



**Проект научно-исследовательской работы
«Метагеномы* фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи»
(НИР1).**

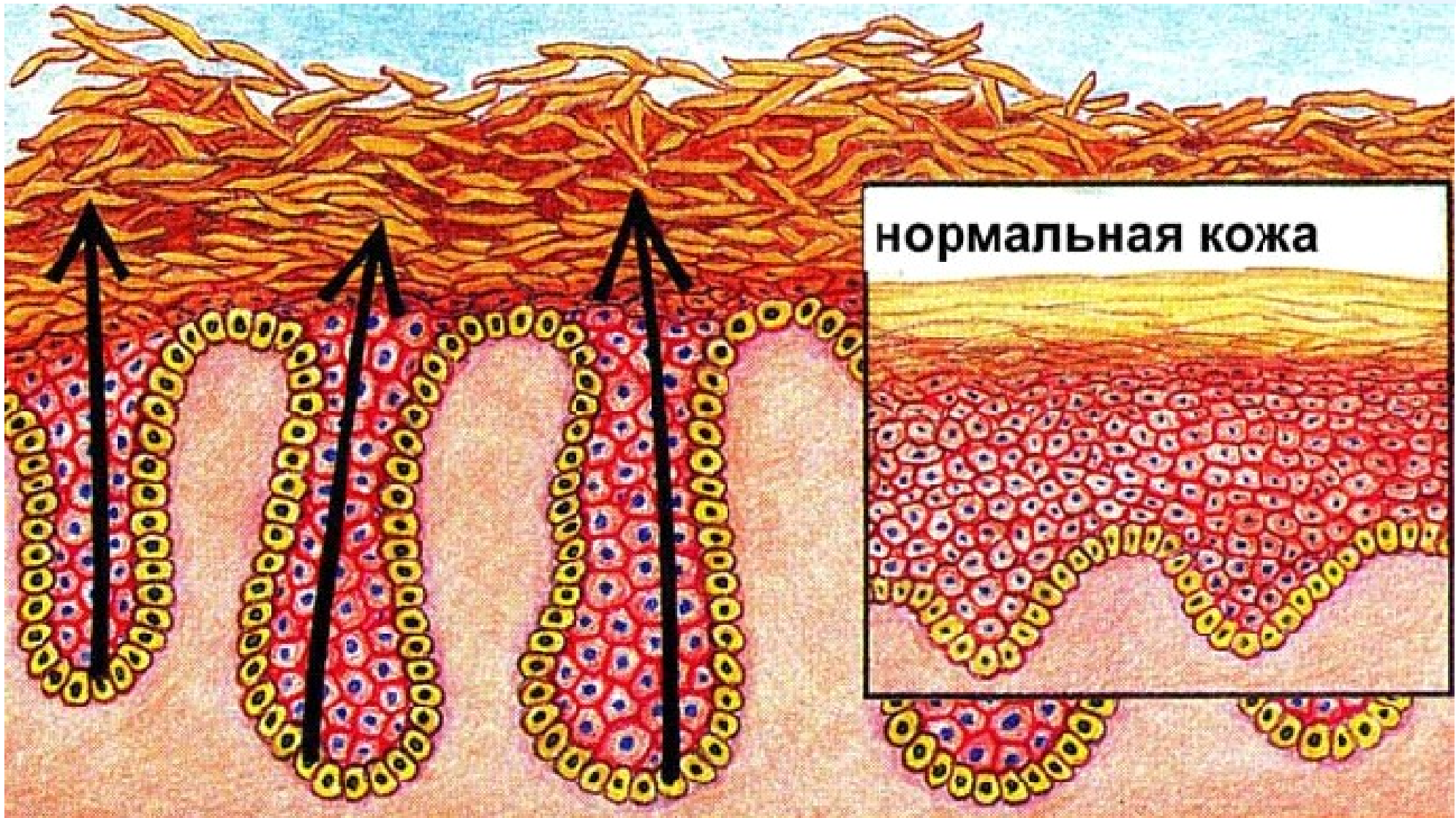
Песляк Михаил Юрьевич,
Председатель Антипсориатической Ассоциации «ЕСТЕСТВЕННЫЙ ПУТЬ»

Раздел 1.

Вопросы НИР1.

**Псориатическая болезнь – факты и гипотезы.
Системный псориатический процесс SPP
– основа Y-модели патогенеза.**

* Метагеном – совокупность всех nhDNA (нехозяйских DNA, т.е. в данной НИР - не принадлежащих человеку), содержащихся в биоматериале. nhDNA – это бактериальная, архейная, грибковая, гельминтная, вирусная, фаговая и т.д. DNA.



Рост высоты сосочков дермы приводит к увеличению толщины дермо–эпидермальной области. Стрелки показывают направление интенсивной пролиферации клеток эпидермиса.

Статистика заболеваемости ПБ по странам.

Страна	Годы	Обследованных	% с псориазом
China	1984	6 617 917	0.12
China, Taiwan	2006	23 000 000	0.24
China	1974–1981	670 000	0.35
Germany	2005	1 344 071	2.53
Germany	2003	2 238 000	2.0
Italy	2006	4 109	2.9
Japan	2010–2011	128 000 000	0.44
Norway	1985	10 576	1.41
Poland	2005–2009	2 161 832	1.45
Portugal	1994	1 037	1.9
Spain	1998	12 938	1.43
Spain	2013	12 711	2.31
Sweden	1998–2010	—	1.95
UK	2009	7 520 293	1.87
UK	1987–2002	7 533 475	1.52
USA	1971–1974	20 749	1.43
USA	2004	27 220	2.2
USA	2009	2 573	5.1

Michalek IM, Loring B, John SM. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2017 Feb;31(2):205-212. 27573025.

Статистика заболеваемости в РФ.

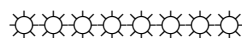
Оценка числа псориатических пациентов в мире.

Количество ПП - псориатических пациентов (тыс.чел)

Регион	Населе- ние	ПП
% населения, имеющих ПБ в РФ и других странах бывшего СССР		4%
Московский регион (Москва и Московская обл.)	17 000	680
Другие регионы России	125 000	5 000
Страны бывшего СССР (кроме РФ)	150 000	6 000
США (2004 год)		2,2%
	315 000	6 930
% населения, имеющих ПБ в мире (в среднем)		2%
Население всех стран мира	7 300 000	146 000

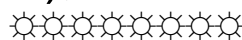
Многие пациенты с псориазом имеют синдром мальабсорбции.

Ж.В.Рудковская и др. (2003), РГМУ им.Н.И.Пирогова, Институт питания РАМН
Е.И. Харьков и др. (2005-13), Красноярский госмедуниверситет.



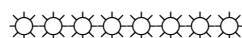
Уровень тонкокишечного СИБР более 10^5 КОЕ/мл обнаружен у 95 из 121 пациентов с псориазом (78,5%).

Н.И.Потатуркина-Нестерова и др. (2009), Ульяновский госуниверситет



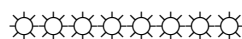
Большинство пациентов с псориазом имеют высокий LPS-уровень в крови.

З.Ш. Гараева и др. (2005-7), Казанская медакадемия.

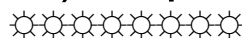


Толеризация (перепрограммирование) фагоцитов крови и их свойства.

Robert Sabat и Kerstin Wolk и др. (2000-5), University Hospital Charité, Berlin, Germany;
Jean-Marc Cavaillon и др. (2004-15), Unit Cytokines & Inflammation, Institut Pasteur, Paris, France.



Системная модель патогенеза (BF-модель). Антигенная роль стрептококкового пептидогликана вне кожи (кишечник, тонзиллы, кровоток) и в псориазической коже. Barbara Baker и Lionel Fry (2006-7), Imperial College, London, UK.



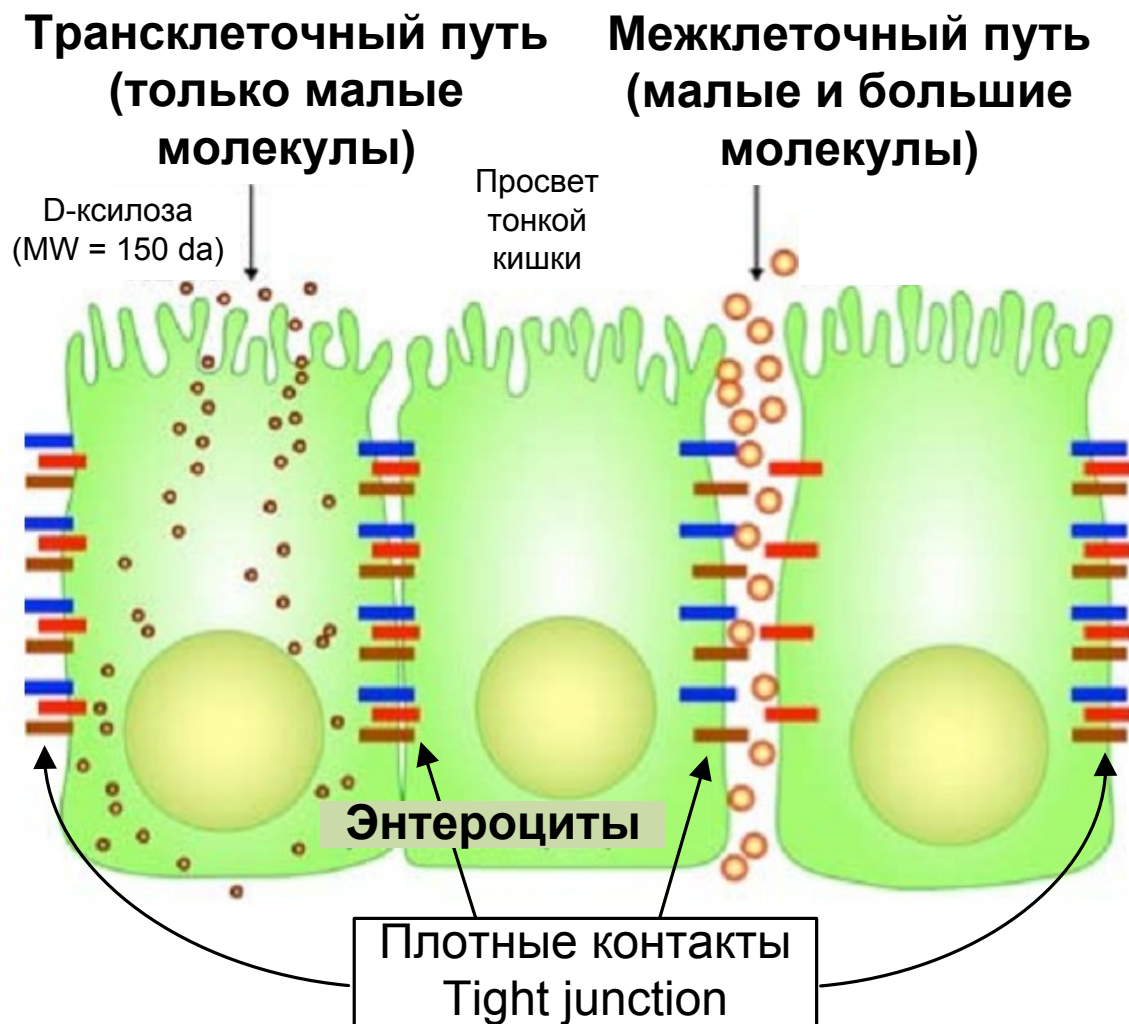
Новая системная модель патогенеза (Y-модель). Развитие BF-модели. Детальное согласованное описание системных и локальных подпроцессов. М.Ю.Песляк (2012).

**Презентация Y-модели патогенеза
на Интернет-ресурсе.**

Трансклеточная тонкокишечная проницаемость при псориазе. Тест с D-ксилозой.

6

Permeability-1_e



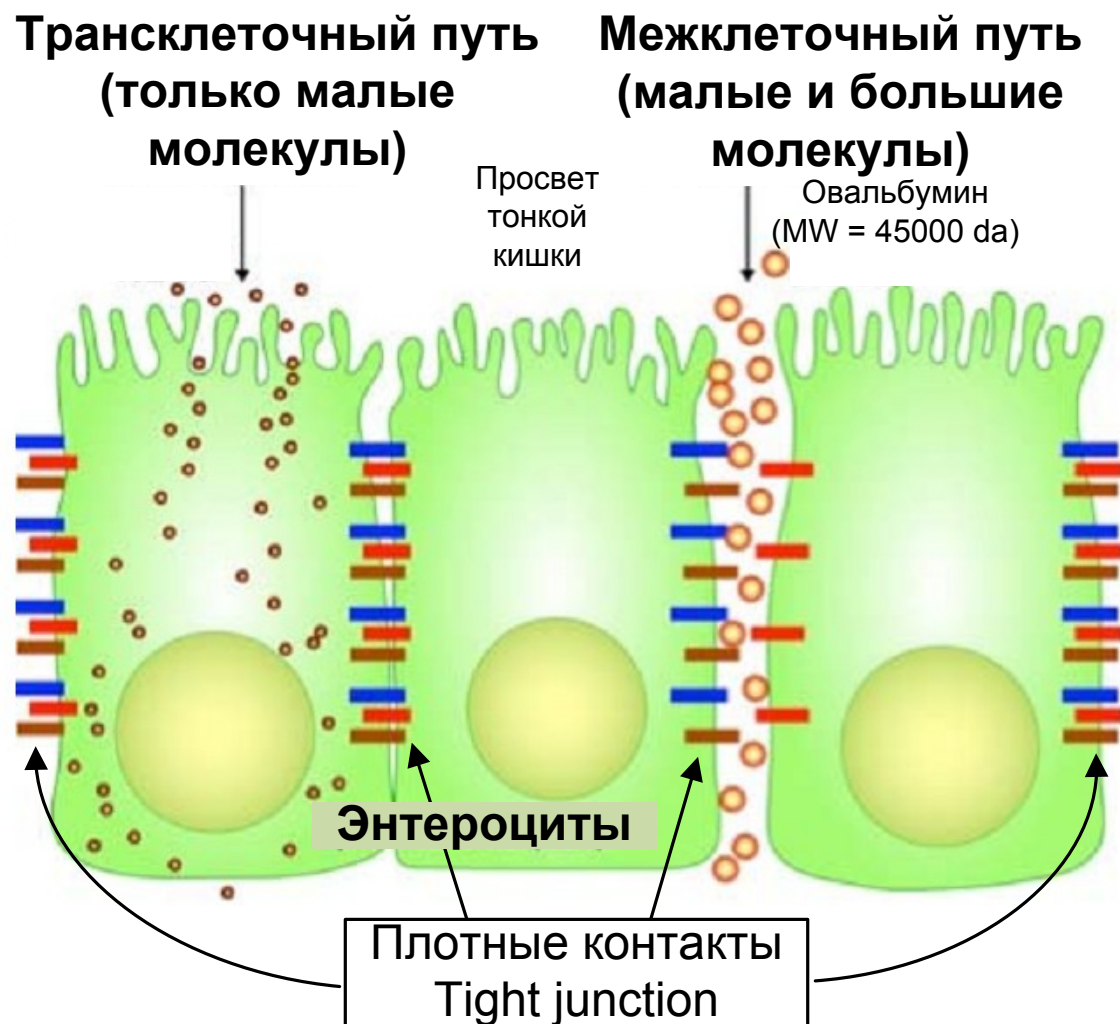
Многие пациенты с псориазом имеют синдром мальабсорбции (Харьков Е.И. с соавторами, Красноярский государственный медицинский университет). Была исследована взаимосвязь между синдромом мальабсорбции (SM) и псориазом. Степень SM может измеряться в граммах D-ксилозы, экскретируемых с мочой в течение 5 часов после орального приема. SM был определен у 83 псориаитиков и 20 человек из контрольной группы. У псориаитиков он был существенно снижен (SM=1,0, в среднем) по сравнению с нормой (SM=1,8, в среднем). Обнаружена обратная зависимость между SM и тяжестью (по PASI) и формой псориаза: вульгарная (SM=1,2, PASI=14), экссудативная или артропатическая (SM=1,0; PASI=18), эритродермия (SM=0,8; PASI=39). Также оказалось что, как правило, чем ниже SM, тем больше стаж заболевания.

Харьков Е.И., Прохоренков В.И., Ширяева Ю.А. Показатели функциональной активности тонкой кишки у больных псориазом. Сибирское медицинское обозрение, 2008;(6):55-58.
Харьков Е.И., Ширяева Ю.А., Терешина Д.С. Синдром мальабсорбции и псориаз: способ коррекции. Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2006;(7):61-63.
Харьков Е.И., Ширяева Ю.А. Синдром мальабсорбции при псориазе: клинико-лабораторные параллели. Сибирское медицинское обозрение, 2005;(2-3):62-64.
Ширяева Ю.А. Синдром мальабсорбции у больных псориазом. дис. кмн., Красноярск, 2007, 150 с. .
Vojdani A. For the assessment of intestinal permeability, size matters. Altern Ther Health Med. 2013 Jan-Feb;19(1):12-24. 23341423.

Межклеточная тонкокишечная проницаемость при псориазе. Овальбуминовый тест.

7

Permeability-2.



С целью изучения уровня кишечной проницаемости у детей страдающих псориазом применялся овальбуминовый (ОВА) тест. В норме ОВА-уровень в крови до ОВА-нагрузки (приема белков куриного яйца) близок к нулю, а через 3 часа после ОВА-нагрузки он не должен превышать 1 нг/мл. У обследованной группы детей (30 пациентов) начальный ОВА-уровень в среднем был равен 1,13 нг/мл, а после ОВА-нагрузки составил 15,5 нг/мл (максимум достигал 104 нг/мл). Причем у детей в прогрессирующей стадии псориаза средний ОВА-уровень составлял 35,4 нг/мл, в то время как в стационарной стадии – 5,1 нг/мл.

В процессе лечения у больных (интервальная нормобарическая гипокситерапия) с подострым течением наблюдалось снижение ОВА-проницаемости в среднем с 43,2 нг/мл до 23,1 нг/мл. Явной корреляции между ОВА-проницаемостью и тяжестью псориаза, определенного по индексу PASI, обнаружено не было.

Положительный эффект гипокситерапии может быть связан с угнетением жизнедеятельности патогенных облигатных аэробов (например *Pseudomonas aeruginosa*) или некоторых кислород-зависимых штаммов стрептококков или энтерококков в микрофлоре ВДП и, возможно, тонкокишечной микрофлоре.

Стенина М.А., Кулагин В.И., Рудковская Ж.В. и др., Роль нарушений барьерной функции кишечника в патогенезе псориаза у детей, Российский журнал кожных и венерических болезней, 2003;(2):20-23.

Рудковская Ж.В., Клинико-лабораторный мониторинг эффективности применения метода интервальной нормобарической гипоксии в комплексном лечении псориаза у детей. Дис. кмн, Москва, 2003, 137 с.

Vojdani A. For the assessment of intestinal permeability, size matters. Altern Ther Health Med. 2013 Jan-Feb;19(1):12-24. 23341423.

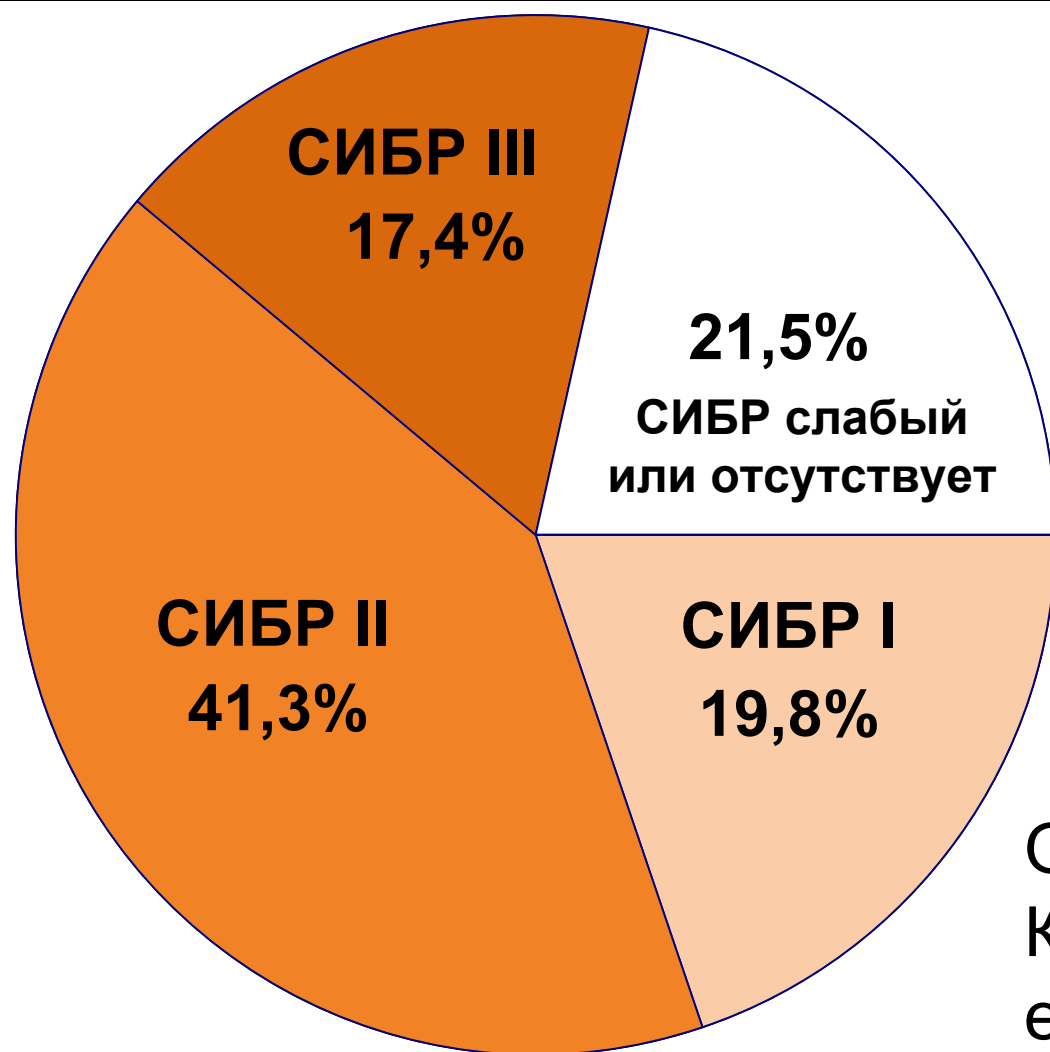
Впервые исследования просветной микрофлоры проксимального отдела тонкой кишки были проведены у 121 пациента с псориазом (PASI ≥ 20) специалистами Ульяновского госуниверситета под руководством Н.И.Потатуркиной-Нестеровой в 2009-11 гг. В группу входило 52 пациента со средне-тяжелым псориазом (PASI 20-30) и 69 пациентов с тяжелым псориазом (PASI > 30).

Контрольная группа состояла из 43 здоровых человек. Для определения родов и видов бактерий использовался метод культурального посева на специальные среды. Результаты исследований были опубликованы в российской периодике и представлены на всемирной псориатической конференции в Стокгольме.

Среднее ОМЧ для пациентов с псориазом составило 3×10^6 КОЕ/мл, что существенно выше, чем в контрольной группе – $1,1 \times 10^3$ КОЕ/мл ($\lg(\text{ОМЧ})=3,05$). Обнаружена корреляция между уровнем СИБР и значением PASI (коэффициент корреляции $R=0,46$), между уровнем СИБР и стажем заболевания ($R=0,43$).

У 93% пациентов с псориазом обнаружены *Bifidobacterium* spp. – в среднем 2×10^5 КОЕ/мл ($\lg(\text{ОМЧ})=5,3$). В контрольной группе у 40%, в среднем 250 КОЕ/мл ($\lg(\text{ОМЧ})=2,41$). У 84% пациентов с псориазом обнаружены *Lactobacillus* spp., в среднем $4,6 \times 10^4$ КОЕ/мл ($\lg(\text{ОМЧ})=4,66$). В контрольной группе у 19%, в среднем 350 КОЕ/мл ($\lg(\text{ОМЧ})=2,54$). У 79 из 121 (65%) пациентов с псориазом обнаружены *Enterococcus* spp. - в среднем 2×10^5 КОЕ/мл ($\lg(\text{ОМЧ})=5,28$). В контрольной группе *Enterococcus* spp. не обнаружены. У части псориаитиков обнаружены *Str.pyogenes* (9%) и *Str.viridans* (30%) (в контрольной группе не обнаружены).

Уровень тонкокишечного СИБР (ОМЧ) более 10^5 КОЕ/мл был обнаружен у 95 из 121 пациента с псориазом (78,5%).



СИБР слабый или отсутствует.

ОМЧ менее 10^5 КОЕ/мл.

СИБР I. Нет анаэробной.

ОМЧ аэробной
от 10^5 до 10^6 КОЕ/мл.

СИБР II. Есть анаэробная.

ОМЧ
от 10^6 до 10^7 КОЕ/мл.

СИБР III. Преобладает анаэробная.

ОМЧ более 10^7 КОЕ/мл.

ОМЧ – общее микробное число.
КОЕ – колониеобразующая единица.

Микрофлора	Пациенты с псориазом (121 чел.)			Контрольная группа здоровых (43 чел.)		
	Носи- тели	% носи- телей	Ig (КОЕ/ мл)	Носи- тели	% носи- телей	Ig (КОЕ/ мл)
Bifidobacterium spp.	112	93%	5,3	17	40%	2,41
Lactobacillus spp.	102	84%	4,66	8	19%	2,54
Bacteroides spp.	20	17%	3,3	5	12%	2,86
E.coli typical	81	67%	5,04	11	26%	2,94
E.coli lactose-neg.	4	3%	3,62	0		
E.coli hemolytic	18	15%	3,6	0		
Enterococcus spp.*	79	65%	5,28	0		
Str.viridans	36	30%	5,74	0		
S.aureus	18	15%	3,24	0		
Str.pyogenes	11	9%	4,81	0		
S.epidermidis	75	62%	5,54	17	40%	2,70
Candida	45	37%	4,76	10	23%	2,43
Acinetobacter spp.	7	6%	3,56	4	9%	2,40
Proteus spp.	24	20%	4,1	7	16%	2,14
Clostridium spp.	24	20%	5,2	0		
Klebsiella spp.	17	14%	3,13	0		
Moraxella spp.	63	52%	4,45	0		
Ig(ОМЧ)			6,49			3,05

Исследования
были выполнены
в Ульяновске.
Презентированы
на всемирной
конференции по
лечению
псориаза и
псориатического
артрита.

Весь доклад
(русская версия)
на Интернет-
ресурсе.

* - определялся с точностью до вида только для части пациентов, в 90% это был E.faecalis.

Микрофлора тонкой кишки псориатических пациентов в зоне связки Трейца, Ig(КОЕ/мл).

Исследования выполнены в НМХЦ им.Н.И.Пирогова.

Вид предполагается псорогенным

Некоторые виды (или штаммы) предполагаются псорогенными.

Микрофлора/Пациент	1	2	3	7	8	9	10	11	12	14	15	18	20	22	23	25	26	27	39	40
Candida albicans	3	3	3	3		4			<3	2	3	2		2				4		
Candida lusitanae								2												
Bifidobacterium sp.									7					3						
Enterococcus avium							4													
Enterococcus casseliflavus																			4	
Enterococcus durans/hirae							3													
Enterococcus faecalis	5	2	3						3			2			3			3		5
Escherichia coli (лактозонегативная)												3							4	6
Gemella haemolysans								<3												
Klebsiella pneumonia																			4	6
Kocuria kristinae											3									
Lactobacillus sp.						4								3						
Staph.aures		3		3					3		4								3	4
Staph.auricularis										5										
Staph.epidermidis													3	3			4			
Staph.lugdunensis				3																
Staph.saprophyticus	4											2			2					
Stenotrophomonas maltophilia					<3															
Strep.agalactiae		3							4											
Strep. anginosus (milleri subgroup)							<=4												4	4
Strep.dysgalactiae											4									
Strep.equinus								3												
Strep.infantarius, subsp.infantarius				4																
Strep.mitis/oralis	5	3	6	<3					4	<3	6		3	4	4		3	5	5	
Strep.mutans															3					
Strep.pneumoniae							3													
Strep.salivarius																	5			
Peptostr.anaerobis	4																			
Pseudomonas alcaligenes										5										
Тонкокишечный СИБР	5	3	6	4	<3	4	4	4	7	6	4	3	4	4	3	3	5	5	4	6

PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) - Патоген-ассоциированные молекулярные структуры, в частности LPS - липополисахарид (Gram(-) бактерии), LTA-липотейхоевые кислоты (Gram+ бактерии), PG – пептидогликан (Gram+ и Gram- бактерии), CpG (фрагмент бактериальной или вирусной ДНК) и т.д.

TLR4 – лиганд LPS;

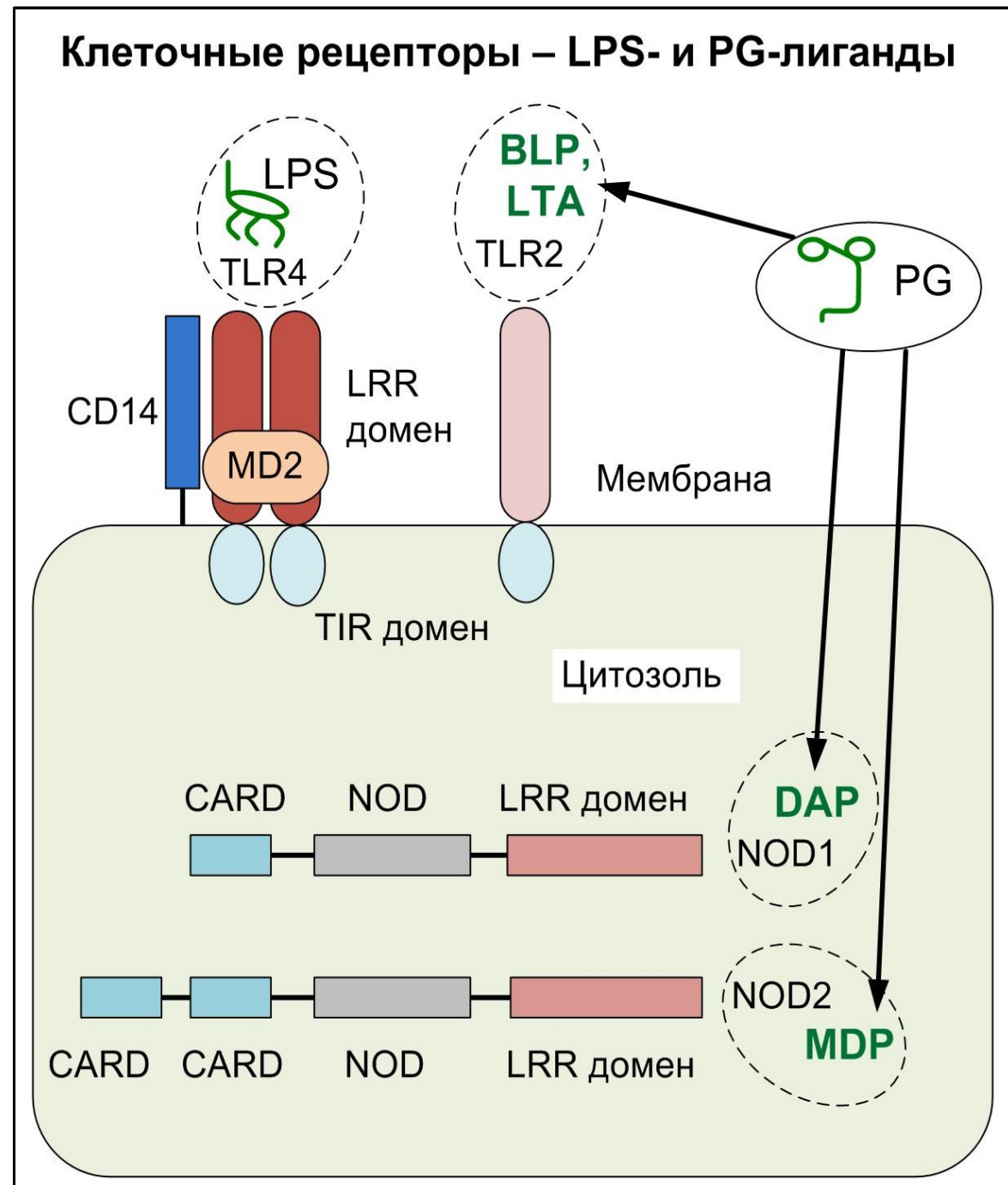
Рецепторы фрагментов PG:

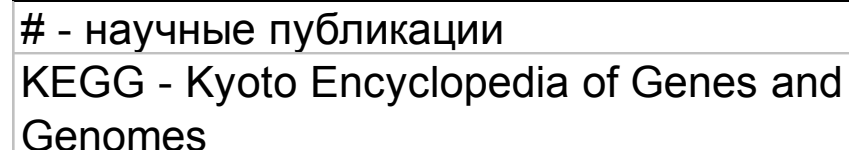
TLR2 – лиганд BLP бактериальный липопроtein) и LTA;

NOD1 – лиганд DAP (диаминопимелиновая кислота);

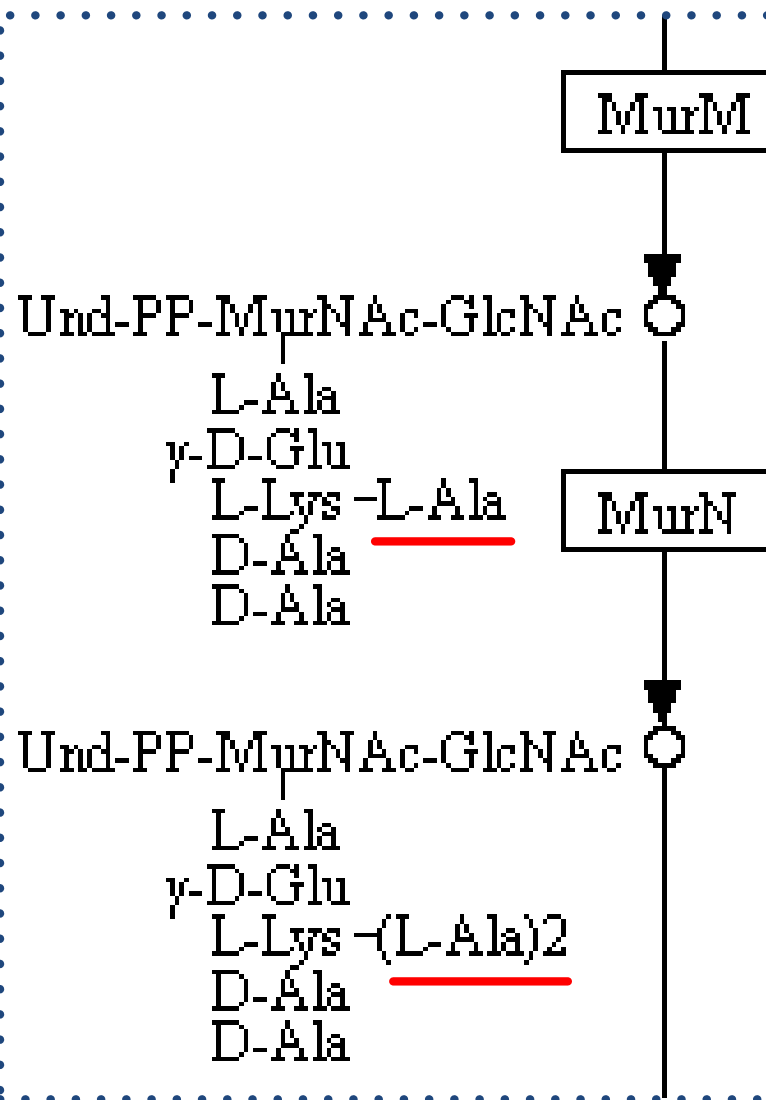
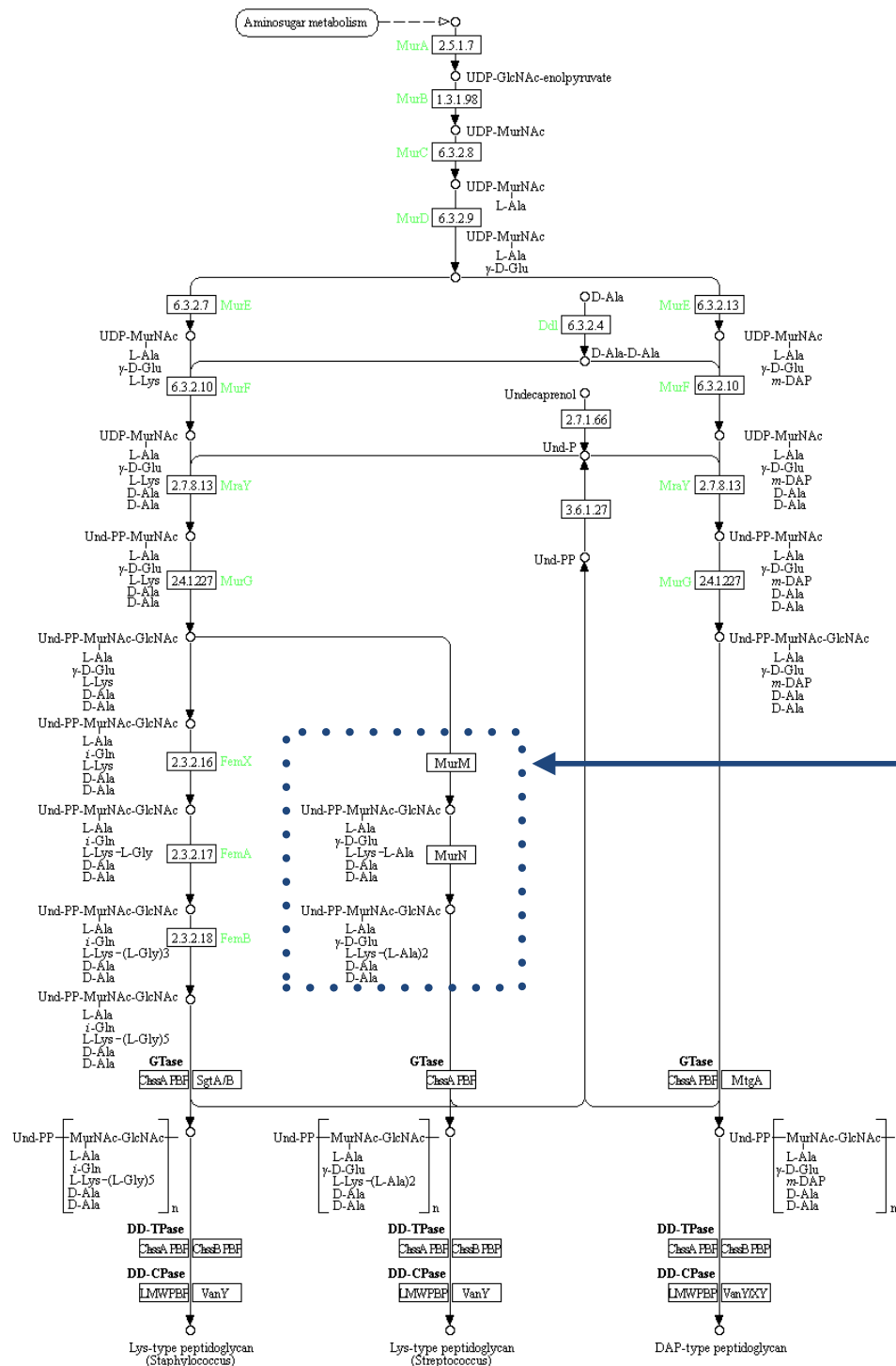
NOD2 – лиганд MDP (мурамил дипептид).

Активность взаимодействия PAMP с его лигандом определяется модификацией PAMP.





Биосинтез межпептидного мостика
с участием энзимов типа murM и murN



Виды Gram+ бактерий с межпептидными мостиками (L-Ala)-(L-Ala) или (L-Ser)-(L-Ala). (База данных KEGG)

15

PG_PsB-3 e

Streptococcus sp.		Виды из других родов
Streptococcus agalactiae	Streptococcus pneumoniae	Enterococcus faecalis
Streptococcus anginosus	Streptococcus pseudopneumoniae	Enterococcus silesiacus
Streptococcus constellatus	Streptococcus pyogenes	Eubacterium sulci
Streptococcus cristatus	Streptococcus salivarius	Lactococcus garvieae
Streptococcus dysgalactiae	Streptococcus sanguinis	Lactococcus piscium
Streptococcus equi	Streptococcus suis	Leuconostoc carnosum
Streptococcus gallolyticus	Streptococcus thermophilus	Leuconostoc citreum
Streptococcus gordonii	Streptococcus uberis	Leuconostoc garlicum
Streptococcus infantarius		Leuconostoc gelidum
Streptococcus iniae		Leuconostoc kimchii
Streptococcus intermedius		Leuconostoc lactis
Streptococcus lutetiensis		Leuconostoc mesenteroides
Streptococcus macedonicus		Melissococcus plutonius
Streptococcus mitis		Oenococcus oeni
Streptococcus mutans		Weissella ceti
Streptococcus parasanguinis		Weissella cibaria
Streptococcus parauberis		Weissella jogaejeotgali
Streptococcus pasteurianus		Weissella koreensis

Почти все штаммы этих видов имеют пептидогликан аналогичный пептидогликану **Str.pyogenes**. Поэтому эти виды предполагаются пораженными. Формирование межпептидных мостиков обеспечивают различные murMN-гены. По базе данных KEGG можно определить все (внесенные в нее) штаммы бактерий, которые имеют гены, обеспечивающие секрецию обоих энзимов, т.е. и типа murM и типа murN.

Муропептиды и пептиды, образующиеся при деградации пептидогликана *Str.pneumonia*.

16

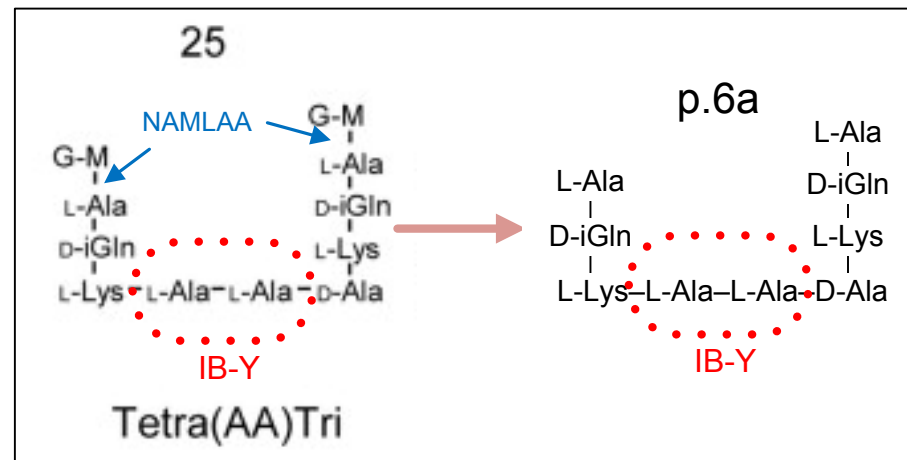
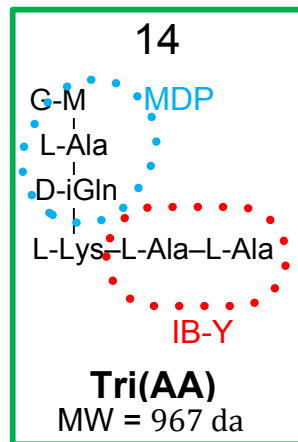
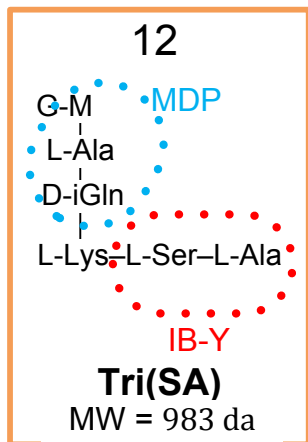
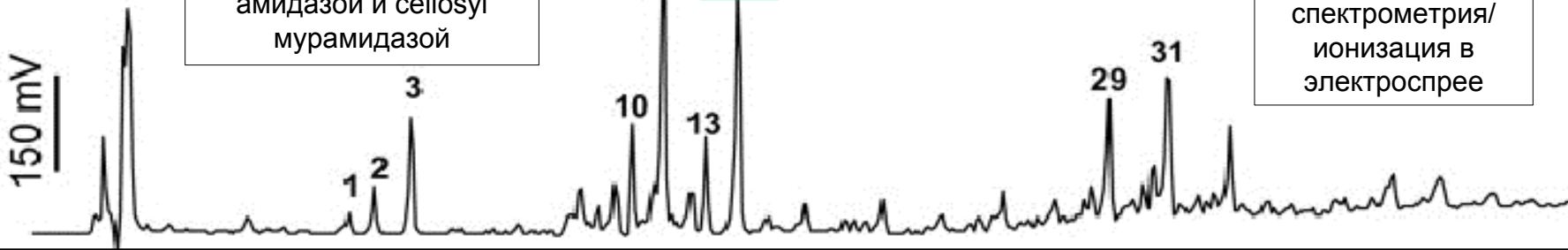
PG_PsB-4

Деградация очищенного пептидогликана выполнялась LytA амидазой и cellosyl мурамидазой

Streptococcus pneumonia, штамм Pen6, в PG много двузвенных межпептидных мостиков

ESI-MS/MS - масс-спектрометрия/ионизация в электроспрее

Муропептиды 12 и 14 составляют значительную часть фрагментов PG (более 20%) штамма Pen6, содержат **MDP** (NOD2 лиганд) и **IB-Y**. Их доля в общей массе определяется % межпептидных мостиков L-Ser-L-Ala и L-Ala-L-Ala в конкретном штамме.

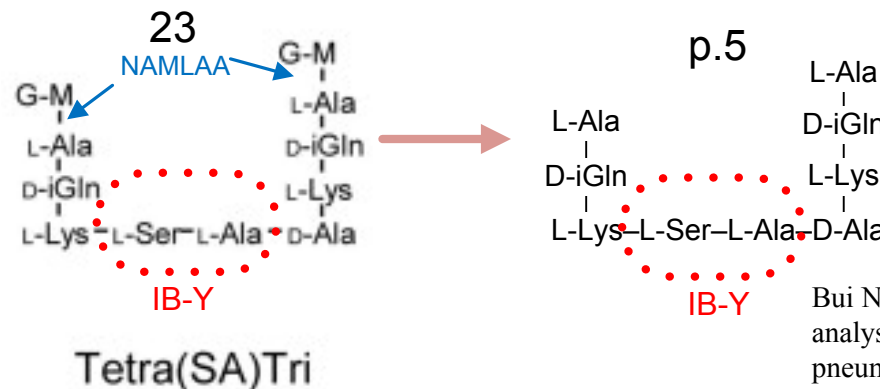
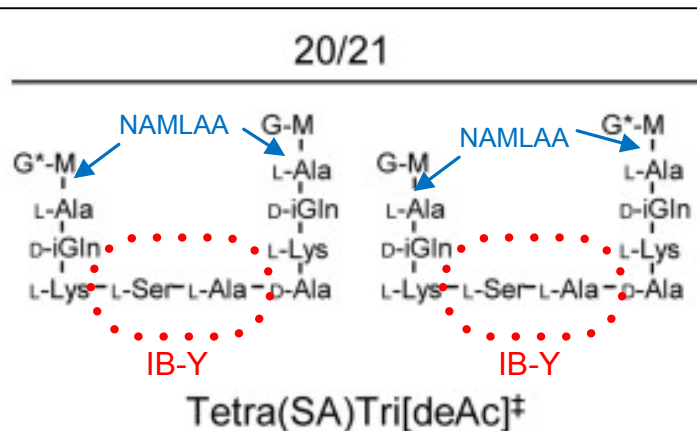


Структура некоторых муропептидов (всего было обнаружено 37).

Муропептиды 20, 21, 23 и 25 после воздействия внутриклеточной амидазы NAMLAA (=PGRP2) образуют линейные пептиды 5 и 6a, соответственно.

Линейные пептиды 5 и 6a содержат эпитоп IB-Y и имеют длину 9 аминокислот, что позволяет им презентироваться через MHC I.

MDP будучи адъювантом обеспечивает интенсивность процессирования и презентации.



Bui NK, Eberhardt A, Vollmer D. et al. Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. Anal Biochem. 2012 Feb 15;421(2):657-66. 22192687.

Пептид В13-2 – потенциальный Y-антиген.

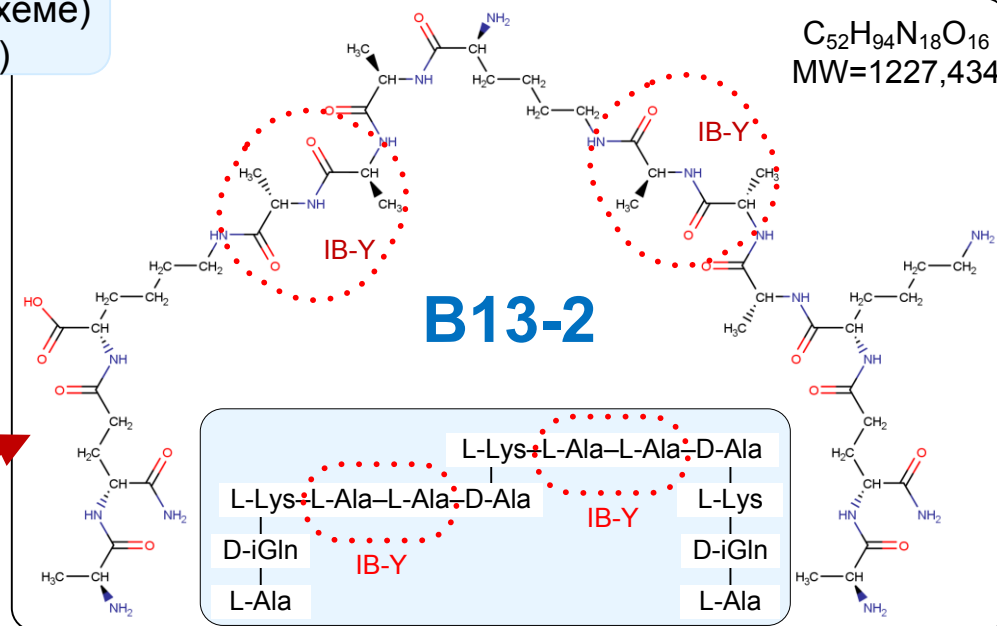
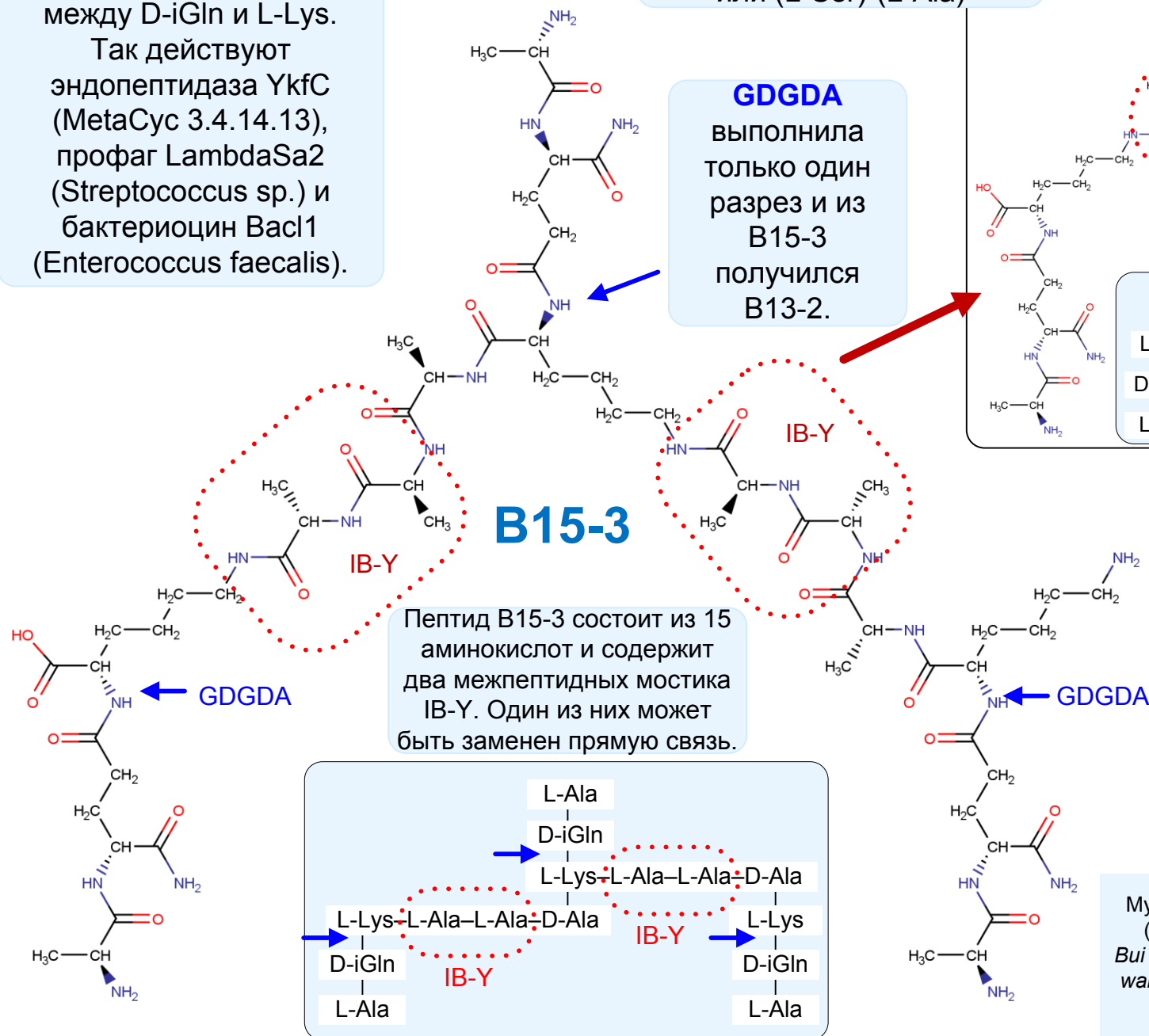
17

PG_PsB-5

GDGDA (условное имя) –
эндопептидаза
разрезающая связь
между D-iGln и L-Lys.
Так действуют
эндопептидаза YkfC
(MetaCyc 3.4.14.13),
профаг LambdaSa2
(Streptococcus sp.) и
бактериоцин Bac11
(Enterococcus faecalis).

IB-Y = (L-Ala)-(L-Ala)
(как в формуле и на схеме)
или (L-Ser)-(L-Ala)

GDGDA
выполнила
только один
разрез и из
В15-3
получился
В13-2.



В зависимости от числа разрезов,
выполняемых эндопептидазой **GDGDA**,
из пептида В15-3 получаются пептиды из 13-ти
аминокислот (три варианта - один из них это
В13-2), из 11-ти (три варианта) или
из 9-ти аминокислот.

Пептид В15-3 (и его аналоги), а также и
некоторые из производных (не менее чем из 11
аминокислот) - потенциальные Y-антигены,
презентируемые через МНС II. В качестве
эпитопов при этом будут один или оба мостика
IB-Y. Роль **MDP** как адъюванта аналогична.

Муропептиды (33,34 и 35) - предшественники пептида В15-3
(при **IB-Y** = (L-Ser)-(L-Ala)) впервые классифицированы в
*Bui NK, Eberhardt A, Vollmer D. et al. Isolation and analysis of cell
wall components from Streptococcus pneumoniae. Anal Biochem.*
2012 Feb 15;421(2):657-66. 22192687.

GDGDA (условное имя) –
эндопептидаза
разрезающая связь
между D-iGln и L-Lys.
Так действуют
эндопептидаза YkfC
(MetaCyc 3.4.14.13),
профар LambdaSa2
(*Streptococcus* sp.) и
бактериоцин Bac11
(*Enterococcus faecalis*).

IB-Y = (L-Ala)-(L-Ala)
(как в формуле
и на схеме)
или (L-Ser)-(L-Ala)

$C_{42}H_{78}N_{14}O_{12}$
MW=971,172

Y-B11

GDGDA выполнила
все три разреза.

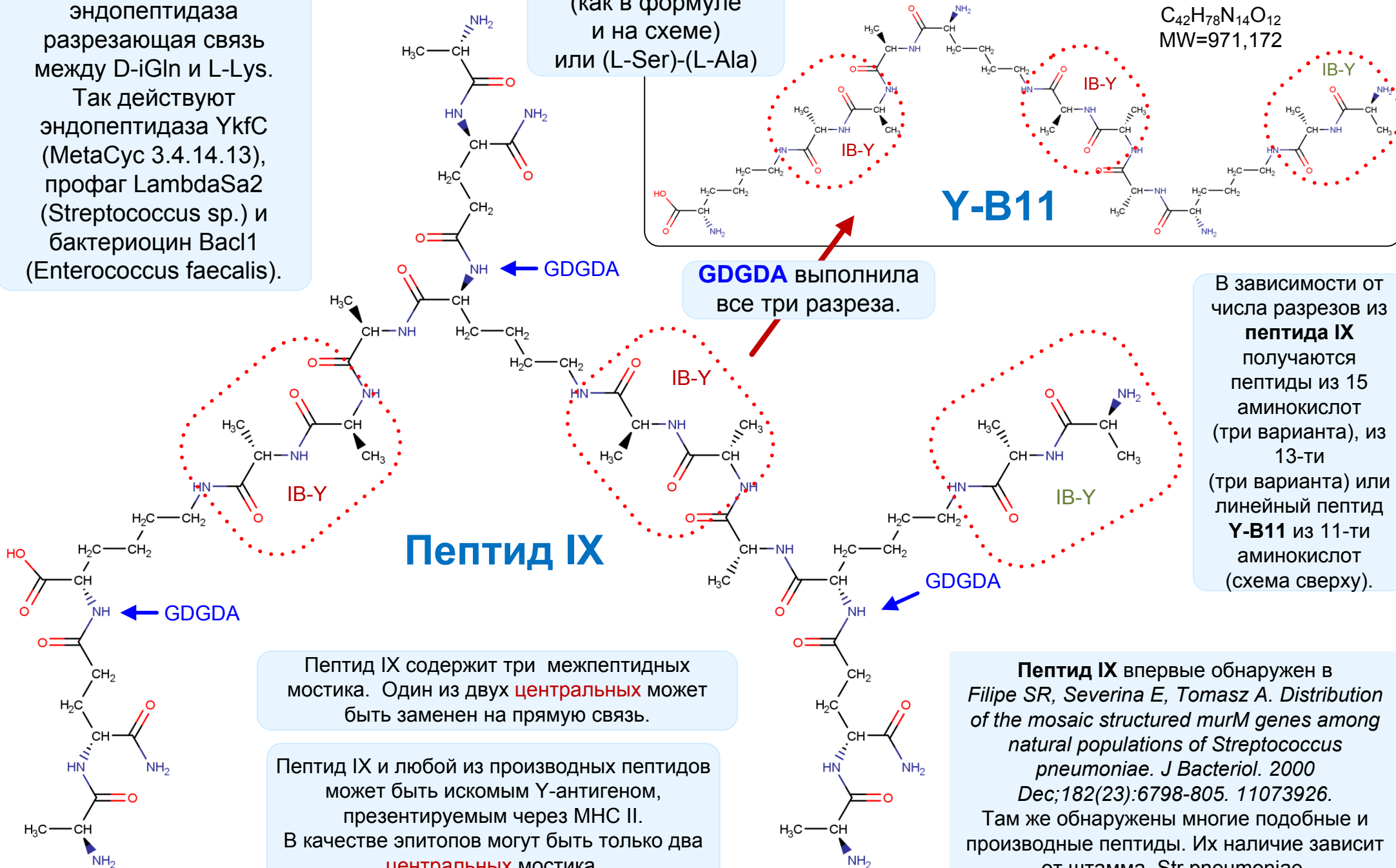
В зависимости от
числа разрезов из
пептида IX
получаются
пептиды из 15
аминокислот
(три варианта), из
13-ти
(три варианта) или
линейный пептид
Y-B11 из 11-ти
аминокислот
(схема сверху).

Пептид IX

Пептид IX содержит три межпептидных
мостика. Один из двух **центральных** может
быть заменен на прямую связь.

Пептид IX и любой из производных пептидов
может быть искомым Y-антигеном,
презентируемым через MHC II.
В качестве эпитопов могут быть только два
центральных мостика.

Пептид IX впервые обнаружен в
*Filipe SR, Severina E, Tomasz A. Distribution
of the mosaic structured murM genes among
natural populations of Streptococcus
pneumoniae. J Bacteriol. 2000
Dec;182(23):6798-805. 11073926.*
Там же обнаружены многие подобные и
производные пептиды. Их наличие зависит
от штамма *Str.pneumoniae*.



Псориаз и эндотоксинемия (LPS-немия).

Методы оценки концентрации LPS и PG в крови.

19

LPS_PG

Для группы из 16 пациентов, имеющих псориаз средней тяжести (среднее PASI = 16,5) концентрация LPS (липополисахарид, он же эндотоксин) составила в среднем 7,2 Ед/мл, а для группы из 30 пациентов с тяжелым псориазом (среднее PASI = 24) - 35,8 Ед/мл. У пациентов с эритродермией и экссудативным псориазом она достигала 1000-2800 Ед/мл. В группе контроля (112 здоровых человек) концентрация LPS в среднем составила 0,1 Ед/мл (Ед ~ 0,1 нг). Концентрация LPS в крови определялась с помощью модифицированного **LAL-теста (Limulus Amebocyte Lysate)**. Исследования были выполнены З.Ш. Гараевой с соавторами (2005-7), Казанская медицинская академия.

Альтернативным методом оценки концентрации LPS в крови является **EAA (Endotoxin Activity Assay, Spectral Medical Inc.)**. Этот метод точнее LAL-теста при концентрации LPS < 0,25 Ед/мл, с 2003 года одобрен FDA и применяется для оценки риска развития сепсиса. Оценка концентрации LPS в крови пациентов с псориазом с помощью EAA никогда не проводилась.

Тест-система для оценки концентрации PG в крови только одна (реагирует также и на beta-глюкан): **SLP (silkworm larvae plasma)**, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Концентрация PG в крови в норме (группа контроля 14 человек) в среднем - 20 пг/мл (от 0 до 90), концентрация PG в крови у пациентов с сепсисом от 50 пг/мл (Fitting 2012) до 190 нг/мл (Kobayashi 2000). Оценка концентрации PG в крови пациентов с псориазом никогда не проводилась.

Подробнее о LAL-тесте здесь: www.limulustest.ru.

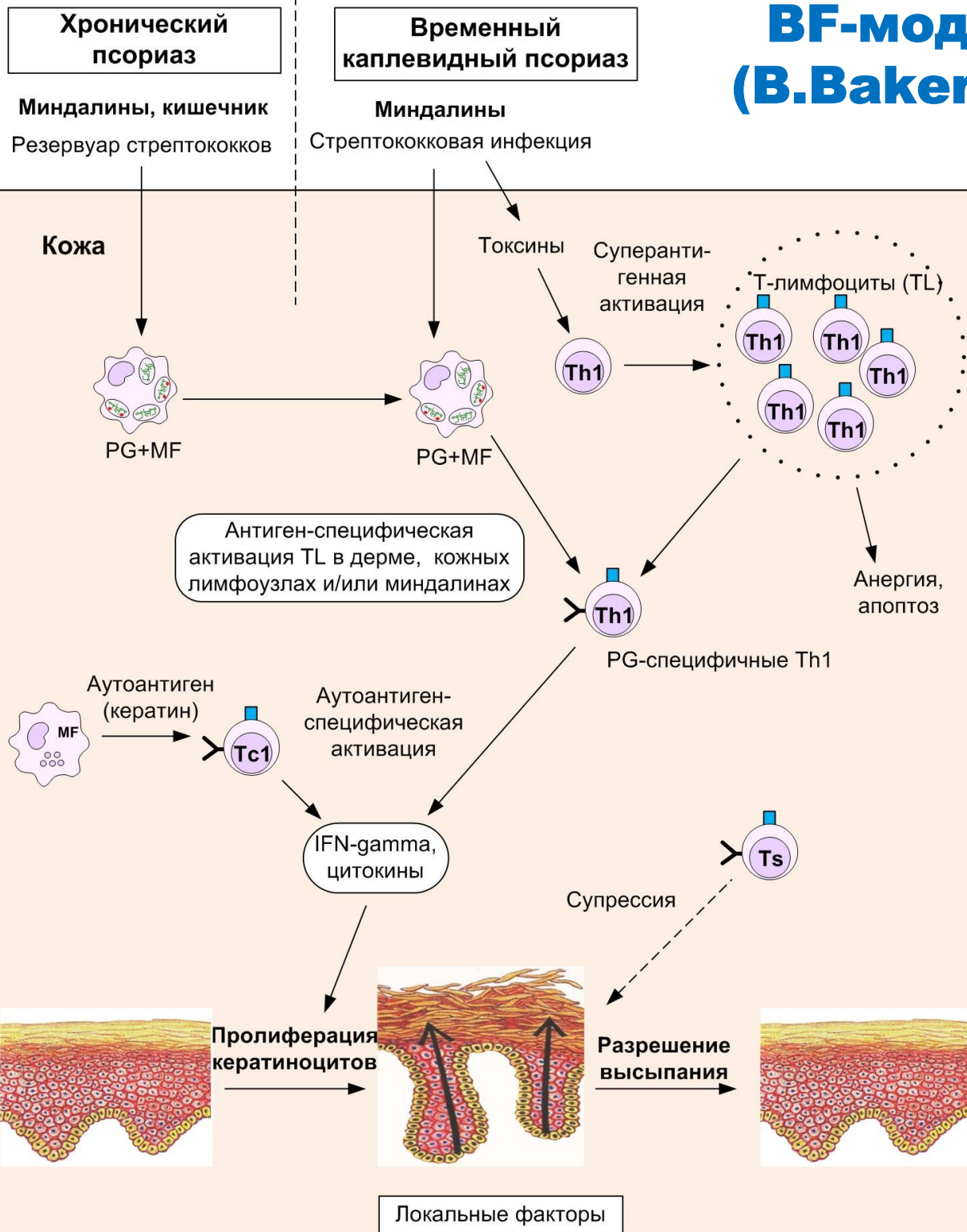
Гараева З.Ш., Сафина Н.А., Тюрин Ю.А., Куклин В.Т., Зинкевич О.Д. Дисбиоз кишечника как причина системной эндотоксинемии у больных псориазом. Вестник дерматологии и венерологии, 2007;(1):23-27. и Гараева З.Ш. Эндотоксинемия в патогенезе псориаза. Лечащий врач, 2013, 5.

Kobayashi T, Tani T, Yokota T, Kodama M. Detection of peptidoglycan in human plasma using the silkworm larvae plasma test. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000 May;28(1):49-53. 10767607.

Ishihata K, Kakihana Y, Yasuda T et al, Newly Developed Endotoxin Measurement Method (the Endotoxin Activity Assay) May Reflect the Severity of Sepsis, Open Journal of Pathology, Vol. 3 No. 1, 2013, pp. 1-6.

Fitting C, Parlato M, Adib-Conquy M. et al. DNAemia detection by multiplex PCR and biomarkers for infection in systemic inflammatory response syndrome patients. PLoS One. 2012;7(6):e38916. doi: 10.1371/journal.pone.0038916. 22719987.

BF-модель патогенеза (B.Baker & L.Fry, 2006-7).



PG индуцирует активацию Т-лимфоцитов (TL) при временном каплевидном псориазе (GP) и при хроническом псориазе (CPs). При GP стрептококк в миндалинах производит токсины, являющиеся суперантигенами, которые активируют TL. Суперантигены также вызывают у TL экспрессию CLA. Большинство активированных TL становится анергичными или гибнет, тогда как PG-специфическая субпопуляция сохраняется из-за контакта с PG+MF. Цитокины, произведенные PG-специфическими TL вызывают пролиферацию кератиноцитов. При хроническом псориазе стрептококки и/или стрептококковые антигены сохраняются в миндалинах и/или кишечнике. PG+MF мигрируют к коже, чтобы активировать PG-специфические TL.

BF-модель не дает ответов на следующие вопросы:

1. Почему PG+Mo оказываются в коже, хотя PG захвачен Мо совсем в другом месте организма?
2. Почему PG+Mo становятся PG+MoDC и презентруют PG?

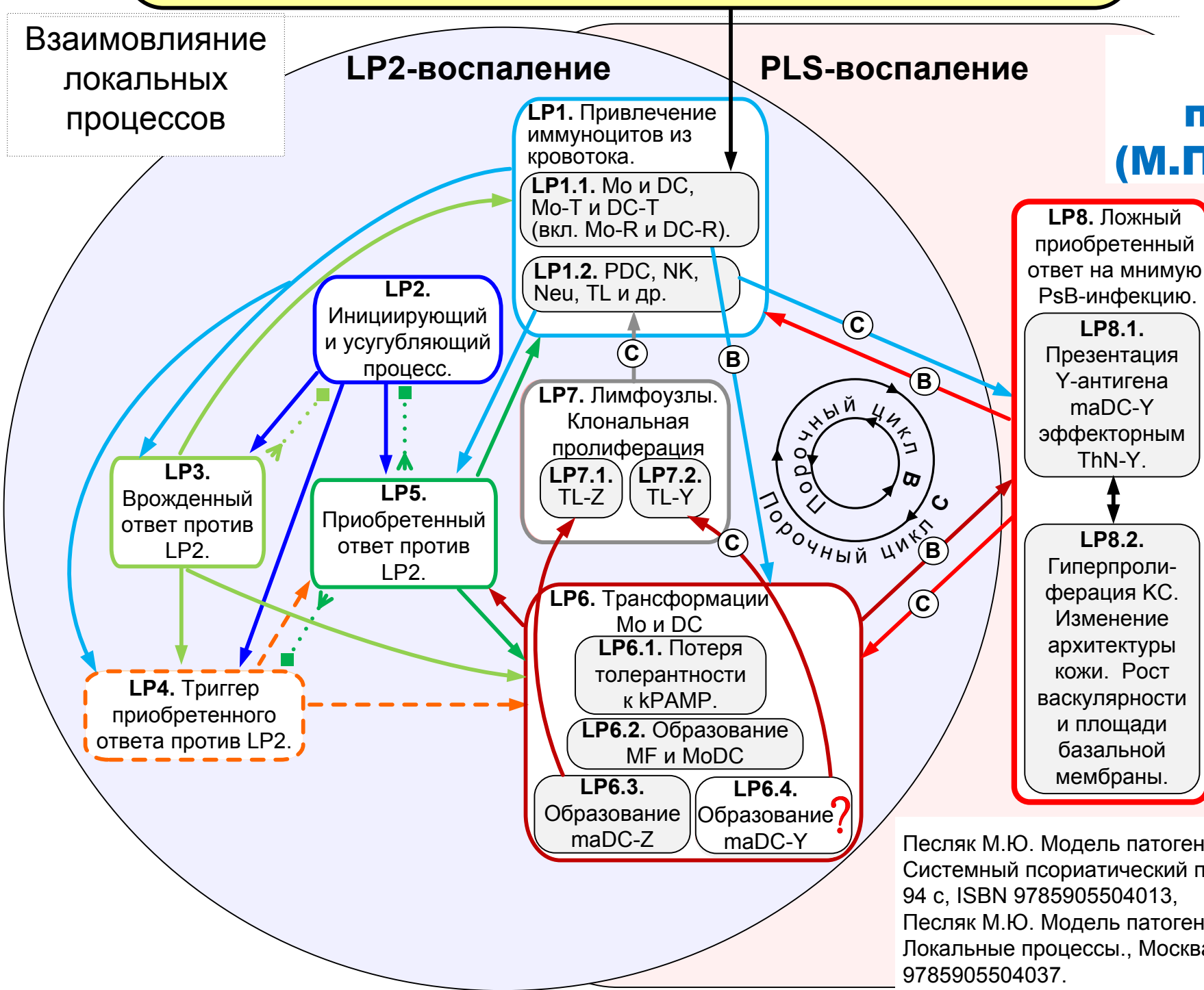
Системный псориатический процесс SPP. Повышенное кРАМР-носительство толеризованных фагоцитов. Повышенное (PG-Y)-носительство R-фагоцитов.

Взаимовлияние
локальных
процессов

LP2-воспаление


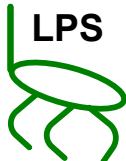

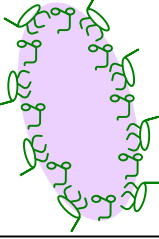
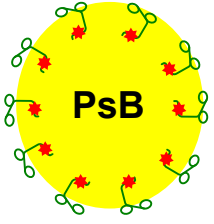
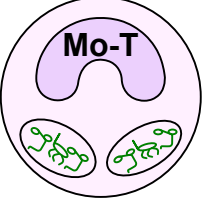
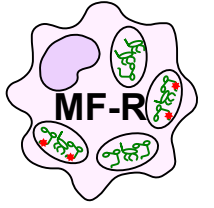
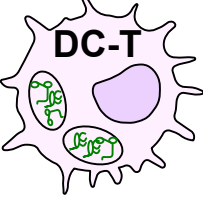
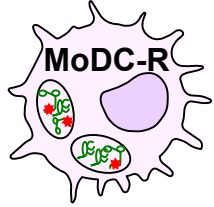
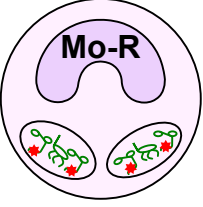
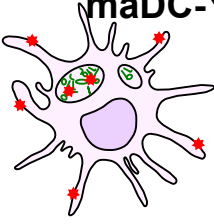
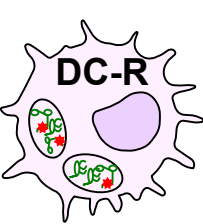
PLS-воспаление

Y-модель патогенеза (М.Песляк, 2012).



Наиболее важные зависимости обозначены цветными стрелками. Цвет стрелки определяется цветом причинного процесса.

Песляк М.Ю. Модель патогенеза псориаза. Часть 1. Системный псориатический процесс, Москва, МYPE, 2012, 94 с, ISBN 9785905504013,
 Песляк М.Ю. Модель патогенеза псориаза. Часть 2. Локальные процессы., Москва, МYPE, 2012, 116 с. ISBN 9785905504037.

Y-antigen 	Y-антиген = часть(и) межпептидного мостика IB-Y	LPS 	LPS = липополисахарид, свободный или связанный в комплексы с LBP, sCD14 и др.
PG-Y 	PG-Y = пептидогликан A3alpha с межпептидными мостиками IB-Y (но м.б. и с другими также)		Gram(-) TLR4-активные бактерии
	PsB = псоразные бактерии = Gram+ бактерии с пептидогликаном PG-Y		Mo-T = толеризованные моноциты. Они являются кРАМР-носителями.
	MF-R = макрофаги, происшедшие от Mo-R		DC-T = толеризованные дендритные клетки. Они являются кРАМР-носителями.
	MoDC-R = дендритные клетки, происшедшие от Mo-R		Mo-R = PG-Y(+)Mo-T
	maDC-Y = зрелые дендритные клетки, презентирующие Y-антиген		DC-R = PG-Y(+)DC-T



В системном псориазическом процессе SPP главную роль играют два первопричинных подпроцесса в тонкой кишке:

SP1. Повышенная проницаемость для бактериальных продуктов.

SP2. Рост популяций Gram+ NOD2-активных (включая псориагенные PsB) и Gram(-) TLR4-активных бактерий.

Эти два подпроцесса (вместе с другими) поддерживают подпроцесс

SP4. PAMP-немия = Эндотоксинемия (LPS-немия) + PG-немия.

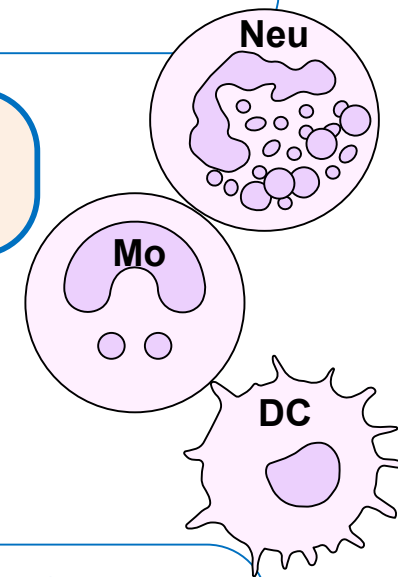
 Главные kPAMP (key PAMP) это LPS (липополисахарид) и  PG (пептидогликан).

kPAMP-нагрузка это фагоцит-зависимый расход (связывание, эндоцитоз) kPAMP и контакт с kPAMP.

kPAMP оказывают **синергичное** воздействие на фагоциты.

PAMP-немия это хроническое повышение kPAMP-нагрузки на фагоциты крови (нейтрофилы, моноциты и дендритные клетки), приводящее

- а) к формированию существенной доли толеризованных фагоцитов
- б) к повышению уровня (концентрации) kPAMP в кровотоке
- с) к повышенному kPAMP-носительству толеризованных фагоцитов



Системный псориатический процесс SPP и некоторые локальные процессы.

SP1. Повышенная проницаемость кишечных стенок

для бактериальных продуктов;

SP2. Рост популяций Gram+ NOD2-активных (в т.ч. псориагенных PsB) и Gram(-) TLR4-активных бактерий в тонкой кишке;

SP3. Нарушение производства и/или циркуляции желчных кислот

SP4. PAMP-немия. Повышенная kPAMP-нагрузка на фагоциты крови. Повышенный уровень (концентрация) kPAMP в крови. Главные kPAMP (key PAMP) это PG и LPS;

SP4.1. (PG-Y)-немия;

SP5. Перегрузка и/или нарушение систем детоксикации

в кишечнике (**SP5.1**) и

гепатобилиарной системе (**SP5.2**);

SP6. Тонзиллярная PsB-инфекция;

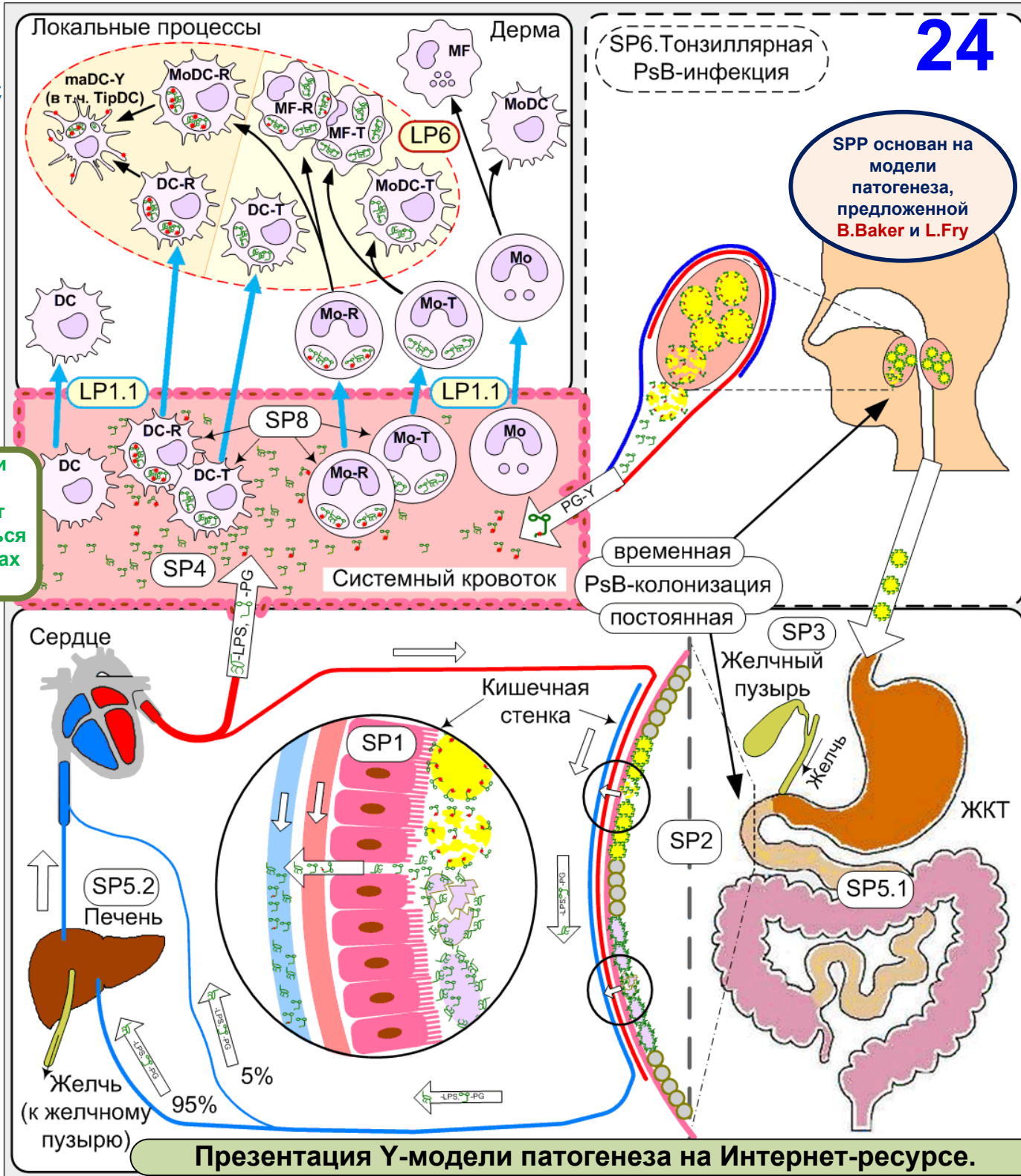
SP8. Рост толеризованных фракций Mo-T и DC-T.

Повышенное kPAMP-носительство.

SP8.1. Рост подфракций Mo-R и DC-R.

Повышенное (PG-Y)-носительство.

SP4 и LP1.1 будут изучаться в рамках НИР1



SPP-базис: толеризация+(PG-Y)-носительство

25

SPP-basis_T+C_e

Две

**компоненты
SPP-базиса:
толери́зация
фагоцитов
и их (PG-Y)-
носите́льство.**

Mo-R = PG-Y(+)Mo-T

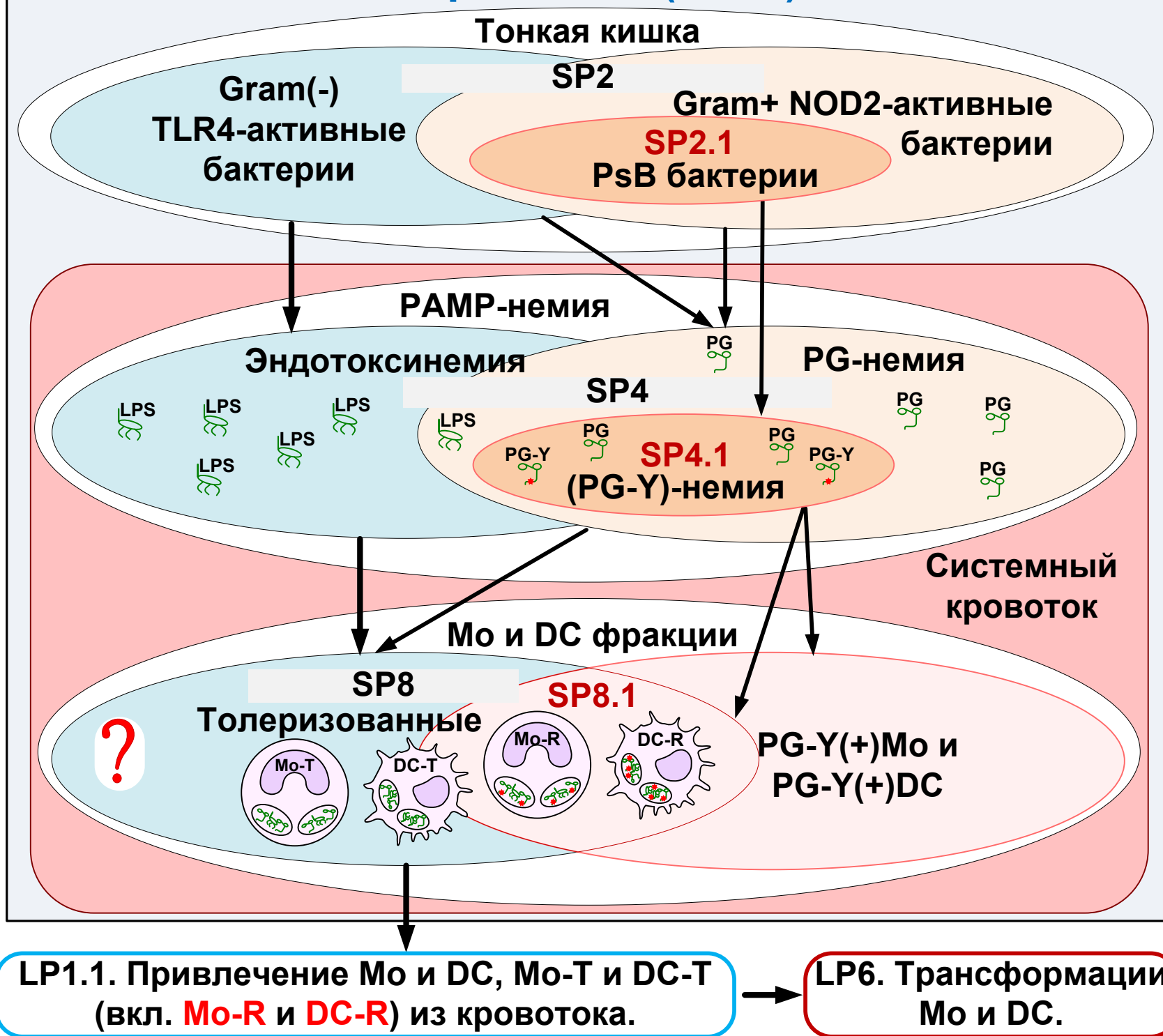
DC-R = PG-Y(+)DC-T

Подфракции

Mo-R и DC-R

могут существовать
(SP8.1) только когда
эти две компоненты
действуют вместе.

**SPP действует
только,
если SP8.1
действует.**



pre-SPP:

толеризация

26

SPP-basis_T_e

Две

**компоненты
SPP-базиса:
толеризация
фагоцитов
и их (PG-Y)-
носительство.**

Mo-R = PG-Y(+)-Mo-T

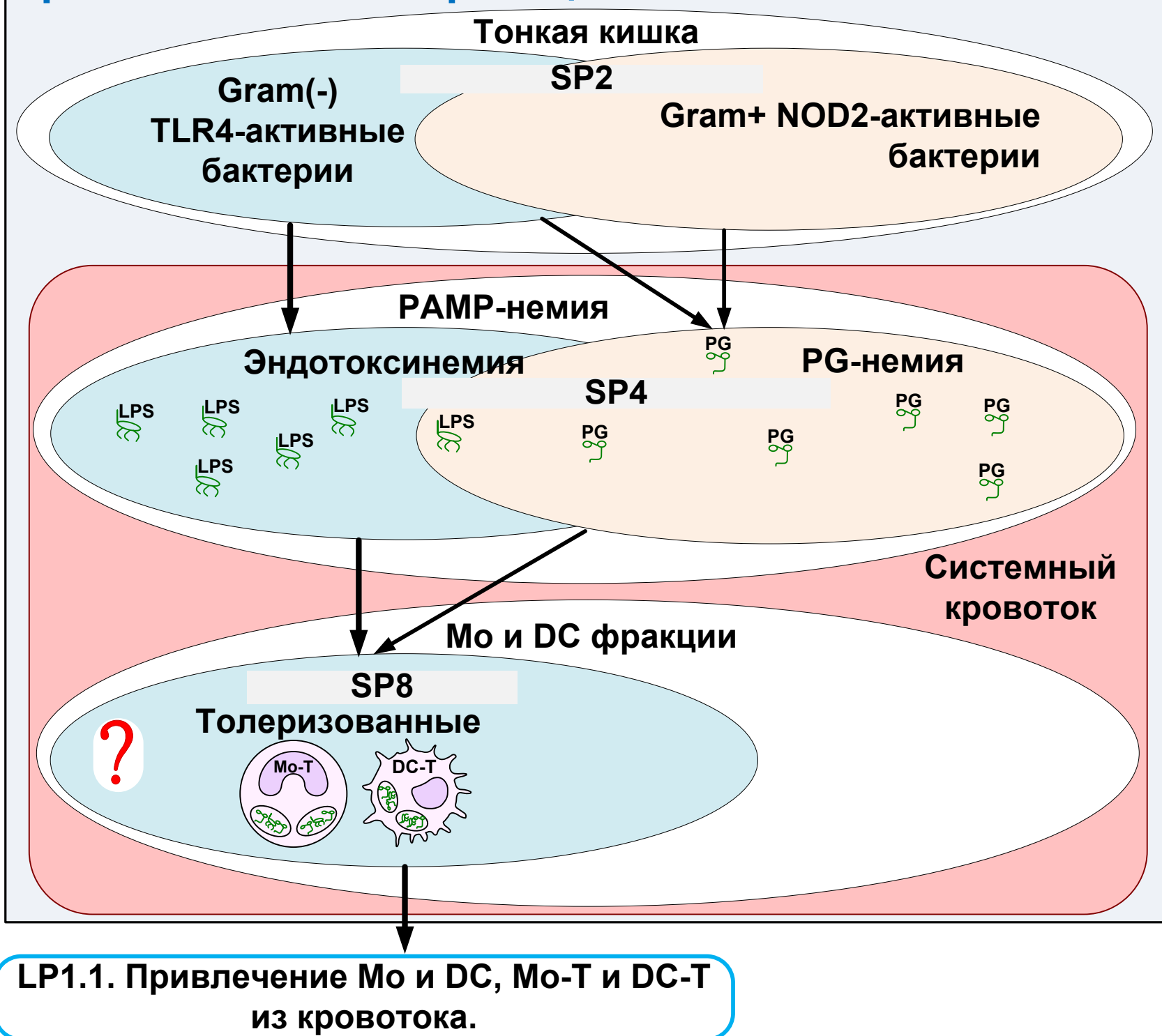
DC-R = PG-Y(+)-DC-T

Подфракции

Mo-R и DC-R

могут существовать
(SP8.1) только когда
эти две компоненты
действуют вместе.

**SPP действует
только,
если SP8.1
действует.**



Две

**компоненты
SPP-базиса:
толеризация
фагоцитов
и их (PG-Y)-
носительство.**

Mo-R = PG-Y(+)Mo-T

DC-R = PG-Y(+)DC-T

Подфракции

Mo-R и **DC-R**

могут существовать
(SP8.1) только когда
эти две компоненты
действуют вместе.

**SPP действует
только,
если SP8.1
действует.**

(PG-Y)-носительство

Тонкая кишка

SP2.1

PsB бактерии

РАМР-немия

PG-Y

SP4.1

(PG-Y)-немия

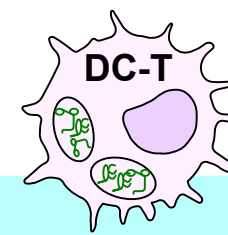
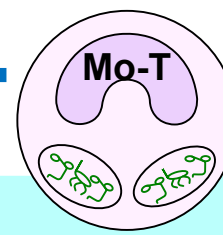
PG-Y

Системный
кровоток

Мо и DC фракции

?

PG-Y(+)Мо и
PG-Y(+)DC



Понижены

- Секреция провоспалительных цитокинов (TNF-alpha, IL-1beta, IL-12 и др.) после повторной PAMP-нагрузки.
- Экспрессия HLA-DR, CD74, HLA-DM, CD58 (LFA-3) и CD86 и др.
- Производство и уровень внутриклеточных протеинов катепсина S и легумаина, ответственных за **деградацию** и процессирование антигенов.
- Производство, транспорт и экспрессия MHC II
- Способность презентировать антигены и активировать Т-лимфоциты

Повышен уровень внутриклеточного протеина **IRAK-M**, ответственного за толеризацию.

Способность быстро терять толерантность (депрограммироваться) под воздействием цитокинов-депрограммеров IFN-gamma, GM-CSF и (опосредованно) IL-12.

Свойство 2.
Они являются **kPAMP-носителями**.

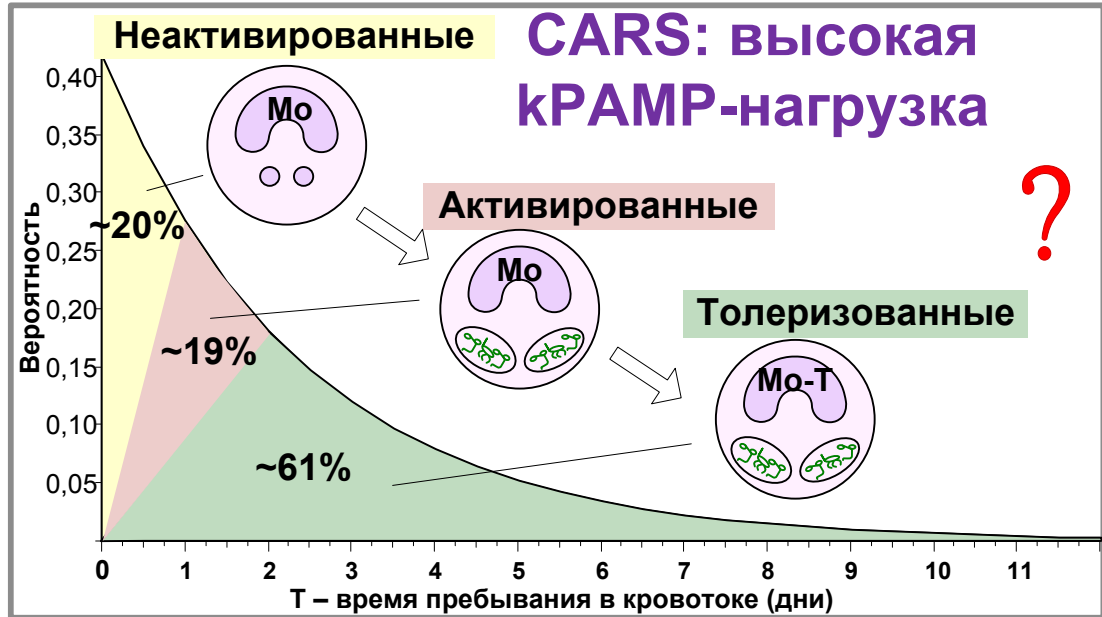
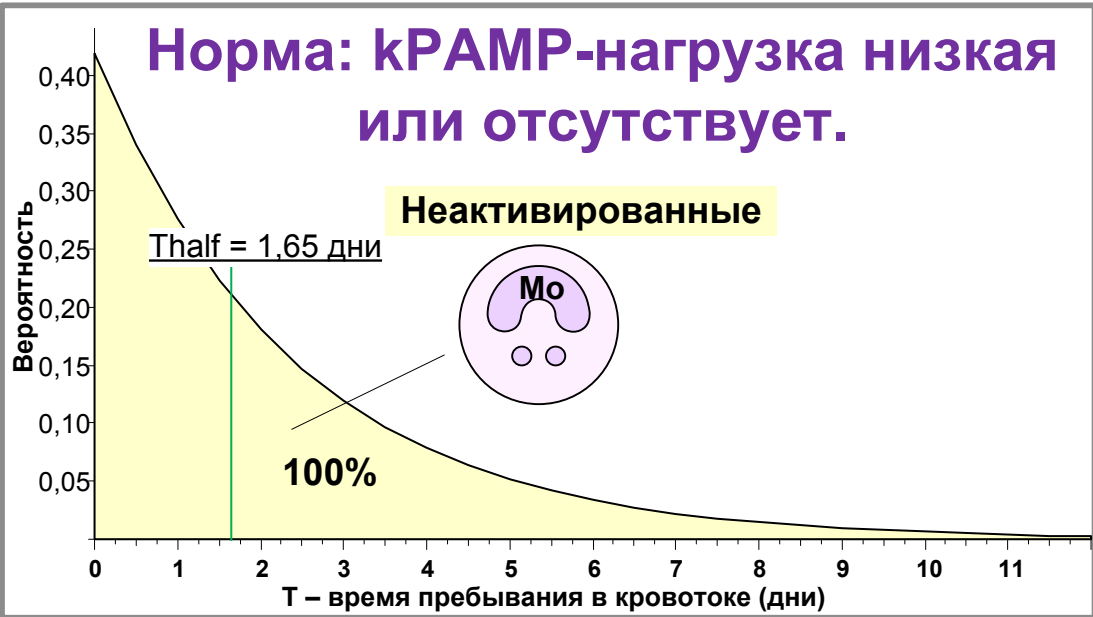
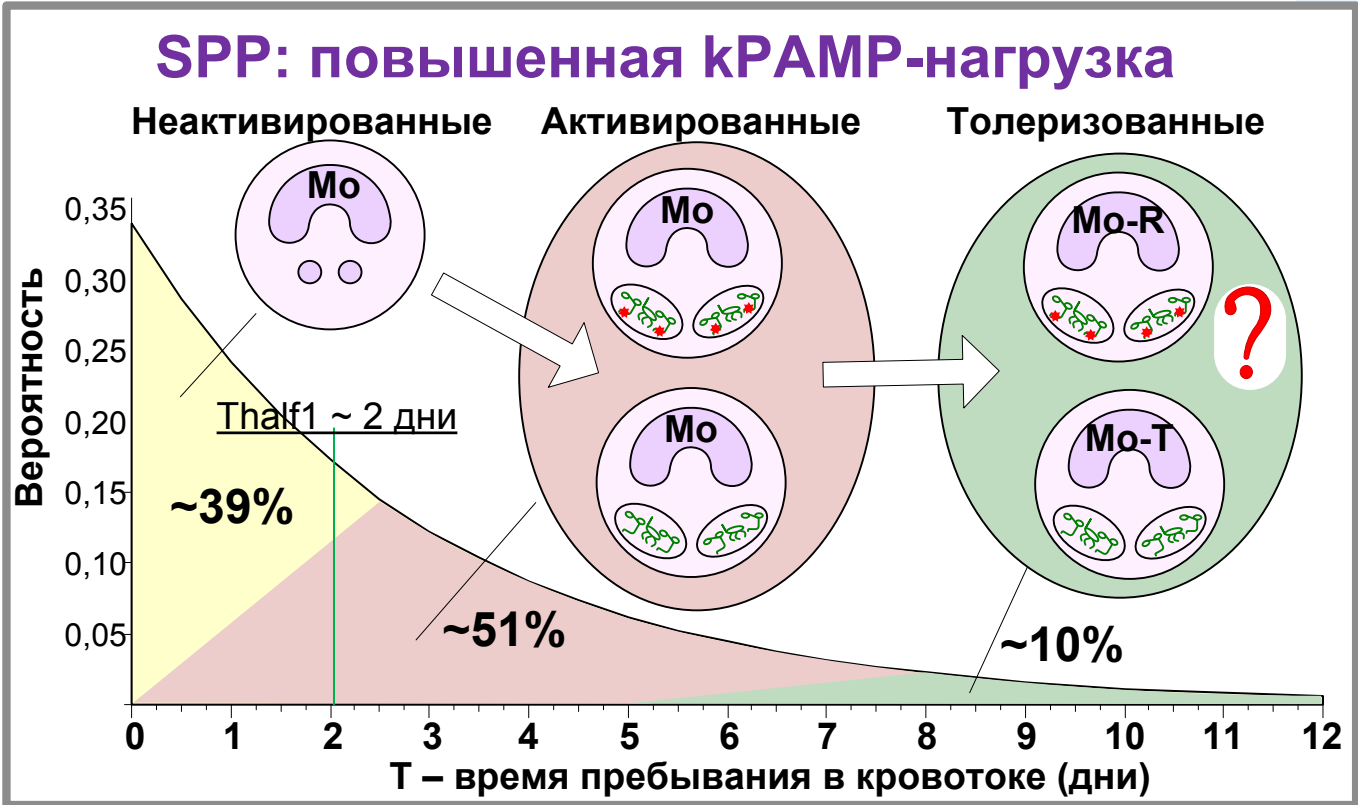
Свойство 1.
Их хеомостатусы (ассортимент экспрессированных хемокиновых рецепторов) подобны неактивированным.

DC-T - да
Mo-T - ?

Как образуется
толеризованная
фракция?

Возможное
фракционирование
при SPP и при
CARS (компенсаторном
противовоспалительном
синдроме).

SPP - это
слабый CARS?



Трансформации и хемотатус CD14+CD16+ моноцитов

30

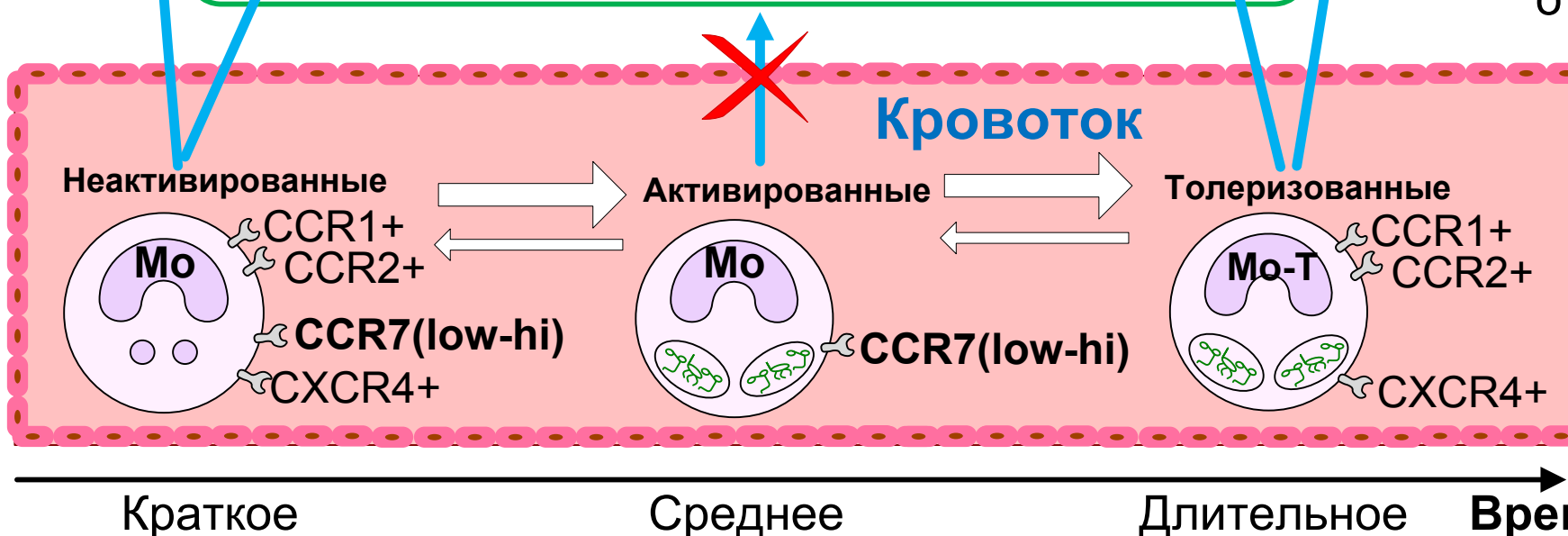
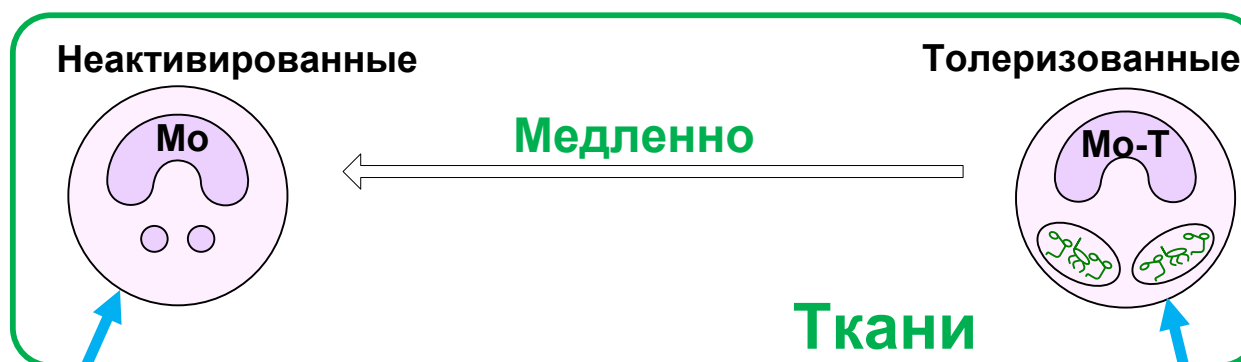
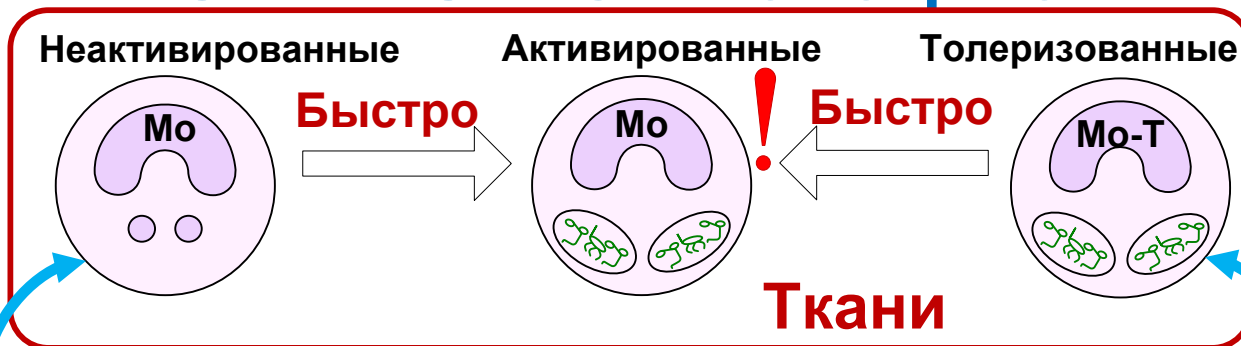
Monocyte
chemostatus

Воспаление

Цитокины-депрограммеры
GM-CSF, IFN-gamma
в избытке.
кРАМР-нагрузка возможна.

Гомеостаз

Цитокины-депрограммеры
GM-CSF, IFN-gamma
отсутствуют.
кРАМР-нагрузка
отсутствует.

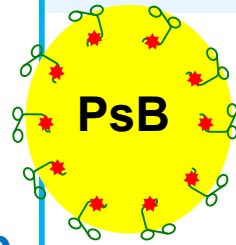


?
Свойство 1.
Хемотатус
Мо-Т подобен
неактивиро-
ванному.

Ожидаемое время пребывания в кровотоке под хронической кРАМР-нагрузкой.

? Системный псориазный процесс SPP. Гипотезы. 31

SPP_hypothesis
e



H1

Главными причинами SPP являются колонизация тонкой кишки Gram⁺ NOD2-активными (в т.ч. псорагенными PsB) и Gram(-) TLR4-активными бактериями, а также ее повышенная проницаемость для бактериальных продуктов. PsB - это E.faecalis, beta-гемолитические стрептококки, VGS и некоторые др.

H2

PsB имеют PG-Y - пептидогликан с межпептидными мостиками IB-Y, т.е. (L-Ala)-(L-Ala) и-или (L-Ser)-(L-Ala).

Y-антиген это часть(и) межпептидного мостика IB-Y.



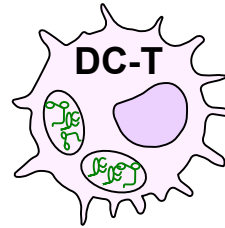
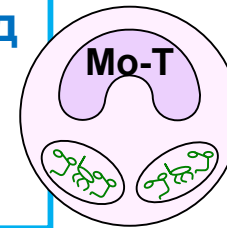
H2 и H3 будут проверяться частично

H3

PAMP-немия и (PG-Y)-немия это главные подпроцессы. kPAMP это LPS и PG.

H4

Рост фракций толеризованных Mo-T и DC-T в кровотоке под хронической kPAMP-нагрузкой. Их повышенное kPAMP-носительство. Они формируются в результате долгосрочного пребывания в кровотоке.

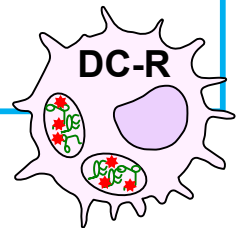
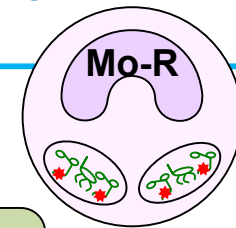


H5

Хемотатусы толеризованных Mo-T и DC-T подобны неактивированным.

H6

Рост подфракций Mo-R и DC-R в кровотоке под хроническими kPAMP-нагрузкой и (PG-Y)-нагрузкой. Тяжесть SPP пропорциональна их суммарному (PG-Y)-носительству.



H7

SPP – это слабый CARS (компенсаторный противовоспалительный синдром).

Презентация Y-модели патогенеза на Интернет-ресурсе.



Локальные процессы. Гипотезы. ?

32

Local_hypothesis

H8

Кебнеризация – это комплекс: LP2 (инициирующий и усугубляющий процесс); LP3 (врожденный ответ против LP2); LP4 (триггер приобретенного ответа); LP5 (приобретенный ответ против LP2). LP5 необходим для инициации псориатического пятна.

H9

HPV-носительство кератиноцитов – это возможный LP2.

Будет проверяться косвенно

H10

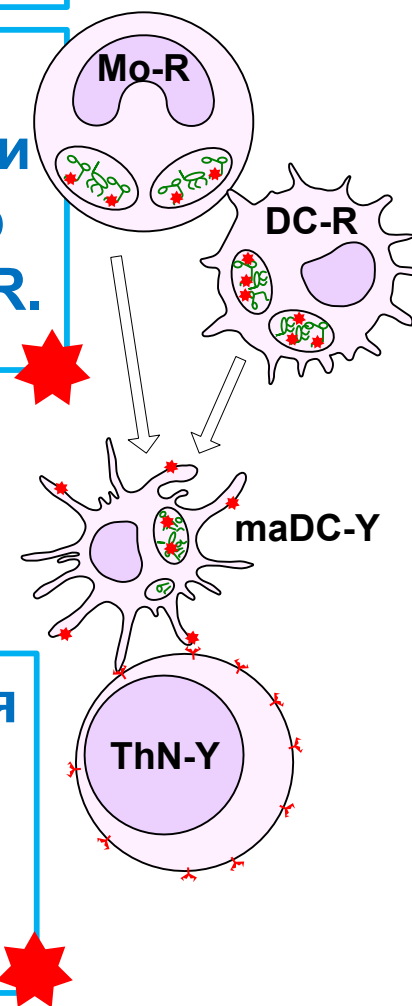
Привлечение Mo-R и DC-R в дерму из кровотока – необходимое звено порочного цикла. Существование и тяжесть любого пятна определяется интенсивностью поступления в дерму Y-антигена, несомого Mo-R и DC-R.

H11

Потеря толерантности DC-R и Mo-R и их последующая трансформация в maDC-Y - необходимые звенья порочных циклов.

H12

Псориатическое воспаление (в т.ч. гиперпролиферация KC) это реакция SIS (кожной иммунной системы) на мнимую PsV-инфекцию. SIS определяет ложную цель, основываясь на презентации Y-антигена.





**Проект научно-исследовательской работы
«Метагеномы* фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи»
(НИР1).**

Песляк Михаил Юрьевич,
Председатель Антипсориатической Ассоциации «ЕСТЕСТВЕННЫЙ ПУТЬ»

Раздел 2.

**Метагеномное секвенирование.
Метагеном крови. Метагеном кожи.**

**Фагоциты кожи в норме и при псориазе.
Комплексное изучение метагеномов фагоцитов крови
и фагоцитов псориатической кожи.**

Цели и задачи НИР1.

* Метагеном – совокупность всех nhDNA (нехозяйских DNA, т.е. в данной НИР - не принадлежащих человеку), содержащихся в биоматериале. nhDNA – это бактериальная, архейная, грибковая, гельминтная, вирусная, фаговая и т.д. DNA.

ВасDNA в плазме крови псориатических пациентов (16S-тест)

Table 1 Summary of bacterial genera identified in psoriasis patients

Bacterial genus	GP (<i>n</i> = 7)	CPP/GF (<i>n</i> = 7)	CPP (<i>n</i> = 6)
<i>Streptococcus</i> sp.	6 ^a	1	1
<i>Staphylococcus</i> sp.	—	5	4
<i>Propionibacterium</i> sp.	—	—	1
<i>Bacillus</i> sp.	—	1	—
<i>Exiguobacterium</i> sp.	1	—	—

а - количество пациентов, у которых обнаружен данный род бактерий;
 GP – Guttage psoriasis (временный каплевидный псориаз);
 CPP – Chronic plaque psoriasis (хронический псориаз).

Munz OH, Sela S, Baker BS et al. Evidence for the presence of bacteria in the blood of psoriasis patients. Arch Dermatol Res. 2010 Sep;302(7):495-8. 20607546.

Патогены, определенные культуральным методом (BC) и NGS (WMS-тест) в плазме крови

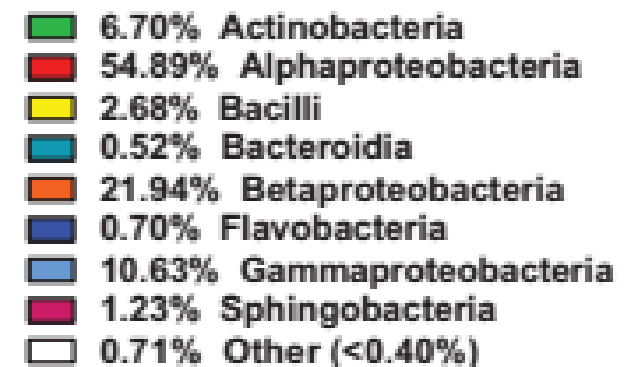
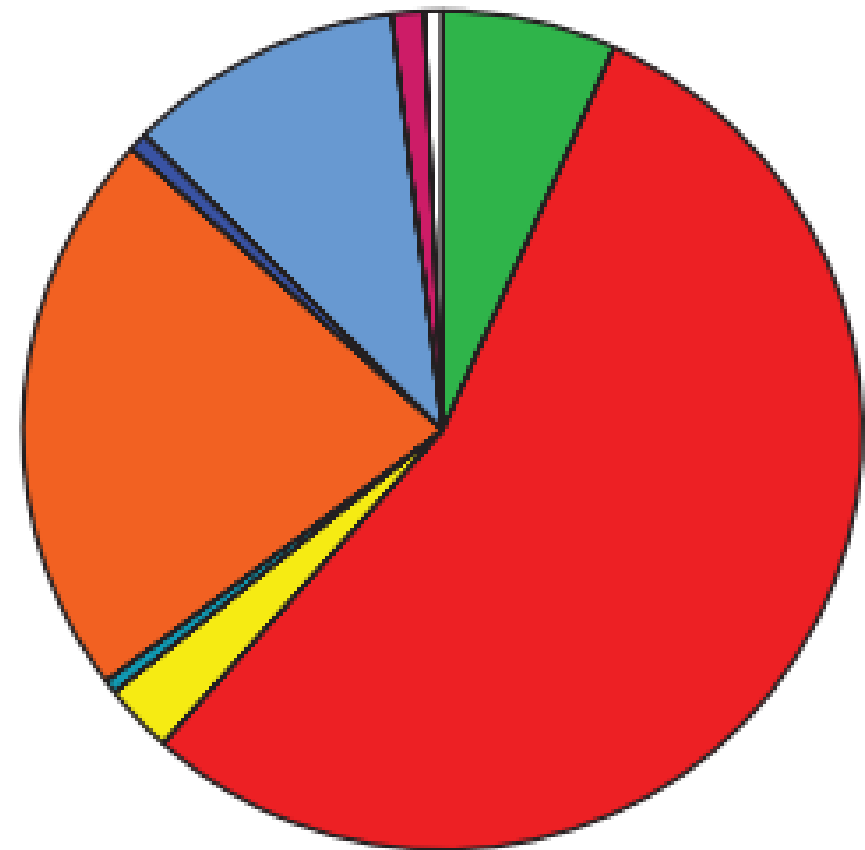
Type	Pathogen	Strain identified		
		BC (+)	NGS (+)	BC and NGS
Gram-positive bacteria	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1	2
	<i>Enterococcus faecium</i>	1	3	3
	<i>Lactococcus lactis</i>	0	1	1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	2	2
Gram-negative bacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	1	2
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	1	1
	<i>Bacteroides fragilis</i>	1	1	1
	<i>Citrobacter freundii</i>	1	1	1
	<i>Escherichia coli</i>	0	1	1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	3	3
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2	2
Fungi	<i>Candida albicans</i>	1	0	1
Total		11	17	20

Количество высеянных (BC – blood culture) и картированных (NGS) видов бактерий и грибов у 78 пациентов и 10 ЗП.

Спектр bacDNA (бактериальной ДНК), обнаруженный в крови 30 ЗП (доноров) 16S-тестом. Подавляющая часть (93,7%) содержится в лейкоцитарной пленке (buffy coat) - фракции лейкоцитов и тромбоцитов. Отображен спектр по классам (class) бактерий.

В рамках НИР1 предполагается разработать и применить WMS-тест (полное метагеномное секвенирование) фагоцитов крови, что позволит установить весь спектр nhDNA (в том числе бактериальной) с точностью до вида.

Фрагмент рис.2 из Païssé S, Valle C, Servant F. et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. Transfusion. 2016 May;56(5):1138-47. 26865079.



Характеристики плазмы крови (7 пациентов с сепсисом, 12 ЗП, WMS-тест)

37

Blood-Germany.

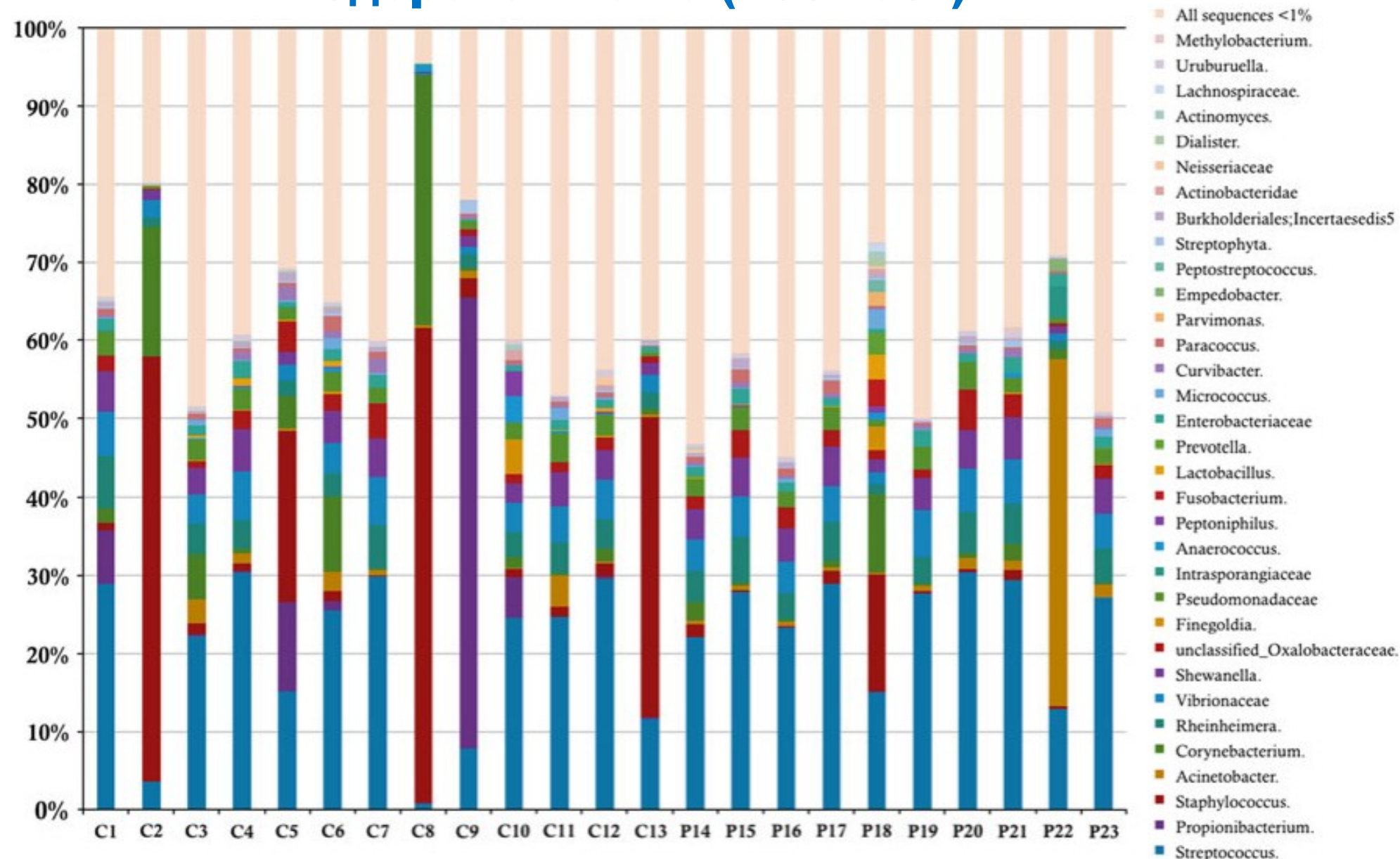
		Table 1 Patient characteristics, cfDNA concentration, and sequencing statistics (cfDNA = cell-free DNA)							
Пациенты с сепсисом	ID	Time	Sex	Age (years)	cfDNA (ng/ml plasma)	Sequencing depth	Human reads (%)	Unmapped (%)	Classified (%)
	S9	T0	M	82	120.59	30,650,143	92.90	7.10	28.90
	S10	T0	M	68	307.83	27,199,593	98.70	1.30	2.85
	S11	T0	M	62	805.50	27,073,879	93.61	6.39	20.73
	S19	T0	F	62	101.30	26,892,684	98.45	1.55	4.75
	S23	T0	M	79	146.70	24,917,032	97.12	2.88	3.85
	S26	T0	M	66	1088.90	32,529,889	96.60	3.40	3.24
	S60	T0	F	70	70.29	27,381,853	97.10	2.90	4.40
			Average S T0	70	377.30	28,092,153	96.36	3.64	9.82
			Average S all	70	197.23	25,960,730	97.79	2.21	4.24
Здоровые персоны	V5		M	24	35.80	34,203,815	81.90	18.10	12.38
	V6		M	29	27.40	30,000,000	98.96	1.04	2.25
	V7		F	22	76.40	21,004,601	96.58	3.42	2.35
	V13		F	26	23.50	24,449,232	98.09	1.91	3.26
	V14		M	28	38.60	37,971,559	97.42	2.58	1.79
	V15		M	27	166.80	24,505,696	97.60	2.40	2.88
	V16		F	29	70.60	27,220,925	97.06	2.94	2.67
	V17		M	26	28.40	20,225,374	98.61	1.39	3.30
	V18		M	28	48.80	19,157,938	98.14	1.86	2.46
	V19		F	31	33.40	25,776,920	97.08	2.92	2.87
	V21		M	22	67.30	25,220,391	97.72	2.28	2.51
	V22		M	25	48.20	30,000,000	99.15	0.85	3.25
			Average V	26	55.43	26,644,704	96.52	3.48	3.50

Фрагмент Таблицы 1 из Grumaz S, Stevens P, Grumaz C. et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. Genome Med. 2016 Jul 1;8(1):73. 27368373.

Бактериальная ДНК в псориатической и здоровой коже (16S-тест)

38

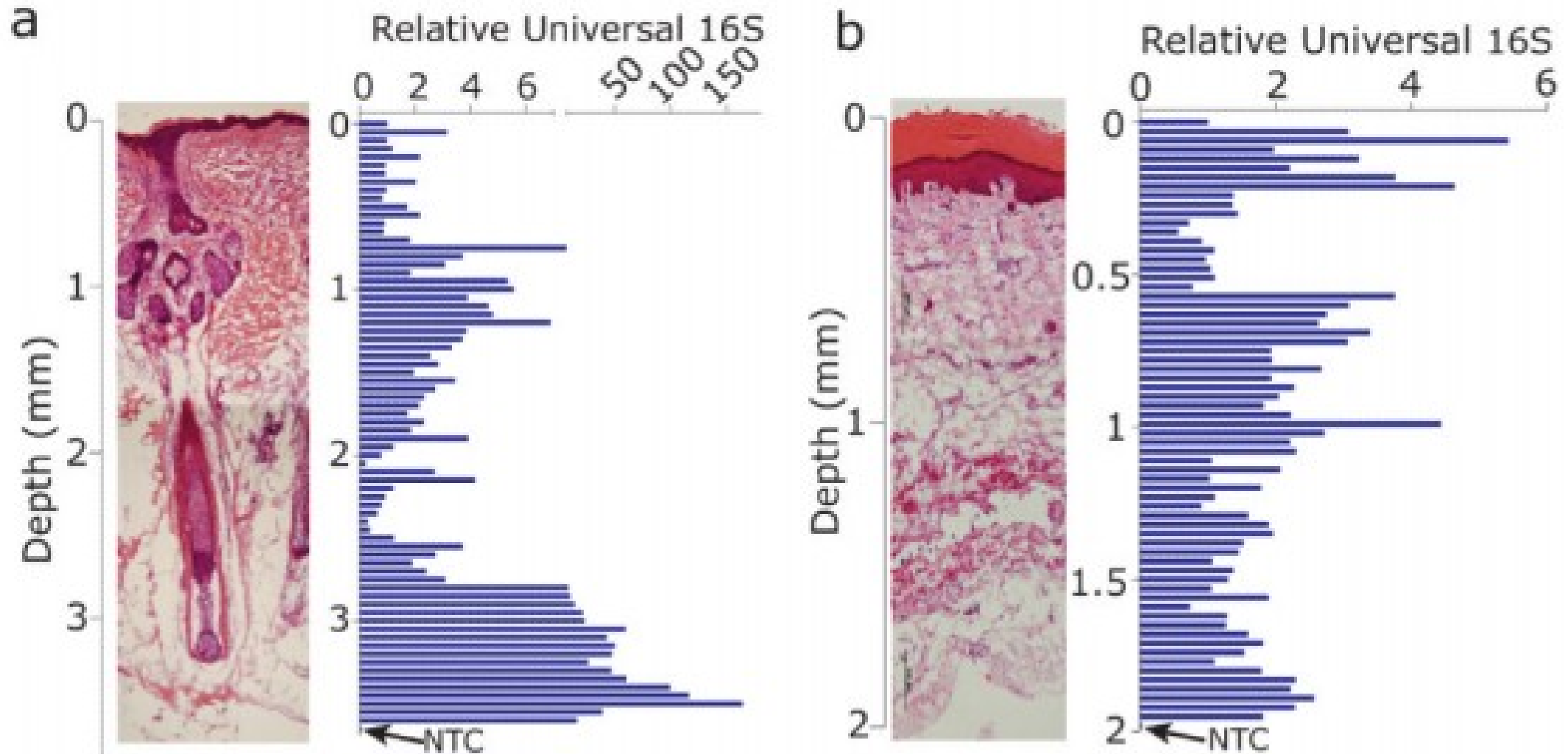
Skin-bacDNA



Распространенность bacDNA на уровне родов (genus) или семейств (family) для биоптатов здоровой (C1-C13) и псориатической (P14-P23) кожи.

Рис.5 из Fahlen A, Engstrand L, Baker BS, Powles A, Fry L. Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin. Arch Dermatol Res. 2012 Jan;304(1):15-22. [22065152](https://doi.org/10.1007/s00402-011-1521-2).

Бактериальная ДНК в эпидермисе и дерме непсориазных пациентов (16S-тест)



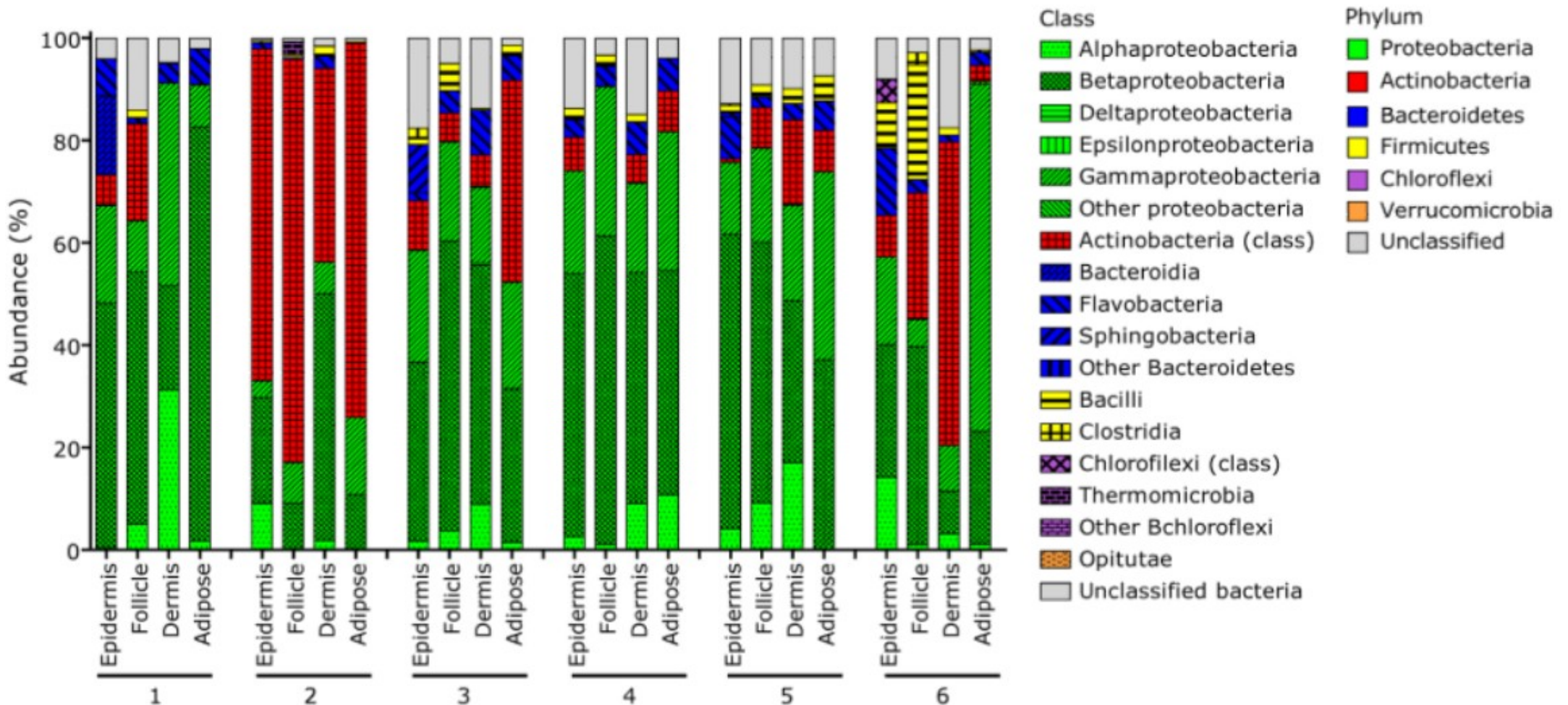
bacDNA в нормальной коже обнаруживается на глубине 2-3 мм
(а – лицевой участок с волосяным фолликулом, б – ладонный участок)

Фрагмент рис.1 из Nakatsuji T, Chiang HI, Jiang SB. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. Nat Commun. 2013;4:1431. [23385576](https://doi.org/10.1038/ncomms2338).

Бактериальная ДНК в эпидермисе и дерме непсориазных пациентов (16S-тест)

40

Derm-16S-2

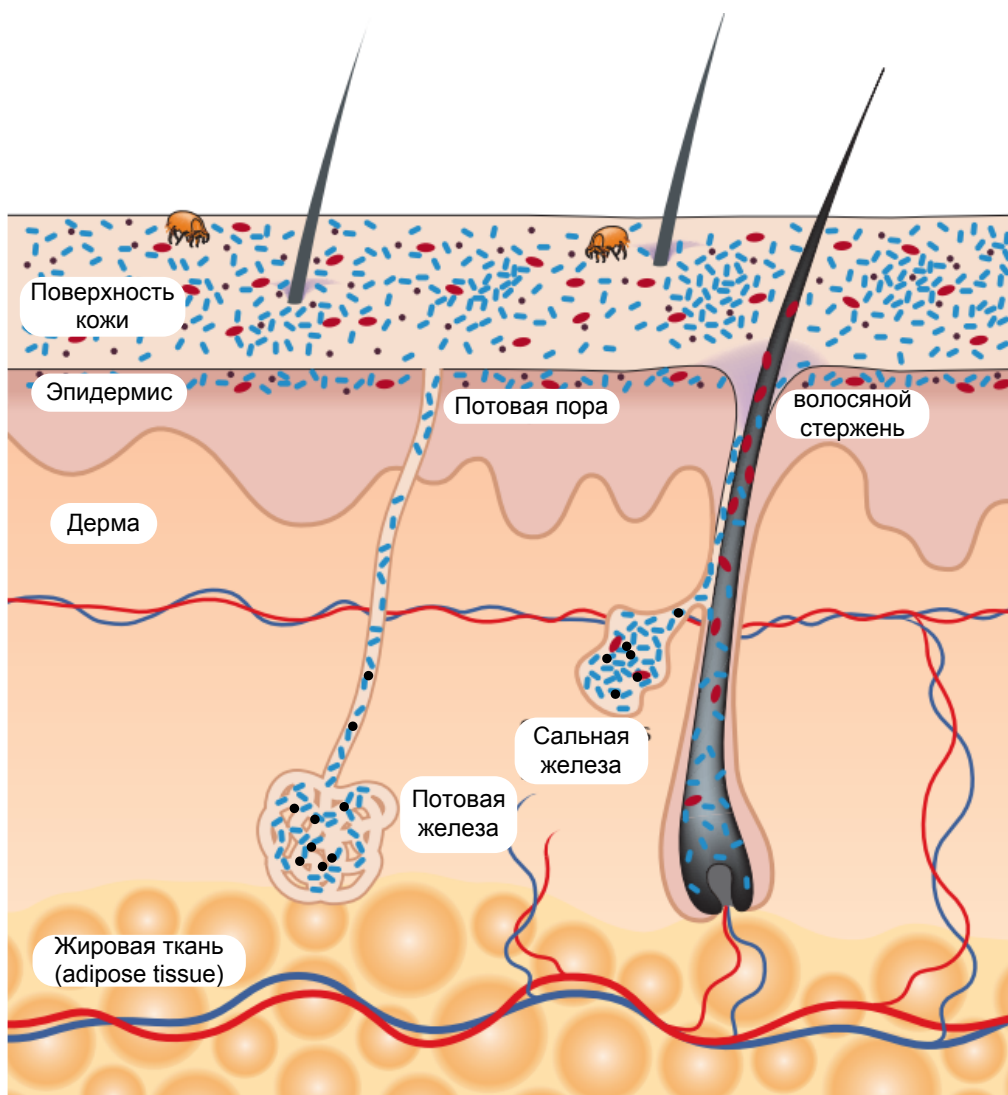


Разнообразие кожной микрофлоры на уровне классов (class). 16S-тест 4-х отделов биоптатов кожи. Относительная распространенность показана для каждого из отделов: эпидермис, фолликулярная дерма (follicle), дерма не содержащая фолликулы (dermis) и дермальная жировая ткань (adipose tissue). Биоптаты (1-6) взяты у непсориазных пациентов. Результаты по кожной микрофлоре на уровне порядка (order) представлены в виде таблицы в дополнительных материалах к статье.

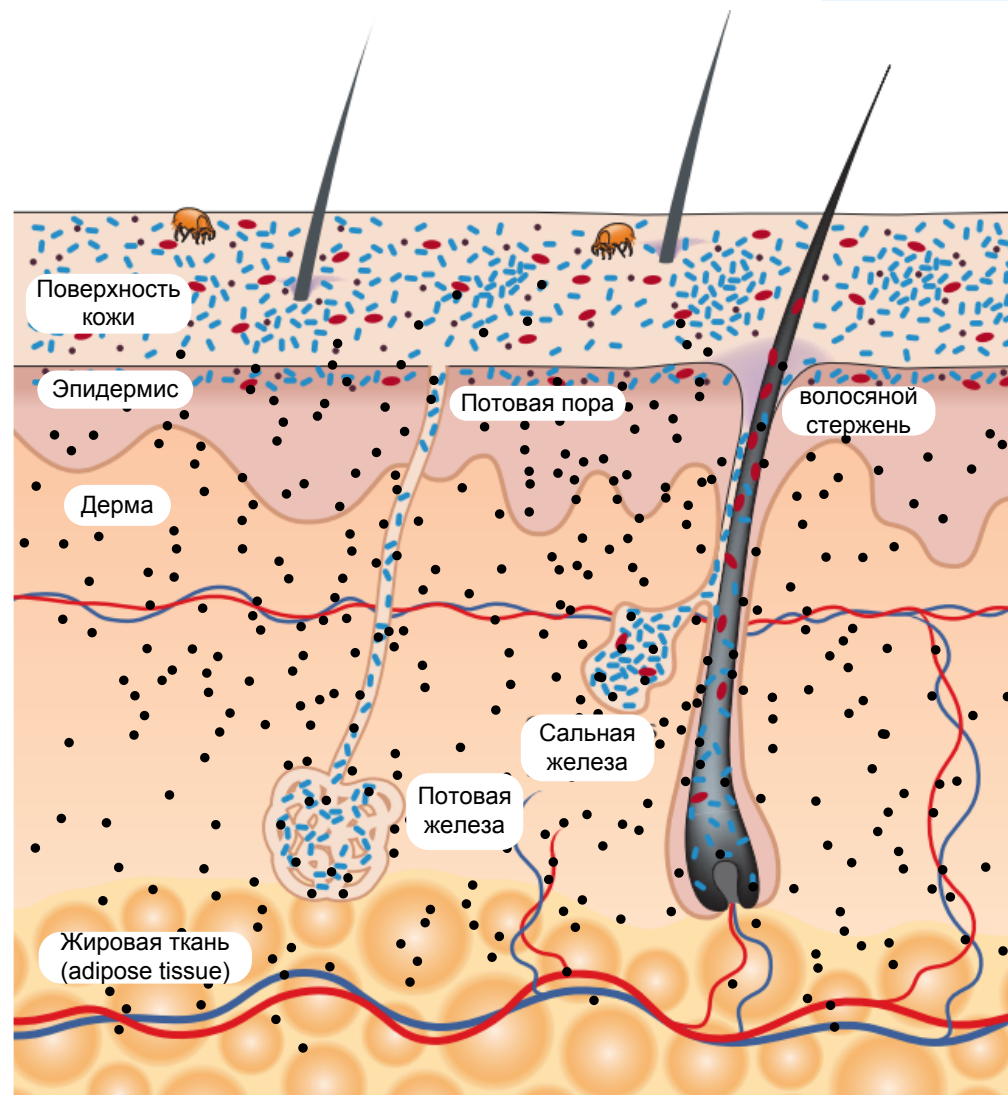
Микроорганизмы (в т.ч. бактерии и bacDNA) в здоровой коже. Предположения и факты.

41

Healthy-skin



До 2013 года предполагалось присутствие bacDNA в только в эпидермисе или в потовых или сальных железах.



Благодаря Nakatsuji T. et al. (2013) выяснилось, что bacDNA присутствует во всех слоях.

Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. Nat Rev Microbiol. 2011 Apr;9(4):244-53. 21407241.

• Вирусы • Бактерии • Грибы • Клеши

Nakatsuji T, Chiang HI, Jiang SB. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. Nat Commun. 2013;4:1431. 23385576.

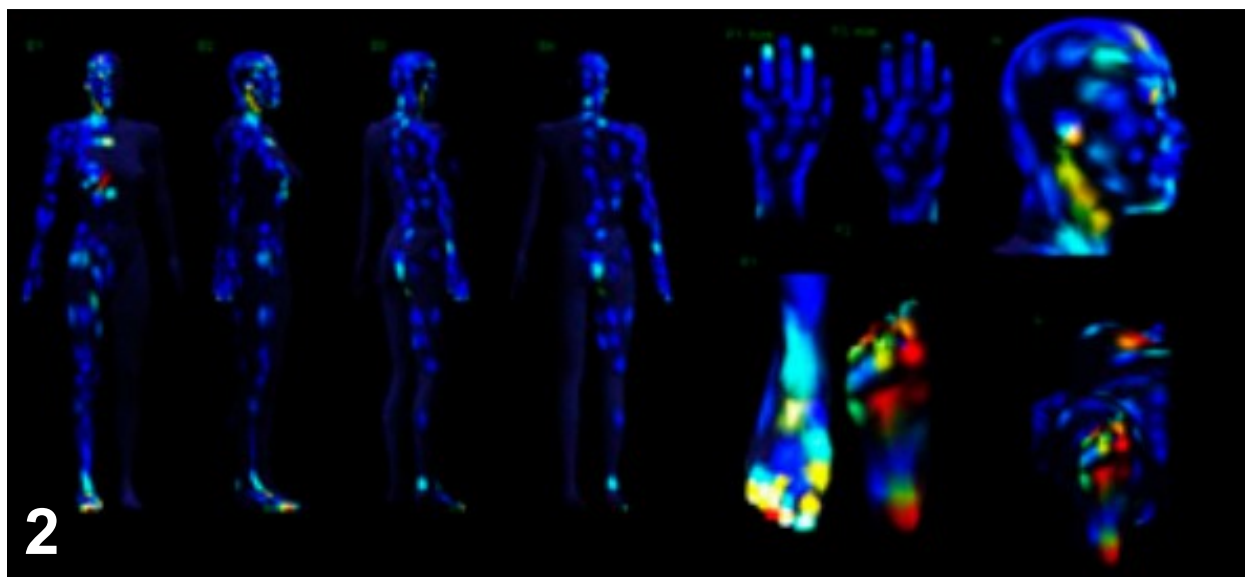
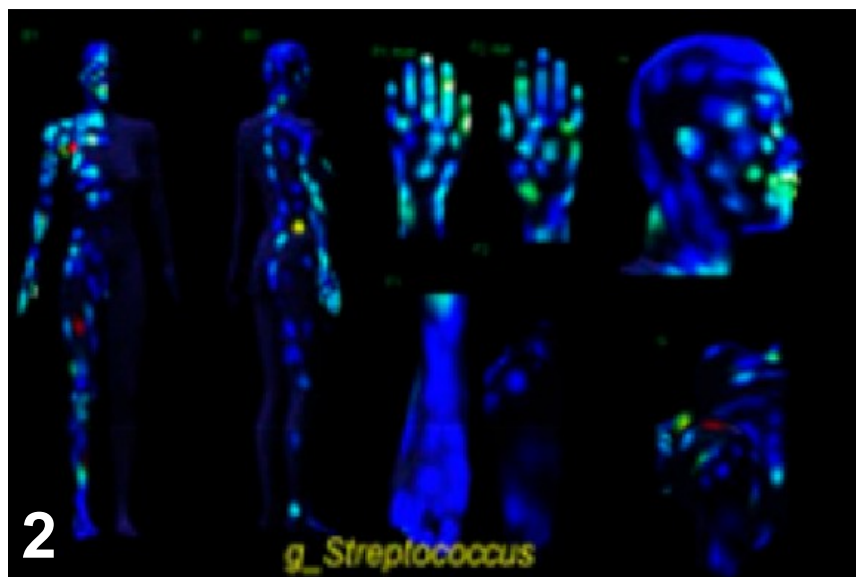
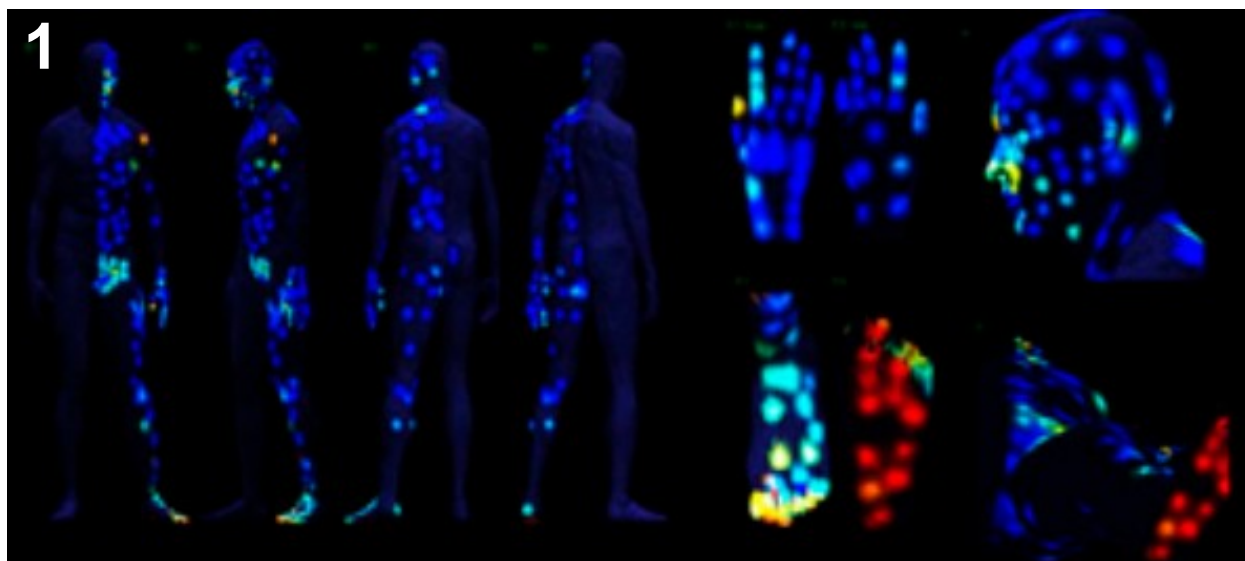
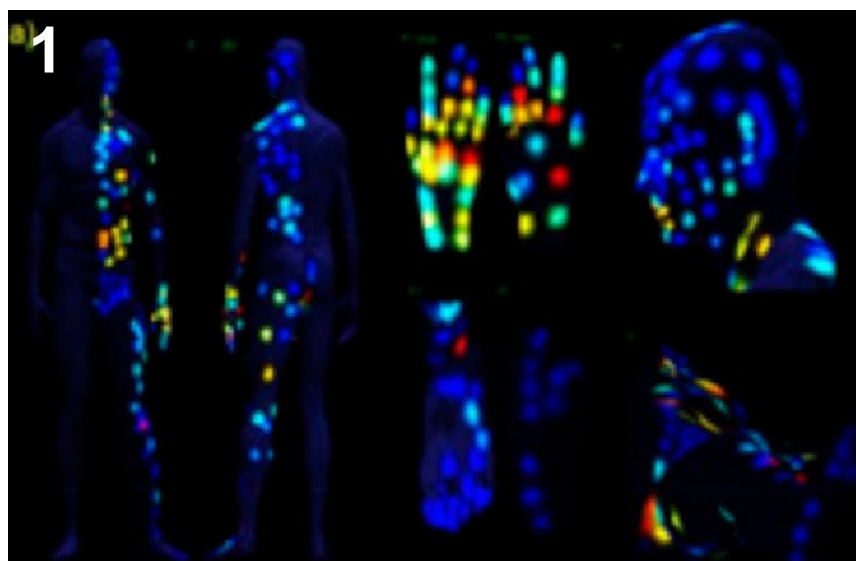
Бактериальная ДНК на здоровой коже мужчины (1) и женщины (2). 16S-тест.

42

Skin_Bacteria_3D_e

Streptococcus sp.

Staphylococcus sp.

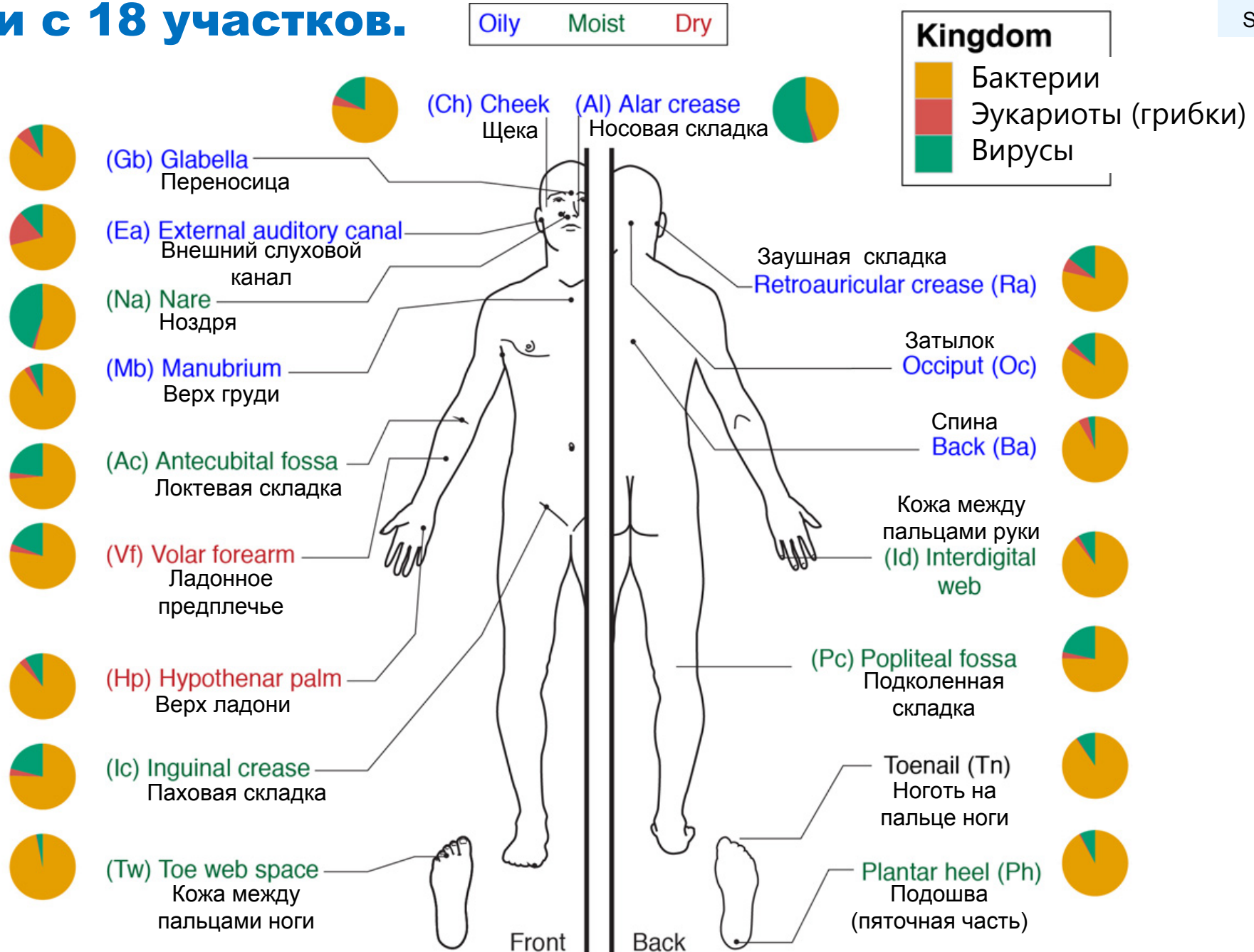


Биогеография кожи (15 3П, WMS-тест).

Мазки с 18 участков.

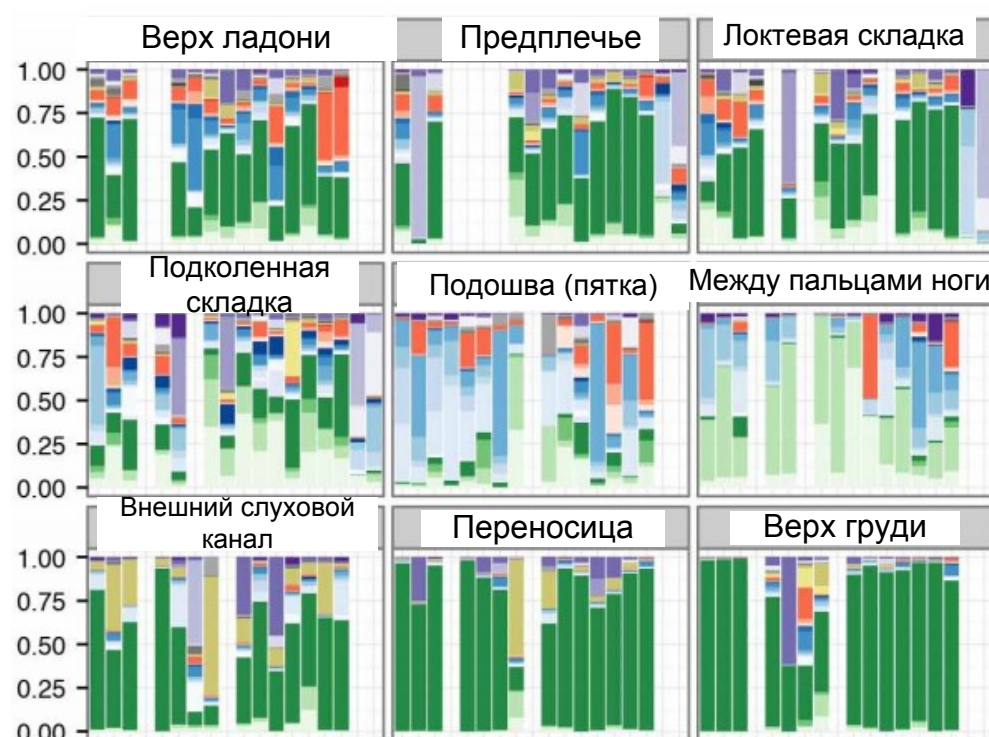
43

Skin-WMS-18-1_e

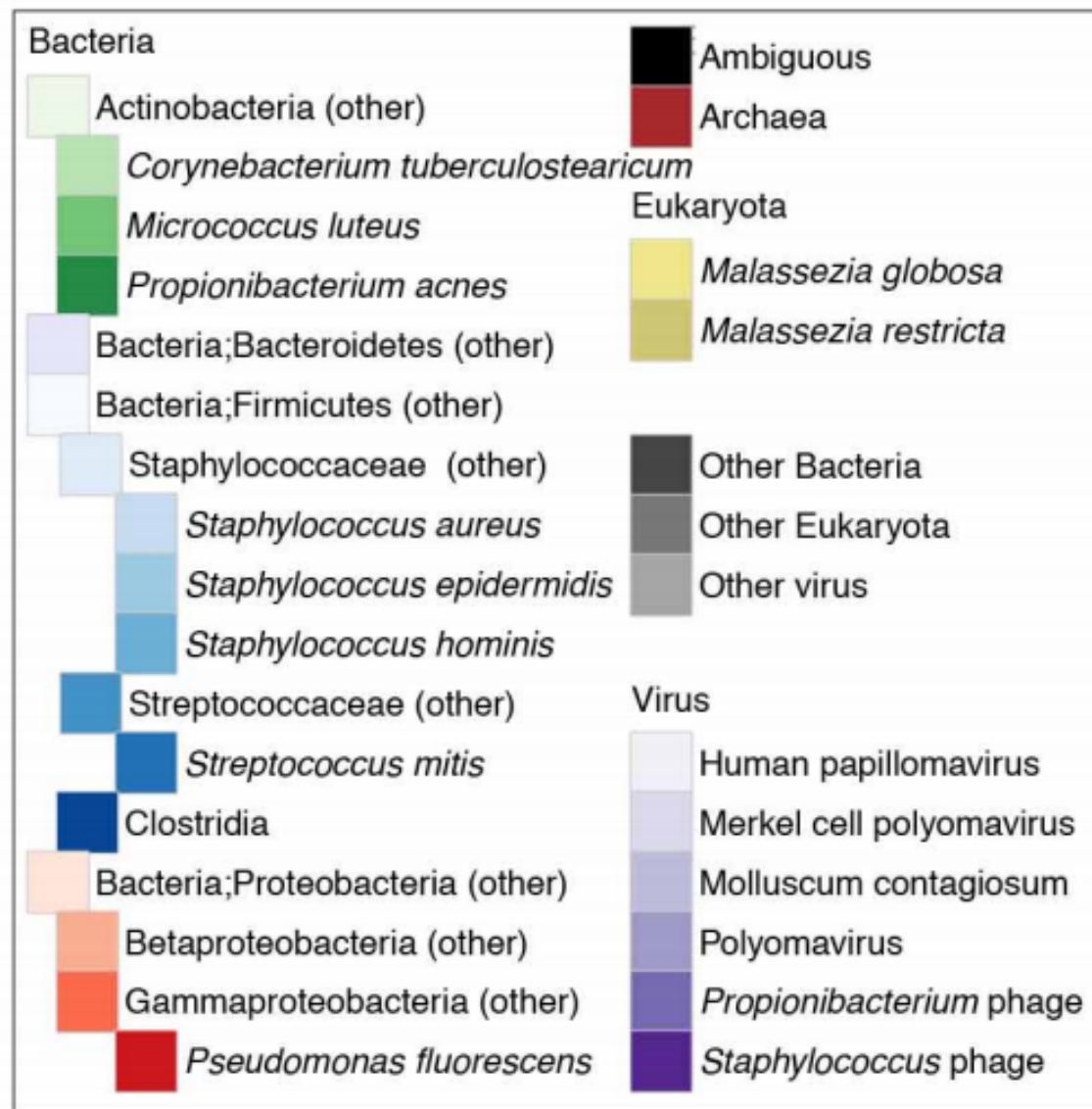
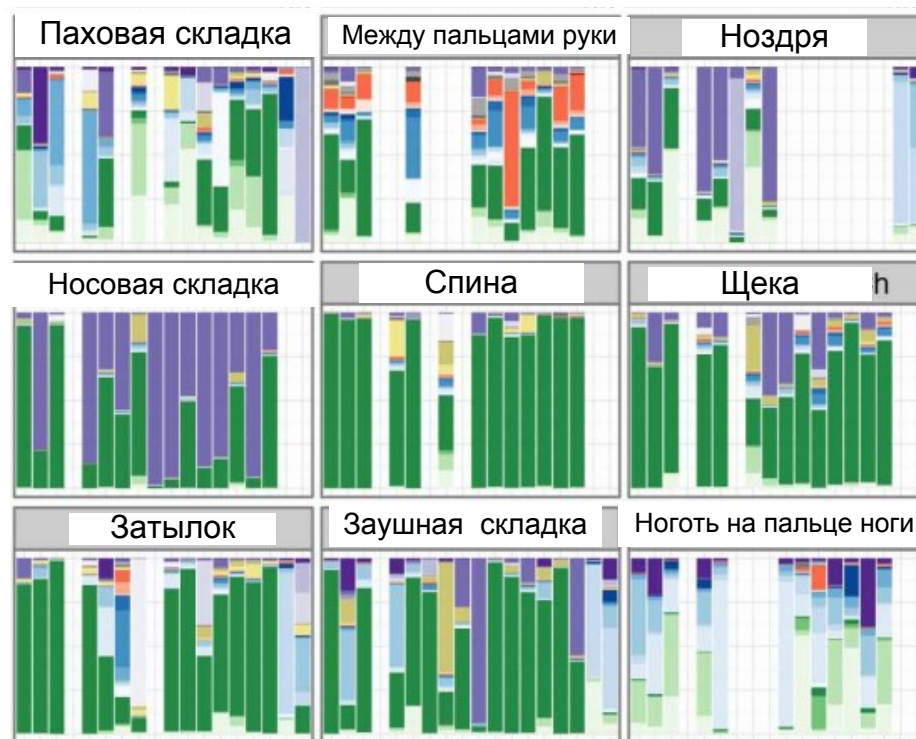


Oh J, Byrd AL, Deming C. et al. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. Nature. 2014 Oct 2;514(7520):59-64. 25279917.

Биогеография кожи (15 ЗП, WMS-тест). Основные результаты.



18 участков для каждого из 15 ЗП



Oh J, Byrd AL, Deming C. et al. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. Nature. 2014 Oct 2;514(7520):59-64. 25279917.

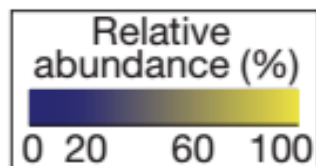
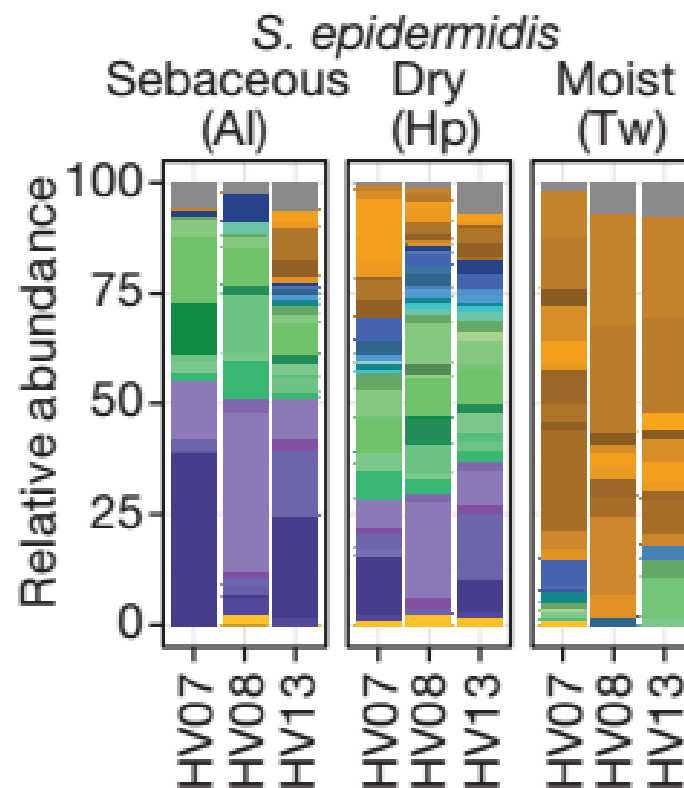
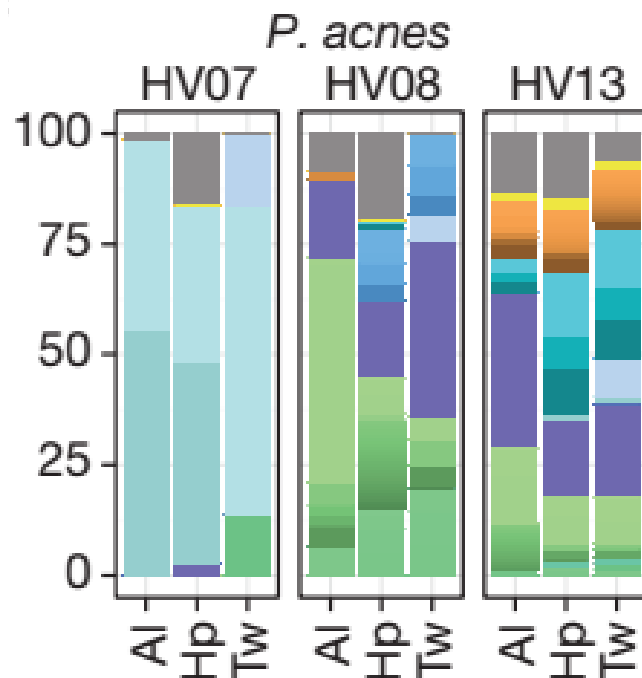
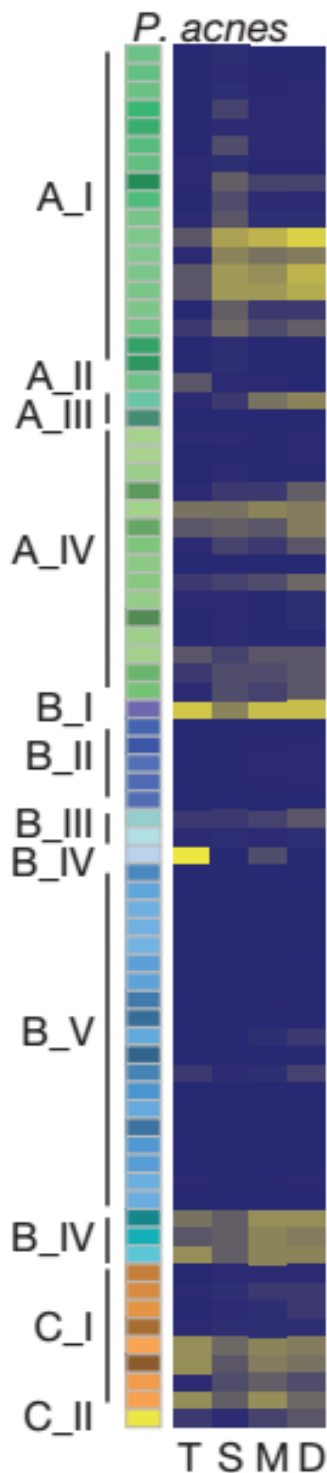
78 штаммов

Биогеография кожи (15 ЗП, WMS-тест). Детализация для двух распространенных видов (*P. acnes* и *Staph. epidermidis*) с точностью до штаммов.

45

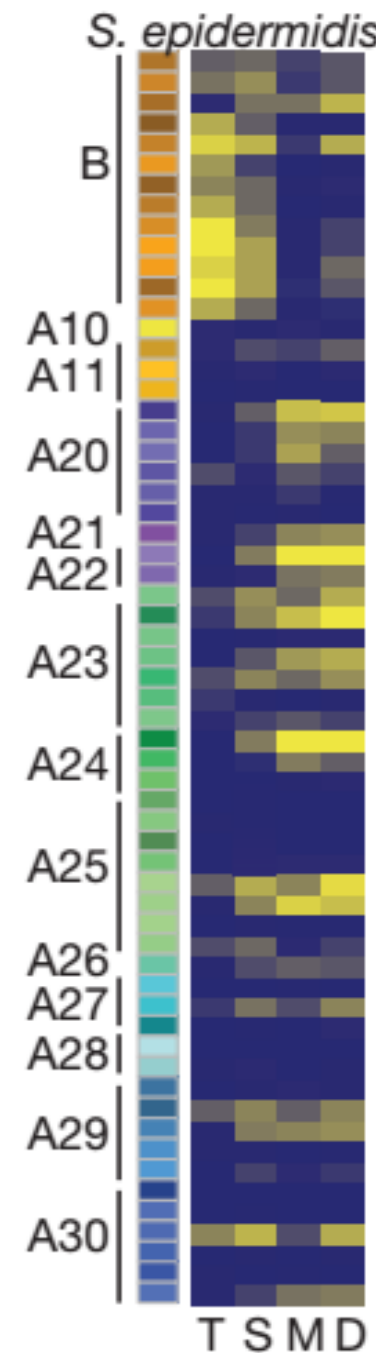
Skin-WMS-18-3.

61 штамм

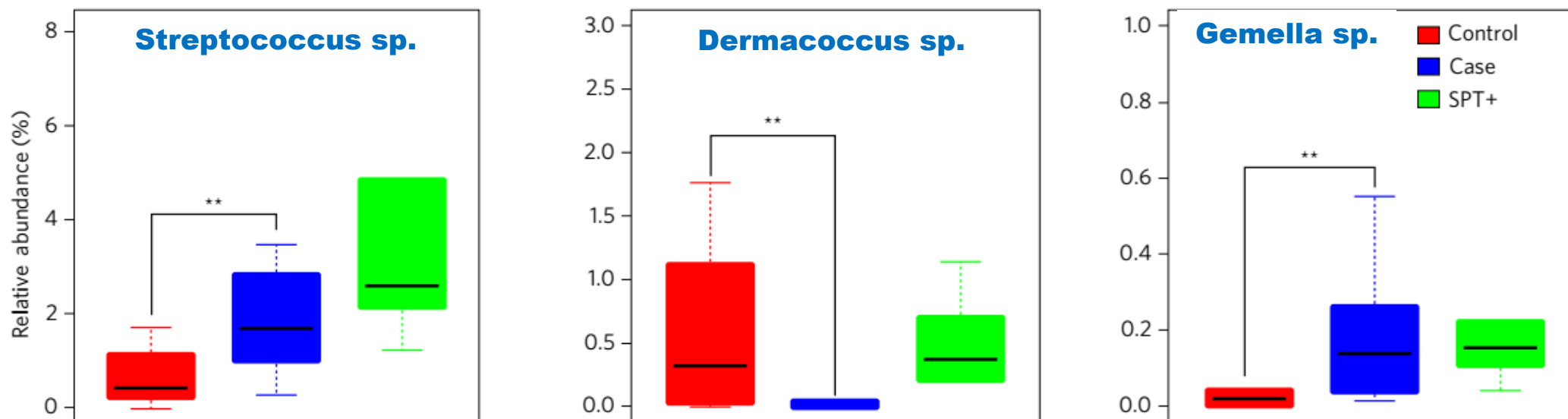


AI - Носовая складка
Hp - Верх ладони
Tw - Кожа между
пальцами ноги

HV07, HV08,
HV13 - коды
пациентов



Метагеном кожи (15 ЗП SPT(-), 19 AtD+, 5 ЗП SPT+, WMS-тест). Относительное присутствие нескольких родов.



Control. 15 ЗП с отрицательным скарификационным тестом.

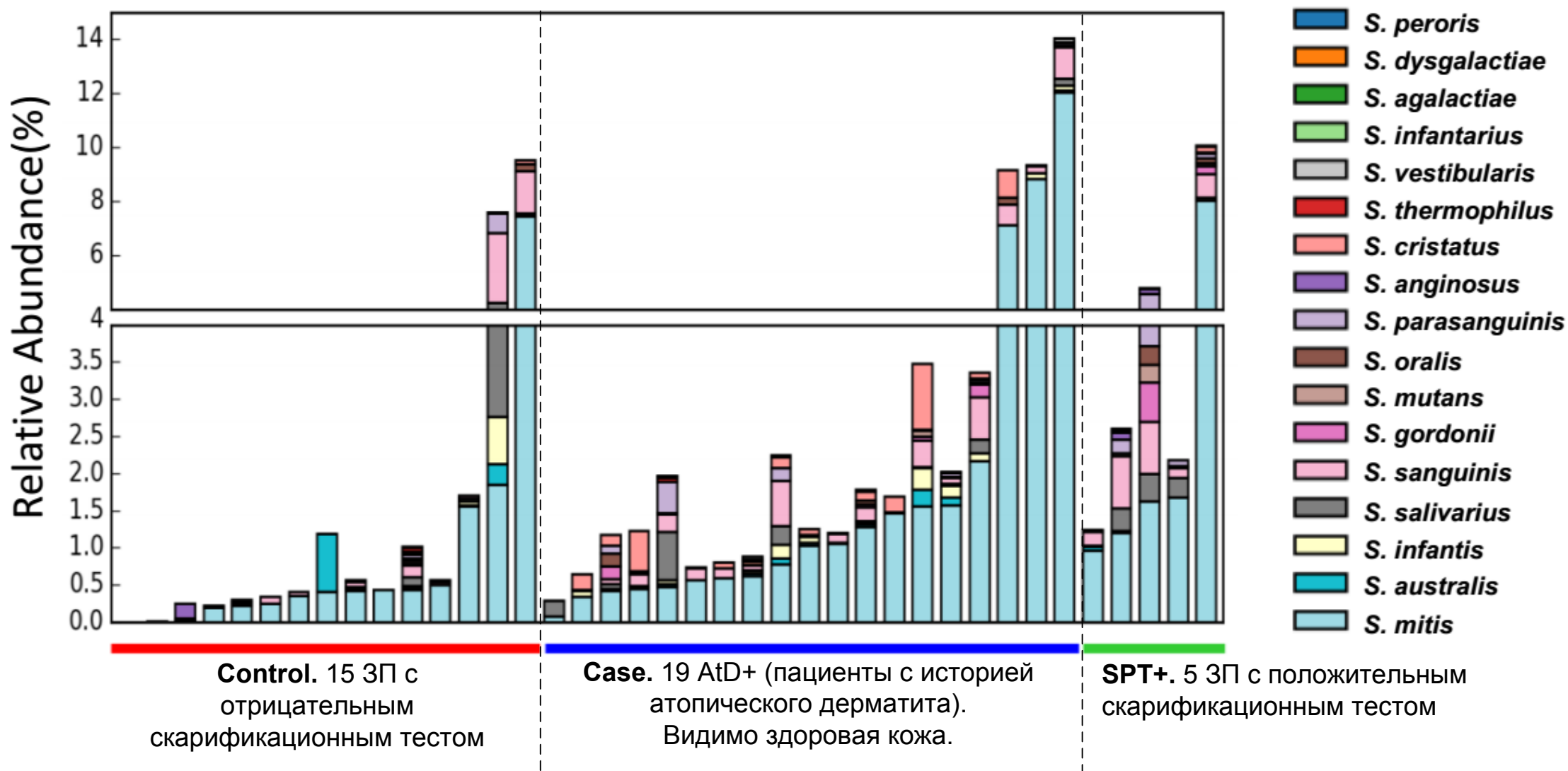
Case. 19 AtD+ (пациенты с историей атопического дерматита). Видимо здоровая кожа.

SPT+. 5 ЗП с положительным скарификационным тестом

У каждого брались два мазка (с правой и левой локтевых складок - antecubital fossae) методом клейкой ленты (tape stripping). Результат двух WMS-тестов усреднялся.

Chng KR, Tay AS, Li C. et al. Whole metagenome profiling reveals skin microbiome-dependent susceptibility to atopic dermatitis flare. Nat Microbiol. 2016 Jul 11;1(9):16106. 27562258.

Метагеном кожи (15 ЗП SPT(-), 19 AtD+, 5 ЗП SPT+, WMS-тест). Относительное присутствие видов *Streptococcus* sp.

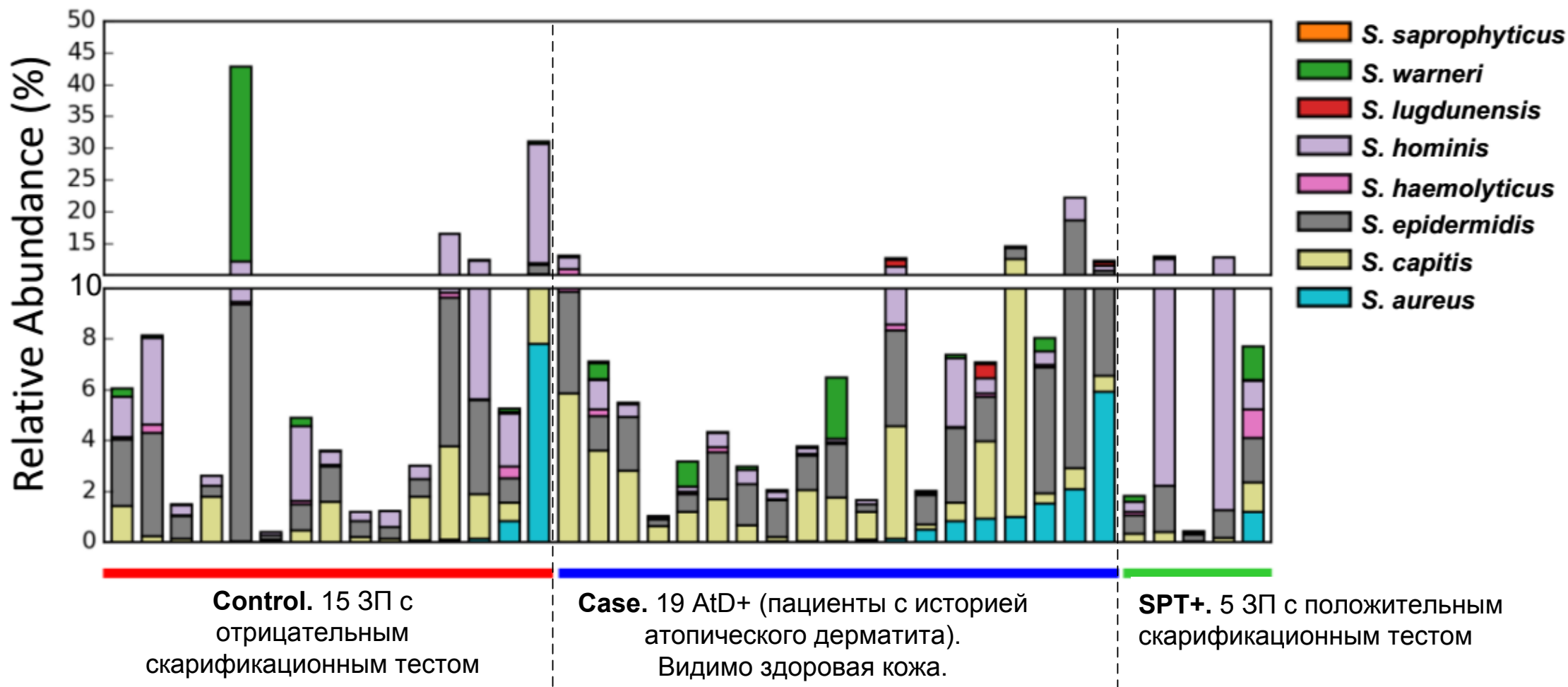


У каждого брались два мазка (с правой и левой локтевых складок - antecubital fossae) методом клейкой ленты (tape stripping). Результат двух WMS-тестов усреднялся.

Метагеном кожи

(19 AtD+, 15 3П SPT(-), 5 3П SPT+, WMS-тест).

Относительное присутствие видов *Staphylococcus* sp.



У каждого брались два мазка (с правой и левой локтевых складок - antecubital fossae) методом клейкой ленты (tape stripping). Результат двух WMS-тестов усреднялся.

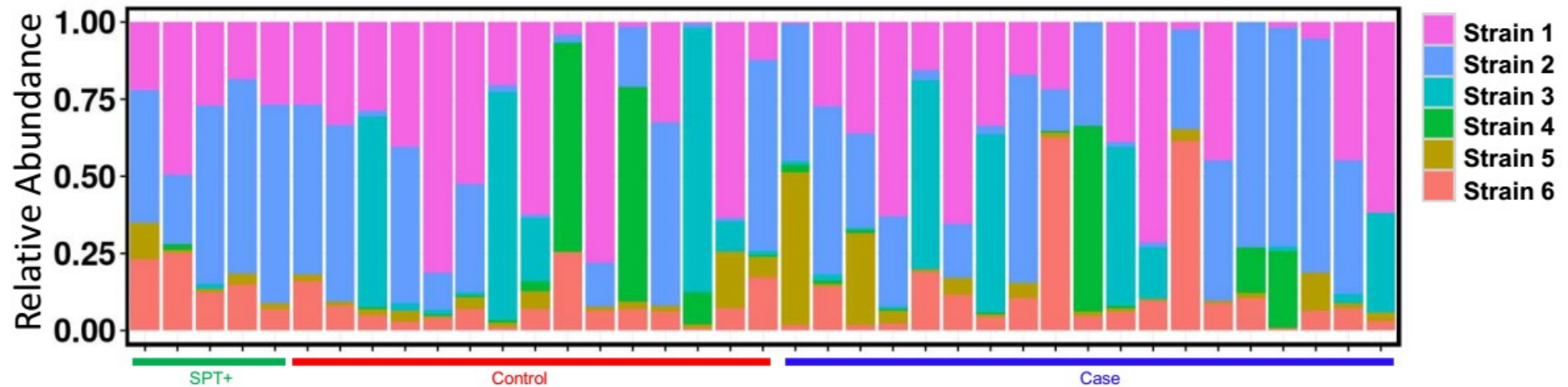
Chng KR, Tay AS, Li C. et al. Whole metagenome profiling reveals skin microbiome-dependent susceptibility to atopic dermatitis flare. Nat Microbiol. 2016 Jul 11;1(9):16106. 27562258.

Метагеном кожи

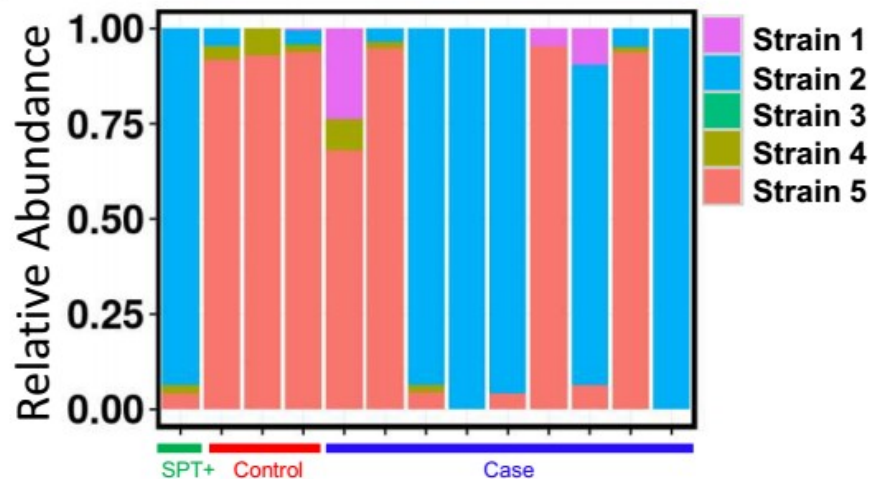
(19 AtD+, 15 3П SPT(-), 5 3П SPT+, WMS-тест).

Относительное присутствие штаммов *Staphylococcus aureus*.

A



B



SPT+. 5 3П с положительным скарификационным тестом

Control. 15 3П с отрицательным скарификационным тестом

Case. 19 AtD+ (пациенты с историей атопического дерматита). Видимо здоровая кожа.

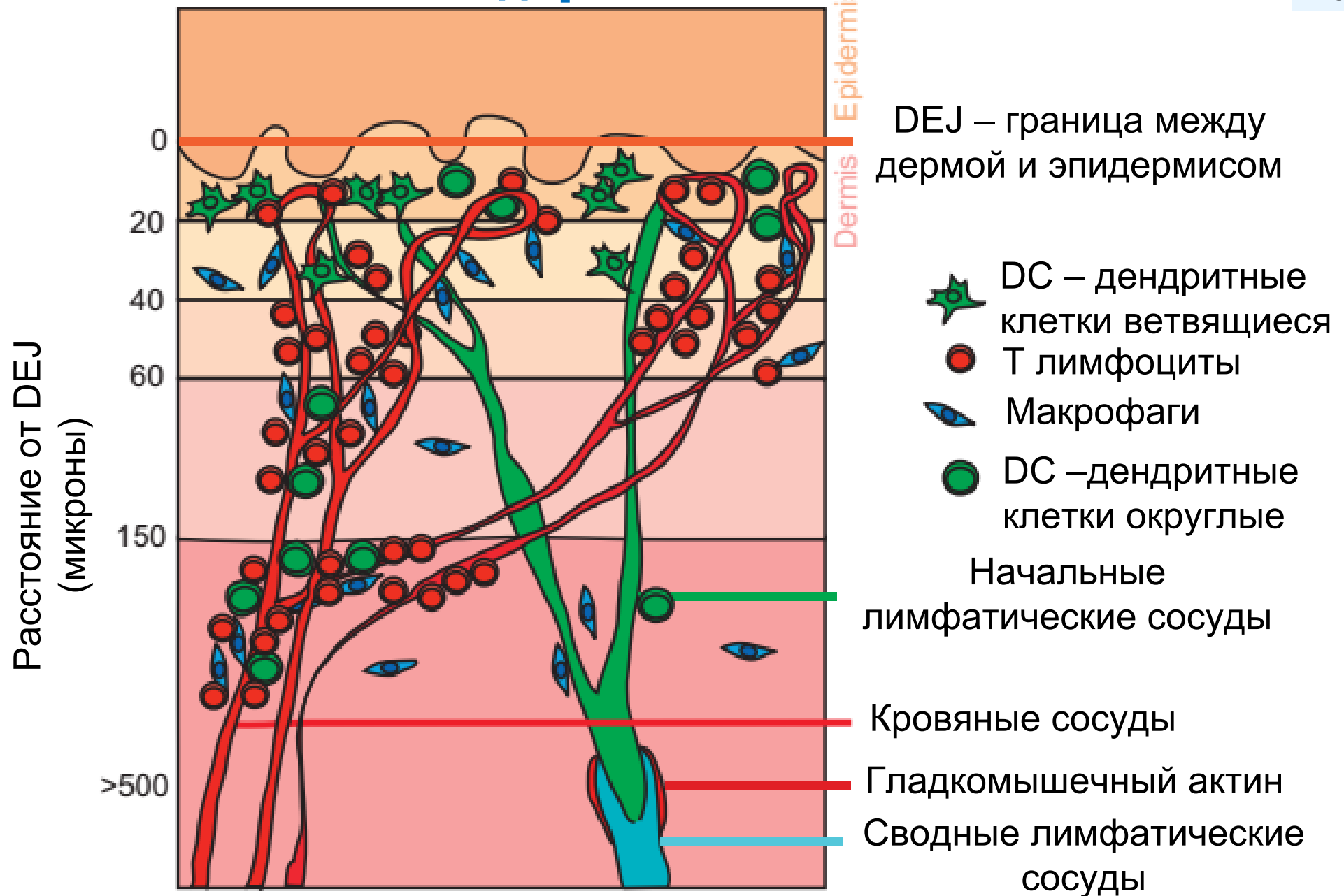


**Фагоциты кожи в норме и при псориазе.
Комплексное изучение метабеномов фагоцитов крови
и фагоцитов псориатической кожи.**

Дендритные клетки, макрофаги и Т-лимфоциты в здоровой коже

51

Skin_2D



Дендритные клетки, макрофаги и Т лимфоциты в здоровой коже (3D)

52

Skin_3D

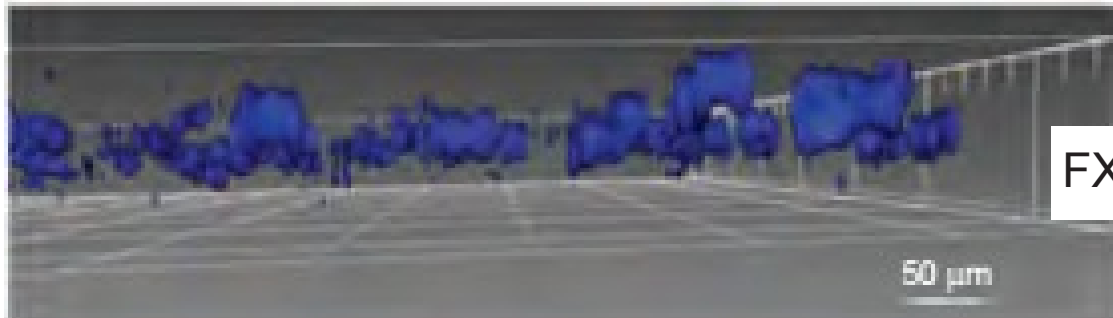


Три вида клеток вместе

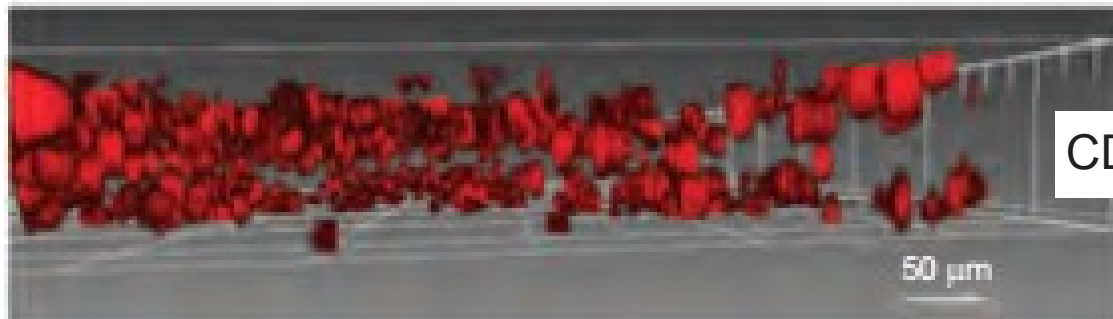
3D-распределение
под DEJ на глубину
от 0 до 60 микрон



CD11c+ DC – дендритные клетки



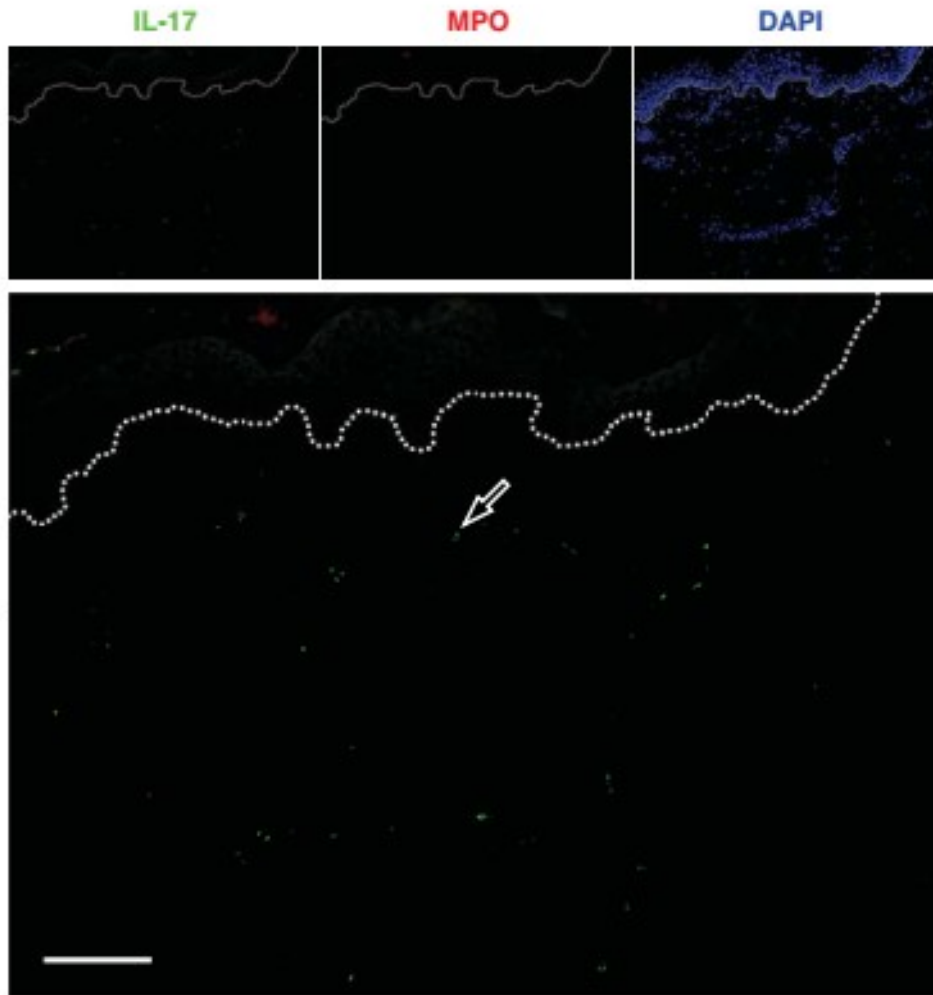
FXIIIa+ MF - макрофаги



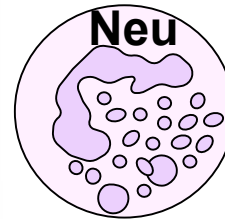
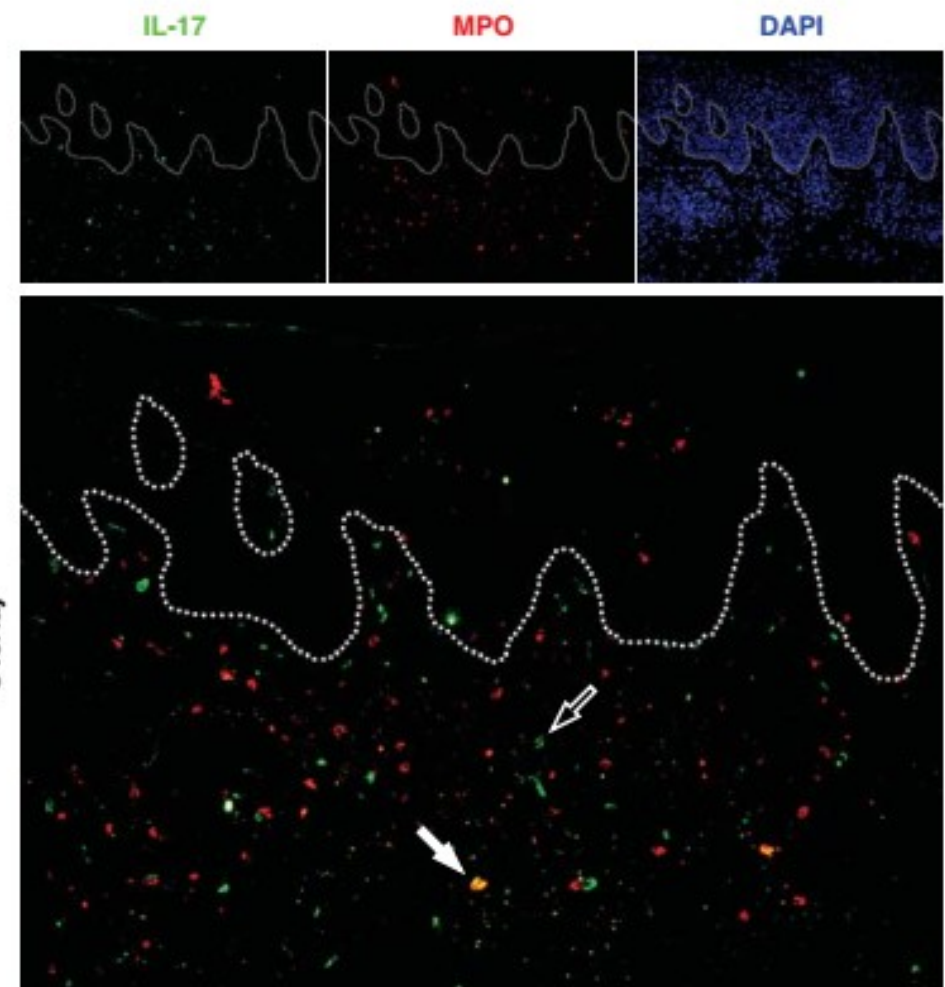
CD3+ Т лимфоциты

Фрагмент Рис.3 из Wang XN, McGovern N, Gunawan M. et al. A Three-Dimensional Atlas of Human Dermal Leukocytes, Lymphatics, and Blood Vessels. J Invest Dermatol. 2014 Apr;134(4):965-74. 24352044.

Норма



Псориаз



Нейтрофилы (красный), содержащие IL-17 (зеленый), наблюдаются в псориатическом пятне.

Иммунофлюоресценция выполнена для IL-17 (зеленый), MPO – миелопероксидаза (красный) и DAPI (синий).

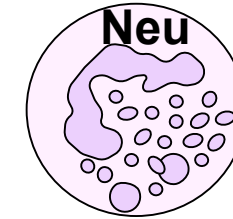
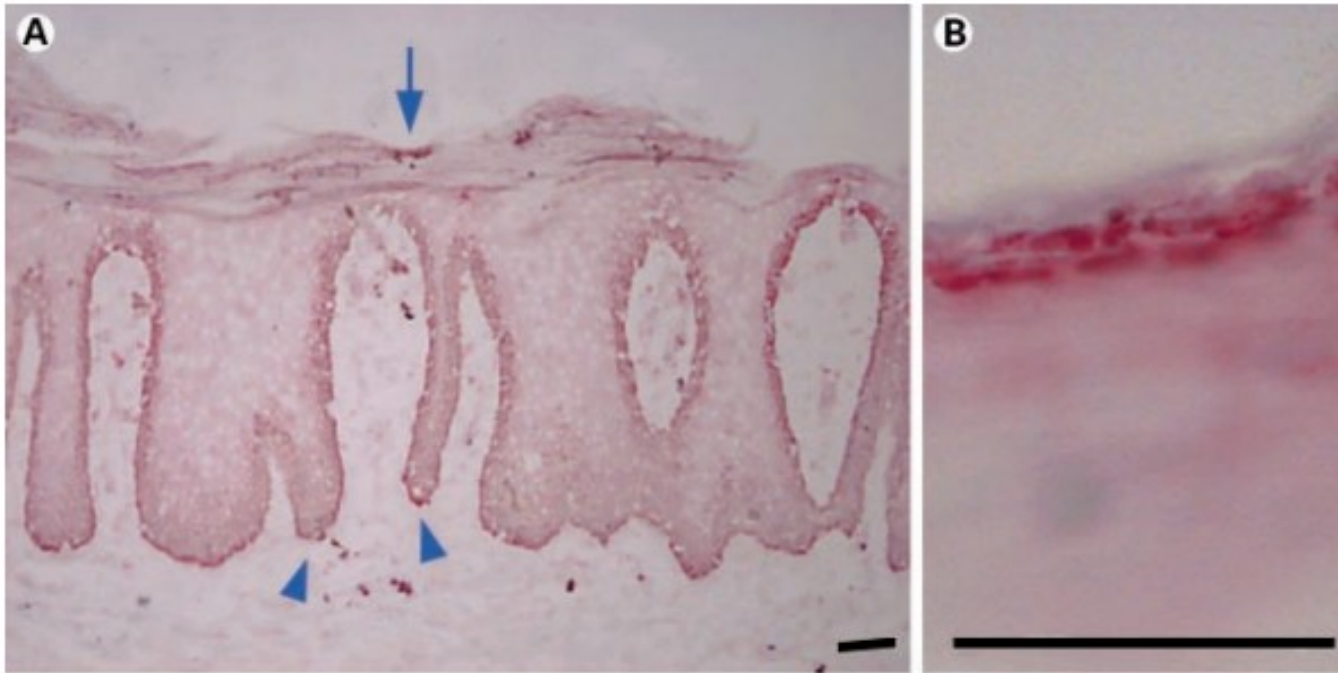
Характерное изображение, одно из 12 для ЗП (слева) и одно из 12 ПП (справа). 200х увеличение. Пунктирная линия обозначает границу между дермой и эпидермисом. Размер отрезка (внизу слева) = 100 микрон.

Фрагмент Рис. 4 из Приложения к статье: Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R. et al. Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. J Immunol.2011 Jul 1;187(1):490-500. 21606249.

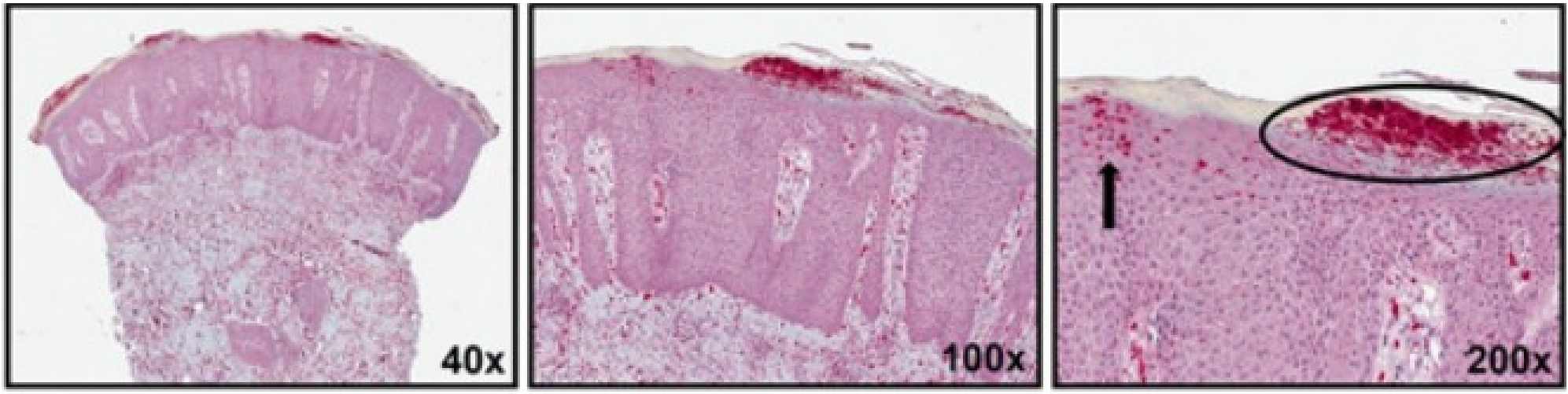
Нейтрофилы в псориазическом эпидермисе (абсцессы Мунро)

54

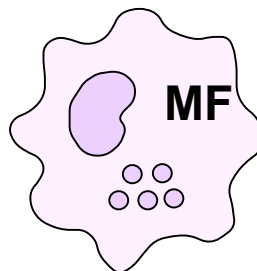
Neutrophils-Munro



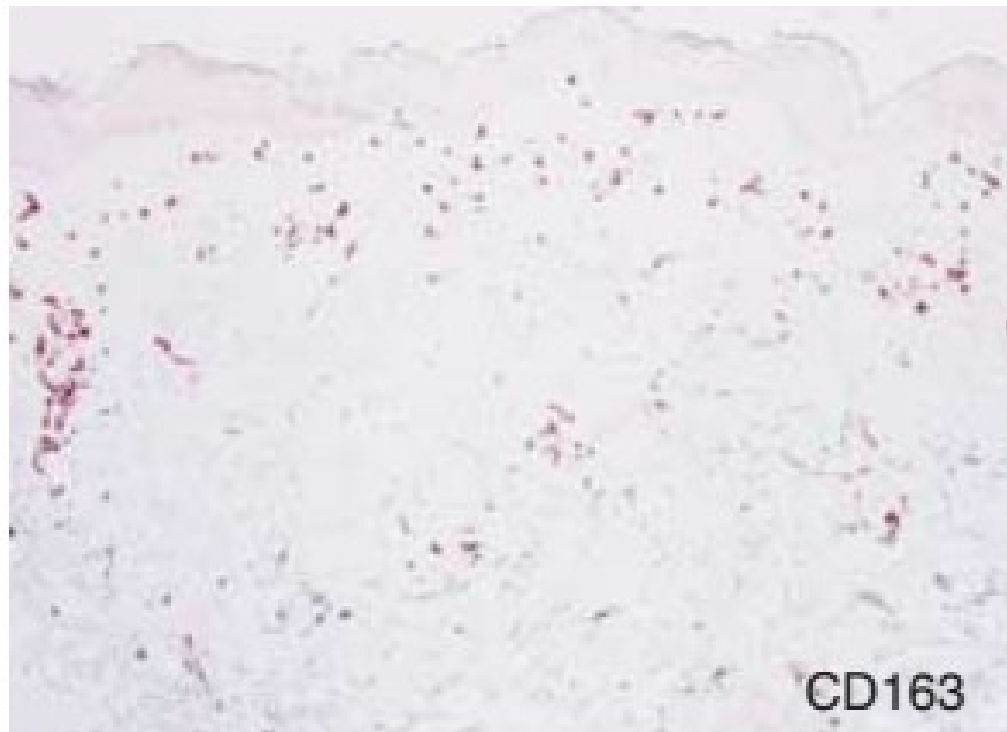
Фрагмент Рис.1 из Ozawa M, Terui T, Tagami H. Localization of IL-8 and complement components in lesional skin of psoriasis vulgaris and pustulosis palmaris et plantaris. *Dermatology*. 2005;211(3):249-55. 16205070.



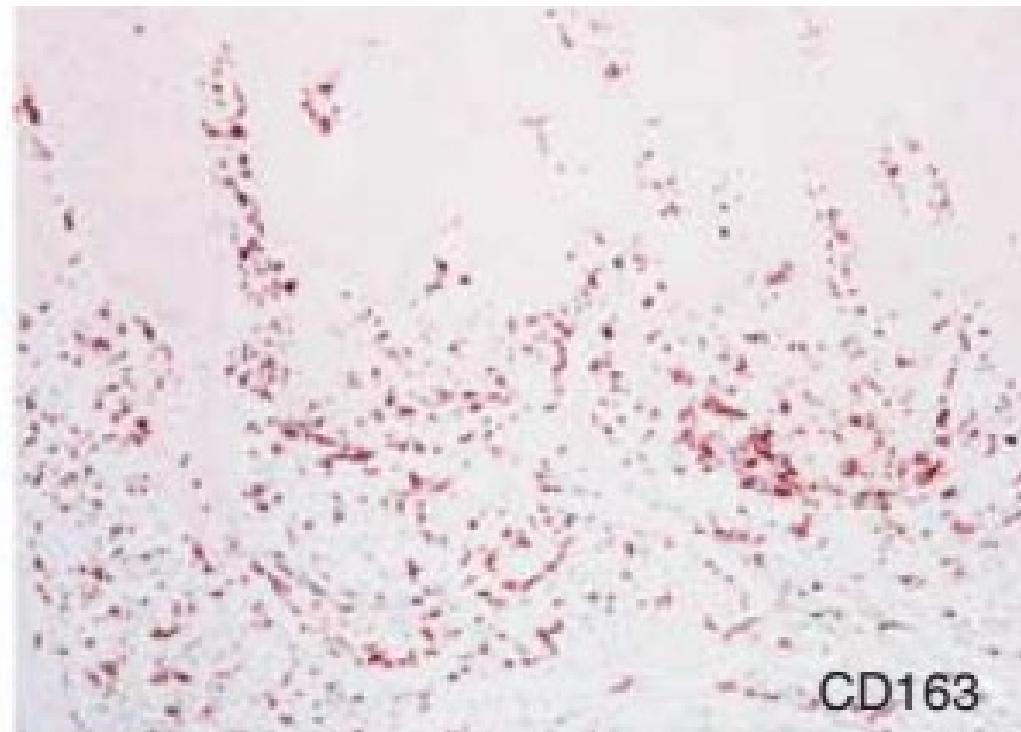
Фрагмент Рис.3 из Reich K, Papp KA, Matheson RT. et al. Evidence that a neutrophil-keratinocyte crosstalk is an early target of IL-17A inhibition in psoriasis. *Exp Dermatol*. 2015 Jul;24(7):529-35. 25828362.



Normal



Psoriasis



CD163+ макрофаги.

Фрагмент Рис.1 из Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Zaba LC et al. A Subpopulation of CD163-Positive Macrophages Is Classically Activated in Psoriasis. Journal of Investigative Dermatology 2010 Oct; 130:2412-2422. 20555352.

Дендритные клетки в здоровой и псориатической коже

56

Dendritic_Cells_e

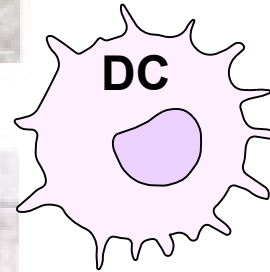
Норма



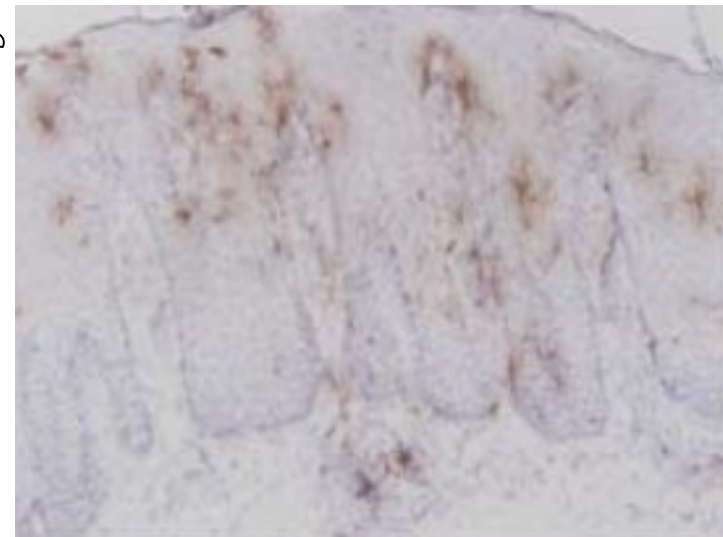
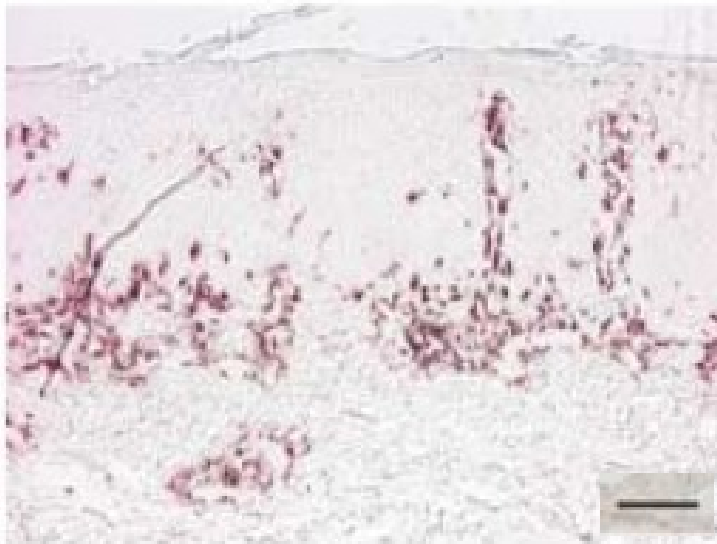
CD11c+



CD1a+



Псориаз



Фрагмент Рис.1 из Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ et al. Psoriasis Is Characterized by Accumulation of Immunostimulatory and Th1/Th17 Cell-Polarizing Myeloid Dendritic Cells. J Invest Dermatol. 2009 Jan;129(1):79-88. 18633443.

Фрагмент Рис.2 из Komine M, Karakawa M, Takekoshi T. et al. Early inflammatory changes in the "perilesional skin" of psoriatic plaques: is there interaction between dendritic cells and keratinocytes? J Invest Dermatol. 2007 Aug;127(8):1915-22. 17446902.

Привлечение фагоцитов крови в кожу при средне-тяжелом псориазе.

57

Phagocytes-1

В здоровой коже почти все фагоциты имеют резидентное происхождение.

Псориазная кожа

Концентрация фагоцитов ~ 41000 шт/мм³ (в верхнем слое толщиной 0,5 мм)

MF - макрофаги, происшедшие от MoDP и Mo

~ 35%

MoDC - дендритные клетки, происшедшие от MoDP и Mo

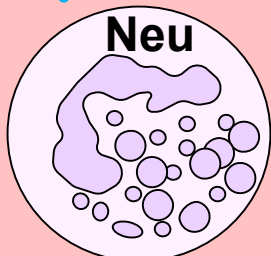
~ 20%

~ 45%

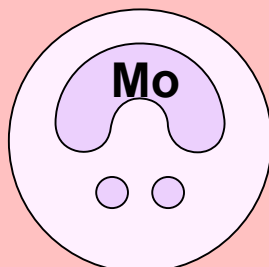
MoDP - предшественники моноцитов и дендритных клеток (дермальные стволовые клетки)

Системный кровоток

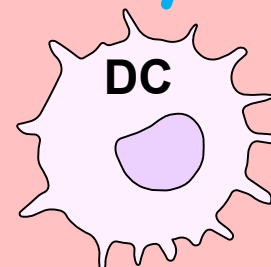
Концентрация фагоцитов ~ 6500 шт/мм³



Нейтрофилы крови ~ 85%



Моноциты крови ~ 15%



Дендритные клетки крови < 1%





До 80% фагоцитов псориазной кожи имеют нерезидентное происхождение, т.е. либо привлечены из кровотока, либо произошли от клеток, привлеченных из кровотока. Это **все** нейтрофилы и до 70% моноцитов-макрофагов и дендритных клеток.

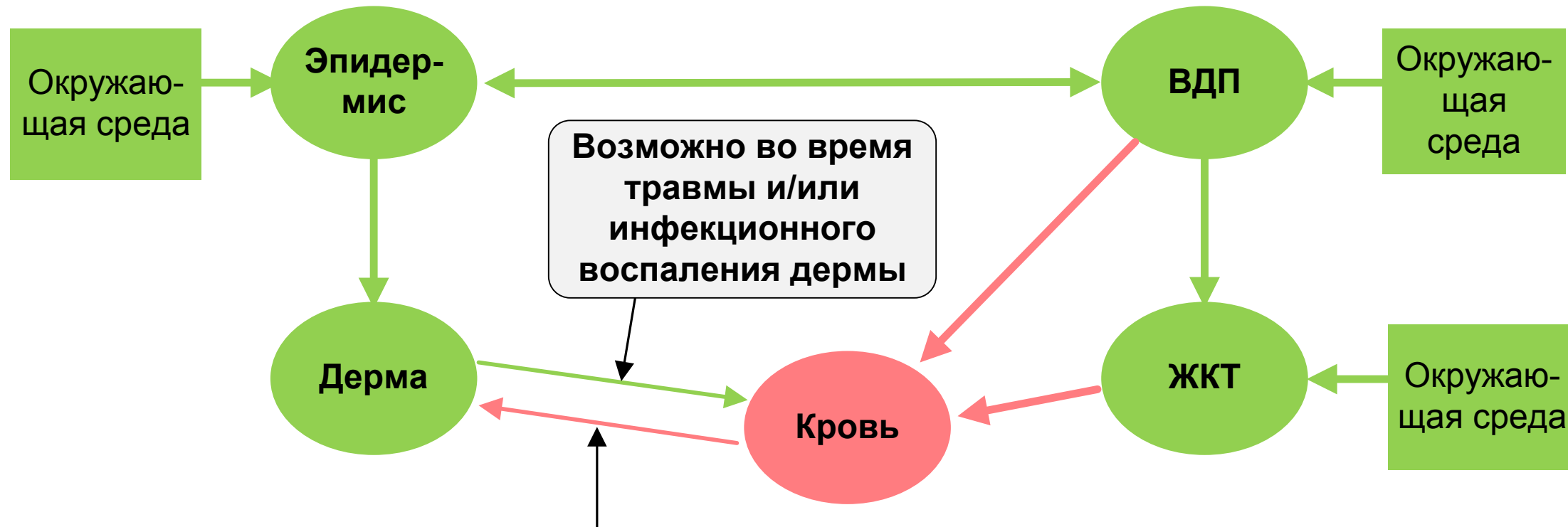
% соотношение между типами фагоцитов в псориазной коже определяется увеличением среднего времени жизни макрофагов и особенно дендритных клеток по сравнению этими же величинами для фагоцитов крови.

Схема присутствия и перемещения нехозяйского биоматериала между органами

58

Biotransfer^e

Биоматериал	Присутствие	Перемещение
Бактерии и бактериальные продукты (в т.ч. bacDNA)		
Только бактериальные продукты (в т.ч. bacDNA)		



Гипотеза H10-S (общая). Недеградированный нехозяйский биоматериал перемещается в псориатическую кожу внутри фагоцитов крови.

?

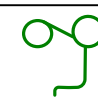
Гипотеза H10. Привлечение толеризированных моноцитов Mo-R и дендритных клеток DC-R в дерму из кровотока – необходимое звено порочного цикла. Существование и тяжесть любого псориатического пятна определяется интенсивностью поступления в дерму Y-антигена, несомого этими фагоцитами крови.

?

Нехозя́йский биоматериал поступает в псориатическую кожу внутри фагоцитов крови ?

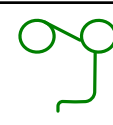
(гипотеза H10-S).

Псориатическая кожа



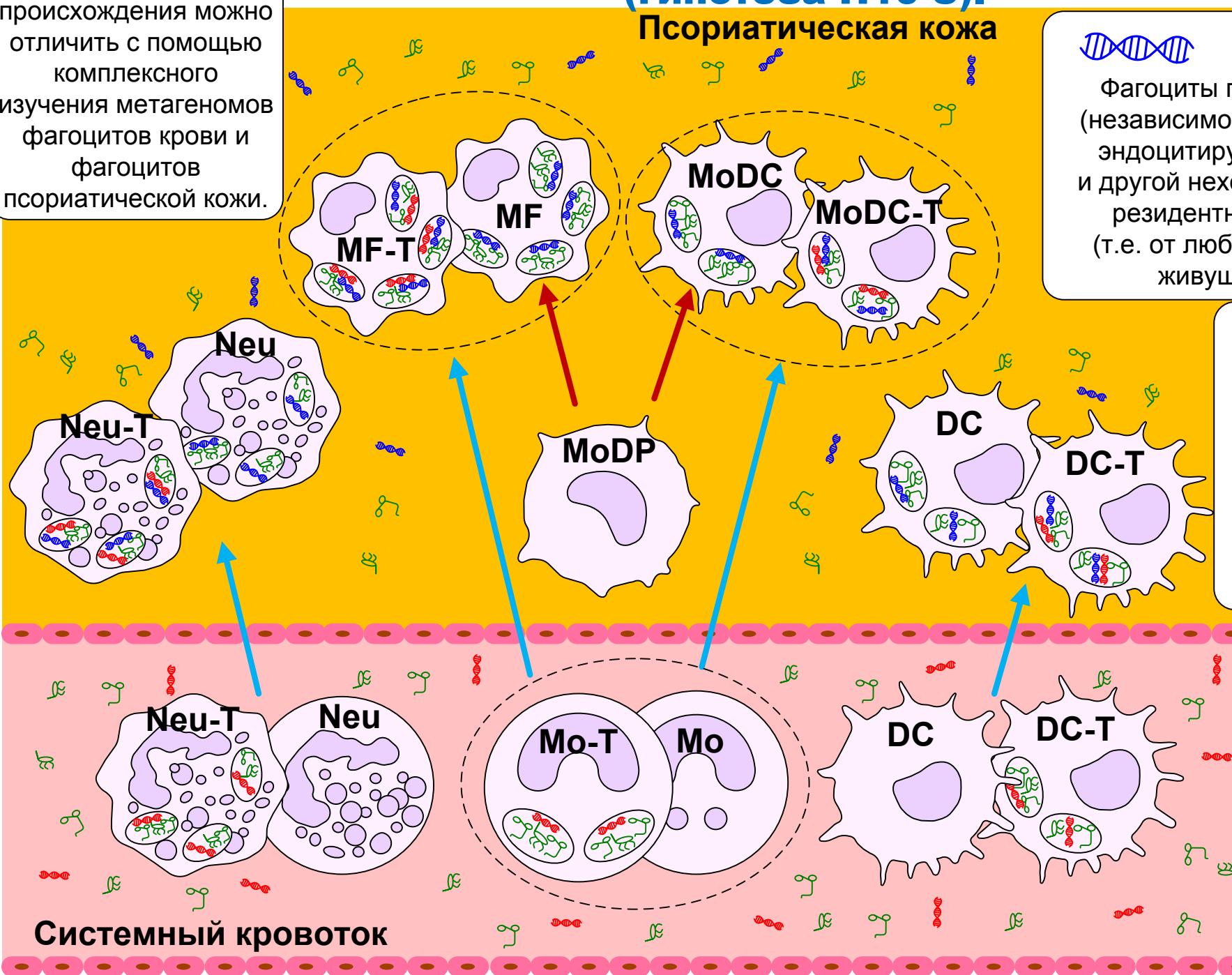
Фагоциты псориатической кожи (независимо от их происхождения) эндоцитируют **nhDNA**, **LPS**, **PG** и другой нехозя́йский биоматериал резидентного происхождения (т.е. от любых микроорганизмов, живущих на и в коже).

WMS-тесты фагоцитов позволят определить концентрацию **nhDNA** и оценить концентрацию другого нехозя́йского биоматериала нерезидентного происхождения в псориатической коже.



nhDNA, **LPS**, **PG** и другой нехозя́йский биоматериал поступает в псориатическую кожу внутри толеризованных фагоцитов крови Neu-T, Mo-T и DC-T

nhDNA резидентного и **nhDNA** нерезидентного происхождения можно отличить с помощью комплексного изучения метагеномов фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи.



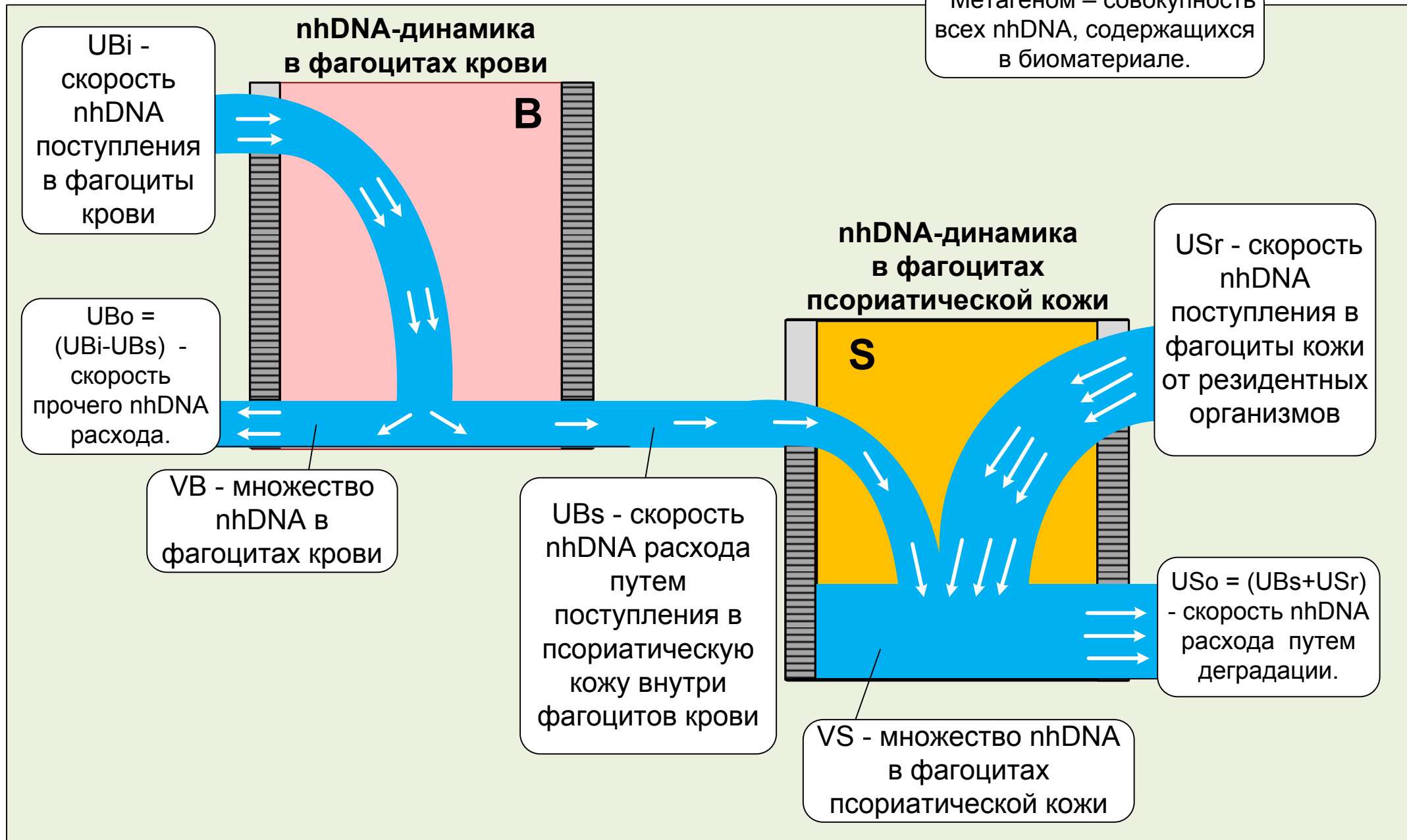
Системный кровоток

Метагеномы* фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи в динамике

60

2Pools-S

* Метагеном – совокупность всех nhDNA, содержащихся в биоматериале.

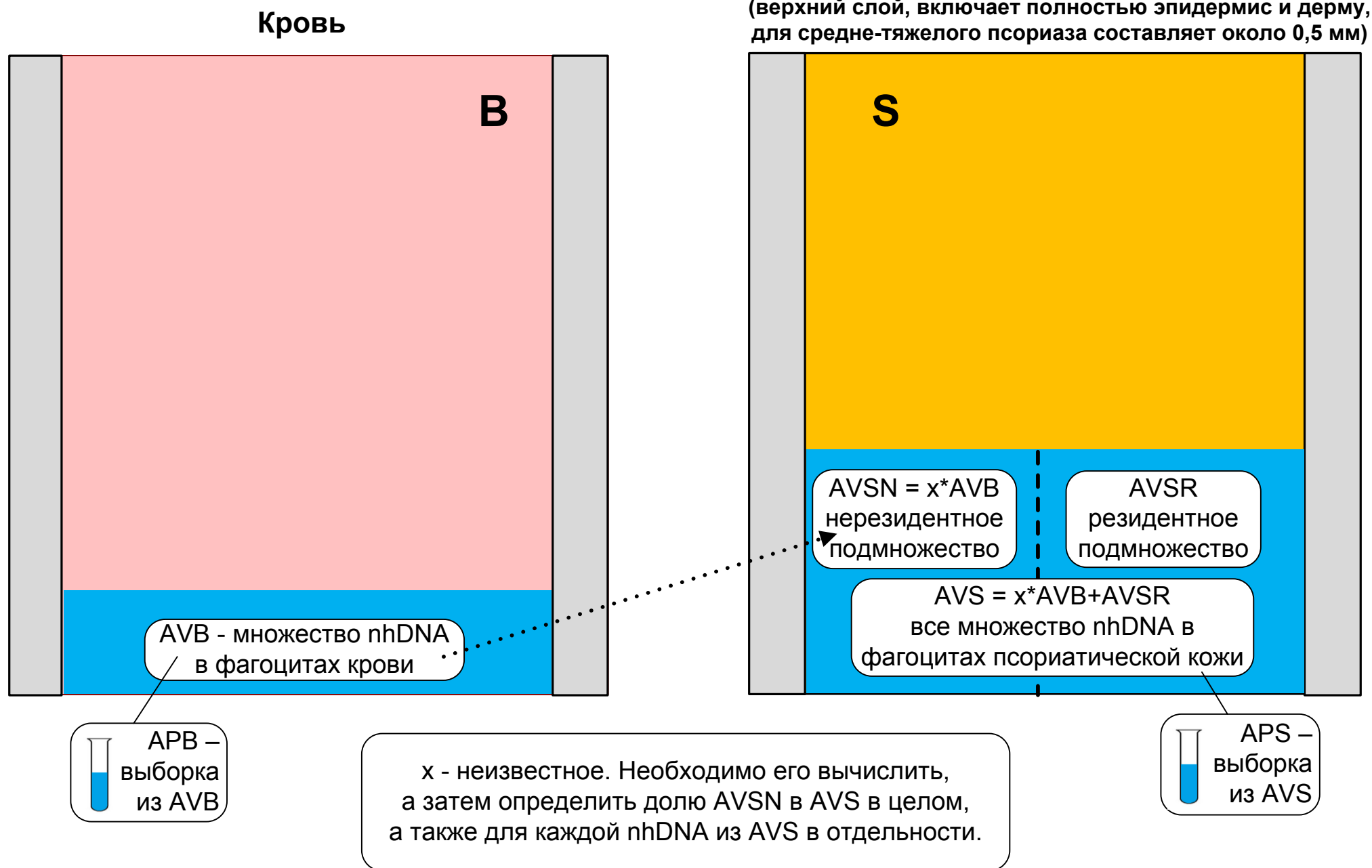


Метагеномы фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи при ее стабильном состоянии.

Мгновенный срез.

61

2Pools-S



Отбор фагоцитов из крови и псориатической кожи иммуномагнитным методом

62

Отрицательная
селекция

Phagocytes_selection

Получение
крови в
стерильных
условиях из
вены.

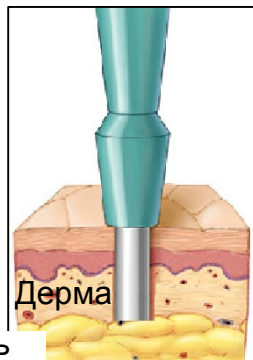
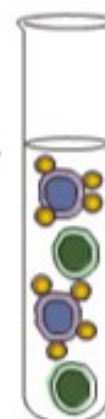


Добавление в
клеточную суспензию
специфических
антител

Инкубация и
центрифуги-
рование

Добавление
магнитных
микробусин,
инкубация

Отбор
несвязанных с
микробусинами
клеток



Гомогениза-
ция биоптата
с целью
полного
разделения
клеток.

Добавление реагента,
освобождающего от
микробусин,
инкубация

Отбор клеток,
освобожденных
от микробусин



Получение биоптата псориатического пятна в
стерильных условиях с помощью панча (≤ 3 мм
диаметром) на глубину ($\sim 0,5$ мм), достаточную для
того, чтобы захватить полностью эпидермис и дерму.

Положительная селекция

Предполагаемые фракции метагенома фагоцитов псориатической кожи MPPS

63

nhDNA-MPPS_e

Смешанная фракция RuN. Возможные причины существования:

- контаминация биоматериала крови кожной микрофлорой во время венепункции.
- транспорт организма и/или его nhDNA из кожи в кровь во время травмы и/или инфекционного воспаления дермы
- наличие в микрофлоре кожи и ЖКТ (ВДП) идентичных штаммов
- картирование различных видов на один референсный

Общая фракция M. Предполагается, что существенный % MPB будет обнаружен в ней (100%?).

**MPB -
Метагеном
фагоцитов
крови**

R. Резидентная.
nhDNA резидентного происхождения
– только из кожных организмов.
(есть в MPPS, но нет в MPB).

RuN. Смешанная. nhDNA резидентного и нерезидентного происхождения.
(Все из фракции M, что не вошло в N.
Для каждой nhDNA этой фракции подмножества резидентного и нерезидентного происхождения определяются алгоритмически).

M. Общая.
(nhDNA есть и в MPB и в MPPS).

N. Нерезидентная. nhDNA нерезидентного происхождения. (nhDNA есть в MPPS только потому, что поступила в псориатическую кожу внутри фагоцитов крови. Определяется логически и алгоритмически. Первоначально в нее включаются nhDNA организмов, которые не могут существовать в коже).

nhDNA есть в MPB, но нет в MPPS (возможно для nhDNA слабо представленных в MPB).

**MPPS -
Метагеном
фагоцитов
псориатичес-
кой кожи**

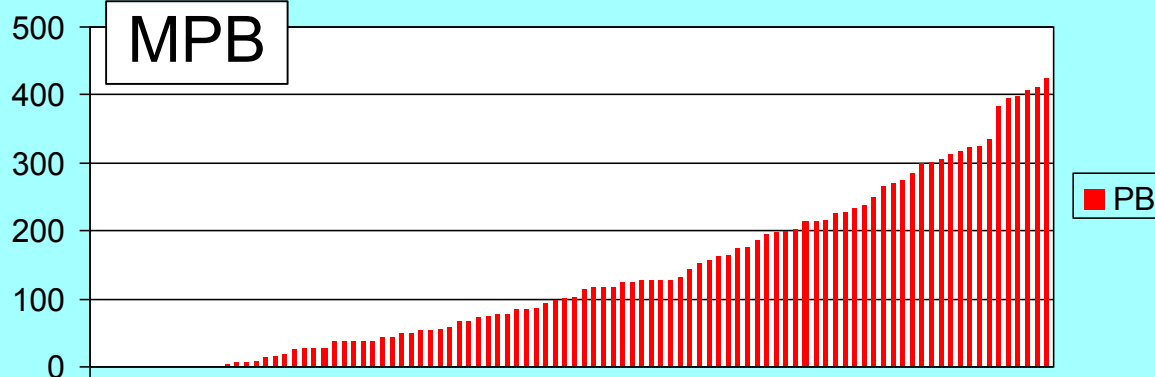
nhDNA – нехозяйская DNA (в т.ч. bacDNA)

* Учитываются nhDNA, относительное содержание которых более 0,01% (величина условная).

Алгоритм разделения метагенома фагоцитов псориатической кожи MPPS на фракции и подмножества. Пример.

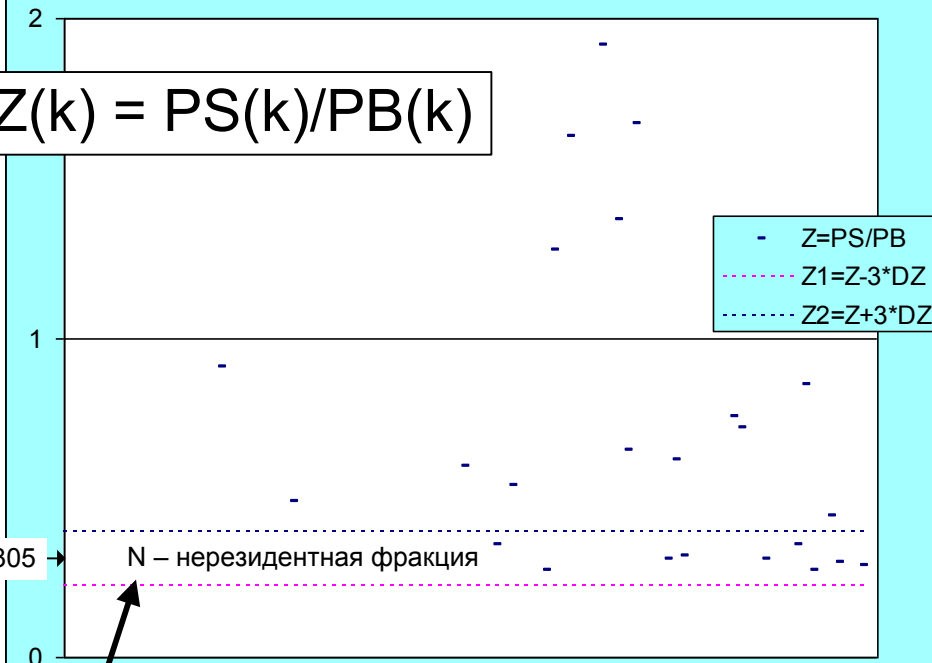
64

MPPS-example_e



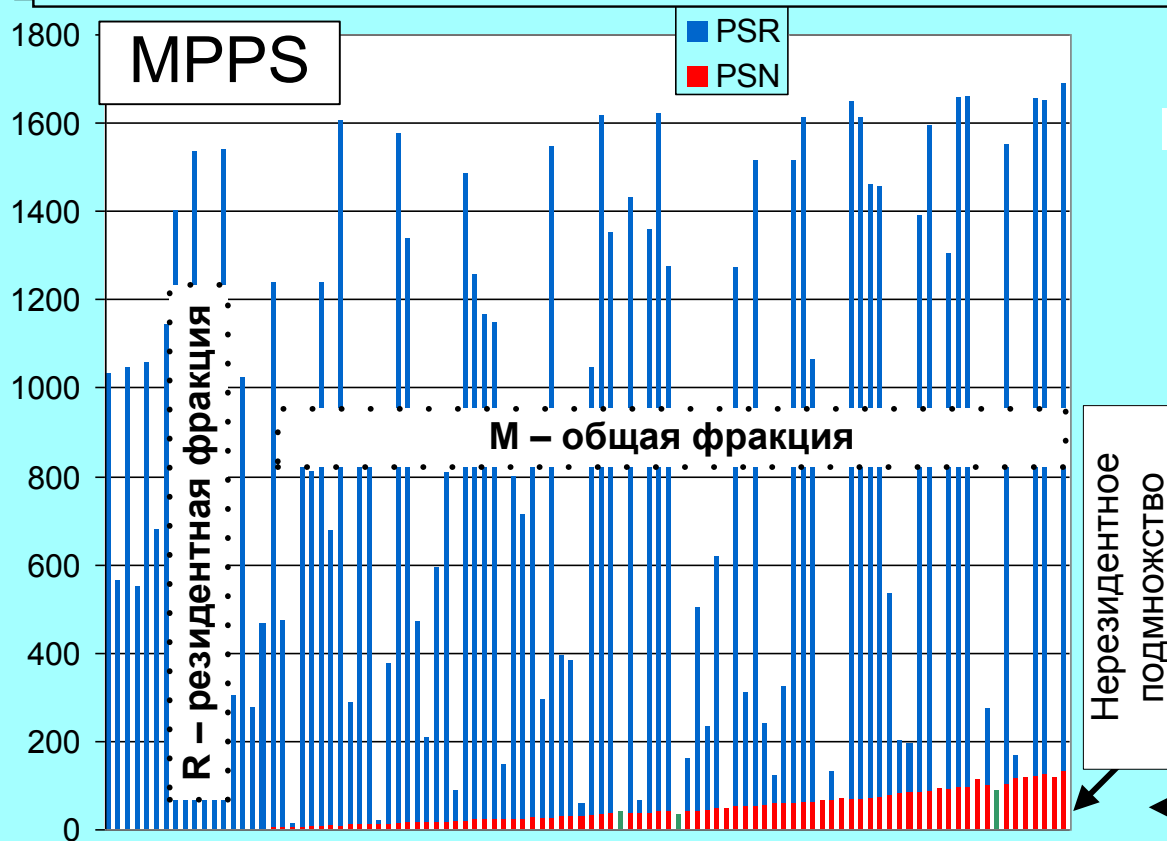
На всех диаграммах виды k упорядочены по возрастанию PB(k).

$$Z(k) = PS(k)/PB(k)$$



Все виды k, для которых PSR(k)=0, включены в нерезидентную фракцию N.
 $Z(k) = PS(k)/PB(k)$ для них значение между двумя пунктирными линиями.
 Для видов k, включенных в резидентную фракцию, значения не вычисляются, т.к. $PB(k)=0$. Значения $Z(k)$ больше 2 не показаны.

Все виды k, для которых PSR(k)=0, включены в нерезидентную фракцию N.
 Они - это только красный (или зеленый - NL) столбик без синего верха - на диаграмме расположены вперемешку с видами из смешанной фракции RuN (двухцветные столбики).



Все виды k, для которых PSN(k)=PB(k)=0, включены в резидентную фракцию R.
 Они - это только синий столбик без красного низа - на диаграмме все слева.

	Вопросы	Возможные ответы и выводы	
1	Коррелирует ли тяжесть псориатической болезни а) с концентрацией каких-либо phDNA в фагоцитах крови? б) с уровнем PAMP-немии?	Да. Прямое подтверждение гипотез H2 и H3.	Частично. Нужно смотреть что именно обнаружено и, вероятно, корректировать гипотезы H2 и/или H3. Нет. Это противоречит гипотезам H2 и H3. Критично для проведения НИР2.
2	Недеградированная phDNA поступает из крови в псориатическую кожу? Если да, то какая часть метагенома фагоцитов крови MPB обнаружена в метагеноме фагоцитов псориатической кожи MPPS и в какой концентрации?	> 80%. Факт доказывает гипотезу H10-S и поддерживает гипотезу H10, поскольку доказывает поступление бактериальных продуктов из крови в псориатическую кожу внутри фагоцитов.	< 20%. Факт ставит под сомнение гипотезы H10-S и H10, поскольку не подтверждает значимого поступления бактериальных продуктов из крови в псориатическую дерму. Критично для проведения НИР2.
3	Какая часть bacDNA видов, предполагаемых псорагенными и/или патогенными бактерий, есть в MPPS?	> 80% Факт поддерживает гипотезы H2 и H3.	< 20% Возможно слишком малая выборка (один биоптат)? Присутствие bacDNA конкретного вида в небольшой выборке (биоптат) может не коррелировать с присутствием LPS, PG и PG-Y. Это разные бактериальные продукты.
4	Спектр фракции N подобен спектру MPB? Коэффициент вариации для фракции N < 1/3 (т.е. распределение однородно?)	Да. Факт поддерживает гипотезу H10.	Нет. Возможно спектр фракции N необходимо сравнивать с усредненным спектром MPB за некоторый предшествующий период?

MPB – метагеном фагоцитов крови, MPPS – метагеном фагоцитов псориатической кожи.

Чтобы сделать какой-либо из вышеперечисленных выводов, необходимо, чтобы результат был статистически значим.

Цели	Задачи
Изучение подпроцессов, лежащих в основе системного псориазического процесса. Получение фактов в поддержку гипотез Н2 и Н3.	1 и 3
Получение фактов в поддержку гипотезы Н10 (Н10-S). Н10 лежит в основе Y-модели патогенеза ПБ и предполагает ключевую роль поступления специфических бактериальных продуктов из системного кровотока в псориазическую дерму внутри фагоцитов крови.	1,2 и 4
Обоснование целесообразности и подготовка к проведению НИР2	Все задачи

НИР2 = НИР «Метагеном крови, метагеномы и микрофлора зева и лаважных вод ЖКТ, а также проницаемость тонкой кишки при псориазической болезни (ПБ). Разработка и апробация Y-методики лечения ПБ, основанной на коррекции микрофлоры зева и/или ЖКТ»

- 1.1. Разработка и применение иммуномагнитного метода выделения фагоцитов из крови.
- 1.2. Разработка и применение метода полного метагеномного секвенирования (WMS) для обнаружения всего спектра nhDNA в фагоцитах крови с точностью до вида, т.е. определение МРВ – метагенома фагоцитов крови.
- 1.3. Определение концентрации каждой nhDNA, обнаруженной в метагеноме .
- 1.4. Оптимизация подготовки ПП к сдаче теста с целью повышения концентрации в крови nhDNA, поступающей из тонкого кишечника.
- 1.5. Разработка и применение оптимального метода предварительной (до секвенирования) элиминации hDNA из биоматериала.
- 1.6. Определение концентрации LPS в крови.
- 1.7. Определение концентраций PG и (1,3)-beta-D-глюкана в крови.

nhDNA – любая нехозяйская ДНК, hDNA – хозяйская ДНК,
ПП – псориатический пациент,
LPS – липополисахарид, PG - пептидогликан.

Задача 2 (практическая). Определение MPPS - метабенома фагоцитов псориатической кожи.

68

Task2

- 2.1. Разработка и применение иммуномагнитного метода выделения фагоцитов из псориатической кожи.
- 2.2. Разработка и применение метода полного метабеномного секвенирования (WMS) для обнаружения всего спектра nhDNA в фагоцитах с точностью до вида, т.е. определение MPPS – метабенома фагоцитов псориатической кожи (общая с 1.2).
- 2.3. Определение концентрации каждой nhDNA, обнаруженной в метабеноме (общая с 1.3).
- 2.4. Оптимизация подготовки ПП к сдаче теста с целью повышения концентрации в коже nhDNA, поступающей из крови (общая с 1.4).
- 2.5. Разработка и применение оптимального метода предварительной (до секвенирования) очистки биоматериала от hDNA (общая с 1.5).

hDNA – любая нехозяйская ДНК, hDNA – хозяйская ДНК,
ПП – псориатический пациент.

Задача 3 (аналитическая). Изучение МРВ – метагенома фагоцитов крови и РAMP-немии в комплексе. Проверка гипотез Н2 и Н3.

69

Task3

3.1. Определение Q0 - суммарной концентрации bacDNA Gram(-) видов (ответственных за LPS-нагрузку).

3.2. Определение генов, ответственных за TLR4 активность LPS. Виды, имеющие эти гены, ответственны за TLR4-активную LPS-нагрузку.

Определение Q1 - суммарной концентрации bacDNA таких видов (либо вычисление Q1 для всех Gram(-) видов с применением коэффициентов TLR4-активности).

Согласование Q0, Q1 и Q6 (концентрация LPS в крови).

3.3. Определение Q2 - суммарной концентрации bacDNA Gram+ видов (ответственных за PG-нагрузку).

Согласование Q2 и Q7 (концентрация PG в крови).

3.4. Определение наличия генов MurM, MurN, ответственных за образование в пептидогликане межпептидных мостиков IB-Y. Виды, имеющие эти гены, предполагаются псорагенными. Определение Q3 - суммарной концентрации bacDNA всех видов, имеющих межпептидные мостики IB-Y.

3.5. Поиск прямых корреляций между параметрами (Q0, Q1, Q2, Q3, Q6, Q7) и тяжестью проявлений псориатической болезни по PASI.

Проверка гипотез Н2 и Н3.

Задача 4 (аналитическая). Изучение MPB и MPPS в комплексе. Проверка гипотезы H10-S.

70

Task4

4.1. Комплексное изучение результатов WMS-тестов фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи (MPB и MPPS).

Определение фракций MPPS - резидентной, нерезидентной и смешанной.

Определение спектра, доли и концентрации nhDNA нерезидентного происхождения в MPPS. Определение спектров, долей и концентраций bacDNA патогенных и предполагаемых псорагенными бактерий резидентного и нерезидентного происхождения в MPPS.

Проверка гипотезы H10-S.

4.2. Поиск и изучение корреляций между тяжестью ПБ и параметрами, характеризующими спектры и концентрации bacDNA в MPB и MPPS.

4.3. Аналогичный подход при обнаружении существенной концентрации небактериальной nhDNA (архейной, грибковой, гельминтной, вирусной и т.д.) в MPPS.

MPB – метагеном фагоцитов крови, MPPS – метагеном фагоцитов псориатической кожи, bacDNA – бактериальная ДНК, nhDNA – любая нехозяйская ДНК, ПБ – псориатическая болезнь.

Порядок участия псориатических пациентов (ПП) в Программе НИР1

71

Participation_Order

Этап 1. Отбор и подготовка.

Информирование, анкетирование, сбор данных о кандидатах.
Отбор ПП, имеющих минимальное количество проблем со здоровьем
(помимо псориатической болезни).

Среди отобранных к участию необходимо присутствие ПП с широким спектром PASI
(от слабого до тяжелого). Решение об участии принимает Оргкомитет НИР.

ПП (участники НИР1) заключают договора (ПП - Ассоциация, ПП - другие ЛПУ).
Для каждого из участников формируется ЭМК.

Этап 2. Определение и изучение метагеномов фагоцитов крови и псориатической кожи. Определение и изучение РAMP-немии.

Консультация дерматолога. Контрольные тесты крови.
Определение метагенома фагоцитов крови (WMS-тест) и концентраций nhDNA.
Определение РAMP-немии.

Определение метагенома фагоцитов псориатического биоптата (WMS-тест).

Изучение метагеномов фагоцитов крови и псориатической кожи,
поиск взаимосвязей. Поиск корреляций между PASI и характеристиками метагенома
фагоцитов крови и РAMP-немией. Статистический анализ и оценка результатов.
Подведение итогов НИР1.

* Метагеном – совокупность всех nhDNA (нехозяйских DNA, т.е. здесь - не принадлежащих человеку), содержащихся в биоматериале. nhDNA – это бактериальная, архейная, грибковая, гельминтная, вирусная, фаговая и т.д. DNA.

Требования к ПП. Заболевания или зависимости, наличие которых не допускается.

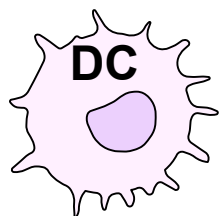
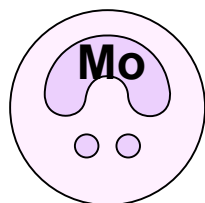
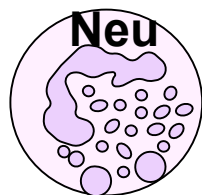
	Условие	Ограничение, срок
1.1	Возраст на момент вхождения в Программу.	18-65 лет
1.2	Индекс массы тела в диапазоне	от 18,5 до 30.
1.3	Наличие выраженного псориаза обычного (пятнистого) – common vulgaris (plague). Уровень поражения – от слабого до тяжелого	PASI от 5
1.4	Отсутствие псориатического артрита.	
1.5	Отсутствие других кожных заболеваний (кроме псориаза).	
1.6	Отсутствие алко- и наркозависимости	
1.7	Отсутствие серьезных хронических инфекционных заболеваний	
1.8	Отсутствие серьезных хронических заболеваний ЖКТ и/или гепатобилиарной системы	
1.9	Отсутствие острых функциональных или токсических нарушений в работе кишечника (расстройства, отравления и т.п.)	за последний месяц (?)
1.10	Отсутствие резких диетических изменений	за последние 3 месяца
1.11	Отсутствие активного лекарственного лечения ПБ	за последние 6 месяцев
1.12	Отсутствие приема цитостатиков и глюкокортикостероидов (1.11 ?)	за последние 6 месяцев
1.13	Отсутствие приема антибиотиков или фаговых препаратов	за последний месяц (?)
1.14	Отсутствие приема пробиотиков или сорбентов	



План НИР на 2017-8 гг.

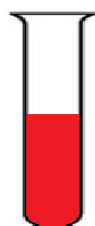
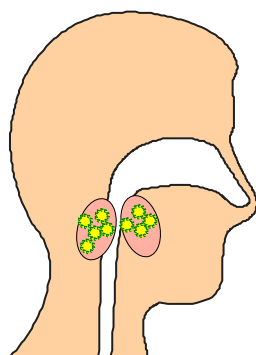
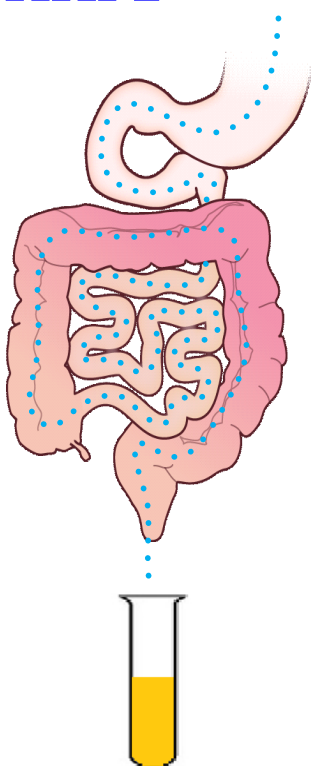
НИР1. Метагеномы фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи.	~ 1,5 млн. руб.	3 мес.	
НИР2. Метагеном крови, метагеномы и микрофлора зева и лаважных вод ЖКТ, а также проницаемость тонкой кишки при псориатической болезни (ПБ). Разработка и апробация Y-методики лечения ПБ, основанной на коррекции микрофлоры зева и/или ЖКТ.	~ 8,5 млн. руб.	10 мес.	+ расходы и время на офис и штат Ассоциации

НИР1



Комплексное
изучение и поиск
влияния

НИР2

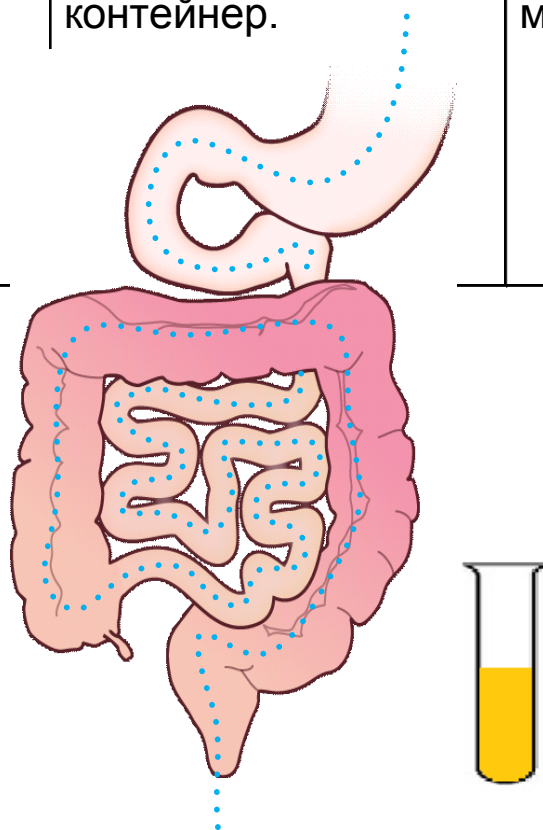


	НИР1	НИР2
Число псориатических пациентов	15	34
Биоматериалы для WMS-тестов		
Тип	Количество	
Фагоциты псориатической кожи	15	
Фагоциты крови	15	
Цельная кровь		54
Мазки со слизистой ВДП*		34
Лаважные (промывные) воды ЖКТ*		54
Всего биоматериалов	30	142

* - в дополнение к WMS-тестам
будет выполняться культуральный
посев

Лаважный СИБР-тест. Интегральный смыв пристеночной микрофлоры. Лаважные воды как биоматериал для изучения микрофлоры ЖКТ.

Название и метод исследования	Биоматериал. Вливание/Сбор	Тест микрофлоры	Примечания. Достоинства (+) и недостатки (-).
Лаважный СИБР-тест. Выполняется кишечный лаваж (СЭР). Может быть использован физраствор (Пракшалана).	Лаважные воды ЖКТ. Вливание – орально. Сбор – во время дефекации в стерильный контейнер.	Отделение надосадочной части. Культуральный и метагеномный.	Были тесты. (+) Биоматериал содержит пристеночную микрофлору всей тонкой кишки (интегральный смыв). (-) биоматериал содержит микрофлору всего пищеварительного тракта. (-) Нет данных о нормофлоре. (-) Нет данных о СЭР, как транспортной среде.



Что такое
кишечный
лаваж?
Ссылка на
Интернет-ресурс.

**Лаважный СИБР-тест будет
основным способом оценки
пристеночной микрофлоры ЖКТ
в рамках НИР2.**

Антипсориатическая Ассоциация "Естественный путь"

Российская детская клиническая больница
(дерматовенерологическое отделение)

Московский научно-практический центр
дерматовенерологии (филиал Черемушкинский).

ФГБУН НИИ Физико-химической медицины

ABG = Atlas Biomed Group



Задачи, которые необходимо решить до начала выполнения НИР1

- 1) Провести экспертную оценку и возможную доработку НИР1;
- 2) Выбрать исполнителей для пробоподготовки биоматериалов для WMS-тестов;
- 3) Выбрать исполнителей для выполнения WMS-тестов и комплексного изучения их результатов;
- 4) Определить общую стоимость и сроки выполнения НИР1 и заключить договора с исполнителями;