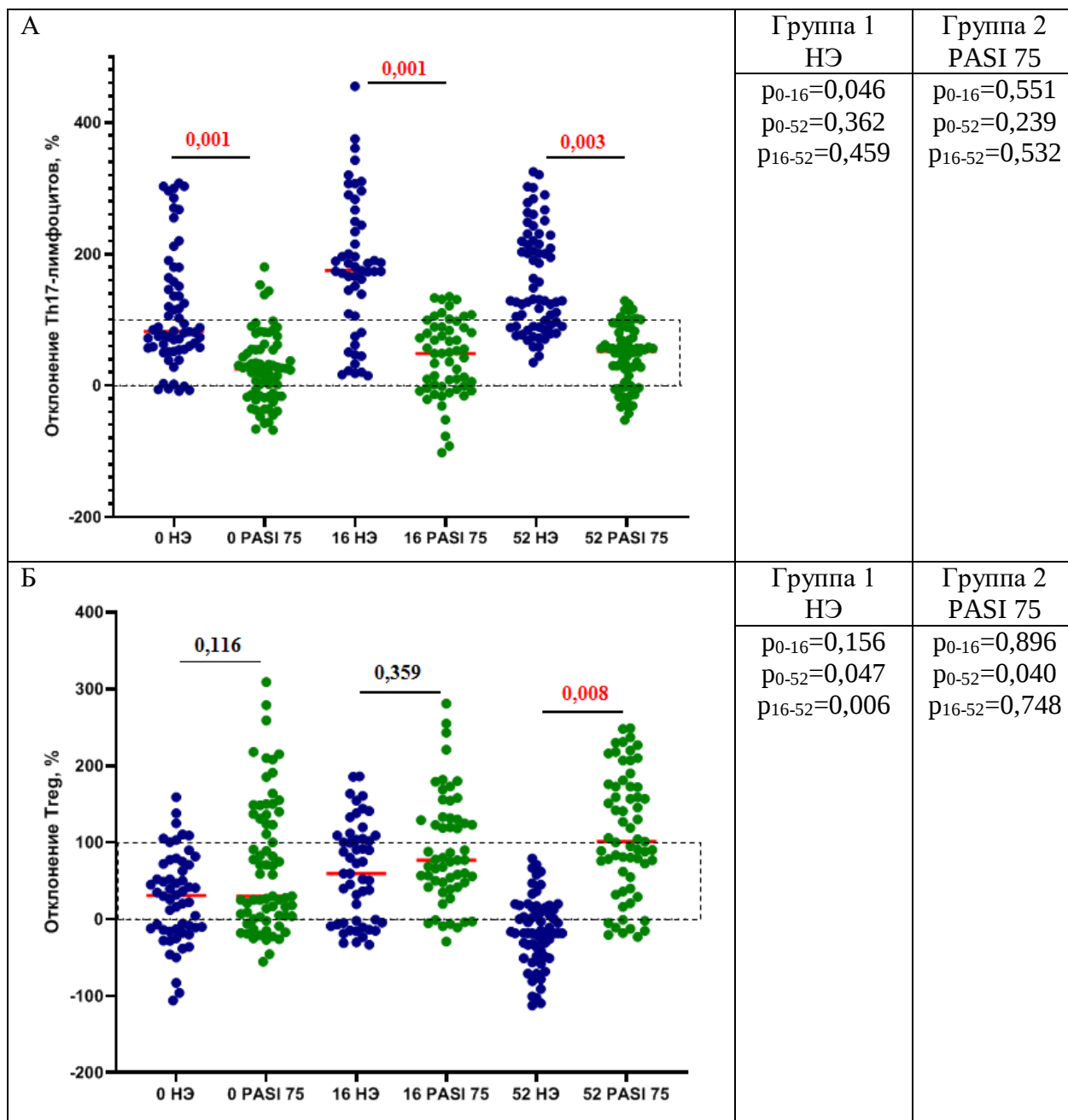


Рисунок 3.58 – Отклонение относительного количества Th17-лимфоцитов (А) и Treg (Б) при недостаточном эффекте (НЭ) и при достижении PASI 75 у детей с псориазом до назначения и на 16, 52 неделях ГИБП

Анализ отношения Th17/Treg у детей с псориазом при разной эффективности биологической терапии показал, что в группе детей с недостаточным эффектом ГИБП до лечения и к году терапии данный показатель существенно увеличен относительно группы 2 (в 1,9-2,3 раз, Таблица 3.19; Рисунок 3.59).

Таблица 3.19 – Отношение Th17/Treg лимфоцитов у детей с псориазом с разной эффективностью биологической терапии

Показатель	Длительность терапии ГИБП, неделя	Группа 1 Недостаточный эффект	Группа 2 Достижение PASI 75	p
Th17/Treg	0	3,0 (2,6-3,6)	1,6 (1,2-2,5)	0,001
	16	2,9 (2,6-3,6)	1,7 (1,2-2,6)	< 0,001
	52	3,9 (2,6-4,3)	1,7 (1,2-2,3)	< 0,001

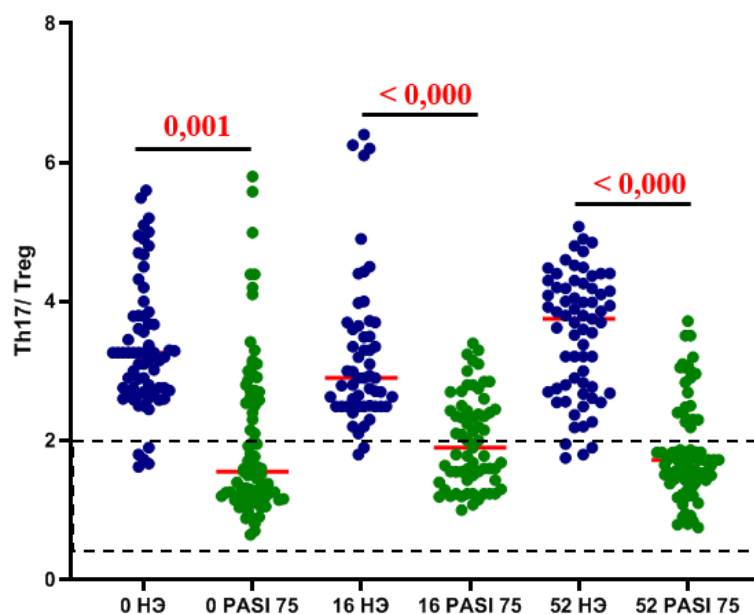


Рисунок 3.59 – Отношение Th17/Treg при недостаточном эффекте (НЭ) и достижении PASI 75 у детей с псориазом на 0, 16, 52 неделе ГИБП

Проведение множественного пошагового регрессионного анализа позволило выделить наиболее информативные показатели клеточного иммунитета в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с псориазом. При выполнении анализа в качестве зависимой переменной принимали достижение PASI 75 к году терапии ГИБП (1) и недостаточный эффект терапии (0). В качестве независимых переменных выступали показатели популяций лимфоцитов до назначения и на 16, 52 неделях терапии. Анализ регрессионных коэффициентов уравнения регрессии показал, что при более низком проценте Th17-лимфоцитов и увеличении Treg у пациентов до назначения ГИБП увеличивается вероятность достижения PASI 75 (Таблица 3.20; Рисунок 3.60).

Таблица 3.20 – Уравнение множественной регрессии для PASI 75 в зависимости от количества основных и малых популяций лимфоцитов у детей с псориазом. р – достоверность отличия коэффициентов регрессии от 0

Уравнение множественной регрессии				
Зависимая переменная PASI 75: 1-достижение PASI 75, 0-НЭ				
Переменная	Коэффициент регрессии	Ошибка коэффициента	t-критерий	p
Длительность ГИБП – 0 недель, прогноз (R _{мн} =0,541)				
Свободный член	0,66	0,086	7,64	< 0,001
Отк. Th17, % CD4	-0,01	0,001	-3,76	0,001
Отк. Treg, % CD4	0,01	0,001	2,29	0,027
Длительность ГИБП – 16 недель, прогноз (R _{мн} =0,710)				
Свободный член	0,83	0,063	13,29	< 0,001
Отк. Th17, % CD4	-0,01	0,001	-7,25	< 0,001
Отк. CD8, % Лф	0,01	0,001	3,75	0,001
Длительность ГИБП – 52 неделе, результат (R _{мн} =0,781)				
Свободный член	0,59	0,071	8,28	< 0,001
Отк. Treg, % CD4	0,01	0,001	5,62	< 0,001
Отк. Th17, % CD4	-0,01	0,001	-3,94	0,001
Отк. CD8, % Лф	-0,01	0,001	-2,23	0,030
Отк. NK-клетки, % Лф	-0,01	0,002	-2,05	0,046

По окончании индукционного курса биологической терапии у детей с псориазом вероятность достижения PASI 75 увеличивается при снижении Th17, при этом данный результат сохраняется к году терапии ГИБП. Регрессионное уравнение на 16 неделе терапии с высокой долей вероятности позволяет прогнозировать достижение PASI 75 к году терапии: в группе PASI 75 все наблюдаемые значения выше 0,5 (Рисунок 3.60). В группе пациентов с хорошим эффектом ГИБП к году лечения показано достоверное снижение содержания Th17, NK-клеток при увеличении Treg (Таблица 3.20; Рисунок 3.60).

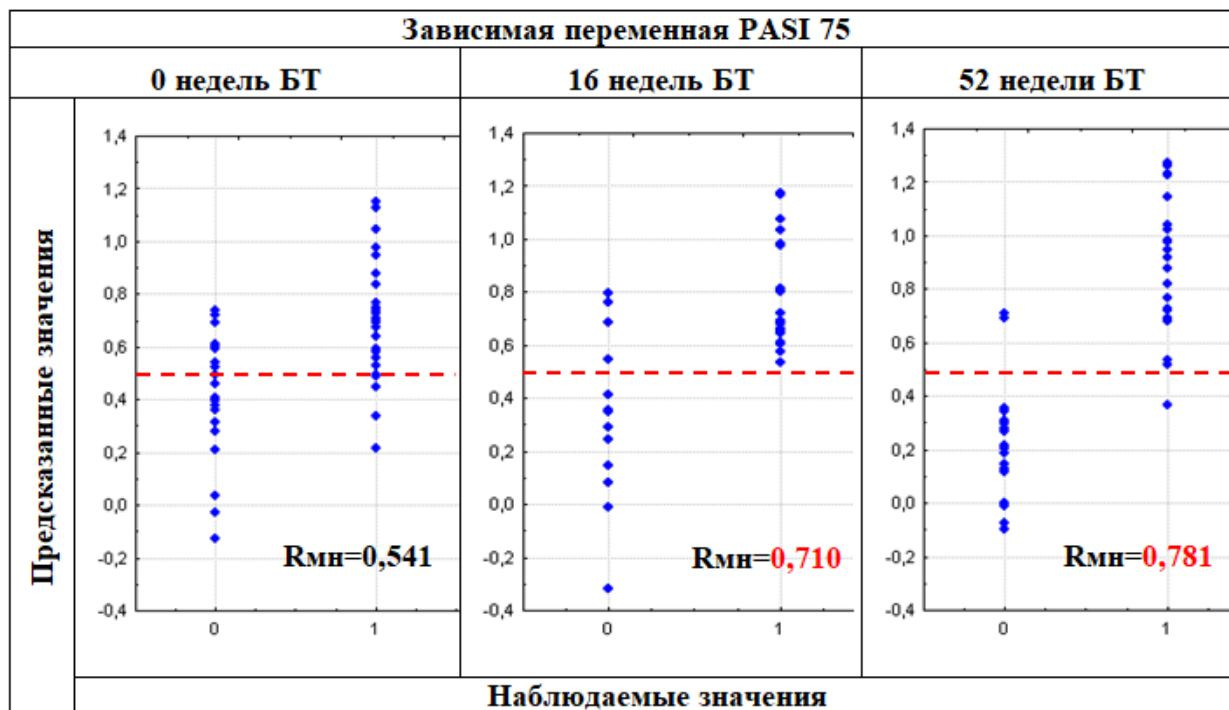


Рисунок 3.60 – Наблюдаемые и предсказанные значения эффективности ГИБП по уравнению регрессии (таблица 3.20) на 0, 16, 52 неделе терапии по показателям иммунофенотипа

Для выявления наиболее информативных иммунологических показателей в прогнозе эффективности применения ГИБП у детей с псориазом был проведен ROC-анализ содержания основных и малых популяций лимфоцитов до назначения биологической терапии (0 неделя) и на момент окончания инкубационного курса лечения. Получено отличное качество разделительной модели для состояний PASI 75 и недостаточного эффекта к году терапии для содержания Th17, Thact и отношения Th17 / Treg до назначения биологической терапии и для Th17, Th17/Treg на 16 неделе ГИБП (AUC > 0,8; Таблица 3.21; Рисунок 3.61; Рисунок 3.62).

Таблица 3.21 - ROC-анализ и пороговые значения наиболее информативных показателей основных и малых популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом

Показатель	Площадь под ROC-кривой AUC (CI), $p < 0,05$	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность
до назначения биологической терапии				
Отклонение Th17	0,816(0,743-0,888)	53%	71%	73%
Отклонение Thact	0,843(0,776-0,910)	181%	75%	76%
Th17 / Treg	0,835(0,760-0,909)	2,6	73%	75%
16 недель ГИБП				
Отклонение Th17	0,870(0,802-0,937)	102%	77%	82%
Th17 / Treg	0,835(0,760-0,929)	2,6	67%	68%

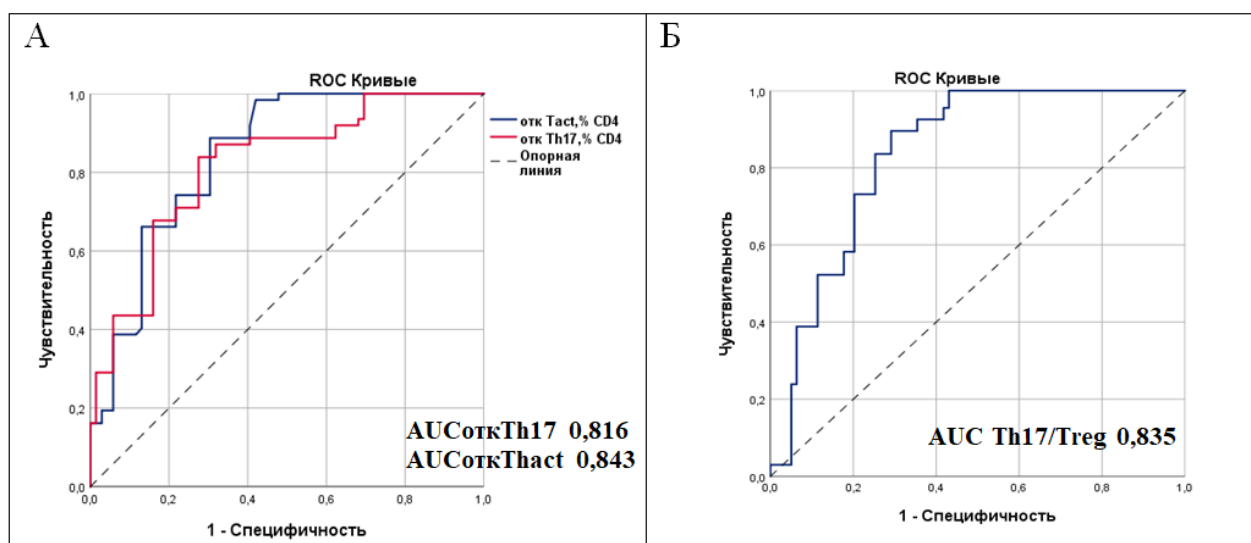


Рисунок 3.61 – ROC-кривые для отклонения Th17-лимфоцитов, Thact (А) и отношения Th17/Treg в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом до назначения ГИБП

Вычисление пороговых значений показателей при совпадении чувствительности и специфичности показало, что при отклонении Th17 выше 53%, Thact выше 181% и Th17/Treg выше 2,6 до назначения ГИБП в 75% случаев можно ожидать недостаточную эффективность биологической терапии к году. Анализ иммунологических показателей на 16 неделе показал, что при отклонении Th17 выше 102 % вероятность неэффективного лечения составляет 82%, и 68% - при отношении Th17/Treg выше 2,6 (Таблица 3.21).

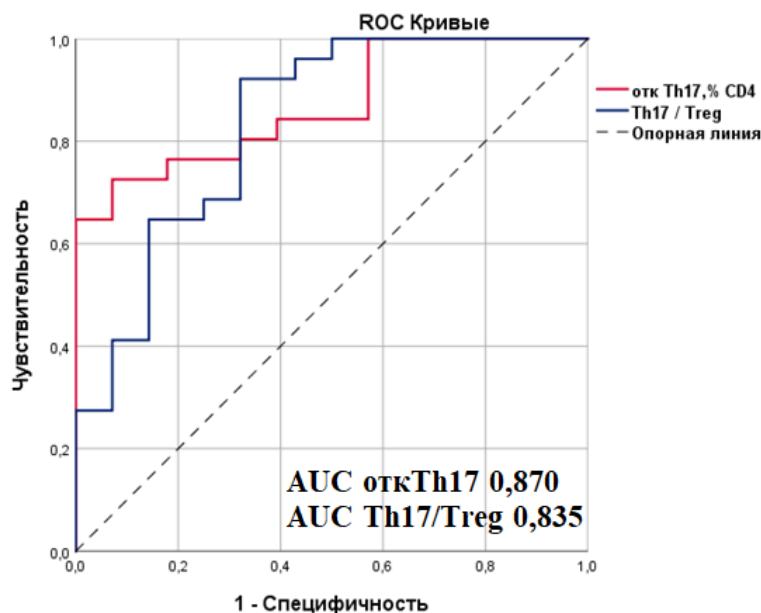


Рисунок 3.62 – ROC-кривые отклонения Th17-лимфоцитов и отношения Th17/Treg в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом на 16 неделе биологической терапии

В зависимости от возрастной динамики содержание Thact (% CD4) до назначения биологической терапии составило: 2-5 лет – 14,1 %; 6-8 лет – 20,5 %; 9-11 лет – 21,4 %; старше 12 лет – 29,6 %. Содержание Th17 (% CD4) на 16 неделе терапии ГИБП составило: 2-5 лет – 13,7 %; 6-8 лет – 18,3 %; 9-11 лет – 22,7 %; старше 12 лет – 22,7 %. При превышении пороговых значений Thact до назначения ГИБП и содержания Th17 к концу индукционного курса можно ожидать недостаточную эффективность биологической терапии к году.

Анализ содержания субпопуляций клеток-супрессоров миелоидного происхождения при разной эффективности ГИБП у детей с псориазом показал, что в группе пациентов с недостаточным эффектом биологической терапии, как до начала лечения, так и к 52 неделе терапии достоверно снижен процент общей популяции MDSCs, относительно группы 2 (Таблица 3.22; Рисунок 3.63).

Таблица 3.22 – Содержание субпопуляций MDSCs у детей с псориазом в периферической крови при разной эффективности биологической терапии

Показатель	Длительность терапии ГИБП, неделя	Группа 1 Недостаточный эффект	Группа 2 Достижение PASI 75	p
MDSCs, % МНК	0	2,0 (1,5-3,8)	3,2 (2,8-5,8)	0,002
	16	4,1 (2,5-5,1)	2,9 (2,1-4,7)	0,467
	52	1,4 (1-2,3)	3,6 (1,8-6,1)	< 0,001
M-MDSCs, % MDSCs,	0	21 (7,4-40,6)	18,7 (16,3-33,9)	0,682
	16	12,9 (6,7-30,4)	24,8 (11,7-35,3)	0,049
	52	17,2 (3,1-36,2)	19,3 (1,3-32,1)	0,915
G-MDSCs, % MDSCs,	0	24,2 (14,4-37,1)	29,3 (15,1-43,2)	0,347
	16	28,2 (11,6-42,8)	21,1 (15-36,8)	0,613
	52	10,4 (4-16,1)	19,8 (8,7-59,3)	0,003
M ⁺ G ⁻ -MDSCs, % MDSCs,	0	42,1 (30,2-53)	43 (20,6-48,9)	0,400
	16	50,1 (31,4-58,8)	48,3 (25,7-65,6)	0,231
	52	59,7 (59,7-87)	48,7 (26,1-60,8)	< 0,001

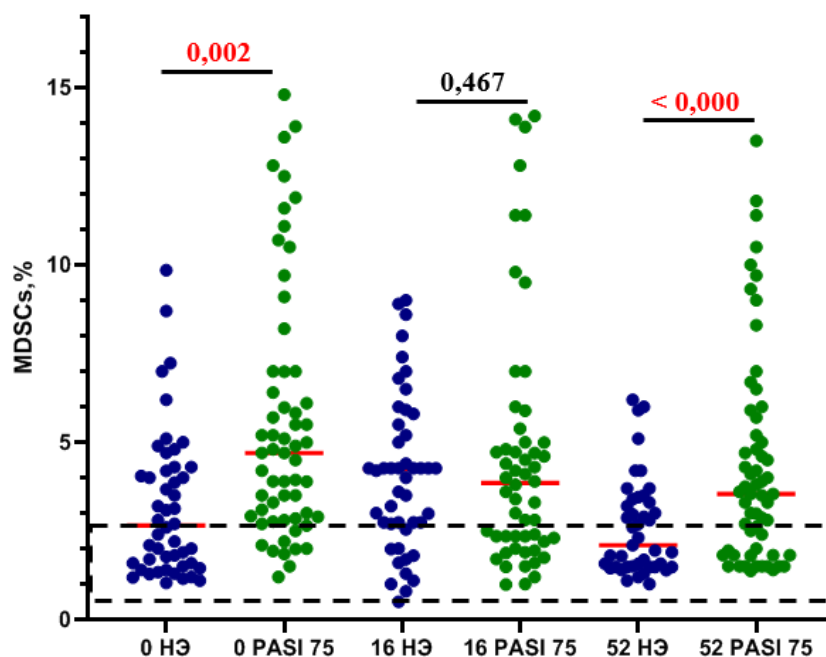


Рисунок 3.63 – Относительное количество MDSCs при недостаточном эффекте (НЭ) и достижении PASI 75 у детей с псориазом на 0, 16, 52 неделе ГИБП

У детей с псориазом при разной эффективности и длительности биологической терапии выявлено изменение содержания субпопуляций MDSCs: на момент инкубационного курса терапии ГИБП получено достоверно более низкий процент M-MDSCs в группе 1 ($p=0,049$) относительно группы 2. К году лечения получено, что содержание G-MDSCs

выше в 2 раза ($p=0,003$), а M-G⁻ -MDSCs напротив ниже ($p<0,001$; Таблица 3.22).

Проведение ROC-анализа для MDSCs и их субпопуляций до назначения терапии ГИБП и на 16 неделе терапии выявил только среднее ($AUC<0,7$) и неудовлетворительное качество ($AUC<0,6$) разделительной модели для состояний PASI 75 и недостаточный эффект: AUC MDSCs 0 неделя = 0,677; AUC MDSCs 16 неделя = 0,543. Таким образом, у детей с псориазом при хорошем эффекте биологической терапии выявлен более высокий уровень MDSCs до начала терапии, чем в группе детей с недостаточной эффективностью ($p=0,002$). Однако из-за большого разброса показателей невозможно вычислить достоверный уровень cut-off для прогноза эффективности.

Оценка содержания CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти при разной эффективности и длительности ГИБП у детей с псориазом показала, что содержание клеток памяти не зависело от длительности биологической терапии (Таблица 3.23). При этом, в группе пациентов с недостаточным эффектом ГИБП, получено достоверно более низкое содержание T_{NAIVE} и более высокие показатели популяций T_{ЕМ}, T_{СМ} и T_{ЕМРА}, относительно показателей детей при достижении PASI 75 (Таблица 3.23).

Таблица 3.23 – Относительное содержание субпопуляций CD4⁺-Т-клеток памяти у детей с псориазом в периферической крови при разной эффективности биологической терапии

Показатель	Длительность терапии ГИБП, неделя	Группа 1 Недостаточный эффект	Группа 2 Достижение PASI 75	p
Наивные клетки памяти (T _{NAIVE}), % CD4	0	49,3 (45,1-60,8)	64,6 (60,3-72,5)	< 0,001
	16	47,4 (44,7-58,8)	68,2 (60,4-73,5)	< 0,001
	52	52,8 (51,5-53,2)	65,1 (56,2-68)	< 0,001
Центральные клетки памяти (T _{СМ}), % CD4	0	23,7 (17,6-28,7)	19,1 (16,4-23)	0,029
	16	25,4 (22,6-29,4)	19 (17,9-22,6)	0,001
	52	21,9 (20,4-22,7)	20,3 (18-23,4)	0,319
Эффекторные клетки памяти (T _{ЕМ}), % CD4	0	18,8 (15,7-24,6)	11,55 (7,3-12,7)	< 0,001
	16	19 (10,2-19,9)	10,2 (7,5-13,1)	0,001
	52	18,4 (14-19,1)	11,05 (8,8-14,9)	0,001

Продолжение таблицы 3.23

Терминально-дифференцированные эффекторные клетки памяти (T _{EMRA}) , % CD4	0	4,25 (3,5-7,5)	2,3 (1,5-3,7)	0,001
	16	4 (2,9-4,3)	2,6 (1,7-3,6)	0,013
	52	9 (4,7-10,6)	2,75 (1,9-3,8)	0,001

При анализе содержания субпопуляций CD8⁺-Т-клеток памяти у детей с псориазом с разной эффективностью ГИБП на момент индукционного курса (16 недель) терапии выявлено достоверно низкий процент наивных (p=0,027) и повышенный центральных (p=0,024) CD8⁺-Т-клеток памяти в группе 1, относительно показателей группы 2 (Таблица 3.24).

Таблица 3.24 – Относительное количество популяций CD8⁺-Т-клеток памяти у детей с псориазом в периферической крови при разной эффективности биологической терапии

Показатель	Длительность терапии ГИБП, неделя	Группа 1 Недостаточный эффект	Группа 2 Достижение PASI 75	p
Наивные клетки памяти, % CD8	0	51,6 (40,3-58,1)	52,0 (44,2-67,3)	0,206
	16	52,1 (38,4-53,9)	56,8 (40,6-65,6)	0,027
	52	61,3 (22,0-63,4)	56,8 (46,8-57,7)	0,624
Центральные клетки памяти, % CD8	0	3,1 (2,3-4,4)	3,55 (2,5-3,8)	0,707
	16	6,1 (2,7-7,2)	3,4 (2,9-4,2)	0,024
	52	5,0 (1,2-9,7)	2,3 (1,3-3,2)	0,221
Эффекторные клетки памяти, % CD8	0	24,1 (21,7-31,2)	19,55 (11,3-22,4)	0,001
	16	23,0 (18,3-36,5)	17,7 (11,8-24,9)	0,132
	52	13,3 (11,6-32,5)	21,8 (18,6-26,4)	0,193
Терминально-дифференцированные эффекторные клетки памяти, % CD8	0	19,1 (15,8-27,7)	21,55 (13,2-27,5)	0,993
	16	21,5 (18,9-35,6)	20,35 (17,4-27,1)	0,180
	52	20,0 (15,5-44,1)	21,9 (17,3-26,8)	0,871

Проведенный ROC-анализ показателей субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти в прогнозе эффективности применения ГИБП у детей с псориазом до назначения биологической терапии (0 неделя) показал хорошее качество разделительной модели (Рисунок 3.64; Таблица 3.25).

Таблица 3.25 – ROC-анализ и пороговые значения наиболее информативных показателей субпопуляций CD4⁺-Т-клеток памяти в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом

Показатель	Площадь под ROC-кривой AUC (CI), p<0,05	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность
0 неделя при достижении PASI 75				
Наивные клетки памяти (T _{NAIVE})	0,887(0,843-0,931)	59 % CD4	80%	79%
0 неделя при недостаточном эффекте ГИБП				
Эффекторные клетки памяти (T _{EM})	0,844(0,792-0,896)	13 % CD4	81%	83%

При уровне наивных Т-клеток (T_{NAIVE}) выше 59% до назначения ГИБП с вероятностью 79% можно ожидать достижение PASI 75 к году терапии. При выявлении эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM}) более 13% от CD4 с вероятностью 83% можно прогнозировать недостаточный эффект ГИБП к году терапии (Рисунок 3.64; Таблица 3.25).

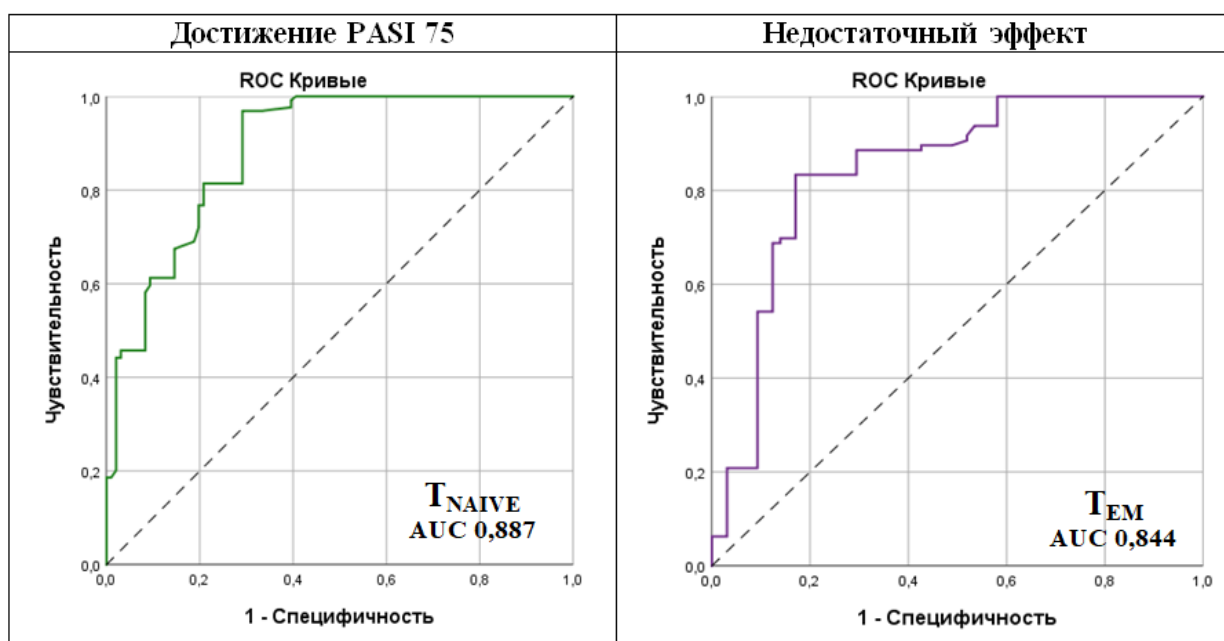


Рисунок 3.64 – ROC-анализ T_{NAIVE} и T_{EM} в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом до назначения ГИБП

При исследовании активности СДГ в популяциях лимфоцитов при разной эффективности биологической терапии к году лечения получено

достоверное снижение активности фермента в регуляторных Т-лимфоцитах в группе детей с недостаточным эффектом ГИБП к году терапии: в группе 2 – 196,6 (187,8-216,6) усл.ед. относительно группы 1 – 168,3 (162,0-190,0) усл.ед., $p < 0,001$ (Таблица 3.26). Стоит отметить, что активность СДГ в Тreg у детей с псориазом в группе с хорошим эффектом ГИБП была в пределах нормативных значений, независимо от длительности биологической терапии (Рисунок 3.65; Таблица 3.26).

Таблица 3.26 – Активность СДГ в популяциях лимфоцитов периферической крови у детей с псориазом с разной эффективностью биологической терапии, (Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), усл.ед.)

Популяция	Длительность терапии ГИБП, неделя	Группа 1 Недостаточный эффект	Группа 2 Достижение PASI 75	p
Общая популяция лимфоцитов	0	164,2 (155,5-178,8)	165,2 (154,5-179)	0,896
	16	172,9 (154,8-192,5)	175,1 (164,3-196,3)	0,213
	52	181,5 (162-183,7)	179,8 (169,8-189,6)	0,891
Т-лимфоциты	0	174 (161-179,8)	178,6 (162,2-189,7)	0,398
	16	176 (169-202,9)	181,3 (171,4-204,5)	0,178
	52	182,6 (163,4-186,9)	186,9 (177,9-191,3)	0,255
В-лимфоциты	0	131,4 (125,4-137,9)	132,3 (120,6-141,3)	0,817
	16	140,8 (126,3-153,1)	135,3 (123,9-141,7)	0,344
	52	136,1 (130-146,9)	137,0 (126,1-149,2)	0,931
НК-клетки	0	135,1 (133,8-161,6)	151,2 (142-157,8)	0,169
	16	174,9 (148,4-182,8)	156 (146,9-179,8)	0,374
	52	153,7 (143,8-162)	155,4 (143,5-165,1)	0,851
Т-хелперы	0	177,3 (171,4-191,7)	182,9 (164,3-192,3)	0,694
	16	177 (169,2-201,2)	189,1 (181,8-201,6)	0,075
	52	181,7 (167,5-187,6)	187,6 (178,4-195,9)	0,234
Цитотоксические Т-лимфоциты	0	175,1 (164,8-182,7)	179,1 (163,9-188,2)	0,617
	16	176,3 (170,2-205,3)	182,8 (171,6-195,6)	0,402
	52	185,1 (163,9-187,2)	181,9 (172,7-200,8)	0,627
Активированные Т-хелперы	0	189,7 (179,1-199,4)	194,9 (174,3-208,1)	0,322
	16	196,1 (171,4-211,4)	201,7 (192,1-226,7)	0,213
	52	184,5 (179-206,1)	203,9 (192,7-209,1)	0,277
Регуляторные Т-лимфоциты	0	185,5 (171,0-196,6)	195,3 (186,7-208,0)	0,431
	16	187,0 (175,2-197,0)	192,2 (183,1-209,0)	0,282
	52	168,3 (162,0-190,0)	196,6 (187,8-216,6)	$< 0,001$
Т-хелперы 17 типа	0	171,6 (169,8-182,5)	175 (158,9-189,2)	0,821
	16	183,5 (156,4-199,1)	180,2 (168,2-201,2)	0,736
	52	178,3 (165,5-182,6)	178,1 (169,8-187,8)	0,737

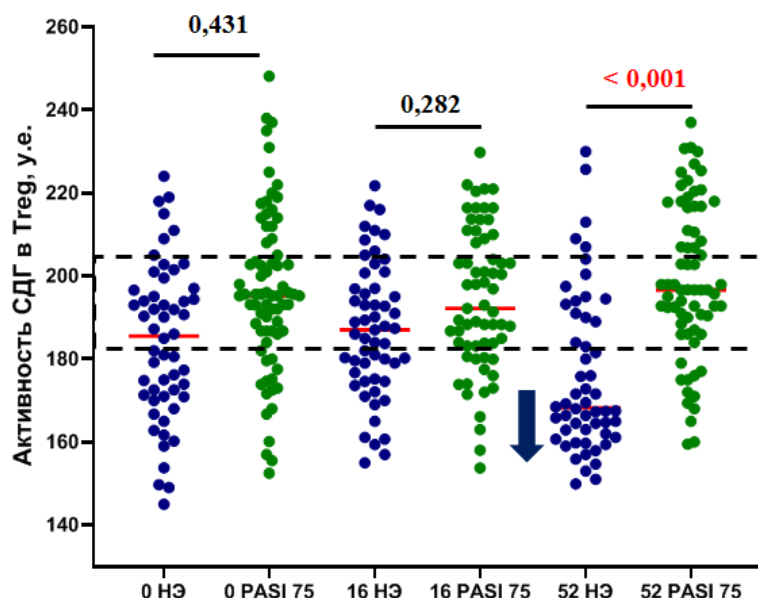


Рисунок 3.65 – Активность СДГ в популяции Treg при недостаточном эффекте (НЭ, синий цвет) и достижении PASI 75 (зеленый цвет) у детей с псориазом на 0, 16, 52 неделе ГИБП

ROC-анализ активности СДГ в популяции Treg позволил определить пороговые значения активности фермента для прогноза эффективности применения ГИБП у детей с псориазом. Анализ на 0 и 16 неделях показал среднее качество разделительной модели, а к году терапии ГИБП - очень хорошее качество разделительной модели (Таблица 3.27, Рисунок 3.66). Неэффективность применения ГИБП у детей с псориазом к году терапии с вероятностью 81% показана при пороговом значении СДГ в популяции Treg менее 185 усл.ед. (Таблица 3.27, Рисунок 3.66).

Таблица 3.27 – ROC-анализ и пороговое значение активности СДГ в популяции Treg в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом

Показатель	Площадь под ROC-кривой AUC (CI), $p < 0,05$	Пороговое значение, усл.ед.	Чувствительность	Специфичность
52 неделя биологической терапии				
Активность СДГ в Treg, усл.ед.	0,805(0,723-0,887)	185	81%	72%

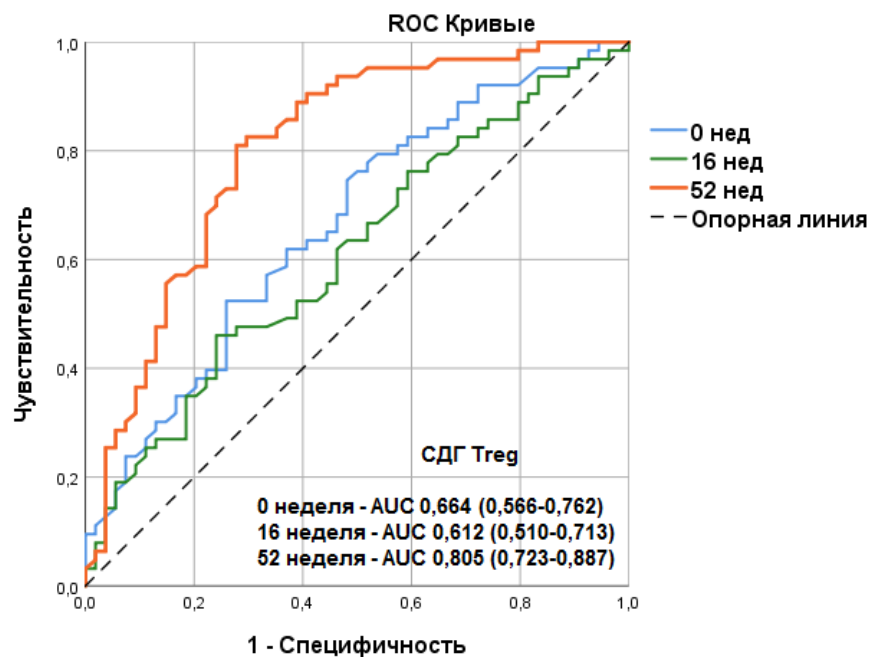


Рисунок 3.66 – ROC-кривые активности СДГ в популяции Treg при разной эффективности ГИБП у детей с псориазом на 0, 16 и 52 неделях терапии

Представленные данные активности СДГ в Treg указывают на необходимость оценки динамики показателей после 16 неделе терапии. Если после индукционного курса наблюдается снижение активности СДГ в Treg ниже 185 усл.ед., то возрастает вероятность неэффективности ГИБП к году лечения (Рисунок 3.65; Рисунок 3.66).

Анализ активности ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов при разной эффективности биологической терапии псориаза у детей показал достоверное снижение активности ГФДГ в Т-лимфоцитах ($p=0,028$) у пациентов с недостаточным эффектом ГИБП до назначения биологической терапии (Таблица 3.28). Наибольшие изменения этого фермента выявлены в популяции НК-клеток: в группе детей с недостаточным эффектом ГИБП как на 16 неделе ($p=0,001$), так и к 52 неделе терапии ($p<0,001$) показано достоверное снижение активности ГФДГ в НК-клетках относительно показателей в группе детей при достижении PASI 75 (Таблица 3.28; Рисунок 3.67).

Таблица 3.28 – Активность ГФДГ в популяциях лимфоцитов периферической крови у детей с псориазом с разной эффективностью биологической терапии, (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), усл.ед.)

Популяция	Длительность терапии ГИБП, неделя	Группа 1 Недостаточный эффект	Группа 2 Достижение PASI 75	p
Общая популяция лимфоцитов	0	140,7 (131,2-154,1)	156,4 (131,3-165,3)	0,067
	16	158,5 (157,7-158,9)	164,0 (146,5-174,5)	0,052
	52	150,9 (142,1-173,6)	163,8 (152,1-172,4)	0,106
Т-лимфоциты	0	141,9 (133,6-155,8)	158,7 (137,2-171)	0,028
	16	159,2 (159,1-162,3)	162,3 (145,2-172,4)	0,104
	52	152,3 (142,2-174,8)	165,6 (149,7-172,2)	0,460
В-лимфоциты	0	122,6 (115,7-140,1)	124,0 (118,6-150,1)	0,141
	16	141,2 (135,7-148,3)	140,1 (131,3-158)	0,136
	52	141,8 (138,7-148,7)	145,4 (125,3-157,1)	0,459
NK-клетки	0	144,0 (138,7-156,1)	152,4 (139,5-165,1)	0,182
	16	159,3 (157,8-166,9)	172,4 (159,6-178,6)	0,001
	52	154,4 (151,6-161,3)	169,1 (164,9-174,9)	<0,001

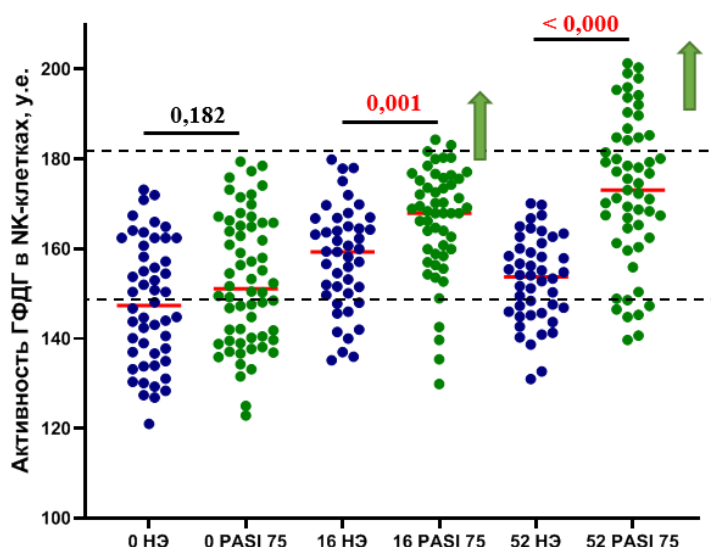


Рисунок 3.67 – Активность ГФДГ в NK-клетках при недостаточном эффекте (НЭ) и достижении PASI 75 у детей с псориазом а 0, 16, 52 неделе ГИБП

Анализ активности ГФДГ в NK-клетках выявил разную динамику показателя в группах с разной эффективностью ГИБП. В группе, показавшей в последствии недостаточный эффект ГИБП, до назначения биологической терапии уровень активности ГФДГ соответствовал нижней границе нормативных значений, а в процессе лечения изменялся несущественно ($p_{0-52}=0,269$; Таблица 3.28). В группе детей с хорошим эффектом ГИБП уже к 16

неделе терапии выявлено достоверное повышение активности фермента ($p_{0-16} < 0,001$), которое сохраняется к году терапии ($p_{0-52} < 0,001$; Рисунок 3.28).

При анализе эффективности биологической терапии и содержания субпопуляций $CD4^+$ -Т-клеток с экспрессией $CD39^+$ - и $CD73^+$ -эктонуклеотидаз у детей с псориазом в группе с недостаточным эффектом ГИБП до начала лечения выявлен более высокий процент $CD39^+$ Tregs ($p < 0,001$), $CD39^+$ Thact ($p = 0,033$) и более низкий процент $CD73^+$ Th17 ($p = 0,001$) относительно показателей группы 2 (Таблица 3.29, Рисунок 3.68).

Таблица 3.29 – Относительное количество субпопуляций $CD4^+$ -Т-клеток с экспрессией $CD39$ и $CD73$ у детей с псориазом при разной эффективности биологической терапии

Показатель	Длительность терапии ГИБП, неделя	Группа 1 Недостаточный эффект	Группа 2 Достижение PASI 75	p
$CD39^+$ Tregs, % Tregs	0	41,3 (32,7-48,7)	25,9 (11,2-39,3)	< 0,001
	16	22,3 (13,1-36,0)	28,1 (10,2-36,1)	0,779
	52	13,2 (9,5-28,5)	27,4 (19,7-28,2)	0,048
$CD73^+$ Tregs, % Tregs	0	7,4 (6,8-12,2)	8,1 (3,3-11,2)	0,678
	16	7,5 (7,2-13,2)	8,8 (3,3-14,8)	0,519
	52	6,7 (6,3-12,9)	9,5 (5,1-16,1)	0,710
$CD39^+$ Thact, % Thact	0	6,6 (4,9-8,8)	3,5 (2-8,9)	0,033
	16	2,9 (0,6-6,5)	5,1 (1,3-9,2)	0,022
	52	0,7 (0,5-3,3)	7,2 (2,8-9,1)	< 0,001
$CD73^+$ Thact, % Thact	0	19,4 (16,2-20,6)	18,2 (13,5-24,1)	0,189
	16	26,8 (15,7-26,8)	19,1 (13,3-22,4)	0,168
	52	18,3 (16,7-29,2)	15,0 (9,8-25,8)	0,001
$CD39^+$ Th17, % Th17	0	6,9 (5,8-9,0)	9,5 (1-13)	0,931
	16	6,3 (0,2-11,1)	5,9 (3,8-10,5)	0,487
	52	1,3 (0,1-8,3)	10,1 (6-11,8)	0,001
$CD73^+$ Th17, % Th17	0	13,3 (11,2-17,5)	9,6 (7,7-12,1)	0,001
	16	15,2 (8,4-16,0)	10,9 (8,5-20,3)	0,599
	52	11,1 (10,4-20,3)	11,7 (7,5-21,9)	0,994

К году терапии ГИБП у детей с псориазом группы 1 достоверно снижалось содержание $CD39^+$ Tregs ($p = 0,038$), $CD39^+$ Th17 ($p = 0,007$) и $CD39^+$ Thact ($p = 0,041$; Таблица 3.29, Рисунок 3.68).

При анализе содержания субпопуляций $CD4^+$ -Т-клеток с экспрессией $CD39^+$ -эктонуклеотидазы обращает на себя внимание, что у детей с

псориазом в группе с хорошей эффективностью биологической терапии процент клеток $CD39^+Tregs$ и $CD39^+Th17$ в течение всего периода наблюдения не изменялся и находился в пределах нормативных значений (Таблица 3.29, Рисунок 3.68).

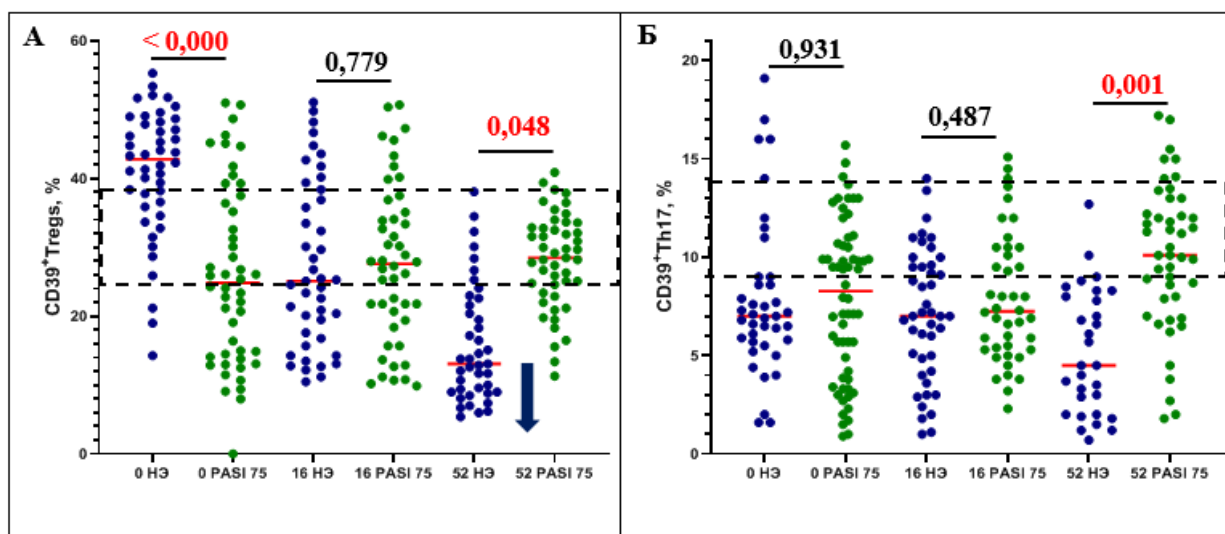


Рисунок 3.68 – Содержание $CD39^+Tregs$ (А) и $CD39^+Th17$ (Б) у детей с псориазом при разной эффективности ГИБП

Проведенный ROC-анализ эффективности биологической терапии и содержания клеток с экспрессией $CD39^+$ - и $CD73^+$ -эктонуклеотидаз у детей с псориазом показал хорошее качество разделительной модели для $CD39^+Tregs$, как до назначения ГИБП (AUC - 0,771), так и к году лечения (AUC - 0,725). При неэффективности ГИБП у детей с псориазом до начала терапии пороговое значение $CD39^+Tregs$ составило 35% от Tregs (Se -72%, Sp - 67%), а при хорошем эффекте биологической терапии к году лечения пороговое значение показателя составило 20% от Tregs (Se -73%, Sp - 69%; Таблица 3.30).

Таблица 3.30 – ROC-анализ и пороговое значение содержания $CD39^+Tregs$ в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом

Показатель	Площадь под ROC-кривой AUC (CI), $p < 0,05$	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность
при недостаточном эффекте до назначения биологической терапии				
$CD39^+Tregs$, % Tregs	0,771(0,679-0,862)	35 %	72%	67%
52 недели ГИБП и достижение PASI 75				
$CD39^+Tregs$, % Tregs	0,725(0,581-0,869)	20 %	73%	69%

Таким образом, у детей с псориазом можно ожидать недостаточный эффект ГИБП, если уровень CD39⁺Tregs до начала терапии превышает 35% от Tregs и в процессе лечения уменьшается до уровня 20% и ниже. Для прогноза эффективности важно оценивать исходный уровень экспрессии CD39⁺-эндонуклеотидазы на Tregs и динамику показателя в процессе лечения.

Определение уровня циркулирующих цитокинов у детей с псориазом до назначения биологической терапии показало, что в группе пациентов с достижением PASI 75 достоверно повышен уровень IFN γ , IL-12p70, IL-1 β , IL-21, IL-27, IL-31 и TNF α относительно показателей в группе 1 (Таблица 3.31).

Таблица 3.31 – Уровень циркулирующих цитокинов в сыворотке крови у детей с псориазом до назначения биологической терапии при разной эффективности ГИБП, пг/мл

Показатель	Группа 1 Недостаточный эффект (n=36)	Группа 2 Достижение PASI75 (n=31)	Уровень достоверности (p)
CCL20/MIP3a	37,8 (35,4-39,4)	38,9 (30,7-67,2)	0,570
GM-CSF	275,9 (255,1-326,7)	316,7 (190,6-394,8)	0,222
IFN γ	3,7 (3,1-3,7)	3,7 (3,1-6,2)	0,012
IL-10	3,6 (3,4-3,7)	4,2 (2,6-6,8)	0,203
IL-12p70	2,4 (2,3-2,9)	3,5 (2,6-4,0)	0,002
IL-13	263,2 (100,3-370,1)	322,8 (117,0-527,5)	0,504
IL-15	8,0 (7,5-8,4)	9,2 (6,3-9,2)	0,203
IL-17A	0,5 (0,4-0,7)	0,6 (0,4-0,7)	0,570
IL-17E/IL-25	21,1 (16,3-24,0)	26,3 (15,3-97,8)	0,241
IL-17F	37,9 (24,5-40,1)	41,2 (24,5-96,6)	0,262
IL-1 β	0,2 (0,2-0,6)	0,4 (0,3-0,5)	0,042
IL-2	8,8 (7,4-8,8)	8,1 (3,4-10,3)	0,985
IL-21	10,2 (7,4-12,2)	11,9 (7,4-16,3)	0,037
IL-22	973,3 (934,2-986,3)	1102,0 (655,3-2369,0)	0,413
IL-23	1025,0 (960,8-1025,0)	1343,0 (642,4-4515,0)	0,060
IL-27	605,7 (535,0-622,1)	798,6 (432,2-1105,0)	0,025
IL-28A	231,1 (206,7-302,1)	302,1 (206,7-302,1)	0,385
IL-31	41,6 (35,1-42,7)	50,5 (35,1-238,3)	0,020
IL-33	20,9 (16,1-22,1)	30,6 (17,9-97,7)	0,115
IL-4	95,2 (85,6-133,9)	85,6 (76,1-495,0)	0,203
IL-5	5,3 (4,5-6,8)	6,5 (3,7-8,4)	0,536
IL-6	6,6 (5,4-8,5)	7,3 (4,6-10,5)	0,622
IL-9	6,1 (5,2-12,7)	8,5 (5,2-10,2)	0,604
TNF α	17,9 (16,5-24,7)	21,9 (19,1-60,4)	0,022
TNF β	8,1 (8,0-32,1)	17,6 (10,0-27,6)	0,358

Проведенный ROC-анализ уровня циркулирующих цитокинов у детей с псориазом до назначения биологической терапии показал разную степень качества разделительной модели для IFN γ , IL-12p70, IL-1 β , IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNF α .

Наилучшее качество разделительной модели получено для IFN γ (AUC - 0,952), IL-23 (AUC - 0,970), IL-27 (AUC - 0,970) и IL-31 (AUC - 0,973) (Таблица 3.32). До начала биологической терапии пороговые значения составили: IFN γ - 3,7 пг/мл, IL-12p70 - 3,2 пг/мл, IL-21 - 12,1 пг/мл, IL-23 - 1057 пг/мл, IL-27 - 669 пг/мл, IL-31 - 43 пг/мл, TNF α - 22,5 пг/мл (Таблица 3.32). При превышении уровня указанных цитокинов выше пороговых значений можно ожидать хороший ответ биологической терапии.

Таблица 3.32 – ROC-анализ и пороговое значение уровня циркулирующих цитокинов в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом

Показатель	Площадь под ROC-кривой AUC (CI), p<0,05	Пороговое значение, пг/мл	Чувствительность	Специфичность
IFN γ	0,952(0,900-1,0)	3,7	81%	88%
IL-12p70	0,833(0,723-0,944)	3,2	77%	88%
IL-1 β	0,667(0,510-0,823)	0,4	57%	63%
IL-21	0,810(0,695-0,925)	12,1	57%	63%
IL-23	0,970(0,928-1,0)	1057	95%	88%
IL-27	0,970(0,933-1,0)	669	81%	88%
IL-31	0,973(0,921-1,0)	43	95%	100%
TNF α	0,786(0,660-0,911)	22,5	62%	63%

Анализ количества клеток с транслокацией NF- κ B и эффективности биологической терапии у детей с псориазом показал достоверно более низкий процент активированных клеток во всех изученных популяциях на момент индукционного курса и к году терапии ГИБП, причем степень снижения активности NF- κ B зависела от популяции клеток (Таблица 3.33).

Таблица 3.33 – Количество клеток с транслокацией NF-κB (%) в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом с разной эффективностью биологической терапии на 0, 16 и 52 неделях терапии ГИБП

Популяция	Длительность терапии ГИБП, неделя	Группа 1 Недостаточный эффект	Группа 2 Достижение PASI 75	p
В-лимфоциты	0	45,4 (32,4-72,0)	45,7 (30,1-70,6)	0,835
	16	51,5 (42,9-79,4)	41,6 (29,7-62,0)	0,004
	52	54,5 (38,3-64,7)	39,8 (28,2-52,7)	0,001
Т-лимфоциты	0	18,7 (16,3-27,2)	20,4 (10,8-56,1)	0,471
	16	21,6 (20,9-40,4)	19,3 (13,8-29,6)	< 0,001
	52	23,1 (21,5-25,0)	18,2 (15-25,1)	< 0,001
Т-хелперы	0	19,1 (17,1-28,4)	20,4 (14,8-56,4)	0,508
	16	22,8 (19,6-43,2)	19,5 (14,0-25,8)	0,007
	52	21,4 (18,6-24,7)	17,1 (12,7-20,5)	< 0,001
Цитотоксические Т-лимфоциты	0	17,9 (14,2-25)	19,1 (9,9-56,2)	0,571
	16	20,9 (18,7-4,7)	16,5 (13,5-28,4)	< 0,001
	52	21,9 (20,8-24,9)	17,0 (9,2-20,2)	< 0,001
Незрелые Т-лимфоциты	0	25,5 (20,7-42,6)	28,5 (4,6-80,5)	0,829
	16	43,0 (32,7-48,2)	21,3 (14,2-35,6)	< 0,001
	52	31,4 (27,8-38,9)	20,9 (14,5-29,2)	< 0,001
NK-клетки	0	32,0 (21,9-47,4)	34,2 (16,0-59,0)	0,725
	16	46,3 (39,3-56,9)	25,1 (12,9-49,8)	< 0,001
	52	43,7 (38,6-45,7)	19,4 (10,6-29,4)	< 0,001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ Т-клетки	0	23,4 (16,6-39,2)	23,8 (13,2-62,7)	0,966
	16	38,1 (30,8-39,7)	19,6 (13,3-30,4)	< 0,001
	52	26,9 (24,6-39,3)	17,4 (9,5-25,5)	< 0,001
Активированные Т-хелперы	0	21,8 (14,9-25,4)	20,3 (9,6-54,8)	0,872
	16	21,3 (20,8-38,8)	18,1 (12,6-28,6)	0,001
	52	29,7 (19,4-31,1)	16,5 (10,9-21,1)	< 0,001
Регуляторные Т-лимфоциты	0	25,3 (20,6-34,2)	26,4 (11,7-56,5)	0,655
	16	31,9 (20,4-48,4)	20,4 (15,7-38,6)	0,001
	52	32,5 (32,4-39,1)	20,6 (10,5-22,3)	< 0,001
Т-хелперы 17 типа	0	21,5 (17,6-30,7)	22,1 (11,9-54,3)	0,882
	16	23,7 (23-36,5)	18,4 (13,3-23,8)	< 0,001
	52	22,4 (19,9-27,1)	16,1 (11,8-17,9)	< 0,001
Цитотоксические Т-хелперы 17 типа (Тс17)	0	23,7 (16,7-33,8)	26,4 (8,6-69,9)	0,373
	16	39,4 (35,9-45,7)	19,5 (12,7-28,2)	< 0,001
	52	32,1 (31,8-32,6)	15,2 (12,6-25,5)	< 0,001

До назначения биологической терапии группы 1 и 2 не отличались по уровню транслокацией NF-κB в изученных популяциях клеток (Таблица 3.33). При этом существенно отличалась динамика показателей в течение

года у пациентов с разной эффективностью терапии. Оценка динамики количества клеток с транслокацией NF-κB до назначения ГИБП и к году терапии у детей с псориазом показала, что максимальная степень снижения показателя наблюдалась в популяции NK-клеток в группе детей с хорошим эффектом.

При достижении PASI 75 к 16 неделе биологической терапии выявлено снижение NK-клеток с транслокацией NF-κB на 27% ($p=0,013$) и на 43% к году лечения ГИБП ($p<0,001$) относительно показателей до назначения препаратов. По уровню транслокации NF-κB в NK-клетках группы 1 и 2 отличались как на 16 неделе терапии, так и к году лечения, в группе с недостаточным эффектом количество NK-клеток с транслокацией NF-κB было достоверно выше (Рисунок 3.69, Таблица 3.33).

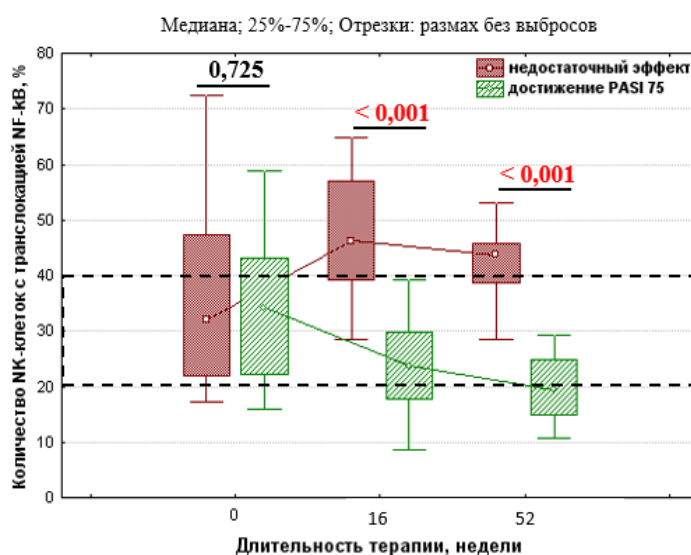


Рисунок 3.69 – Содержание NK-клеток с транслокацией NF-κB при недостаточном эффекте (НЭ) и достижении PASI 75 у детей с псориазом на 0, 16, 52 неделе ГИБП

У пациентов при достижении PASI 75 наблюдалось достоверное снижение уровня транслокации NF-κB на 16 неделе и к году терапии в Т-лимфоцитах ($p<0,001$), В-лимфоцитах ($p=0,002$), Т-хелперах ($p<0,001$), цитотоксических Т-лимфоцитах ($p=0,001$) и NK-клетках ($p<0,001$). У пациентов недостаточным эффектом, наоборот, наблюдалось достоверное повышение активности NF-κB в популяциях лимфоцитов относительно

исходных значений: Т-лимфоцитах ($p=0,011$), NK-клетках ($p=0,001$) и цитотоксических Т-лимфоцитах ($p=0,009$).

Оценка содержания субпопуляций $CD4^+$ -Т-клеток с транслокацией NF- κ B в зависимости от эффективности биологической терапии у детей с псориазом показала, что к 16 неделе терапии при достижении PASI 75 наблюдалось снижение активности NF- κ B в популяциях Tc17 на 26% ($p=0,003$), в Treg на 23% ($p=0,001$), тогда как в Th17 на 17% ($p=0,001$) и Thact на 11%, при этом содержание активированных клеток в этих популяциях уже находилась в пределах референсных значений (Рисунок 3.70; Рисунок 3.71).

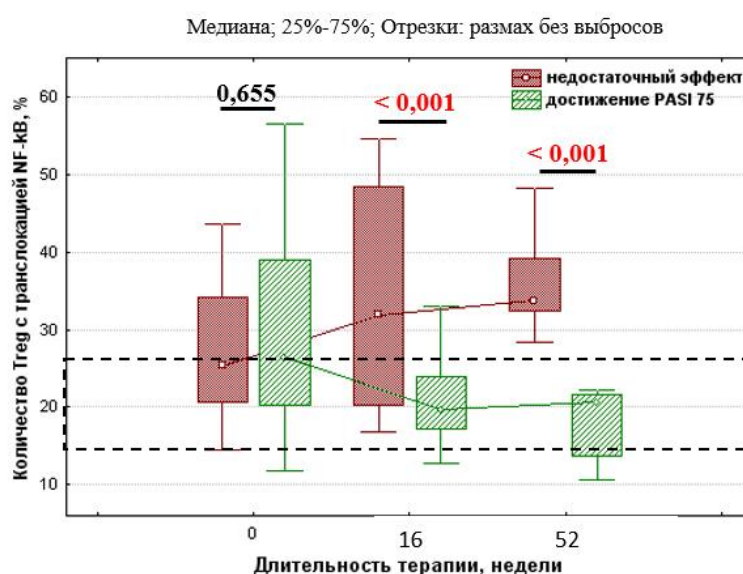


Рисунок 3.70 – Содержание Treg с транслокацией NF- κ B при недостаточном эффекте (НЭ) и достижении PASI 75 у детей с псориазом на 0, 16, 52 неделе ГИБП

Наибольшее снижение количества активированных клеток к году лечения ГИБП у детей с псориазом выявлены для Tc17 на 42% ($p<0,001$) при хорошем эффекте биологической терапии, относительно значений до начала терапии. Также при достижении PASI 75 к году применения ГИБП выявлено снижение активности NF- κ B в Th17 на 27% ($p<0,001$), Treg на 22% ($p<0,001$), и Thact на 19% ($p=0,003$; Рисунок 3.71).

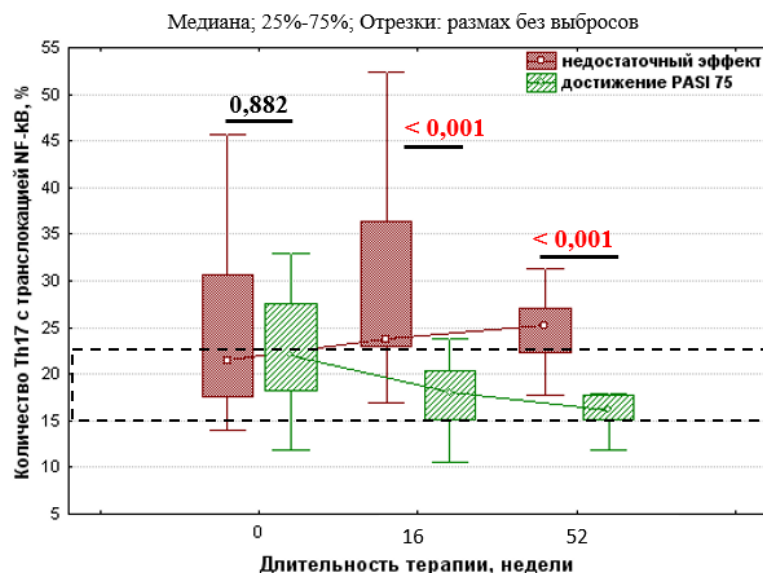


Рисунок 3.71 – Содержание Th17 с транслокацией NF-κВ при недостаточном эффекте (НЭ) и достижении PASI 75 у детей с псориазом на 0, 16, 52 неделе ГИБП

Динамика содержания субпопуляций CD4⁺-Т-клеток с транслокацией NF-κВ к году лечения ГИБП при недостаточном эффекте показала достоверное повышение активности NF-κВ в Treg ($p < 0,001$) и Thact ($p < 0,001$), существенных изменений активности NF-κВ в Tc17 и Th17 не выявлено (Таблица 3.33).

Проведение множественного пошагового регрессионного анализа позволило определить наиболее информативные популяции клеток с транслокацией NF-κВ у детей с псориазом для оценки эффективности биологической терапии. Анализ регрессионного уравнения показал, что у детей с псориазом эффективность биологической терапии на 16 и 52 неделе достигается при снижении уровня транслокации NF-κВ в NK-клетках, CD8⁺ Т-клетках, Thact и Th17 относительно исходного уровня (Таблица 3.34, Рисунок 3.72).

Таблица 3.34 – Уравнение множественной регрессии для PASI 75 в зависимости от количества клеток транслокацией NF-κB у детей с псориазом. Для построения уравнений регрессии использовали метод множественный пошаговой регрессией с исключениями. p – достоверность отличия коэффициентов регрессии от 0

Уравнение множественной регрессии				
Зависимая переменная: PASI 75				
Переменная	Коэффициент регрессии	Ошибка коэффициента	t-критерий	p
Длительность ГИБП – 0 недель				
Свободный член	0,66	0,23	2,91	0,005
В-лимфоциты	-0,01	0,004	-2,39	0,020
Длительность ГИБП – 16 недель				
Свободный член	3,46	0,104	16,25	< 0,001
NK-клетки	-0,02	0,003	-6,55	< 0,001
Thact	-0,03	0,007	-4,75	< 0,001
CD8 клетки	-0,04	0,013	-2,81	0,006
Th17-лимфоциты	-0,02	0,007	-2,20	0,031
Длительность ГИБП – 52 недели				
Свободный член	2,8	0,167	12,70	< 0,001
Th17-лимфоциты	-0,06	0,008	-7,58	< 0,001
NK-клетки	-0,02	0,004	-5,64	< 0,001
В-лимфоциты	-0,01	0,003	-2,32	0,023
Thact	-0,01	0,005	-2,18	0,033

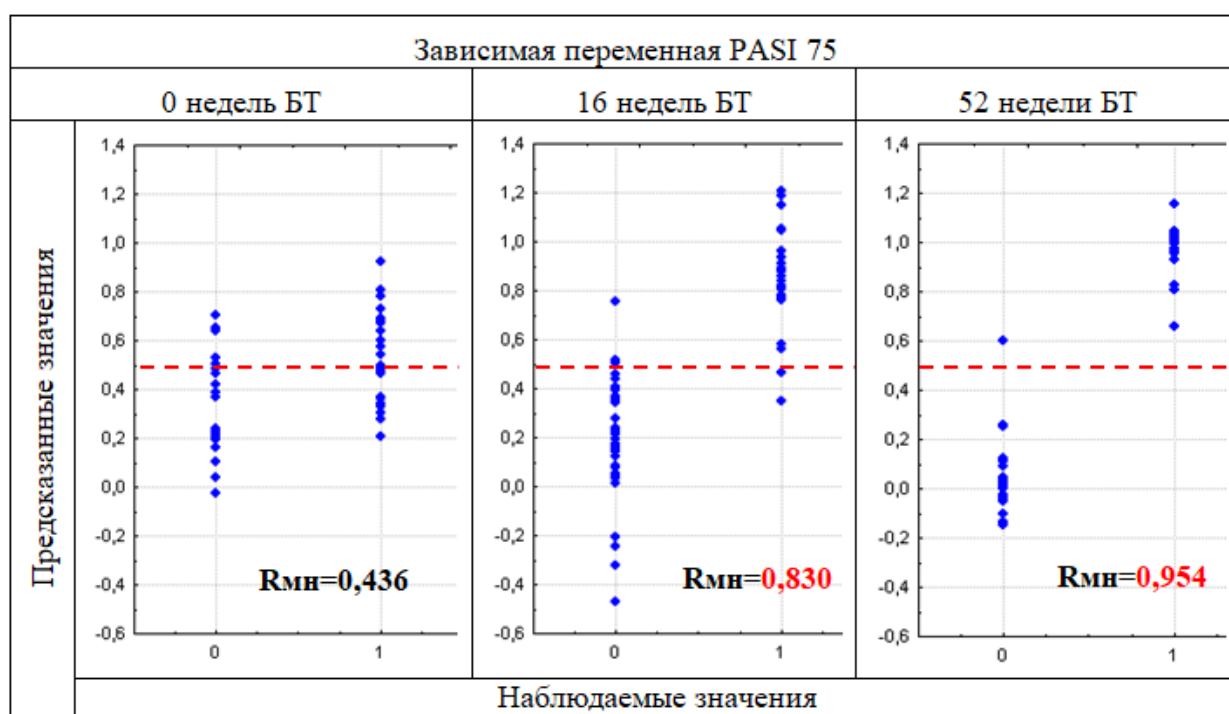


Рисунок 3.72 – Наблюдаемые и предсказанные значения эффективности ГИБП по уравнению регрессии (Таблица 7.16) на 0, 16, 52 неделе терапии по уровню транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов

Исходя из множественных коэффициентов регрессии, следует, что до начала терапии ГИБП группы 1 и 2 не отличались, а к 16 неделе и к году терапии наблюдалось достоверное различие групп по совокупности показателей активности NF-κB в популяциях лимфоцитов (Рисунок 3.72).

Для прогноза эффективности применения ГИБП у детей с псориазом был проведен ROC-анализ содержания популяций лимфоцитов с транслокацией NF-κB на момент окончания индукционного курса лечения. Получено отличное качество разделительной модели для NK-клеток (AUC-0,936), Th17-лимфоцитов (AUC-0,930), CD8-клеток (AUC-0,923; Таблица 3.35).

Таблица 3.35 – ROC-анализ и пороговое значение содержания популяций лимфоцитов с транслокацией NF-κB в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом

Показатель	Площадь под ROC-кривой AUC (CI), $p < 0,05$	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность
16 недель биологической терапии				
NK-клеток	0,936(0,888-0,985)	32%	87%	84%
Th17-лимфоцитов	0,930(0,872-0,987)	22%	93%	93%
CD8-клеток	0,923(0,861-0,935)	19%	89%	86%

Неэффективность применения ГИБП у детей с псориазом можно ожидать при содержании NK-клеток с транслокацией NF-κB выше 32%, Th17-лимфоцитов более 22% и CD8-клеток более 19% на 16 неделе терапии (Рисунок 3.73, Таблица 3.35).

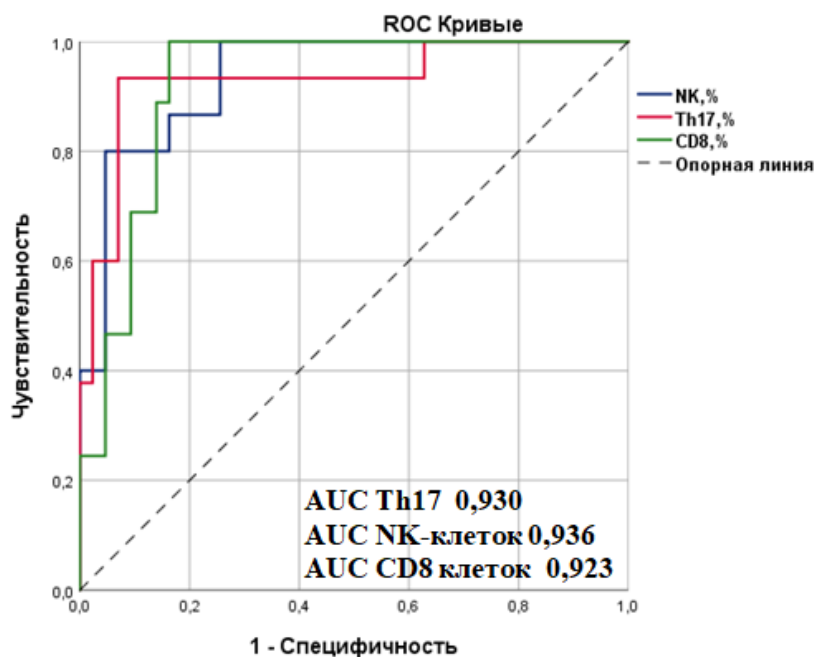


Рисунок 3.73 – ROC-кривые содержания NK-клеток, Th17-лимфоцитов и CD8⁺T-клеток с транслокацией NF-κB в прогнозе эффективности ГИБП у детей с псориазом на 16 неделе биологической терапии

Таким образом, для прогноза эффективности ГИБП у детей с псориазом необходимо учитывать динамику уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов к окончанию индукционного курса терапии. Выявление наиболее информативные показатели уровня транслокации NF-κB и их пороговые значения.

Таким образом, проведенный анализ позволил выделить наиболее информативные иммунологические показатели в прогнозе и оценке эффективности ГИБП у детей с псориазом. Анализ динамики содержания основных и малых популяций лимфоцитов в течение года биологической терапии у детей с разной эффективностью терапии показал, что наиболее значимые изменения выявлены в содержании популяций Th17-лимфоцитов и Treg и их отношения (Th17/Treg). Показана информативность данных показателей до начала терапии и динамика их к концу индукционного курса. При отклонении Thact выше 181% (от возрастной нормы) и Th17/Treg выше 2,6 до назначения ГИБП в 75% случаев можно ожидать недостаточную эффективность биологической терапии к году. Анализ на 16 неделе показал,

что при отклонении Th17 выше 102 % вероятность неэффективного лечения составляет 82% и составляет 68% при отношении Th17/Treg выше 2,6.

У детей с псориазом при хорошем эффекте биологической терапии выявлено более высокое содержание MDSCs до начала терапии и в течение года терапии, чем в группе детей с недостаточной эффективностью.

Оценка содержания субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти в прогнозе эффективности применения ГИБП у детей с псориазом до назначения биологической терапии показала, что при уровне наивных Т-клеток (T_{NAIVE}) выше 59% от CD4 с вероятностью 79% можно ожидать достижение PASI 75 к году терапии. Кроме того, при выявлении эффекторных клеток памяти (T_{EM}) более 13% от CD4 с вероятностью 83% можно прогнозировать недостаточный эффект ГИБП к году терапии.

Показана важность оценки функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов в процессе лечения у детей с псориазом. При снижении активности СДГ в Treg ниже 185 усл.ед. после 16 недель биологической терапии возрастает вероятность неэффективности ГИБП к году лечения.

Анализ активности ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов при разной эффективности биологической терапии псориаза у детей показал достоверное снижение активности ГФДГ в Т-лимфоцитах при недостаточном эффекте ГИБП до назначения биологической терапии. Снижение активности ГФДГ в НК-клетках после 16 недели терапии является фактором риска неэффективности ГИБП к году лечения. В группе детей с хорошим эффектом ГИБП уже к 16 неделе терапии выявлено достоверное повышение активности фермента, которое сохраняется к году.

Анализ содержания субпопуляций CD4⁺-Т-клеток с экспрессией CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидаз у детей с псориазом показал, что недостаточный эффект ГИБП можно ожидать, если уровень CD39⁺Tregs до начала терапии превышает 35% от Tregs и в процессе лечения уменьшается до уровня 20% и ниже. Для прогноза эффективности важно оценивать

исходный уровень экспрессии эндонуклеотидазы CD39⁺ на Tregs и динамику показателя в процессе лечения.

ROC-анализ уровня циркулирующих цитокинов у детей с псориазом до назначения биологической терапии показал, что при превышении уровня цитокинов выше пороговых значений можно ожидать достижение PASI 75 к году терапии: IFN γ - 3,7 пг/мл, IL-12p70 - 3,2 пг/мл, IL-21 - 12,1 пг/мл, IL-23 - 1057 пг/мл, IL-27 - 669 пг/мл, IL-31 - 43 пг/мл, TNF α - 22,5 пг/мл.

Для прогноза эффективности ГИБП у детей с псориазом необходимо учитывать динамику уровня транслокации NF- κ B в популяциях лимфоцитов к окончанию индукционного курса. Получено отличное качество разделительной модели «PASI 75 – НЭ» (AUC>0,9) для NK-клеток, Th17-лимфоцитов, CD8⁺-Т-клеток. При содержании NK-клеток с транслокацией NF- κ B выше 32%, Th17 более 22% и CD8⁺ Т-клеток более 19% на 16 неделе терапии можно ожидать неэффективность применения ГИБП у детей с псориазом.

Таким образом, прогноз эффективности ГИБП у детей с псориазом возможен по содержанию Th17 и Treg, уровню провоспалительных циркулирующих цитокинов до назначения биологической терапии. Ранними маркерами ответа на терапию ГИБП являются динамика активности дегидрогеназ в Treg и NK-клетках, CD39⁺-эктонуклеотидазы в Treg и уровень транслокации NF- κ B в цитотоксических Т-лимфоцитах, NK-клетках и Th17-лимфоцитах.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Псориаз является иммуноопосредованным воспалительным многофакторным заболеванием кожи со сложным патогенезом, обусловленным взаимодействиями между иммунной системой, локусами восприимчивости к псориазу, аутоантигенами псориаза и факторами окружающей среды [31, 99, 191]. Псориаз характеризуется гиперпролиферацией кератиноцитов, расширением кровеносных сосудов, воспалительной инфильтрацией лейкоцитов в дерме и образованием на коже бляшек [29, 71, 160]. Не смотря на значительные успехи в системном лечении псориаза, в последние годы у детей сохраняется рост тяжелых инвалидизирующих форм псориаза [30, 44].

Лечение псориаза у детей включает алгоритмы наружной и системной терапии, основанные на клинической оценке характерных признаков и изменений на коже пациента [21, 22, 91, 204]. При среднетяжелом и тяжелом течении заболевания, а также при неэффективности ранее применяемой терапии, используются генно-инженерные биологические препараты [10, 113, 231, 242]. Таргетное действие ГИБП основано на блокаде основных провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL-17, IL-12 и IL-23 [22, 46, 115]. За последнее десятилетие применение биологической терапии у детей с псориазом показало свою эффективность в достижении продолжительной ремиссии и значительно улучшило качество жизни пациентов [85, 120, 274]. Однако, в последнее время все чаще встречаются случаи развития резистентности к проводимой терапии ГИБП в детском возрасте, требующие отмены или замены препарата [105, 114, 138, 148]. Факторами потери ответа на терапию ГИБП являются выработка антител к биологическим препаратам или снижение уровня препаратов в сыворотке крови [18, 27, 53, 123, 244]. В настоящее время отсутствуют четкие лабораторные маркеры прогноза эффективности ГИБП у детей с псориазом.

Учитывая рост заболеваемости псориазом у детей, наличие тяжелых форм, развитие резистентности к проводимой биологической терапии, цель данного исследования состояла в оценке комплекса иммунологических показателей для прогноза эффективности применения ГИБП при данной патологии. Для решения поставленных задач обследовано 277 детей с обыкновенным вульгарным псориазом в возрасте от 1,5 до 18 лет разной степени тяжести (индекс PASI изменялся от 0 до 68), часть из которых обследованы в динамике. На первом этапе работы анализировали иммунологические показатели у детей с вульгарным псориазом, получавших разную патогенетическую терапию (наружную, терапию метотрексатом, анти-TNF, анти-IL12/23) относительно группы сравнения (n=90). Для выявления потенциальных иммунологических критериев эффективности ГИБП на следующем этапе работы у 110 детей с вульгарным псориазом проводили оценку исследуемых параметров на 0, 16 и 52 неделе терапии адалимумабом, этанерцептом и устикинумабом. Клиническую эффективность проводимой биологической терапии оценивали по достижению критерия PASI 75 к году лечения. В группу с недостаточным эффектом ГИБП вошло 52 ребенка (менее PASI 75), и 58 детей составили группу пациентов с хорошим эффектом биологической терапии.

В качестве потенциальных критериев эффективности ГИБП у детей с псориазом были выбраны наиболее патогенетически значимые показатели иммунной системы. Оценивали содержание основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови, клеток-супрессоров миелоидного происхождения, количество субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти периферической крови, активность метаболизма иммунных клеток, активность ферментов пуринергической регуляции (CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидаз), комплекс циркулирующих цитокинов и уровень транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов.

4.1. Зависимость показателей клеточного иммунитета от клинических характеристик детей с вульгарным псориазом

Считается, что центральную роль в развитии воспаления кожи при псориазе играет синтез активированными Т-лимфоцитами провоспалительных цитокинов, запускающих патогенетический каскад [111, 233, 270]. Действие цитокинов обуславливает пролиферацию кератиноцитов, гиперплазию эпидермиса, миграцию нейтрофилов, усиление иммунной реакции по пути Т-хелперов 1 и 17 типов [23, 132, 270]. Различные провоспалительные цитокины (TNF α , IFN γ , IL-6, IL-17, IL-21, IL-23), вовлеченные в это иммуноопосредованное заболевание, продуцируются клетками-эффекторами иммунной системы и кератиноцитами [99, 111, 234]. Повышенное содержание провоспалительных цитокинов является важным фактором формирования псориазных поражений кожи. Отличительной чертой псориаза является устойчивое воспаление, которое приводит к неконтролируемой пролиферации кератиноцитов и их дисфункциональной дифференцировке [103, 111]. Патофизиология псориаза связана не только с активацией провоспалительных реакций, а также со снижением противовоспалительных функций иммуносупрессивных клеток (Treg, Breg, MDSCs) [154, 188, 193, 199].

В нашей работе исследование клеточного иммунитета у детей с псориазом включало определение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, NK-клеток, CD3⁺CD56⁺ Т-клетки, активированных Т-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, активированных Т-хелперов, Th17-лимфоцитов, Th2-лимфоцитов, CD5⁺ В-клеток и CD5⁻ В-клеток. Оценка содержания субпопуляций клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSCs) включала выделение популяции клеток, не несущих на себе линейные лимфоцитарные маркеры CD3, CD19, CD56, негативные по HLA-DR и позитивные по специфическим маркерам CD11b и CD33. По маркерам CD14

и CD15 проводили разделение субпопуляций клеток на моноцитарную и гранулоцитарную субпопуляцию. Анализ содержания субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти включал определение наивных Т-клеток, центральных, эффекторных и терминально-дифференцированных эффекторных Т-клеток.

В результате проведенного нами исследования получено, что возрастная динамика содержания основных популяций лимфоцитов у детей с вульгарным псориазом соответствовала динамике в группе сравнения: абсолютное количество клеток в основных популяциях снижалось с возрастом на фоне повышения относительного содержания Т-лимфоцитов. В отношении малых популяций выявлена прямая зависимость относительного количества Th17-лимфоцитов и Thact с возрастом, при этом абсолютное количество этих популяций не зависело от возраста. Для популяции Treg отмечена обратная тенденция: относительное количество Treg не зависело от возраста детей, а абсолютное - снижалось с возрастом, повторяя динамику абсолютного содержания Т-хелперов. Выявленная возрастная зависимость популяций лимфоцитов соотносится с таковой у здоровых детей, описанной в работах Топтыгиной А.П. и Радыгиной Т.В. [54, 66].

Состав основных популяций лимфоцитов у детей с псориазом характеризуется значительной вариабельностью индивидуальных показателей и не имеет типичных изменений. Содержание НК-клеток у детей с псориазом снижено в 51% случаев, относительное количество Т-хелперов повышено в 47% случаев. Кроме того, отмечено значительное увеличение относительного количества (% CD4) активированных Т-хелперов в 77% случаев, Th17-лимфоцитов в 47% случаев, при этом уровень регуляторных Т-лимфоцитов не отличался от показателей группы сравнения. Аналогичное увеличение содержания Th17-лимфоцитов описано у взрослых пациентов с псориазом, что подтверждает основополагающую роль нарушения баланса аутоагрессивных и регуляторных клеток иммунной системы при данной патологии [36, 49, 167, 250, 281].

Содержание популяций лимфоцитов у детей с псориазом определялось возрастом, длительностью и тяжестью заболевания. Получена прямая зависимость индекса PASI и содержания Thact, Th17 и цитотоксических Т-лимфоцитов. Подобные результаты получены в отношении цитотоксических Т-лимфоцитов в работе Барило А.А. и др. (2019), которые показали, что содержание CD8⁺-Т-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с тяжелым течением псориаза значимо выше, чем при среднетяжелой степени заболевания и в контрольной группе [6]. В исследовании Kurihara К. и др. (2019) установлено, что CD8⁺-Т-клетки из пораженной кожи обладают повышенной цитотоксической способностью и активно пролиферируют при ингибировании Treg [161]. Проведение множественного пошагового регрессионного анализа позволило определить наиболее информативные показатели основных и малых популяций лимфоцитов в оценке тяжести поражения кожного покрова псориазом у детей. Анализ коэффициентов регрессии показал, что индекс PASI увеличивается при повышении относительного количества активированных Т-хелперов (% CD4), Th17-лимфоцитов (% CD4), CD3⁺CD56⁺ Т-клеток и CD5⁺ В-клеток (R_{мн}=0,68). Представленные зависимости тяжести псориаза по индексу PASI и клеток-эффекторов согласуются с результатами, полученными в различных исследованиях у взрослых пациентов с псориазом, что еще раз подтверждает важную роль клеточного иммунитета в развитии воспалительной реакции при этом заболевании [47, 74, 149, 259, 261].

Анализ содержания популяций лимфоцитов у детей с псориазом, получавших разную патогенетическую терапию, показал, что не зависимо от типа терапии содержание В-лимфоцитов было в пределах нормативных значений при большом разбросе показателей. Содержание NK-клеток у детей, получавших наружную терапию, терапию метотрексатом и анти-IL12/23, соответствовало нижней границе референсных значений, а в группе детей, получавших терапию блокаторами TNF α , было ниже нормы. Выявлено увеличение популяции Thact относительно группы сравнения у детей с

псориазом независимо от типа терапии. Аналогичные результаты, показанные у взрослых пациентов с псориазом, свидетельствуют о наибольшем влиянии анти-TNF терапии (адалимумаб, этанерцепт) на изменение количества лимфоцитов периферической крови, а также о значимом изменении в содержании малых популяций CD4⁺-Т-клеток (Th1, Th17, Treg) [57, 96, 179, 250, 253].

Миелоидные супрессорные клетки представляют гетерогенную популяцию незрелых миелоидных клеток, обладающих способностью подавлять иммунную систему [104, 203]. В последнее десятилетие MDSCs широко изучаются при различных патологических состояниях, а также в качестве терапевтической мишени в экспериментальных работах на животных [13, 42, 104, 157, 165, 255]. Существенный объем данных свидетельствует о том, что MDSCs играют решающую роль при хроническом воспалении, аутоиммунных заболеваниях, инфекциях, трансплантации, лекарственной устойчивости и метастазировании опухолей [104, 140, 174, 225, 277]. У здоровых людей MDSCs, присутствующие в кровотоке в небольшом количестве, участвуют в регуляции иммунных реакций и восстановлении тканей [256, 257]. При инфекции, воспалении и онкологических заболеваниях описано увеличение дифференцировки MDSCs и повышение содержания популяции в циркуляции [104, 157, 255]. Следовательно, выяснение роли MDSCs при псориазе имеет важное теоретическое и практическое значение. В нашем исследовании у детей с псориазом содержание MDSCs было значимо повышено относительно группы сравнения, что согласуется с результатами у взрослых пациентов с псориазом [97, 102, 238]. Увеличение популяции MDSCs происходило, в основном, за счет моноцитарной субпопуляции MDSCs и зависело от типа терапии. Наибольшее количество MDSCs выявлено у детей, получавших терапию блокаторами TNF α , относительно других типов терапии. Из-за фенотипической и функциональной гетерогенности точный механизм

развития, накопления и функционирования MDSCs нуждается в дальнейшем изучении.

Анализ содержания клеток памяти в периферической крови у детей с псориазом показал увеличение популяции центральных и эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти, центральных CD8⁺-Т-клеток памяти и снижение наивных CD4⁺-Т-клеток памяти с возрастом. Полученный результат соотносится с данными других исследований, показавших снижение наивных и увеличении центральных CD4⁺-Т-клеток памяти в периферической крови [60, 66, 217]. У детей с псориазом нами получены более высокие показатели эффекторных и терминально-дифференцированных CD8⁺-Т-клеток памяти по сравнению с CD4⁺-Т-клетками памяти. Возможно, это обусловлено важностью CD8⁺-Т-клеток в патогенезе псориаза и присутствием большого количества этих клеток в псориатических бляшках [7, 248].

Оценка содержания субпопуляций клеток памяти у детей с псориазом на разных типах терапии показала, что наибольшее количество эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти наблюдалось у детей, получавших наружную терапию ГКС, а наименьшее количество эффекторных CD8⁺-Т-клеток памяти – у детей на терапии метотрексатом, что вероятно, может объяснять положительный клинический эффект действия метотрексата. Таким образом, значительное увеличение относительного количества активированных Т-хелперов и Th17-лимфоцитов в периферической крови детей с псориазом является следствием их активной пролиферации в псориатических бляшках. Нами показана значимость содержания Thact, Th17, цитотоксических Т-лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов в оценке тяжести поражения псориазом, что может, является дополнительным лабораторным инструментом оценки тяжести заболевания.

4.2. Изменение метаболизма лимфоцитов при псориазе у детей

Каждый этап иммунного ответа характеризуется определенным метаболическим профилем лимфоцитов. Показано перепрограммирование различных метаболических путей иммунных клеток в состоянии активации и дифференцировки [94, 214, 229, 239]. Активированные Т-клетки эффекторы используют гликолиз для пролиферации и поддержания эффекторных функций. После активации $CD8^+$ Т-клетки увеличивают OXPHOS и увеличивают скорость гликолиза, даже до первого клеточного деления. Полностью дифференцированный $CD8^+$ Т-клетки используют гликолиз и OXPHOS [133]. Интенсивность метаболических процессов зависит от популяции лимфоцитов [133]. Метаболические изменения в эпителиальных и стромальных клетках в ответ на различные стимулирующие сигналы имеют решающее значение при воспалении и аутоиммунных заболеваниях, включая псориаз [35, 101, 239, 260, 273]. У детей с ВЗК показана информативность оценки интенсивности метаболизма клеток иммунной системы, в частности активности СДГ в Treg, для прогноза эффективности биологической терапии [63]. Помимо этого, показано, что пуриnergическая передача сигналов модулирует системные и местные воспалительные реакции при иммуноопосредованных заболеваниях [11, 55, 121, 136, 263].

Внеклеточный АТФ, относится к DAMP, является сильным провоспалительным сигналом и важной частью пуриnergической регуляции. Уровень внеклеточного АТФ регулируется каталитическими эффектами $CD39^+$ - и $CD73^+$ -эктонуклеотидаз [76, 121, 228, 279]. При псориазе D. Ferrari и соав. показали роль внеклеточного АТФ, который высвобождается в результате повреждения клеток кожи, и провоцирует развитие воспалительной реакции [125]. Ранее проведенные исследования по изучению пуриnergической регуляции у взрослых пациентов с псориазом выявили снижение экспрессии $CD73$ в популяции Tregs по сравнению со здоровыми людьми [143, 271, 280]. Yan K. и Bossennec M. В своих

исследованиях показали, что лечение метотрексатом у пациентов с вульгарным псориазом и псориатическим артритом восстанавливает иммуносупрессивную функцию Treg посредством усиления регуляции CD73 [90, 272]. Однако, исследования метаболизма лимфоцитов и пуринаргической регуляции в поддержании хронического воспаления при псориазе у детей не проводились.

Оценка интенсивности метаболизма клеток иммунной системы включала определение активности митохондриальных дегидрогеназ (сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ)) в популяциях лимфоцитов, активности аргиназы-1 – внутриклеточного фермента MDSCs и оценку содержания малых популяций CD4⁺-Т-клеток (Thact, Th17, Treg), экспрессирующих CD39⁺- или CD73⁺-эктонуклеотидазы.

СДГ – митохондриальный фермент, непосредственно связанный с митохондриальной мембраной, отражает интенсивность цикла Кребса и является II комплексом OXPHOS. ГФДГ - фермент, который наряду с NAD-зависимой ГФДГ, отражает работу глицерофосфатного челночного механизма по транспорту электронов из цитоплазмы (с процесса гликолиза) в цепь переноса электронов (на OXPHOS) в митохондриях [87, 94, 108, 282].

В нашем исследовании получено, что активность СДГ в основных и малых популяциях лимфоцитов у детей с псориазом значительно ниже, чем в группе сравнения, за исключением популяции активированных Т-хелперов и CD5⁺ В-клеток. Степень снижения активности СДГ зависела от популяции клеток, наибольшее снижение выявлено в НК-клетках. Активность ГФДГ значимо снижена в В-лимфоцитах и НК-клетках, что приводило к снижению активности фермента в общей популяции лимфоцитов. Тяжесть состояния пациентов по индексу PASI была тем выше, чем ниже активность СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов. Нами выявлено, что степень снижения активности митохондриальных ферментов СДГ и ГФДГ у детей с псориазом, получавших разную патогенетическую терапию, зависела от типа терапии и популяции клеток. Наибольшее снижение активности СДГ обнаружено в

группе детей, получавших анти-TNF терапию, в популяциях НК-клеток и В-лимфоцитов. Активность СДГ в Treg у детей, получавших наружную терапию, метотрексатом и блокаторами TNF α , была ниже уровня референсных значений. Полученные нами данные согласуются с данными Geltink R. и соав. (2018), которые показали, что в популяции Treg преобладают процессы OXP HOS и снижение интенсивности этих процессов приводит к снижению функциональной активности Treg [133].

Одним из механизмов развития иммуносупрессии служит истощение питательных веществ для Т-лимфоцитов. Описано, что MDSCs продуцируют фермент аргиназу-1, которая разрушает аргинин, вызывает повреждение ζ -цепи TCR и, тем самым, блокирует активацию и пролиферацию Т-клеток [104, 203]. В нашем исследовании получено, что уровень экспрессии аргиназы-1 в MDSCs у детей с псориазом достоверно увеличена относительно группы сравнения. Выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем экспрессии аргиназы-1 и относительным количеством G-MDSCs, M-MDSCs и обратная с M⁻G⁻-MDSCs. У детей в прогрессирующей стадии псориаза (PASI $\geq$ 10) уровень экспрессии фермента аргиназы-1 достоверно ниже, чем в стадии регресса заболевания, что свидетельствует о снижении иммуносупрессивных свойств MDSCs. Анализ активности митохондриальных дегидрогеназ и уровня экспрессии аргиназы-1 у детей с тяжелым течением заболевания (PASI $>$ 20) показал выраженное снижение активности СДГ в Treg, ГФДГ в общей популяции лимфоцитов и уровня экспрессии аргиназы-1 в MDSCs ($p<0,01$).

Эктонуклеотидазы CD39 и CD73 играют фундаментальную роль в поддержании концентрации внеклеточного АТФ, тем самым контролируя биохимический состав воспалительной среды [54, 56, 75, 136, 285, 264]. В связи с тем, что описана информативность определения эктонуклеотидаз при аутоиммунных заболеваниях, в проведенном нами исследовании был применен протокол определения количества клеток с экспрессией CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидаз в популяциях Treg, Thact, Th17. Результаты

показали, как у детей с псориазом, так и в группе сравнения количество клеток с экспрессией CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидаз определяется популяцией клеток. Содержание CD39⁺Tregs значимо превышало количество клеток в популяциях CD39⁺Thact и CD39⁺Th17, при этом количество CD39⁺Th17 было выше, чем CD39⁺Thact. Полученные нами данные согласуются с данными литературы о том, что эктонуклеотидаза CD39, которая последовательно превращает АТФ в АМФ, наиболее часто экспрессируется в популяции Treg [54, 55, 56, 142]. Результаты исследования Han L. и соав. по оценке количества CD39⁺Tregs, полученные у 10 взрослых пациентов с вульгарным псориазом, не показали достоверных отличий относительно здоровых доноров, но показали снижение CD39⁺Tregs при пустулезном псориазе [143]. Что касается эктонуклеотидазы CD73, которая превращает АМФ в провоспалительный аденозин, в нашем исследовании наибольшее содержание клеток с экспрессией CD73⁺ выявлено в популяции Thact как у детей с псориазом, так и в группе сравнения.

Особый интерес представляет популяция Th17 клеток с экспрессией CD39⁺ (supTh17), обладающая регуляторными и иммуносупрессивными свойствами [168, 279]. При ювенильном аутоиммунном заболевании печени и воспалительных заболеваниях кишечника показано снижение содержания популяции supTh17 [176]. В нашем исследовании также получено снижение supTh17 у детей с псориазом относительно группы сравнения, что может свидетельствовать о сохранении эффекторных свойств Th17 клеток.

У детей с псориазом при увеличении тяжести заболевания (PASI $\geq$ 10), наблюдается большой разброс показателя CD39⁺Tregs, выделяются пациенты, как с высоким, так и с низким содержанием CD39⁺Tregs, значимо отличающиеся от показателя в группе сравнения. С чем связано такое распределение CD39⁺Tregs предстоит выяснить. Можно предположить, что данный факт связан с разной активностью CD39⁺-эктонуклеотидазы. Так у детей с ВЗК в обострении заболевания увеличение количества клеток с экспрессией CD39⁺-эктонуклеотидазы в Treg связано с их функциональной

недостаточностью [56]. В стадии регресса заболевания (PASI<10) распределение пациентов по содержанию CD39⁺Tregs не отличается от здоровых детей (критерий χ^2 ; $p>0,01$) и достоверно отличается от распределения пациентов в стадии прогресса заболевания ($p<0,01$).

На всех типах патогенетической терапии у детей с псориазом выявляется большой разброс содержания популяций CD4⁺-Т-клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы. Получено снижение содержания CD39⁺Th17 у пациентов, получавших биологическую терапию и терапию метотрексатом. В процессе биологической терапии и при снижении индекса PASI, уменьшается количество пациентов со сниженной и повышенной экспрессией CD39⁺ в Tregs. Yan K. и Bossennec M. В своих исследованиях показали, что лечение метотрексатом у пациентов с вульгарным псориазом и псориатическим артритом восстанавливает иммуносупрессивную функцию Treg посредством усиления регуляции CD73⁺-эктонуклеотидазы [90, 272]. В нашем исследовании мы также выявили увеличение относительного количества CD73⁺Thact и CD73⁺Th17 у детей с псориазом относительно группы сравнения.

Таким образом, метаболическая активность клеток у детей с псориазом информативна в оценке тяжести состояния и должна учитываться наряду с количественным содержанием клеток в периферической крови.

4.3. Роль ядерного фактора транскрипции κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом

Сложный патогенез псориаза может быть объяснен изменением путей передачи внутриклеточных сигналов в иммунных клетках. Нарушение регуляции в этих путях передачи влияет на активацию иммунных клеток, пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов при псориазе [81, 187, 212, 243]. Одним из путей передачи внутриклеточных сигналов является путь активации ядерного фактора транскрипции κB , участвующего в регуляции большого количества провоспалительных генов. Активация фактора

транскрипции NF-κB влияет на продукцию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, непосредственно участвующих в развитии псориаза [81, 172, 211, 232, 243].

При псориазе показаны изменения сигнальных путей, включая JAK-STAT сигнальный путь, сигнальные преобразователи янус-киназы, сигнальные пути Akt и Wnt, а также сигнальный путь NF-κB [175, 172, 187, 212, 243, 268]. В нашем исследовании с помощью современной технологии ImageStream^X (Amnis ImageStream^X Mk II) методом проточной цитометрии с визуализацией была проведена оценка количества клеток с транслокацией NF-κB в основных и малых популяциях лимфоцитов у детей с псориазом.

Проведенный анализ показал, что уровень транслокации NF-κB у обследованных детей изменялся от 7,0 до 98% и зависел от популяции клеток. Наибольший процент активированных клеток с транслокацией NF-κB выявлен в популяции В-лимфоцитов. Полученные нами данные согласуются с данными других авторов, что наибольшее количество клеток с транслокацией NF-κB характерно для популяции В-лимфоцитов [81, 187]. У детей с псориазом выявлено увеличение процента активированных клеток с транслокацией NF-κB в Т-хелперах, Thact, Treg, Th17 и Tc17 относительно показателей группы сравнения. Полученный результат активации сигнального пути NF-κB в популяциях Т-клеток у детей с псориазом объясняет избыточную продукцию провоспалительных цитокинов, непосредственно участвующих в поддержании хронического воспаления в коже, что отмечено также в работах у взрослых пациентов [78, 81, 172, 193, 212, 243].

Для оценки действия ГИБП на активность NF-κB в популяциях лимфоцитов мы обследовали 42 ребенка с псориазом до и через сутки после введения препаратов: адалимумаба, этанерцепта, устекинумаба. Независимо от препарата через сутки после введения биологической терапии получено значимое снижение количества клеток с транслокацией NF-κB в Th17-лимфоцитах. В ответ на введение анти-TNF терапии выявлено снижение

процента активированных клеток в популяциях В-лимфоцитов и Т-хелперов. Через сутки после введения адалимумаба и этанерцепта также получено снижение количества клеток с транслокацией NF-κB в популяции CD8⁺-Т-клеток, Treg и Thact. Тогда как после введения устекинумаба наблюдалось снижение доли активированных клеток в НК-клетках, незрелых Т-лимфоцитах, Thact и Treg. Полученные нами результаты согласуются с данными о снижении активации NF-κB под действием анти-TNF терапии у взрослых пациентов с псориазом и объясняют один из механизмов действия этой терапии [51, 78, 179, 193, 276].

У детей с псориазом, как и в группе сравнения, выявлена обратная зависимость уровня транслокации NF-κB и активности митохондриальных дегидрогеназ (СДГ, ГФДГ) в популяциях лимфоцитов независимо от типа терапии. Исходя из полученных зависимостей, при снижении СДГ в Т-лимфоцитах и НК-клетках можно ожидать увеличение фактора транскрипции NF-κB. Это согласуется с описанным в литературе снижением процессов OXPHOS под действием члена семейства NF-κB RelA (p65) и стимуляции перехода OXPHOS к гликолизу [78]. На основании установленной обратной корреляционной зависимости уровня транслокации NF-κB и активности СДГ в лимфоцитах возможно использование доступного иммуноцитохимического метода для оценки активности NF-κB.

Являясь одним из факторов, регулирующих функциональную активность клеток, уровень транслокации NF-κB может рассматриваться как дополнительный критерий оценки тяжести состояния у пациентов с псориазом.

4.4. Информативность определения уровня циркулирующих цитокинов в сыворотке крови у детей с псориазом

В развитии воспаления при псориазе особое значение имеет дисбаланс про и противовоспалительных цитокинов [50, 60, 111, 132, 234]. Определение цитокинового профиля у детей с псориазом включало наиболее значимые

для данного заболевания противо- и провоспалительные цитокины, входящие в панель Human Th17. В работе анализировали плазменную концентрацию следующих цитокинов и хемокинов: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31, IL-33, GM-CSF, IFN γ , CCL20/MIP-3 α , TNF α и TNF β .

В исследовании у детей с псориазом отмечен повышенный плазменный уровень провоспалительных цитокинов – IL-23, IL-22, IL-12p70, IL-27, IL-17E, IL-17F, TNF α , продуцируемых активированными лимфоцитами и кератиноцитами [111, 199]. Наибольший уровень показателей в сыворотке крови выявлен для IL-23 и достигал 8300 пг/мл, IL-22 - 7000 пг/мл, IL-27 - 1900 пг/мл. Интересно отметить, что концентрация TNF α была повышена у 82% пациентов с псориазом. Полученные нами данные обосновывают правильность применения антицитокиновой терапии у детей с псориазом. Известно, что IL-23 усиливает пролиферацию и нарушает дифференцировку кератиноцитов, приводя к формированию характерных псориазических высыпаний на коже и акантозу эпидермиса [111, 163, 166, 195]. Повышенный уровень IL-17 и IL-22 согласуется с данными о ведущей роли этих цитокинов в прогрессировании иммуновоспалительного процесса [111, 270, 250, Furue M.2020]. IL-22 нарушает терминальную дифференцировку кератиноцитов, тем самым вызывая характерные нарушения в эпидермисе при псориазе [147, 163, 240].

У детей с псориазом для анализа взаимосвязей в цитокиновой сети были определены ранговые коэффициенты корреляции Спирмена для исследуемых цитокинов. Анализ показал высокую ($>0,7$; $n=88$) и очень высокую ($>0,9$) силу связи между цитокинами семейства IL-17 (IL-17E и IL-17F) и цитокинами семейства IL-12 (IL-23 и IL-27), а также с цитокинами IL-31 и IL-33, также получены значимые корреляции между гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором и цитокинами IL-2, IL-5, IL-9, IL-10, IL-15 и TNF α .

У детей с тяжелым течением псориаза (PASI>20) выявлено значимое увеличение провоспалительных цитокинов – IL-17A, TNF α , IL-2, IL-6 и IL-9, по сравнению с пациентами с легкой степенью тяжести заболевания. Полученные нами результаты о повышении уровня TNF α в сыворотке крови и его корреляция с PASI у детей с псориазом согласуются с данными других исследователей о важной роли этого цитокина в инициации и поддержании активности иммунной системы и воспалительной реакции кожи [111, 199, 234].

Результаты работы показывают влияние типа проводимой терапии у детей с псориазом на уровень циркулирующих цитокинов. Наибольший уровень цитокинов выявлен у детей с псориазом, находящихся на биологической терапии блокаторами TNF α и IL-12/23, а наименьший - на терапии наружными ГКС. Для пациентов с псориазом, получавших биологическую терапию, выявлено увеличение концентрации IL-12p70, GM-CSF, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1 β , IL-2, IL-21, IL-22, IL-23, IL-33, IL-6 и TNF α относительно группы детей на терапии наружными ГКС. Для детей с псориазом, получавших терапию метотрексатом, получено значимое увеличение уровня GM-CSF, IFN γ , IL-12p70, IL-15, IL-2, IL-21 и IL-5 относительно детей, получавших наружную терапию ГКС. Полученные результаты подтверждают тот факт, что дети с псориазом, получавшие системную и биологическую терапию, имеют повышенную активность заболевания и нуждаются в таргетных методах лечения. Ранее у взрослых пациентов с псориазом показаны корреляции ведущих провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-17) с активностью заболевания [19, 98, 184].

4.5. Значение прогностических критериев эффективности ГИБП у детей с псориазом

На следующем этапе работы для выявления наиболее значимых иммунологических показателей для прогноза и оценки эффективности ГИБП у 110 детей с вульгарным псориазом мы оценили показатели клеточного

иммунитета, активность метаболизма иммунных клеток и ферментов пуринаргической регуляции, уровень транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов и уровень циркулирующих цитокинов на 0, 16 и 52 неделе терапии адалимумабом, этанерцептом и устикинумабом. Эффективность проводимой биологической терапии оценивали по достижению клинического критерия PASI 75 к году терапии. По возрасту дети с псориазом в группах с разной эффективностью ГИБП не отличались: 12,3 (7,8-16,4) года против 12,5 (8,8-15,3) лет ($p=0,821$), что позволило проводить анализ иммунологических параметров, не учитывая возраст детей.

Анализ эффективности биологической терапии у детей с псориазом по индексу PASI показал, что до назначения биологической терапии группы с разной эффективностью ГИБП не отличались по тяжести заболевания, но начиная с 16 недели терапии в группе пациентов с хорошим эффектом индекс PASI значимо снижался и был ниже, чем в группе пациентов с недостаточным эффектом: в группе с хорошим эффектом ГИБП к концу индукционного курса PASI снижался с 20,1 (14-31) до 11,3 (7-15), $p_{0-16}=0,001$ и к году лечения ГИБП составлял 6,1 (1,5-9,9), $p_{16-52}=0,017$; в группе детей с недостаточным эффектом на 16 неделе терапии PASI составил 16,2 (15-21) ($p_{0-16}=0,956$) и к году терапии PASI был выше 10 баллов - 10,9 (4,9-22) ($p_{16-52}=0,092$).

Оценка динамики содержания основных и малых популяций лимфоцитов в течение года биологической терапии у детей с разной эффективностью показала, что наиболее значимые изменения выявлены в содержании популяций Th17-лимфоцитов, Treg и их отношения (Th17/Treg). В группе детей с недостаточным эффектом ГИБП содержание Th17 в течение года терапии было выше нормы и существенно не снижалось, а количество Treg достоверно уменьшалось к 52 неделе биологической терапии ($p=0,047$). В группе детей хорошим эффектом (PASI 75) содержание Th17 сохранялось в пределах нормативных значений, а количество Treg к году терапии увеличивалось ($p=0,040$). В исследовании Олисовой О.Ю. и др. (2020) на

примере 12 пациентов было также продемонстрировано влияние эффективного курса узкополосной средневолновой фототерапии на увеличение содержания Treg в периферической крови у взрослых пациентов с вульгарным псориазом при хорошем эффекте терапии [49]. Наши исследования согласуются с результатами у взрослых пациентов с псориазом о значительном увеличении содержания Th17-лимфоцитов и уменьшении доли Treg в периферической крови при недостаточной эффективности ГИБП [47, 158, 173, 200, 281, 283].

ROC-анализ показал информативность содержания малых популяций лимфоцитов до начала терапии и динамики к концу индукционного курса в прогнозе эффективности терапии ГИБП. При отклонении Thact выше 181% и Th17/Treg выше 2,6 до назначения ГИБП в 75% случаев можно ожидать недостаточную эффективность биологической терапии к году. Если к концу индукционного курса содержание Th17 превышает верхнюю границу возрастных нормативных значений (выше 102%) вероятность неэффективного лечения ГИБП увеличивается и составляет 82%.

У детей с псориазом при достижении PASI 75 к году лечения ГИБП выявлено увеличение содержания популяции MDSCs в 2,6 раз по сравнению с группой детей с недостаточной эффективностью терапии. Этот результат подтверждает основные иммуносупрессорные и регуляторные функции популяции MDSCs, за счет способности этих клеток, с одной стороны, к продукции противовоспалительных цитокинов (TGF β , IL-10) и поддержке Treg, а, с другой стороны, за счет увеличения активности аргиназы-1, что приводит к снижению активации и пролиферации Т-клеток при псориазе и других аутоиммунных заболеваниях [104, 140, 157, 203, 225, 226, 277].

Оценка содержания субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти у детей с псориазом до назначения биологической терапии и проведенные расчеты показали, что при уровне наивных Т-клеток (T_{NAIVE}) выше 59% от CD4⁺-Т-клеток с вероятностью 79% можно ожидать достижение PASI 75 к году терапии. Кроме того, при содержании эффекторных Т-клеток памяти

(T_{EM}) более 13% от CD4⁺-Т-клеток с вероятностью 83% можно прогнозировать недостаточный эффект ГИБП к году терапии. У взрослых пациентов с псориазом показано сохранение Т-клеток памяти в коже, что объясняет его неизлечимость и рецидивирующее течение [163, 198, 248, 270].

Проведенный нами анализ показал важность оценки интенсивности метаболизма в регуляторных Т-лимфоцитах для прогноза эффективности лечения у детей с псориазом. При снижении активности СДГ в Treg ниже 185 усл.ед. после индукционного курса биологической терапии у детей с псориазом возрастает вероятность потери эффекта ГИБП к году лечения. При анализе активности ГФДГ в популяциях лимфоцитов и прогноза эффективности биологической терапии псориаза у детей значимые изменения получены для популяции НК-клеток. В группе детей с хорошим эффектом ГИБП уже к 16 неделе терапии показано повышение активности ГФДГ в НК-клетках до 172 усл.ед., которое сохраняется к году терапии и соответствует диапазону нормативных значений. Ранее изучение метаболизма иммунных клеток у детей с псориазом не проводилось. Однако в исследовании Мирошкиной Л.В. и соавт. (2014), у детей с воспалительными заболеваниями кишечника показана информативность оценки активности СДГ в Treg для прогноза эффективности анти-TNF терапии [63]. Таким образом, у детей с псориазом положительный эффект биологической терапии сопровождается сохранением активности СДГ в Treg и активности ГФДГ в НК-клетках или умеренным увеличением активности ферментов в течение года терапии, что свидетельствует о нормальной работе митохондриального аппарата, сопряженности энергетических путей образования АТФ в клетке и соотносится с благоприятным течением псориаза.

Влияние генно-инженерной биологической терапии на пуринергическую регуляцию функционирования Т-клеток при аутоиммунных заболеваниях описано только в единичных работах. Так, Yan K. и Bossennec M. показали, что лечение метотрексатом у пациентов с

вульгарным псориазом и псориатическим артритом восстанавливает иммуносупрессивную функцию Treg посредством усиления регуляции CD73 [90, 272]. В нашем исследовании у детей с псориазом анализ содержания субпопуляций CD4⁺-Т-клеток с экспрессией CD39⁺- и CD73⁺-эктонуклеотидаз показал, что недостаточный эффект ГИБП можно ожидать, если уровень CD39⁺Tregs до начала терапии превышает 35% от Tregs и в процессе лечения уменьшается до уровня 20% и ниже. Для прогноза эффективности важно оценивать исходный уровень экспрессии CD39⁺-эктонуклеотидазы на Treg и динамику показателя в процессе лечения.

ROC-анализ уровня циркулирующих цитокинов у детей с псориазом до назначения биологической терапии показал, что у пациентов, отвечающих на терапию ГИБП, уровень цитокинов значительно выше, чем в группе детей с недостаточным эффектом. Если до назначения биологической терапии уровень циркулирующих цитокинов в сыворотке крови выше рассчитанных пороговых значений можно ожидать достижение PASI 75 к году терапии: IFN γ - 3,7 пг/мл, IL-12p70 - 3,2 пг/мл, IL-21 - 12,1 пг/мл, IL-23 - 1057 пг/мл, IL-27 - 669 пг/мл, IL-31 - 43 пг/мл, TNF α - 22,5 пг/мл. Диагностическая значимость циркулирующих цитокинов в прогнозе эффективности биологической терапии при псориазе у детей на сегодняшний день находится в стадии изучения. Исследования последних лет указывают на информативность оценки провоспалительных цитокинов (IL-12, IL-17, TNF α), напрямую участвующих в патогенезе псориаза, в качестве предикторов ответа на таргетную терапию заболевания у взрослых пациентов [189, 240, 252, 261]. В своем исследовании Lam C. Tsoi и др. методом РНК-секвенирования показали, что ответ на анти-TNF терапию сопровождается подавлением экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL-17 и TNF α , а контроль уровня IL-17 и TNF α может являться, по мнению авторов, предиктором клинического ответа на этанерцепт [252]. Решающая роль IL-17A при псориазе была доказана положительным клиническим ответом на терапию, снижающую уровень IL-17A в поврежденной коже [88, 89, 111].

Изменения в путях передачи внутриклеточных сигналов, влияющих на активацию иммунных клеток, пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов при псориазе, могут объяснить сложный патогенез заболевания [187, 212, 243]. Одним из центральных путей передачи внутриклеточных сигналов является сигнальный путь NF-κB, относящийся к универсальным факторам транскрипции, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла [175, 268]. В проведенном исследовании показано, что для прогноза эффективности ГИБП у детей с псориазом необходимо учитывать динамику уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов к окончанию индукционного курса. При хорошем эффекте биологической терапии у детей с псориазом показано снижение процента активированных клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов. Получено отличное качество разделительной модели «PASI 75 - недостаточная эффективность» ($AUC > 0,9$) для NK-клеток, Th17-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов. При содержании NK-клеток с транслокацией NF-κB выше 32% (ДС=84%), Th17 более 22% (ДС=93%) и CD8⁺-Т-клеток более 19% (ДС=86%) на 16 неделе терапии можно ожидать неэффективность применения ГИБП у детей с псориазом. Полученные нами результаты согласуются с данными о снижении активации NF-κB под действием анти-TNF терапии у взрослых пациентов с псориазом [51, 78, 179, 193, 276]. Влияние других таргетных биологических препаратов на изменение количества клеток с транслокацией NF-κB в настоящее время находится в стадии изучения, однако описано, что хроническое ингибирование пути NF-κB может приводить к снижению эффективности терапии иммунозависимых заболеваний и этим можно объяснить потерю эффективности ГИБП при длительном применении [206, 211, 216].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании представлен комплексный анализ показателей клеточного иммунитета (основные и малые популяции лимфоцитов, субпопуляции Т-клеток памяти, клетки-супрессоры миелоидного происхождения) у детей с вульгарным псориазом, который позволил выявить информативные диагностические лабораторные маркеры оценки тяжести заболевания и эффективности проводимого лечения. Тяжесть и распространенность псориаза у детей по индексам PASI и BSA напрямую коррелирует с содержанием Th17-лимфоцитов, активированных Т-хелперов, регуляторных Т-клеток и клеток-супрессоров миелоидного происхождения.

Изучение интенсивности метаболизма клеток иммунной системы у детей с вульгарным псориазом показало снижение активности митохондриальных дегидрогеназ в изученных популяциях лимфоцитов, при этом выявлено повышение иммуносупрессивных функций клеток-супрессоров миелоидного происхождения, за счет увеличения уровня экспрессии аргиназы-1.

В нашей работе подтверждена патогенетическая роль провоспалительных цитокинов в развитии и поддержании воспалительной реакции при псориазе у детей и показано, что уровень провоспалительных цитокинов напрямую отражает тяжесть заболевания по индексу PASI. Повышенный уровень провоспалительных цитокинов до назначения биологической терапии характерен для пациентов с эффективным лечением ГИБП.

В результате оценки количества клеток с транслокацией NF-κB в периферической крови у детей с псориазом впервые выявлено увеличение доли активированных клеток в популяциях Т-хелперов, Thact, Treg, Th17 и Tc17. Нами показано, что для прогноза эффективности ГИБП у детей с псориазом необходимо учитывать динамику уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов к окончанию индукционного курса и при снижении

показателя можно с высокой долей вероятности прогнозировать хороший эффект биологической терапии. Являясь одним из факторов, регулирующих функциональную активность клеток, уровень транслокации NF-κB может рассматриваться как дополнительный критерий оценки тяжести состояния у пациентов с псориазом. На основании установленной обратной корреляционной зависимости уровня транслокации NF-κB и активности сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах можно рекомендовать использование доступного иммуноцитохимического метода для оценки активности фактора транскрипции NF-κB.

В проведенном исследовании выявлены информативные иммунологические показатели, позволяющие прогнозировать эффективность биологической терапии у детей с псориазом на основании показателей до назначения терапии и их динамики к концу индукционного курса. Недостаточный эффект ГИБП можно прогнозировать на основании динамики CD39⁺Tregs к концу индукционного курса и активности СДГ в Treg после 16 недели биологической терапии. Эффективность применения ГИБП у детей с псориазом можно прогнозировать по содержанию активированных Т-хелперов, соотношению Th17/Treg, наивных и эффекторных Т-клеток памяти в периферической крови, уровню циркулирующих цитокинов в сыворотке крови до назначения биологической терапии.

ВЫВОДЫ

1. У детей с вульгарным псориазом возрастная динамика содержания основных популяций лимфоцитов соответствует динамике здоровых детей. С возрастом снижается абсолютное количество лимфоцитов, повышается относительное содержание Т-лимфоцитов, увеличивается относительное количество Th17-лимфоцитов, активированных Т-хелперов и снижается абсолютное количество Treg. Содержание центральных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти и эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти увеличивается, а наивных CD4⁺-Т-клеток памяти снижается с возрастом.

2. Состав основных популяций лимфоцитов у детей с псориазом характеризуется значительной вариабельностью индивидуальных показателей и не имеет типичных изменений: содержание NK-клеток снижено в 51% случаев, относительное количество Т-хелперов повышено в 47% случаев. У детей с псориазом отмечено значительное увеличение активированных Т-хелперов и популяции MDSCs ($p<0,01$) в периферической крови относительно показателей группы сравнения. Увеличение содержания Th17, Treg, MDSCs и M-MDSCs отражает активность заболевания по индексу PASI ($R_{\text{мн}}=0,63$; $p<0,01$), а увеличение содержания Thact и Th17 - по индексу BSA ($R_{\text{мн}}=0,57$; $p<0,01$).

3. Активность митохондриальных дегидрогеназ СДГ и ГФДГ снижена в основных популяциях лимфоцитов у детей с псориазом относительно группы сравнения. Активность СДГ в популяциях Th17, Treg и CD5⁺ В-клеток снижена, а уровень экспрессии аргиназы-1 в популяции MDSCs увеличен у детей с псориазом относительно группы сравнения ($p<0,01$). У детей с тяжелым течением заболевания ($\text{PASI}>20$) отмечено выраженное снижение активности СДГ в Treg, ГФДГ в общей популяции лимфоцитов и уровня экспрессии аргиназы-1 в MDSCs ($p<0,01$).

4. У детей с псориазом наибольшее содержание клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, выявлено в популяции Treg (Me

33 (21-42), %), а $CD73^+$ – в Thact (Me 18 (15-25), %). Содержание супрессорной популяции Th17 ($CD39^+Th17$) у детей с псориазом снижено относительно группы сравнения ($p<0,01$). При снижении индекса PASI происходит нормализация содержания $CD39^+Tregs$.

5. Уровень транслокации NF-κB в Т-хелперах, Thact, Treg, Th17 и Tc17 у детей с псориазом увеличен относительно группы сравнения ($p<0,05$). В ответ на введение ГИБП количество клеток с транслокацией NF-κB снижается и зависит от популяции лимфоцитов. Установлена обратная корреляционная зависимость уровня транслокации NF-κB и активности СДГ в лимфоцитах, как у детей с псориазом ($r=-0,44$; $p<0,01$), так и в группе сравнения ($r=-0,49$; $p<0,01$). При содержании NK-клеток с транслокацией NF-κB выше 32% ($Sp=84\%$), Th17 более 22% ($Sp=93\%$) и $CD8^+$ -Т-клеток более 19% ($Sp=86\%$) к окончанию индукционного курса можно прогнозировать неэффективность применения ГИБП у детей с псориазом.

6. При тяжелом течении псориаза у детей ($PASI>20$) уровень провоспалительных цитокинов (IL-17A, $TNF\alpha$, IL-2, IL-6, IL-9) повышен по сравнению с пациентами с легким течением ($PASI<10$; $p<0,05$). Для пациентов с хорошим эффектом ГИБП к году терапии выявлен более высокий исходный уровень цитокинов в сыворотке крови по сравнению с детьми, имеющими недостаточный эффект ($p<0,05$). При исходном уровне цитокинов выше пороговых значений ($IFN\gamma$ - 3,7 пг/мл, IL-12p70 - 3,2 пг/мл, IL-21 - 12,1 пг/мл, IL-23 - 1057 пг/мл, IL-27 - 669 пг/мл, IL-31 - 43 пг/мл, $TNF\alpha$ - 22,5 пг/мл) можно ожидать достижение PASI 75 к году терапии ГИБП.

7. Прогноз эффективности ГИБП у детей с псориазом возможен по оценке иммунологических показателей до назначения препаратов и к окончанию индукционного курса терапии. Недостаточный эффект ГИБП можно ожидать, если уровень $CD39^+Tregs$ до начала терапии превышает 35% от Tregs ($Se=72\%$, $Sp=67\%$, $p<0,05$) и в процессе лечения снижается менее 20% ($Se=73\%$, $Sp=69\%$, $p<0,05$). Снижение активности СДГ в Treg менее 185

усл.ед. (Se=81%, Sp=72%, $p<0,05$) после индукционного курса биологической терапии позволяет прогнозировать потерю эффекта ГИБП к году лечения.

8. Ранними прогностическими критериями неэффективности биологической терапии псориаза у детей являются: отклонение Thact выше 181% (Se=75%, Sp=76%, $p<0,05$), отношение Th17/Treg выше 2,6 (Se=73%, Sp=75%, $p<0,05$), содержание эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM}) более 13% от CD4 (Se=81%, Sp=83%, $p<0,05$) до назначения ГИБП.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для мониторинга воспалительного процесса у детей с вульгарным псориазом показано определение содержания активированных Т-хелперов, Th17-лимфоцитов, CD5⁺ В-клеток и CD3⁺CD56⁺ Т-клеток в периферической крови, отражающие тяжесть заболевания по индексу PASI.

2. В качестве лабораторных критериев оценки тяжести заболевания и эффективности биологической терапии у детей с псориазом рекомендовано определение активности митохондриальных дегидрогеназ (СДГ, ГФДГ) в популяциях лимфоцитов и уровень экспрессии аргиназы-1 в клетках-супрессорах миелоидного происхождения, наряду с содержанием популяций клеток.

3. При назначении биологической терапии всем детям с псориазом следует определять содержание активированных Т-хелперов, соотношение Th17/Treg, содержание эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти, уровень циркулирующих цитокинов (TNF α , IL-23, IL-27 и IL-31), что позволит прогнозировать эффект ГИБП и персонафицировано подходить к выбору тактики лечения.

4. У детей с вульгарным псориазом, получающих ГИБП, рекомендовано определение активности сукцинатдегидрогиназы и CD39⁺-эктонуклеотидазы в регуляторных Т-клетках после индукционного курса для оценки риска потери эффекта терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаскевич, В. П. Клинические особенности псориаза у детей и подростков / В. П. Адаскевич, М. А. Катина // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum. — 2018. — №. 2. — С. 83-88.
2. Амбарчян, Э. Т. / Современные подходы к терапии псориаза у детей с учетом особенностей коморбидного фона // Э. Т. Амбарчян, А. И. Материкин, С. Н. Турбовская [и др.] // Кремлевская медицина. Клинический вестник. — 2018. — №. 1. — С. 16-20.
3. Бакулев, А. Л. Современные проблемы генно-инженерной биологической терапии больных псориазом / А. Л. Бакулев // Вестник дерматологии и венерологии. — 2020. — Т. 96. — №2. — С. 51-57.
4. Бакулев, А. Л. Псориаз в педиатрической практике / А. Л. Бакулев, Е. Е. Тальникова // Вопросы современной педиатрии. — 2020. — Т. 19. — №. 6. — С. 496-499.
5. Барило, А. А. Иммунологические показатели у больных псориазом в зависимости от степени тяжести заболевания / А. А. Барило, С. В. Смирнова // Российский иммунологический журнал. — 2019. — Т. 13. — №. 2-1. — С. 147-149.
6. Барило, А. А. Теории развития псориаза и роль атопии среди общепринятых концепций / А. А. Барило, С. В. Смирнова // Клиническая дерматология и венерология. — 2021. — Т. 20. — №3. — С. 18-26.
7. Барковская, М. Ш. Содержание CD4⁺ и CD8⁺ эффекторных клеток памяти и пролиферативная активность Т-лимфоцитов при бронхиальной астме / М. Ш. Барковская, Е. А. Блинова, Л. В. Гришина [и др.] // Медицинская иммунология. — 2019. — Т. 21. — №3. — С. 503-516.
8. Будихина А. С. Роль гликолиза в иммунном ответе / А. С. Будихина, М. В. Пащенко // Иммунология. — 2021. — Т. 42. — № 1. — С. 5–20.

9. Галимова, Э. С. Миссенс-мутация Gln11Leu гена Toll-подобного рецептора 7 и предрасположенность к псориазу / Э. С. Галимова, К. Кинго, С. Кокс // Медицинская иммунология. — 2017. — Т. 19. — №. 3. — С. 267-274.
10. Галлямова, Ю. А. Метотрексат в дерматологии: от теории к практике / Ю. А. Галлямова, А. В. Асоскова // Лечащий врач. — 2021. — №. 5. — С. 46-51.
11. Головкин, А. С. Пуринергическая регуляция основных физиологических и патологических процессов / А. С. Головкин, И. А. Асадуллина, И. В. Кудрявцев // Медицинская иммунология. — 2018. — Т. 20. — №4. — С. 463-476.
12. Жукова, О. В. Эпидемиологические аспекты псориаза у детей / О. В. Жукова, Е. И. Касихина // Клиническая дерматология и венерология. — 2018. — Т. 17. — №. 5. — С. 24-29.
13. Заморина, С. А. Роль гликоделина в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорных клеток / С. А. Заморина, В. П. Тимганова, М. С. Бочкова [и др.] // Медицинская иммунология. — 2021. — Т. 23. — №. 4. — С. 641-646
14. Зурочка, А. В. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. / А. В. Зурочка, С. В. Хайдуков, И. В. Кудрявцев [и др.] - Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. — 720 с.
15. Иванов, Р. А. Важность и перспективы изучения выживаемости генно-инженерной биологической терапии при псориазе у детей / Р. А. Иванов // Медицинский алфавит. — 2022. — №. 8. — С. 80-85.
16. Иванов, Р. А. Выживаемость биологической терапии у детей, страдающих псориазом: когортное исследование / Р. А. Иванов, Н. Н. Мурашкин // Вопросы современной педиатрии. — 2021. — Т. 20. — №. 5. — С. 451-458.
17. Иванов, Р. А. Особенности применения генно-инженерной биологической терапии (устекинумаб) у детей с псориазом при наличии сопутствующего метаболического синдрома или неэффективности

предшествующей биологической терапии: клинические наблюдения / Р. А. Иванов, Н. Н. Мурашкин // Вопросы современной педиатрии. — 2022. — Т. 21. — №. 5. — С. 419-429.

18. Илларионов, А. С. Значение мониторинга уровня инфликсимаба и антител к нему в сыворотке крови для оптимизации терапии воспалительных заболеваний кишечника у детей / А. С. Илларионов, А. С. Потапов, С.В. Петричук [и др.] // Вопросы практической педиатрии. — 2021. — Т. 16. — №. 2. — С. 14-21.

19. Карапетян, Ш. В. Патогенетическая роль цитокинов при псориазе / Ш. В. Карапетян, Х. М. Хачикян // Российский журнал кожных и венерических болезней. — 2018. — Т. 21. — №. 2. — С. 90-93.

20. Кишкун, А. А. Клиническая лабораторная диагностика. / А. А. Кишкун — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. — 1000 с.

21. Клинические рекомендации. Псориаз артропатический. Псориатический артрит. Общероссийская общественная организация "Российское общество дерматовенерологов и косметологов" / Москва, 2020.

22. Клинические рекомендации. Псориаз: Общероссийская общественная организация «Российское общество дерматовенерологов и косметологов» / Москва, 2023.

23. Козлов, В. А. Очерки о функциональной настроенности иммунной системы / В. А. Козлов — Красноярск: Версо, 2022. — 250 с.

24. Козлов, В. А. Клиническая иммунология. / В. А. Козлов, А. А. Савченко, И. В. Кудрявцев [и др.] — Красноярск: Поликор. 2020. — 386 с.

25. Козлов, В. А. Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов / В. А. Козлов, Е. П. Тихонова, А. А. Савченко [и др.] — Красноярск: Поликор. 2021. — 550 с.

26. Корсунская, И. М. Оценка содержания интерлейкина-31 в сыворотке крови больных тяжелыми формами псориаза / И. М. Корсунская, О.О. Мельниченко // Медицинский алфавит. — 2018. — Т. 2. — №. 31. — С. 9-11.

27. Круглова, Л. С. Иммуногенность препаратов биологической терапии / Л. С. Круглова, А. А. Хотко // Эффективная фармакотерапия. — 2018. — №. 34. — С. 22-29.
28. Круглова, Л. С. Раннее назначение генно-инженерной биологической терапии пациентам с псориазом / Л. С. Круглова, А. А. Хотко, М. А. Петрий // Медицинский алфавит. — 2019. — Т. 1. — №. 7. — С. 25-28.
29. Круглова, Л. С. Псориаз. / Л. С. Круглова, А. Л. Бакулев, Т. В. Коротаева [и др.] — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — 320 с.
30. Круглова, Л. С. Псориаз в детском возрасте: клиническое течение и тактика ведения / Л. С. Круглова, О. Б. Тамразова, Иванов Р. А. // Журнал Международной Медицины. Педиатрия/Неонатология. — 2019. — Т. 2. — № 36. — С. 19–25.
31. Кубанов, А. А. Организация и результаты оказания медицинской помощи по профилю «дерматовенерология» в Российской Федерации. Итоги 2018 года / А. А. Кубанов, Е. В. Богданова // Вестник дерматологии и венерологии. — 2019. — Т. 95. — №4. — С. 8-23.
32. Кубанов, А. А. Эпидемиология псориаза среди населения старше трудоспособного возраста и объемы оказываемой специализированной медицинской помощи больным псориазом в Российской Федерации в 2010–2019 гг. / А. А. Кубанов, Богданова Е. В. // Вестник дерматологии и венерологии. — 2020. — Т. 96. — №5. — С. 7-18.
33. Кубанов, А. А. Индекс PASI (Psoriasis Area and Severity Index) в оценке клинических проявлений псориаза / А. А. Кубанов, А. Э. Карамова, Л. Ф. Знаменская [и др.]. // Вестник дерматологии и венерологии. — 2016. — №. 4. — С. 33-38.
34. Кудрявцев, И. В. Фенотипическая характеристика цитотоксических Т-лимфоцитов: регуляторные и эффекторные молекулы / И. В. Кудрявцев, А. Г. Борисов, Е. В. Васильева [и др.]. // Медицинская иммунология. — 2018. — Т. 20. — № 2. — С. 227-240.

35. Курбатова, О. В. Перспективы изучения иммунометаболизма в клинической практике / О. В. Курбатова, Д. Г. Купцова, Р. Ш. Закиров [и др.]. // Вестник ташкенской медицинской академии. — 2023. — №. 3(1). — С. 98-104.

36. Луценко, А.В. Определение субпопуляций Т- и В-лимфоцитов в крови больных псориазом в прогрессирующий период / А. В. Луценко, Г.А. Волков // Известия Российской Военно-медицинской академии. — 2018. — Т. 37. — №. 1 S1-2. — С. 9-12.

37. Матушевская, Е. В. Топическая терапия псориаза. Разбор клинических случаев / Е. В. Матушевская, Е.В. Владимирова, Ю.И. Матушевская [и др.]. // Медицинский совет. — 2021. — №. 8. — С. 13-18.

38. Мельниченко, О. О. Современные подходы к терапии тяжелых форм псориаза / О. О. Мельниченко // Медицинский совет. — 2017. — №. 11. — С. 208-211.

39. Меркушова, Е. Д. Гиперэкспрессия генов инфламмасомного комплекса NLRP1 и цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-18 в биоптатах пораженной и непораженной кожи больных с псориазом / Е. Д. Меркушова, Е. М. Хасанова, Л. В. Ганковская // Иммунология. — 2021. — Т. 42. — №. 1. — С. 21-28.

40. Меркушова, Е. Д. Механизмы врожденного иммунитета в патогенезе псориаза: подходы к таргетной терапии / Е. Д. Меркушова, Е. М. Хасанова, Л. В. Ганковская // Медицинская иммунология. — 2020. — Т. 22. — №. 3. — С. 449-458.

41. Меркушова, Е. Д. Роль TLR9 и компонентов инфламмасомного комплекса в иммунопатогенезе псориаза / Е. Д. Меркушова, Е. М. Хасанова, О. А. Свитич [и др.]. // Российский иммунологический журнал. — 2019. — Т. 22. — №2-1. — С. 406-408.

42. Моренкова, А. Ю. Экспансия миелоидных супрессорных клеток в периферической крови пациентов с анкилозирующим спондилитом / А. Ю. Моренкова, М. А. Тихонова, Т. В. Тыринова [и др.]. // Медицинская иммунология. — 2021. — Т. 23. — №. 2. — С. 327-338.

43. Мурашкин, Н. Н. Эффективность и безопасность устекинумаба у детей с бляшечной, эритродермической и ладонноподошвенной формами псориаза: ретроспективное когортное исследование / Н. Н. Мурашкин, Э. Т. Амбарчян, Р. В. Епишев [и др.]. // Вопросы современной педиатрии. — 2020. — Т. 19. — №. 6. — С. 531-537.
44. Мурашкин, Н. Н. Коморбидности псориаза в детском возрасте / Н. Н. Мурашкин, Л. С. Круглова, Ю. А. Коваленко [и др.]. // Вопросы современной педиатрии. — 2020. — Т. 19. — №. 6. — С. 460-467.
45. Мурашкин, Н. Н. Псориаз и псориатический артрит в детском возрасте / Н. Н. Мурашкин, А. И. Материкин, Э. Т. Амбарчян [и др.]. // Вопросы современной педиатрии. — 2020. — Т. 19. — №. 6. — С. 444-451.
46. Намазова-Баранова, Л. С. Лечение среднетяжелого и тяжелого псориаза у детей: новые возможности генно-инженерной биологической терапии / Л. С. Намазова-Баранова, А. Л. Бакулев, Н. Н. Мурашкин [и др.]. // Вопросы современной педиатрии. — 2021. — Т. 20. — №. 5. — С. 446-450.
47. Новиков, Ю. А. Иммуногистохимический анализ FOXP3+ Т-регуляторных клеток и его роль в оценке эффективности терапии псориаза / Ю. А. Новиков, В. А. Охлопков, Д. С. Трошина [и др.]. // Клиническая дерматология и венерология. — 2020. — Т. 19. — №. 1. — С. 24-30.
48. Олисов, О. Ю. Роль регуляторных Т-клеток в развитии аутоиммунной воспалительной реакции при псориазе / О. Ю. Олисов, В. В. Гудова, Быковская С. Н. // Медицинский алфавит. — 2019. — Т. 1. — №. 7. — С. 10-14.
49. Олисова, О. Ю. Регуляторные Т-клетки CD4+ CD25+ FOXP3+ CD127LOW у больных вульгарным псориазом / О. Ю. Олисова, С. Н. Быковская, Гудова В. В. // Российский журнал кожных и венерических болезней. — 2020. — Т. 23. — №. 1. — С. 29-34.
50. Пашкин, А. Ю. Роль цитокинов семейства интерлейкина-36 в иммунопатогенезе псориаза / А. Ю. Пашкин, Е. И. Воробьева, В. Р.

Хайрутдинов [и др.]. // Медицинская иммунология. — 2018. — Т. 20. — №. 2. — С. 163-170.

51. Петричук, С. В. Оценка эффективности анти-TNF терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями по активности NF-κB в популяциях лимфоцитов / С. В. Петричук, Т. В. Радыгина, Д. Г. Купцова [и др.]. // Российский иммунологический журнал. — 2022. — Т. 25. — № 4. — С. 491-498.

52. Петричук, С. В. Диагностические и прогностические возможности клинической цитохимии. Методическое пособие для врачей / С. В. Петричук, В. М. Шищенко, З. Н. Духова [и др.] — Москва, 2005. — 74 с.

53. Радыгина, Т. В. Определение остаточного уровня адалимумаба для оценки эффективности анти-TNF терапии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / Т. В. Радыгина, Д. Г. Купцова, А. С. Илларионов [и др.] // Российский педиатрический журнал. — 2022. — Т. 25. — №. 4. — С. 281.

54. Радыгина, Т. В. Экспрессия эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях CD4⁺ лимфоцитов у условно здоровых детей / Т. В. Радыгина, Д. Г. Купцова, С. В. Петричук [и др.] // Российский иммунологический журнал. — 2022. — Т. 25. — №3. — С. 283-290.

55. Радыгина, Т.В. Содержание CD4⁺-клеток с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73 у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / Т.В. Радыгина, С.В. Петричук, Д.Г. Купцова [и др.]. // Вестник Российского государственного медицинского университета. — 2022. — №. 4. — С. 19-26.

56. Радыгина, Т. В. Оценка функциональной активности эктонуклеотидазы CD39 в регуляторных Т-клетках у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / Т. В. Радыгина, Е. Г. Сорокина, С. В. Петричук [и др.]. // Медицинская иммунология. — 2023. — Т. 25. — № 2. — С. 415-422.

57. Савченко, А. А. Особенности субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у больных анкилозирующим спондилитом на фоне генно-инженерной биологической терапии / А. А. Савченко, О. Д. Гриценко, А. Г. Борисов [и др.]. // Медицинская иммунология. — 2021. — Т. 23. — №. 6. — С. 1319-1332.

58. 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.

59. 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.

60. 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 [и др.]. // Медицинская иммунология. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-CIT-2592>

61. Смольяникова, В. А. Роль IL-17A и нейтрофильных гранулоцитов в патогенезе псориаза / В. А. Смольяникова, А. Э. Карамова, М. А. Нефедова // Архив патологии. — 2020. — Т. 82. — №. 1. — С. 30-37.

62. Сорокина, Е. В. Роль клеток врожденной иммунной системы при псориазе / Е. В. Сорокина, И. В. Бишева // Вестник дерматологии и венерологии. — 2022. — Т. 98. — №. 5. — С. 59-64.

63. Способ измерения митохондриальной активности лимфоцитов: патент РФ 2302635: G01N33/53; G01 № 33/50 / С. В. Петричук, Т. Д. Измайлова, Т. В. Радыгина; заявитель и патентообладатель ГУ Научный центр здоровья детей РАМН. — № 2005141145; заявл. 28.12.2005; опубл. 10.07.2007, Бюл. № 19. — 9 с. — Текст: непосредственный.

64. Способ прогнозирования эффекта терапии инфликсимабом у детей с болезнью Крона: патент РФ 047833: G01N33/52; G01 № 33/52 / Л. В.

Мирошкина, С. В. Петричук, Е. Г. Цимбалова, А. С. Потапов, И. В. Самохина, Т. Д. Измайлова, О. В. Курбатова, М. М. Венедиктова, М. А. Варичикина; заявитель и патентообладатель ГУ Научный центр здоровья детей РАМН. – № 2013132028/15; заявл. 11.07.2013; опубл. 20.11.2014, Бюл. № 32. – 11 с. – Текст: непосредственный.

65. Сухоруков, В. С. Очерки митохондриальной патологии. / В. С. Сухоруков. — Москва: ИД «МЕДПРАКТИКА–М», 2011. — 288с.

66. Топтыгина, А. П. Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста / А. П. Топтыгина, Е. Л. Семикина, С.В. Петричук [и др.]. // Медицинская иммунология. — 2017. — Т.19. — №4. — С.409-420.

67. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник. / Р. М. Хаитов. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2021. — 520 с.

68. Хаитов, Р. М. Иммунология. Атлас. / Р. М. Хаитов, Ф. Ю. Гариб. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020 — 416 с.

69. Хайдуков, С. В. Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса / С. В. Хайдуков, Л. В. Байдун // Медицинский алфавит. — 2015. — Т.2. — № 8. — С. 44-51.

70. Хайрутдинов, В. Р. Иммунный патогенез псориаза / В. Р. Хайрутдинов, И. Э. Белоусова, А. В. Самцов // Вестник дерматологии и венерологии. — 2016. — №. 4. — С. 20-26.

71. Хайрутдинов, В. Р. Псориаз. Современные представления о дерматозе: руководство для врачей / В. Р. Хайрутдинов, А. В. Самцов — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2021. — 260 с.

72. Хайрутдинов, В.Р. Роль CD45RA +, CD45RO +-лимфоцитов в патогенезе псориаза / В.Р. Хайрутдинов, А.Ф. Михайличенко, А.Л. Пискунова [и др.]. // Российский журнал кожных и венерических болезней. — 2012. — Т. 15. — №6. — С. 30-35

73. Чебышева, С. Н. Клинические особенности псориатического артрита в детском возрасте / С. Н. Чебышева, Н. А. Геппе, Е. С. Жолобова [и др.] // Доктор. Ру. — 2020. — Т. 19. — №. 10. — С. 22-26.
74. Aguilar-Flores, C. Association of Pathogenic Th17 Cells with the Disease Severity and Its Potential Implication for Biological Treatment Selection in Psoriasis Patients / C. Aguilar-Flores, O. Castro-Escamilla, E. M. Ortega-Rocha [et al.] // Mediators Inflamm. — 2020. — Vol. 2020. — P. 1-16.
75. Allard, B. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets / B. Allard, M. S. Longhi, S. C. Robson [et al.] // Immunol. Rev. — 2017. — Vol. 276. — No. 1. — P. 121—144.
76. Alvarez-Sanchez, N. Peripheral CD39-expressing T regulatory cells are increased and associated with relapsing-remitting multiple sclerosis in relapsing patients / N. Alvarez-Sanchez, I. Cruz-Chamorro, M. Díaz-Sanchez [et al.] // Sci Rep. — 2019. — Vol. 9. — No. 2302. — P. 1-8.
77. AlQassimi, S. Global burden of psoriasis - comparison of regional and global epidemiology, 1990 to 2017 / S. AlQassimi, S. AlBrashdi, H. Galadari [et al.] // Int J Dermatol. — 2020. — Vol. 59. — No 5. — P. 566-571.
78. Andres-Ejarque, R. Enhanced NF- κ B signaling in type-2 dendritic cells at baseline predicts non-response to adalimumab in psoriasis / R. Andres-Ejarque, H. B. Ale, K. Grys [et al.] // Nat Commun. — 2021. — Vol.12. — No 1. — P. 1-16.
79. Angajala, A. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights into Immuno-Metabolism / A. Angajala, S. Lim, J. B. Phillips [et al.] // Front Immunol. — 2018. — Vol. 9. — No 1605. — P. 1-19.
80. Armstrong, A. W. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review / A. W. Armstrong, C. Read // JAMA. — 2020. — Vol. 323. — No 19. — P. 1945-1960.
81. Barnabei, L. NF- κ B: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation / L. Barnabei, E. Laplantine, W. Mbongo [et al.] // Front Immunol — 2021. — Vol. 12. — No 12. — P.1-27.

82. Barteneva, N. S. Imaging Flow Cytometry Methods and protocols / N. S. Barteneva, I. A. Vorobjev // *Methods Mol. Biol.*, 2017. — 188 p.
83. Bantug, G. R. The spectrum of T cell metabolism in health and disease / G. R. Bantug, L. Galluzzi, G. Kroemer [et al.] // *Nat Rev Immunol* — 2018. — Vol. 18. — No. 1. — P. 19-34.
84. Bayaraa, B. Sustainability and switching of biologics for psoriasis and psoriatic arthritis at Fukuoka University Psoriasis Registry / B. Bayaraa, S. Imafuku // *J Dermatol* — 2019. — Vol. 46. — No. 5. — P. 389-398.
85. Bellodi Schmidt, F. Biologic response modifiers and pediatric psoriasis / F. Bellodi Schmidt, K. N. Shah // *Pediatr Dermatol* — 2015. — Vol. 32. — No. 3. — P. 303-320.
86. Belpaire, A. From IL-17 to IFN- γ in inflammatory skin disorders: Is transdifferentiation a potential treatment target? / A. Belpaire, N. van Geel, R. Speeckaert // *Front Immunol* — 2022. — Vol. 13. — P. 1-8.
87. Bishop, E. L. Control of T Cell Metabolism by Cytokines and Hormones / E. L. Bishop, N. Gudgeon, S. Dimeloe // *Front Immunol* — 2021 — Vol. 12.
88. Blair, H. A. Secukinumab: A Review in Moderate to Severe Pediatric Plaque Psoriasis / H. A. Blair // *Paediatr Drugs* — 2021. — Vol. 23. — No. 6. — P. 601-608.
89. Blauvelt, A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis / A. Blauvelt, A. Chiricozzi // *Clin Rev Allergy Immunol* — 2018. — Vol. 55. — No. 3. — P. 379-390.
90. Bossennec, M. Methotrexate Restores CD73 Expression on Th1.17 in Rheumatoid Arthritis and Psoriatic Arthritis Patients and May Contribute to Its Anti-Inflammatory Effect through Ado Production / M. Bossennec, C. Rodriguez, M. Hubert [et al.] // *J Clin Med* — 2019. — Vol. 8(11). — No. 1859. — P. 1-16.
91. Branisteanu, D. E. Management of psoriasis in children (Review) / D. E. Branisteanu, S. Georgescu, I. L. Serban [et al.] // *Exp Ther Med*. — 2021. — Vol. 22. — No. 6. — P.1-8.

92. Brandon, A. Diagnosis and management of cutaneous psoriasis: a review / A. Brandon, A. Mufti, R. G. Sibbald // *Advances in skin & wound care*. — 2019. — Vol. 32. — No 2. — P. 58-69.
93. Brandt, D. TCR+CD3+CD4-CD8-effector T cells in psoriasis / D. Brandt, M. Sergon, S. Abraham [et al.] // *Clin Immunol*. — 2017. — Vol. 181. — P. 51-59.
94. Braun, M. Y. The Natural History of T Cell Metabolism // M. Y. Braun / *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021. — Vol. 22. — No. 13. — P. 1-16.
95. Bqain, M. Immunogenicity of biologics used in the treatment of inflammatory bowel disease / M. Bqain, A. Efimov, D. Baker [et al.] // *Hum Antibodies*. — 2021. — Vol. 29. — No. 4. — P. 225-235.
96. Campanati, A. TNF- α inhibitors reduce the pathological Th1 - Th17/Th2 imbalance in cutaneous mesenchymal stem cells of psoriasis patients / A. Campanati, M. Orciani, R. Lazzarini [et al.] // *Exp Dermatol*. — 2017. — Vol. 26. — No 4. — P. 319-324.
97. Cao, L. Y. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Psoriasis Are an Expanded Population Exhibiting Diverse T-Cell-Suppressor Mechanisms / L. Y. Cao, J. S. Chung, T. Teshima [et al.] // *J Invest Dermatol*. — 2016. — Vol. 136. — No. 9. — P. 1801-1810.
98. Cataldi, C. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine profiles in psoriasis: use as laboratory biomarkers and disease predictors / C Cataldi, N. L Mari, M. A. B. Lozovoy [et al.] // *Inflamm Res*. 2019. — Vol. 68. — No. 7. — P. 557-567.
99. Chhabra, S. Recent Update on Immunopathogenesis of Psoriasis / S. Chhabra, S. Dogra, K. Sharma [et al.] // *Indian J Dermatol*. — 2022. — Vol. 67. — No. 4. — P. 360-373.
100. Chang, C. The use of biologics in the treatment of autoimmune liver disease / C. Chang, A. Tanaka, C. Bowlus [et al.] // *Expert Opin Investig Drugs*. — 2020. — Vol. 29. — No. 4. — P. 385-398.

101. Chapman. N. M. Metabolic adaptation of lymphocytes in immunity and disease / N. M. Chapman, H. Chi // Immunity — 2022. — Vol. 55. — No. 1. — P. 14-30.
102. Chen, C. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells Is a Novel Strategy for Anti-Psoriasis Therapy / C. Chen, L. Tan, W. Zhu [et al.] // Mediators Inflamm — 2020. — Vol. 2020. — P. 1-12.
103. Chiricozzi, A. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis / A. Chiricozzi, P. Romanelli, E. Volpe [et al.] // International journal of molecular sciences — 2018. — Vol. 19. — No. 1. — P. 1-31.
104. Consonni, F. M. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Ductile Targets in Disease / F. M. Consonni, C. Porta, A. Marino [et al.] // Front. Immunol — 2019. — Vol. 10. — P. 1-15.
105. Curmin, R. Switches between biologics in patients with moderate-to-severe psoriasis: results from the French cohort PSOBIOTEQ / R. Curmin, S. Guillo, Y. De Rycke [et al.] // J Eur Acad Dermatol Venereol — 2022. — Vol. 36. — No. 11. — P. 2101-2112.
106. D'Adamio, S. Pharmacotherapeutic management of psoriasis in adolescents and children. Expert Opin / S. D'Adamio, D. Silvaggio, A. Massaro [et al.] // Pharmacother — 2019. — Vol. 20. — No. 14. — P. 1777-1785.
107. Dai, H. Adamopoulos I.E. Psoriatic arthritis under the influence of IFN γ . / H. Dai // Clin Immunol — 2020. — Vol. 218. — P.1-13.
108. Das, M. Regulatory T Cells under the Mercy of Mitochondria / M. Das, F. Alzaid, J. Bayry // Cell Metab — 2019. — Vol. 29. — No. 2. — P. 243-245.
109. Davila-González, D. Pharmacological Inhibition of NOS Activates ASK1/JNK Pathway Augmenting Docetaxel-Mediated Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer. / D. Davila-González, D. S. Choi, R. R. Rosato [et al.] // Clin Cancer Res — 2018. — Vol. 24. — No. 5. — P. 1152-1162.
110. Davis, R. J. Anti-PD-L1 Efficacy Can Be Enhanced by Inhibition of Myeloid-Derived Suppressor Cells with a Selective Inhibitor of PI3K δ/γ . / R. J.

Davis, E.C. Moore, P. E. Clavijo [et al.] // Cancer Res — 2017. — Vol. 77. — No. 10. — P. 2607-2619.

111. de Alcantara, C. C. Cytokines in psoriasis / C. C. de Alcantara, E. M. V. Reiche, A. N. C. Simão. // Adv Clin Chem — 2021. — Vol. 100. — P. 171-204.

112. de Ruiter C. C. Biologics Can Significantly Improve Dermatology Life Quality Index (DLQI) in Psoriatic Patients: A Systematic Review / de Ruiter C.C., Rustemeyer T. // Psoriasis (Auckl) — 2022. — Vol. 12. — P. 99-112.

113. Diotallevi, F. Biological Treatments for Pediatric Psoriasis: State of the Art and Future Perspectives / F. Diotallevi, O. Simonetti, G. Rizzetto [et al.] // Int J Mol Sci — 2022. — Vol. 23. — No. 19. — P. 1-11.

114. Dodero-Anillo, J. M. Optimising the Therapeutic Interval for Biologics in Patients with Psoriasis / J. M. Dodero-Anillo, I. C. Lozano-Cuadra, E. Rios-Sanchez [et al.] // Life (Basel) — 2022. — Vol. 12. — No. 12. — P. 1-9.

115. Dogra, S. Biologics in pediatric psoriasis - efficacy and safety / S. Dogra, R. Mahajan // Expert Opin Drug Saf — 2018. — Vol. 17. — No. 1. — P. 9-16.

116. Donetti, E. Interleukin 22 early affects keratinocyte differentiation, but not proliferation, in a three-dimensional model of normal human skin / E. Donetti, L. Cornaghi, F. Arnaboldi [et al.] // Exp Cell Res — 2016. — Vol. 345. — P. 247-254.

117. Dopytalska, K. The role of epigenetic factors in psoriasis / K. Dopytalska, P. Ciechanowicz, K. Wiszniewski [et al.] // International Journal of Molecular Sciences — 2021. — Vol. 22. — No. 17. — P. 1-16.

118. D'Adamio, S. Pharmacotherapeutic management of psoriasis in adolescents and children / S. D'Adamio, D. Silvaggio, A. Massaro [et al.] // Expert Opin Pharmacother — 2019. — Vol. 20. — No. 14. — P. 1777-1785.

119. Dhar, S. Psoriasis in pediatric age group / S. Dhar, S. M. Srinivas // Indian Journal of Dermatology — 2022. — Vol. 67. — No. 4. — P. 374-380.

120. Duarte, A. Adalimumab, etanercept and ustekinumab for treating plaque psoriasis in children and young people: systematic review and economic evaluation

/ A. Duarte, T. Mebrahtu, P. S. Goncalves [et al.]. // Health Technol Assess. — 2017. — Vol 21. — No 64. — P. 1-244.

121. Eberhardt, N. Purinergic modulation of the immune response to infections. / N. Eberhardt, G. Bergero, Y. L. Mazzocco Mariotta [et al.]. // Purinergic Signal. — 2022. — Vol. 18. — No 1. — P. 93-113.

122. Eisert, L. S2k guidelines for the treatment of psoriasis in children and adolescents — Short version part 2. / L. Eisert, M. Augustin, S. Bach [et al.] // J Dtsch Dermatol Ges. — 2019. — Vol. 17. — No. 9. — P. 959–973.

123. Elberdín, L. Real-world use of ustekinumab therapeutic drug monitoring in moderate to severe psoriasis. / L. Elberdín, R.M. Fernández-Torres, M. Mateos [et al.] // Front Med (Lausanne). — 2022. — Vol. 9. — P. 1-8.

124. Farber, D. L. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. / D. L. Farber, N. A. Yudanin, N. P. Restifo [et al.] // Nature reviews. Immunology. — 2014. — Vol. 14. — No.1. — P. 24–35.

125. Ferrari, D. Purinergic Signaling and Inflammasome Activation in Psoriasis Pathogenesis / D. Ferrari, F. Casciano, P. Secchiero [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2021. — Vol. 22. — No. 17. — P. 1-16.

126. Frischknecht, L. The role of epigenetics and immunological imbalance in the etiopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis / L. Frischknecht, M. Vecellio, C. Selmi // Ther Adv Musculoskelet Dis. — 2019. — Vol. 11. — P.1-8.

127. Fu, Y. Immunometabolism shapes B cell fate and functions / Y. Fu, L. Wang, B. Yu [et al.] // Immunology. — 2022. — Vol. 166. — No. 4. — P. 444-457.

128. Fu, Z. Requirement of Mitochondrial Transcription Factor A in Tissue-Resident Regulatory T Cell Maintenance and Function / Z. Fu, J. Ye, J.W. Dean [et al.] // Cell Rep. — 2019.— Vol 28. — No. 1. — P. 159-171.

129. Furue, M. Interleukin-17A and Keratinocytes in Psoriasis / M. Furue, K. Furue, G. Tsuji [et al.] // Int J Mol Sci. — 2020. — Vol 21. — No. 4. — P.1-21.

130. Furiati S. C., Catarino J. S., Silva M. V., [et al.]. Th1, Th17, and Treg Responses are Differently Modulated by TNF- α Inhibitors and Methotrexate in

Psoriasis Patients / Furiati S. C., Catarino J. S., Silva M. V. [et al.] // Sci Rep. — 2019. — Vol. 9. — P.1-11.

131. Gatti, J. Reconsideration of 2008 decision: Food and Drug Administration approval of etanercept for systemic treatment of moderate to severe pediatric psoriasis / J. Gatti, J.A. Lindstrom, J. Beitz // *Pediatr Dermatol.* — 2018. — Vol. 35. — No 5. — P.688-689.

132. Georgescu, S. R. Advances in Understanding the Immunological Pathways in Psoriasis / S. R. Georgescu, M. Tampa, C. Caruntu [et al.] // *Int J Mol Sci.* — 2019. — Vol. 20. — No. 739. — P.1-17.

133. Geltink, R. I. K. Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function / R. I. K. Geltink, R.L Kyle., E.L. Pearce // *Annu Rev Immunol.* — 2018. — Vol. 36. — P.461-488.

134. Ghoreschi, K. Therapeutics targeting the IL-23 and IL-17 pathway in psoriasis / K. Ghoreschi, A. Balato, C. Enerbäck [et al.] // *Lancet.* — 2021. — Vol. 397. — No. 10275. — P.754-766.

135. Griffiths, C. E. M. Psoriasis / C. E. M. Griffiths, A.W. Armstrong, J. E. Gudjonsson [et al.] // *Lancet.* — 2021. — Vol. 397., No. 10281. P.1301-1315.

136. Giuliani, A. L. Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation / A. L. Giuliani, A. C. Sarti, F. Di Virgilio // *Front. Pharmacol* — 2021. — Vol. 11. — No. 619458. — P. 1-20.

137. Goenaga-Vázquez, Y. Therapeutic challenges in managing pediatric psoriasis / Y. Goenaga-Vázquez, K. C. Lauck, A. A Hebert // *Int J Womens Dermatol.* — 2020. — Vol. 7. — No. 3. — P. 314-318.

138. Golhen, K. Understanding efficacy-safety balance of biologics in moderate-to-severe pediatric psoriasis / K. Golhen, C. Winskill, M. Theiler [et al.] // *Front Med (Lausanne).* — 2022. — Vol. 9. — No. 944208. — P.1-21.

139. Gooderham, M. J. Real-world, long-term treatment patterns of commonly used biologics in Canadian patients with moderate-to-severe chronic plaque psoriasis / M. J. Gooderham, C. Lynde, I. Turchin [et al.]. // *J Dermatol.* — 2022. — Vol.49. — No. 1. — P. 95-105.

140. Grover, A. Myeloid-Derived Suppressor Cells: A Propitious Road to Clinic / A. Grover, E. Sanseviero, E. Timosenko [et al.] // *Cancer Discov.* — 2021. — Vol. 11. — No. 11. — P. 2693-2706.
141. Grover, P. Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function / P. Grover, P. N. Goel, M. I. Greene // *Front Immunol.* — 2021. — Vol. 12. — P.1-10.
142. Guo, H. Stability and inhibitory function of Treg cells under inflammatory conditions in vitro / H. Guo, L. Xun, R. Zhang [et al.] // *Exp Ther Med.* — 2019. — Vol. 18. — No. 4. — P. 2443-2450.
143. Han, L. Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ regulatory T-cells in psoriasis / L. Han, H. Sugiyama, Q. Zhang [et al.] // *Australas. J. Dermatol.* — 2018. — Vol. 59. — No. 1. — P. 31-38.
144. Hawkes, J. E. Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis / J. E. Hawkes, B. Y. Yan, T. C. Chan [et al.] // *J Immunol.* — 2018. — Vol. 201. — No 6. — P.1605-1613.
145. Hebert, A. A. Managing pediatric psoriasis: Update on treatments and challenges-A review / A. A. Hebert, J. Browning, P.C. Kwong [et al.] // *Journal of Dermatological Treatment* — 2022. — Vol. 33. — No. 5. — P. 2433-2442.
146. Hegde, S. MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity / S. Hegde, A. M. Leader, M. Merad // *Immunity.* — 2021. — Vol. 54. No. 5. — P.875-884.
147. Hong, D. Profiling Serum Cytokines and Anticytokine Antibodies in Psoriasis Patients / D. Hong, X. Liu, X. Qiu [et al.] // *J Immunol Res.* — 2022. — Vol. 2022. — P.1-9.
148. Hong, J. J. TNF-alpha inhibitors and ustekinumab for the treatment of psoriasis: therapeutic utility in the era of IL-17 and IL-23 inhibitors / J. J. Hong, E. K. Haderler, M. L. Mosca [et al.] // *J Psoriasis Psoriatic Arthritis.* — 2022. — Vol.7. — No.2. — P.79-92.

149. Hu, P. The Role of Helper T Cells in Psoriasis / P. Hu, M. Wang, H. Gao [et al.] // Front Immunol. — 2021. — Vol. 12. — P.1-10.
150. Huang, Z. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases / Z. Huang, N. Xie, P. Illes [et al.] // Signal Transduct Target Ther. —2021. — Vol. 6. — No. 1. — P. 1-20.
151. Israel, L. Clinical and genetic heterogeneity of CARD14 mutations in psoriatic skin disease / L. Israel, M. Mellett // Frontiers in Immunology — 2018. — Vol. 9. — P.1-15.
152. Jiang, Q. Role of Th22 cells in the pathogenesis of autoimmune diseases / Q. Jiang, G. Yang, F. Xiao [et al.] // Frontiers in Immunology —2021. —Vol. 12. — P.1-14.
153. Kamata, M. Dendritic Cells and Macrophages in the Pathogenesis of Psoriasis / M. Kamata, Y. Tada // Frontiers in Immunology — 2022. — Vol.13. — P. 1-10.
154. Kanda, N. The Defect in Regulatory T Cells in Psoriasis and Therapeutic Approaches / N. Kanda, T. Hoashi, H. Saeki // J Clin Med. — 2021. — Vol. 10. — No. 17. — P. 1-13.
155. Katakam, B. K. Recommendations for Management of Childhood Psoriasis / B. K. Katakam, M. Munisamy, T. N. Rao [et al.] // Indian Dermatol Online J. — 2021. — Vol. 12 (S71-85). — P. 1-15.
156. Kim H. O. Pediatric Psoriasis: From New Insights into Pathogenesis to Updates on Treatment / H. O. Kim, S. Y. Kang, J. C. Kim [et al.] // Biomedicines— 2021. — Vol. 9. — No. 8. — P. 1-17.
157. Kim C. H. Anti-psoriatic effect of myeloid-derived suppressor cells on imiquimod-induced skin inflammation in mice / C. H. Kim, Yoo J. K. Kim, S. H. Jeon [et al.] // Scand J Immunol. — 2019. — Vol 89. — No. 3. — P. 1-10.
158. Kim, J. The imbalance between Type 17 T-cells and regulatory immune cell subsets in psoriasis vulgaris / J. Kim, A. Moreno, J. G Krueger // Front Immunol. —2022. — Vol.13. — P. 1-8.

159. Kocaaga, A. Psoriasis: An Immunogenetic Perspective / A. Kocaaga, M Kocaaga // Glob Med Genet. — 2022. — Vol. 9. — No. 2. — P. 82-89.
160. Kumar, D. Update on psoriasis: a review / D. Kumar, J. P. Rajguru, D. Maya [et al.] // Journal of Family Medicine and Primary Care — 2020. — Vol. 9. No. 1. — P. 20-24.
161. Kurihara, K. Significance of IL-17A-producing CD8⁺CD103⁺ skin resident memory T cells in psoriasis lesion and their possible relationship to clinical course / K. Kurihara, T. Fujiyama, P. Phadungsaksawasdi [et al.] // J Dermatol Sci. — 2019. — Vol. 95. — No. 1. — P. 21-27.
162. Kurtovic, N.O. Serum Concentrations of Interferon Gamma (IFN- γ) in Patients with Psoriasis: Correlation with Clinical Type and Severity of the Disease / N. O. Kurtovic, E. K. Halilovic // Med Arch. — 2018. — Vol. 72. — No. 6. — P. 410-413.
163. Lanna, C. Skin immunity and its dysregulation in psoriasis / C. Lanna, M. Mancini, R. Gaziano [et al.] // Cell cycle. — 2019. — Vol. 18. — No 20. — P. 2581–2589.
164. Liang, Y. Psoriasis: a mixed autoimmune and autoinflammatory disease / Y. Liang, M. K. Sarkar, L. C. Tsoi // Curr Opin Immunol. — 2017.— Vol. 49. — P. 1-8
165. Li, T. c-Rel Is a Myeloid Checkpoint for Cancer Immunotherapy / T. Li, X. Li, A. Zamani [et al.]. // Nat Cancer. — 2020. — Vol. 1. — No. 5. — P. 507-517.
166. Lebwohl, M. Interleukin-23 blockade: Another breakthrough in the treatment of psoriasis / M. Lebwohl // Lancet. — 2019. — Vol. 394. — P. 544-46
167. Lee, G. R. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity / G. R. Lee // Int J Mol Sci. — 2018. — Vol. 19. — No. 3. — P. 1-14.
168. Liberal, R. CD39 mediated regulation of Th17-cell effector function is impaired in juvenile autoimmune liver disease / R. Liberal, C. R. Grant, Y. Ma [et al.] // J. Autoimmun — 2016. — Vol. 72. — P. 102-112.

169. Li, Y. Novel Characterization of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Microenvironment / Y. Li, H. He, R. Jihu [et al.] // Front Cell Dev Biol. — 2021. — Vol. 9. — P. 1-15.

170. Linh, N. T. T Association of PSORS1C3, CARD14 and TLR4 genotypes and haplotypes with psoriasis susceptibility / N. T. T. Linh, N. H. Giang, N. T. K. Lien [et al.] // Genet Mol Biol. — 2022. — Vol. 45. — No.4. — P. 1-14.

171. Li, B. The role of Th17 cells in psoriasis / B. Li, L. Huang, P. Lv [et al.] // Immunol Res. — 2020. — Vol. 68. — No 5. — P. 296-309.

172. Liu, D. NF- κ B: A Double-Edged Sword Controlling Inflammation / D. Liu, Z. Zhong, M. Karin // Biomedicines. — 2022. — Vol.10. — No. 6. — P.1-13.

173. Liu, Y. A novel role of IL-17A in contributing to the impaired suppressive function of Tregs in psoriasis / Y. Liu, C. Zhang, B. Li [et al.] // J Dermatol Sci. —2021. — Vol. 101. — No. 2. — P. 84-92.

174. Liu, P. Acitretin Promotes the Differentiation of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Treatment of Psoriasis / P. Liu, C. Peng, X. Chen [et al.] // Front Med (Lausanne). — 2021. — Vol. 8. — P. 1-13.

175. Liu, T. NF- κ B signaling in inflammation / T. Liu, L. Zhang, D. Joo [et al.] // Signal Transduct Target Ther. — 2017. — Vol. 2. — P.1-9.

176. Longhi, M. S. Bilirubin suppresses Th17 immunity in colitis by upregulating CD39 / M. S. Longhi, M. Vuerich, A. Kalbasi [et al.] // J.C.I. Insight. — 2017. — Vol. 2. — No. 9. — P. 1-15.

177. Long, D. Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity / D. Long, Y. Chen, H. Wu [et al.] // Journal of autoimmunity. — 2019. — Vol 99. — P. 1-14.

178. Lopez, D.V. Role of IL-22 in homeostasis and diseases of the skin / D. V. Lopez, M. Kongsbak-Wismann // APMIS. — 2022. — Vol. 130. — No. 6. — P. 314-322.

179. Luan, L. Down-regulation of the Th1, Th17, and Th22 pathways due to anti-TNF- α treatment in psoriasis / L. Luan, S. Han, H. Wang [et al.] // Int Immunopharmacol. — 2015. — Vol. 29. — No. 2. — P. 278-284.

180. Magni, G. Adenosine Signaling in Autoimmune Disorders / G. Magni, S. Ceruti // *Pharmaceuticals (Basel)*. — 2020. — Vol. 13. — No. 9. — P. 1-22.
181. Maguire, O. Simultaneous assessment of NF- κ B/p65 phosphorylation and nuclear localization using imaging flow cytometry / O. Maguire, K. O'Loughlin, H. Minderman // *J Immunol Methods*. — 2015. — Vol. 423. — P. 3-11.
182. Marzano, A.V. Pathogenesis of Psoriasis: Focus on Autoinflammation / A.V. Marzano, F. Derlino, E. F. Berti // *Dermatopathology (Basel)*. — 2018. — Vol. 5. — No 1. — P. 14-15.
183. Menter, A. Joint American Academy of Dermatology-National Psoriasis Foundation guidelines of care for the management and treatment of psoriasis in pediatric patients / A. Menter, K. M. Cordoro, D. M. R. Davis [et al.] // *J Am Acad Dermatol*. — 2020. — Vol. 82. — No. 1. — P. 161-201.
184. Michalak-Stoma, A. Multiple Cytokine Analysis of Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg Cytokine Pathway for Individual Immune Profile Assessment in Patients with Psoriasis / A. Michalak-Stoma, J. Bartosińska, D. Raczkiewicz [et al.] // *Med Sci Monit*. — 2022. — Vol. 28. — P. 1-15.
185. Miraghazadeh, B. Nuclear Factor-kappaB in Autoimmunity: Man and Mouse / B. Miraghazadeh, M. C. Cook // *Front Immunol*. — 2018. — Vol. 9. — P. 1-16.
186. Miroshkina, L. Succinate dehydrogenase activity of peripheral lymphocytes in children with inflammatory bowel disease / L. Miroshkina, O. Kurbatova, G. Semenova [et al.] // *Journal of World Mitochondria Society*. — 2015. — Vol. 1. — No 2. — P. 138.
187. Mitchell, J.P. NF- κ B and the Transcriptional Control of Inflammation / J.P. Mitchell, R.J. Carmody // *Int Rev Cell Mol Biol*. — 2018. — Vol. 335. — P. 41-84.
188. Mizumaki, K. Suppression of IL-23-mediated psoriasis-like inflammation by regulatory B cells / K. Mizumaki, M. Horii, M. Kano [et al.] // *Sci Rep*. — 2021. — Vol. 11. — No. 1. — P.1-13.

189. Mohd Noor A. A. Orchestrated Cytokines Mediated by Biologics in Psoriasis and Its Mechanisms of Action / A. A. Mohd Noor, M. Azlan, N. Mohd Redzwan // *Biomedicines* — 2022. — Vol. 10. — No. 2. — P.498.
190. Moorchung, N. Role of NF- κ B in the pathogenesis of psoriasis elucidated by its staining in skin biopsy specimens / N. Moorchung, J. S. Kulaar, M. Chatterjee [et al.] // *Int J Dermatol.* — 2014. — Vol. 53. — No 5. — P.570-574.
191. Nedoszytko B. Pathogenesis of psoriasis in the "omic" era. Part II. Genetic, genomic and epigenetic changes in psoriasis / B. Nedoszytko, A. Szczerkowska-Dobosz, M. Stawczyk-Macieja [et al.] // *Postepy Dermatol Alergol.* — 2020. — Vol. 37. — No. 3. — P. 283-298.
192. Ni, X Keratinocyte: A trigger or an executor of psoriasis? / X. Ni, Y. Lai // *J Leukoc Biol.* — 2020. — Vol.108. — No. 2. — P. 485-491.
193. Nussbaum, L. Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment / L. Nussbaum, Y. L. Chen, G. S. Ogg // *Br J Dermatol.* — 2021. — Vol. 184. — No. 1. — P.14-24.
194. Ogawa, E. Pathogenesis of psoriasis and development of treatment / E. Ogawa, Y. Sato, A. Minagawa [et al.] // *J. Dermatol.* — 2018. — Vol. 45. — No. 3. — P. 264-272.
195. Orsmond, A. Skin Barrier Dysregulation in Psoriasis / A. Orsmond, L. Bereza-Malcolm, T. Lynch [et al.] // *Int J Mol Sci.* — 2021. — Vol. 22. — No. 19. — P. 1-27.
196. Ortega, C. IL-17-producing CD8⁺ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines / C. Ortega, Fernández-A S, J.M. Carrillo [et al.] // *J Leukoc Biol.* — 2009. — Vol. 86. — No. 2. — P. 435-443.
197. Ovcina-Kurtovic, N. Serum Levels of Tumor Necrosis Factor - alpha in Patients With Psoriasis / N. Ovcina-Kurtovic, E. Kasumagic-Halilovic // *Mater Sociomed.* —2022. —Vol. 34. — No. 1. — P.40-43.

198. Owczarczyk Saczonek, A. Immunological Memory of Psoriatic Lesions / A. Owczarczyk Saczonek, M. Krajewska-Włodarczyk, M. Kasprowicz-Furmańczyk [et al.] // *Int J Mol Sci.* — 2020. — Vol. 21. — No. 2. — P. 1-11.
199. Owczarczyk-Saczonek, A. The role of regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in psoriasis / A. Owczarczyk-Saczonek, J. Czerwińska, W. Placek // *Acta Dermatovenereol Alp Pannonica Adriat.* — 2018. — Vol. 27. — No 1. — P. 17-23.
200. Owczarczyk-Saczonek, A. Evaluation of selected mechanisms of immune tolerance in psoriasis / A. Owczarczyk-Saczonek, J. Czerwińska, M. Orylska [et al.] // *Postepy Dermatol Alergol.* — 2019. — Vol. 36. — No. 3. — P. 319-328.
201. Pagni, R. Interleukin-6 and indoleamine-2,3-dioxygenase as potential adjuvant targets for Papillomavirus-related tumors immunotherapy / R. L. Pagni, P. D. C. Souza, R. Pegoraro [et al.] // *Front Immunol.* — 2022. — Vol. 13. — P. 1-15.
202. Papp, K. Efficacy and Safety of Adalimumab Every Other Week versus Methotrexate Once Weekly in Children and Adolescents with Severe Chronic Plaque Psoriasis: a Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial / K. Papp, D. Thaçi, D. Marcoux [et al.]. // *Lancet.* — 2017. — Vol. 390. — P. 40–49.
203. Pawelec, G. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Not Only in Tumor Immunity / G. Pawelec, C. P. Verschoor, S. Ostrand-Rosenberg // *Front Immunol.* — 2019 — Vol. 10. — P.1-10.
204. Peris, K Update on the Management of Pediatric Psoriasis: An Italian Consensus / K. Peris, A. B. Fortina, L. Bianchi, [et al.] // *Dermatology and Therapy.* — 2022. — Vol. 12. — No. 8. — P. 1753-1775.
205. Perrone, V Treatment patterns and pharmacoutilization in patients affected by psoriasis: an observational study in an Italian Real-World setting / V. Perrone, S. Losi, A. Maiorino [et al.]. // *Drugs-Real World Outcomes.* — 2022. — Vol. 9. — No. 2. — P. 243-251.

206. Pflug, K. M. Targeting NF- κ B-Inducing Kinase (NIK) in Immunity, Inflammation, and Cancer / Pflug K. M., Sitcheran R. // *Int J Mol Sci.* — 2020. — Vol. 21. — No. 22. — P.1-19.
207. Phan, C. biological treatments for paediatric psoriasis: a retrospective observational study on biological drug survival in daily practice in childhood psoriasis / C. Phan, A. Beauchet, A. C. Burztein [et al.]. // *J Eur Acad Dermatol Venereol.* —2019. — Vol. 33. — No. 10. — P.1984-1992.
208. Phan, C. Switching biologics in children with psoriasis: Results from the BiPe cohort / C. Phan, A. Beauchet, Z. Reguiat [et al.] // *Pediatr Dermatol.* — 2022. —Vol. 39. — No. 1. — P. 35-41.
209. Pinson, R. Psoriasis in children / R. Pinson, B. Sotoodian, L. Fiorillo // *Psoriasis (Auckl).* — 2016. — Vol. 6. — P.121-129.
210. Pinton, L. Activated T cells sustain myeloid-derived suppressor cell-mediated immune suppression / L. Pinton, S. Solito, V. Damuzzo [et al.] // *Oncotarget.* —2016. — Vol. 7. — No. 2. — P.1168-1184.
211. Poma, P. NF- κ B and Disease / P. Poma // *Int J Mol Sci* — 2020. — Vol. 21. — No. 23. — P. 1-3.
212. Prescott, J. A. Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease / J. A. Prescott, J.P. Mitchell, S. J. Cook // *Biochem J.* — 2021. — Vol. 478. — No. 13. — P. 2619-2664.
213. Priyadarssini, M. Effect of methotrexate monotherapy on T-cell subsets in the peripheral circulation in psoriasis / M. Priyadarssini, L. Chandrashekar, M. Rajappa // *Clin Exp Dermatol.* — 2019. — Vol. 44. — No. 5. — P. 491-497.
214. Purohit, V. Systems-based approaches to study immunometabolism / V. Purohit, A. Wagner, N. Yosef [et al.] // *Cell Mol Immunol.* — 2022. — Vol. 19. — No. 3. — P. 409-420.
215. Raharja, A. Psoriasis: a brief overview / A. Raharja, S. K. Mahil, J. N. Barker // *Clin. Med. (Lond).* — 2021. — Vol. 21. — No. 3. — P. 170-173.

216. Ramadass, V. Small Molecule NF- κ B Pathway Inhibitors in Clinic / V. Ramadass, T. Vaiyapuri, V. Tergaonkar // *Int J Mol Sci.* — 2020. — Vol. 21. — No. 14. — P. 1-43.
217. Raphael, I. Memory CD4⁺ T Cells in Immunity and Autoimmune / I. Raphael, R. R. Joern, T. G. Forsthuber // *Diseases. Cells* — 2020. — Vol. 9. — No. 3. — P.1-23.
218. Rasheed, MRHA, Succinate Dehydrogenase Complex: An Updated Review / MRHA Rasheed, G. Tarjan // *Arch Pathol Lab Med.* — 2018. — Vol. 142. — No.12. — P.1564-1570.
219. Ray-Jones, H. One SNP at a time: moving beyond GWAS in psoriasis / H. Ray-Jones, S. Eyre, A. Barton [et al.]. // *Journal of Investigative Dermatology.* — 2016. — Vol. 136. — No. 3. — P. 567-573.
220. Reich, K. Clinical response of psoriasis to subcutaneous methotrexate correlates with inhibition of cutaneous T helper 1 and 17 inflammatory pathways / K. Reich, J. L. K. Reich, T.M. Falk [et al.]. // *Br J Dermatol.* — 2019. — Vol. 181. — No 4. — P. 859-862.
221. Relvas M. Pediatric psoriasis / M. Relvas, T. Torres // *American journal of clinical dermatology.* — 2017. — Vol. 18. — No. 6. — P. 797-811.
222. Rendon, A. Psoriasis Pathogenesis and Treatment / A. Rendon, K. Schäkel // *Int J Mol Sci.* — 2019. — Vol 20. — No 6. — P.1-28.
223. Ren, H. M. New developments implicating IL-21 in autoimmune disease / H. M. Ren, A. E. Lukacher, Z. S. M. Rahman [et al.]. // *Journal of autoimmunity* — 2021. — Vol.122. — P.1-30.
224. Reyes, A.C. A reevaluation of the origin of the rate acceleration for enzyme-catalyzed hydride transfer / A. C. Reyes, T. L. Amyes, J. P. Richard // *Org Biomol Chem.* — 2017. — Vol 15. — No. 42. — P. 8856-8866.
225. Reuven, O. Functional Assays Evaluating Immunosuppression Mediated by Myeloid-Derived Suppressor Cells / O. Reuven, I. Jr. Mikula, H. Ashkenazi-Preiser [et al.] // *Curr Protoc.* —2022. — Vol. 2. — No. 10. — P. 1-36.

226. Reuven, O. Phenotypic Characterization and Isolation of Myeloid-Derived Suppressor Cells / O. Reuven, I. Jr Mikula, H. Ashkenazi-Preisner [et al.] // Curr Protoc. — 2022. — Vol. 2. — No. 10. — P. 1-31.
227. Robson, S.C. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance / S.C. Robson, J. Sévigny, H. Zimmermann // Purinergic Signal. — 2006. — Vol. 2. — No. 2. — P. 409-430.
228. Savio, L. E. B. Ectonucleotidase Modulation of Lymphocyte Function in Gut and Liver / L. E. B. Savio, S. C. Robson, M. S. Longhi // Front. Cell. Dev. Biol. — 2021. — Vol. 8. — No. 621760. — P. 1-9.
229. Saravia, J. Signaling networks in immunometabolism / J. Saravia, J. L. Raynor, N. M. Chapman [et al.]. // Cell Res. — 2020. — Vol. 30. — No. 4. — P. 328-342.
230. Samotij, D. Biologics in the Treatment of Lupus Erythematosus: A Critical Literature Review / D. Samotij, A. Reich // Biomed Res Int. — 2019. — Vol. 2019. — P.1-18.
231. Sbidian, E. Systemic pharmacological treatments for chronic plaque psoriasis: a network meta-analysis / E. Sbidian, A. Chaimani, I. Garcia-Doval [et al.] // Cochrane Database of Systematic Reviews. — 2022. — Vol 12. — No. 12. — P. 1-749.
232. Schnappauf, O. Mendelian diseases of dysregulated canonical NF- κ B signaling: From immunodeficiency to inflammation / O. Schnappauf, I. Aksentijevich // J Leukoc Biol. — 2020. — Vol. 108. — No. 2. — P. 573-589.
233. Schon, M. P. Adaptive and Innate Immunity in Psoriasis and Other Inflammatory Disorders / M. P. Schon // Front Immunol. — 2019. — Vol. 10. — P. 1-14.
234. Seyedmirzaei, H. Cytokine alterations in psoriasis: an updated review / H. Seyedmirzaei, N. Rezaei // Expert Rev Clin Immunol. — 2021. — Vol. 17. — No. 12. — P. 1323-1335.

235. Shi, Y. IL-21 Induces an Imbalance of Th17/Treg Cells in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis Patients / Y. Shi, Z. Chen, Z. Zhao [et al.] // Front Immunol. — 2019. — Vol.10. — P. 1-12.
236. Silva-Vilches, C. ATP and Its Metabolite Adenosine as Regulators of Dendritic Cell Activity / C. Silva-Vilches, S. Ring, K. Mahnke // Front Immunol. — 2018. — Vol. 9. — P. 2581.
237. Soler, D.C. Expanding the List of Dysregulated Immunosuppressive Cells in Psoriasis / D. C. Soler, T. S. McCormick // J Invest Dermatol. —2016. — Vol. 136. — No. 9. — P.1749-1751.
238. Soler, D. C. Increased, but Functionally Impaired, CD14(+) HLA-DR(-/low) Myeloid-Derived Suppressor Cells in Psoriasis: A Mechanism of Dysregulated T Cells / D. C. Soler, A. B. Young, L. Fiessinger [et al.]. // J Invest Dermatol. — 2016. — Vol.136. — No 4. — P. 798-808.
239. Stathopoulou, C. Immunometabolism: an overview and therapeutic prospects in autoimmune diseases / C. Stathopoulou, D. Nikoleri, G. Bertsias // Immunotherapy. —2019. — Vol.11. — No. 9. — P. 813-829.
240. Strychalski, M. L. Cytokine Modulators in Plaque Psoriasis - A Review of Current and Prospective Biologic Therapeutic Approaches / M. L. Strychalski, H.S. Brown, S. C. Bishop // JAAD Int. — 2022. — Vol. 9. — P. 82-91.
241. Srivastava, A. Cross-talk between IFN- γ and TWEAK through miR-149 amplifies skin inflammation in psoriasis / A. Srivastava, L. Luo, W. Lohcharoenkal [et al.]. // J Allergy Clin Immunol. — 2021. —Vol. 147. — No. 6. — P. 2225-2235.
242. Subedi, S. Management of pediatric psoriasis with acitretin: A review / S. Subedi, Q. Yu, Z. Chen [et al.] // Dermatol Ther. — 2018. — Vol. 31. — No. 1. — P.1-6.
243. Sun, W. 'Psoriasis 1' reduces psoriasis like skin inflammation by inhibiting the VDR mediated nuclear NF κ B and STAT signaling pathways / W. Sun, Y. Gao, X. Yu [et al.]. Mol Med Rep. — 2018. — Vol. 18. — No. 3. —P. 2733-2743.

244. Syversen, S. W. Effect of Therapeutic Drug Monitoring vs Standard Therapy During Maintenance Infliximab Therapy on Disease Control in Patients With Immune-Mediated Inflammatory Diseases: A Randomized Clinical Trial / S. W. Syversen, K. K. Jørgensen, G. L. Goll [et al.]. // JAMA. — 2021. — Vol. 326. — No. 23. — P. 2375-2384.

245. Ten Bergen, L. L. Current knowledge on autoantigens and autoantibodies in psoriasis / L. L Ten Bergen., A. Petrovic, A. K. Aarebrot [et al.]. // Scandinavian Journal of Immunology. —2020. — Vol. 92. — No. 4. — P.1-6.

246. Timosenko, E. Modulation of cancer-specific immune responses by amino acid degrading enzymes / E. Timosenko, A. V. Hadjinicolaou, V. Cerundolo // Immunotherapy. — 2017. — Vol. 9. — No. 1. — P. 83-97.

247. Timperi, E. CD39 Regulation and Functions in T Cells. // E. Timperi, V. Barnaba / Int J Mol Sci. — 2021. — Vol. 22. — No. 15. — P. 1-13.

248. Tokura, Y. Pathophysiology of Skin Resident Memory T Cells / Y. Tokura, P. Phadungsaksawasdi, K. Kurihara, et al. // Frontiers in immunology — 2021. — Vol. 11. — No. 618897. — P. 1-19.

249. Tseng J. C. Therapeutic Development Based on the Immunopathogenic Mechanisms of Psoriasis / J. C. Tseng, Y. C. Chang, C. M. Huang [et al.]. // Pharmaceutics — 2021. — Vol. 13. — No. 7. — P. 1-24.

250. Tsiogkas, S. G. A sharp decrease of Th17, CXCR3⁺-Th17, and Th17.1 in peripheral blood is associated with an early anti-IL-17-mediated clinical remission in psoriasis / S. G. Tsiogkas, A. Mavropoulos, E. Dardiotis [et al.] // Clin Exp Immunol. — 2022. — Vol. 210. — No. 1. — P. 79-89.

251. Tsoi, L. C. Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants / L.C. Tsoi, P. E. Stuart, C. Tian [et al.]. // Nat Commun. — 2017. — Vol. 8. — P. 1-8.

252. Tsoi L. C. Cytokine responses in nonlesional psoriatic skin as clinical predictor to anti-TNF agents / L.C. Tsoi, M. T. Patrick, S. Shuai [et al.] // J Allergy Clin Immunol. — 2022. — Vol. 149. — No. 2. — P.640-649

253. Uttarkar, S. Regulatory cells in the skin: Pathophysiologic role and potential targets for anti-inflammatory therapies / S. Uttarkar, N. C. Brembilla, W.H. Boehncke // *J Allergy Clin Immunol.* — 2019. — Vol. 143. — No.4. — P. 1302-1310.
254. Valenzuela, F. Immunogenicity to biological drugs in psoriasis and psoriatic arthritis / F. Valenzuela, R. Flores. // *Clinics (Sao Paulo).* — 2021. — Vol. 76. — P.1-9.
255. van Geffen, C. Pharmacological modulation of myeloid-derived suppressor cells to dampen inflammation / C. van Geffen, C. Heiss, A. Deißler [et al.]. // *Front Immunol.* — 2022. — Vol. 13. — P.1-26.
256. Veglia, F. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity / F. Veglia, E. Sanseviero, D. I. Gabrilovich // *Nat Rev Immunol.* — 2021. — Vol. 21. — No. 8. — P. 485-498.
257. Veglia, F. Myeloid-derived suppressor cells coming of age / F. Veglia, M. Perego, D. Gabrilovich // *Nat Immunol.* — 2018. — Vol. 19. — No. 2. — P. 108-119.
258. Vicic, M. Current concepts of psoriasis immunopathogenesis / M. Vicic, M. Kaštelan, I. Brajac [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences* — 2021. — Vol. 22. — No. 21. — P. 1-14.
259. Vicic, M. Systemic and Local Increase of Granulysin Expression in Cytotoxic Lymphocytes in Severe Psoriasis / M. Vicic, M. Kaštelan, V. Sotošek Tokmadžić [et al.]. // *Acta Derm Venereol.* — 2019. — Vol. 99. — No. 12. — P. 1136-1142.
260. von Meyenn, L. Targeting T Cell Metabolism in Inflammatory Skin Disease / L. von Meyenn, N. L. Bertschi, C. Schlapbach // *Front Immunol.* — 2019. — Vol. 10. — P. 1-14.
261. Volarić, I. The Role of CD8⁺ T-Cells and their Cytokines in the Pathogenesis of Psoriasis / I. Volarić, M. Vičić, L. Prpić-Massari // *Acta Dermatovenereol Croat.* — 2019. — Vol. 27. — No. 3. — P. 159-162.

262. Voss, K. A guide to interrogating immunometabolism / K. Voss, H. S. Hong, J. E. Bader [et al.]. // *Nat Rev Immunol.* —2021. —Vol. 21. — No. 10. — P. 637-652.

263. Vuerich, M. Dysregulation of Adenosinergic Signaling in Systemic and Organ-Specific Autoimmunity / M. Vuerich, R. P. Harshe, S.C. Robson [et al.]. // *Int. J. Mol. Sci.* — 2019. — Vol. 20. — No. 528. — P. 1-15.

264. Vuerich M. Ectonucleotidases in Intestinal and Hepatic Inflammation / M. Vuerich, S. C. Robson, M. S. Longhi // *Front. Immunol.* — 2019. — Vol. 10. — No. 507. — P. 1-11.

265. Wang, L. Reactive oxygen species in immune cells: A new antitumor target / L. Wang, Z. Kuang, D. Zhang [et al.] // *Biomed Pharmacother.* — 2021. — Vol. 133. — P. 1-9.

266. Wang, Y. Mitochondrial metabolism regulates macrophage biology / Y, Li N Wang, X. Zhang [et al.] // *J Biol Chem.* — 2021. —Vol. 297. — No. 1. — P. 1-11.

267. Wensveen, F. M. NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness / F. M. Wensveen, V Jelenčić, B. Polić // *Front Immunol.* — 2018. —Vol 9. — No. 441. — P. 1-8.

268. Woo, Y. R. Molecular Mechanisms and Management of a Cutaneous Inflammatory Disorder: Psoriasis / Y. R. Woo, D. H. Cho, H. J. Park // *Int J Mol Sci.* — 2017. — Vol. 18. — No. 12. — P. 1-26.

269. Xie, X. Biologics recommendations for patients with psoriasis: a critical appraisal of clinical practice guidelines for psoriasis / X. Xie, Y. Wang, S. Yao [et al.] // *J Dermatolog Treat.* — 2022. — Vol. 33. — No. 4. — P. 2038-2050.

270. Yamanaka, K. Pathophysiology of psoriasis: A review / K. Yamanaka, O. Yamamoto, T. Honda // *J Dermatol.* — 2021. — Vol. 48. — No. 6. — P. 722-731.

271. Yan, K. The distinct role and regulatory mechanism of IL-17 and IFN- γ in the initiation and development of plaque vs guttate psoriasis / K. Yan, L. Han, H. Deng [et al.] // *J Dermatol Sci.* — 2018. — Vol. 92. — No. 1. — P. 106-113.

272. Yan, K. Methotrexate restores the function of peripheral blood regulatory T cells in psoriasis vulgaris via the CD73/AMPK/mTOR pathway / K. Yan, W. Xu, Y. Huang [et al.] // *Br J Dermatol.* — 2018. — Vol.179. — No.4. — P. 896-905.

273. Yang, W. CD4⁺ T cell metabolism, gut microbiota, and autoimmune diseases: implication in precision medicine of autoimmune diseases / W. Yang, T. Yu, Y. Cong // *Precis Clin Med.* — 2022. — Vol. 5. — No. 3. — P. 1-11.

274. Yiu, Z. Z. N. Drug survival of adalimumab, ustekinumab and secukinumab in patients with psoriasis: a prospective cohort study from the British Association of Dermatologists Biologics and Immunomodulators Register (BADBIR) / Z. Z. N. Yiu, K. J. Mason, P. J. Hampton [et al.] // *Br J Dermatol.* — 2020. — Vol. 183. — No. 2. — P. 294-302.

275. Yiu, Z. Z. N. Drug Survival Associated With Effectiveness and Safety of Treatment With Guselkumab, Ixekizumab, Secukinumab, Ustekinumab, and Adalimumab in Patients With Psoriasis / Z. Z. N. Yiu, Becher G., Kirby B. [et al.] // *JAMA Dermatol.* — 2022. — Vol. 158. — No. 10. — P. 1131-1141.

276. Yu, H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study / H. Yu, L. Lin, Z. Zhang [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* — 2020. — Vol. 5. — No. 1. — P. 1-23.

277. Yu, K. The Function and Therapeutic Implications of TNF Signaling in MDSCs / K. Yu, C. Yu, L. Jiao [et al.] // *Biomolecules.* — 2022. — Vol. 12. — No. 11. — P. 1-14.

278. Zangrilli, A. Adalimumab in children and adolescents with severe plaque psoriasis: a safety evaluation / A. Zangrilli, M. Bavetta, L. Bianchi // *Expert Opin Drug Saf.* — 2020. — Vol. 19. — No. 4. — P. 433-438.

279. Zeng, J. Implications of CD39 in immune-related diseases / J. Zeng, Z. Ning, Y. Wang [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* — 2020. — Vol. 89. — No. 107055. — P. 1-10.

280. Zhang, H. Y. Target tissue ectoenzyme CD39/CD73-expressing Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with psoriasis / H. Y. Zhang, K. X. Yan, Q. Huang [et al.]. // Clin. Exp. Dermatol. — 2015. — Vol. 40. — No. 2. — P. 182-191.
281. Zhang, L. Characterization of Th17 and FoxP3(+) Treg Cells in Paediatric Psoriasis Patients / L. Zhang, Y. Li, X. Yang [et al.] // Scand J Immunol. — 2016. — Vol. 83. — No. 3. — P. 174-180.
282. Zhang, M. Metabolic regulation of T cell development / M. Zhang, X. Lin, Z. Yang [et al.] // Front Immunol. — 2022. — Vol. 13. — P.1-9.
283. Zhang, W. Transcriptional and posttranslational regulation of Th17/Treg balance in health and disease / W. Zhang, X. Liu, Y. Zhu [et al.] // Eur J Immunol. — 2021. — Vol. 51. — No. 9. — P. 2137-2150.
284. Zhu, X. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders / X. Zhu, J. Zhu // Int J Mol Sci. — 2020. — Vol. 21. — No. 21. — P. 1-26.
285. Zimmermann, H. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. / H. Zimmermann // Purinergic Signal. — 2021. — Vol. 17. — No. 1. — P. 117-125.
286. Zuo, H. Metabolic Reprogramming in Mitochondria of Myeloid Cells. / H. Zuo, Y. Wan // Cells. — 2019. — Vol. 9. — No. 1. — P. 1-17.