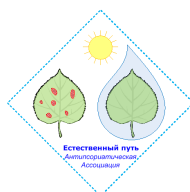


Метагеномы крови и псориатической кожи

Проект исследования

Издание r2.2a

М.Ю.Песляк, Н.Г.Короткий



**Антипсориазная Ассоциация
«Естественный путь»
Москва, 2019**

УДК 616.5:616-092;
ББК 55.83

 Песляк Михаил Юрьевич¹,  Короткий Николай Гаврилович².
Метагеномы крови и псориатической кожи. Проект исследования.
Издание r2.2a, Москва,
Антипсориатическая Ассоциация «Естественный путь», 2019. – 73 с.

ISBN 978-5-905504-05-1 Copyright © 2019, Песляк М.Ю., Короткий Н.Г.

¹ Антипсориатическая Ассоциация «Естественный путь»

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова

Дата публикации в Интернет (Electronic Publication Date) изданий:

r1.6 (DOI: [10.5281/zenodo.1415419](https://doi.org/10.5281/zenodo.1415419)) 2017, Sep 10;

r2.1 (DOI: [10.5281/zenodo.2567779](https://doi.org/10.5281/zenodo.2567779)) 2019, Feb 18;

r2.2 (DOI: [10.5281/zenodo.2677815](https://doi.org/10.5281/zenodo.2677815)) 2019, May 9;

Самое последнее издание (DOI: [10.5281/zenodo.1415418](https://doi.org/10.5281/zenodo.1415418));

Web: www.psorias.info, E-mail: info@psorias.info

Разрешается использовать неизмененные материалы этой книги для некоммерческих целей с указанием авторов, названия, номера издания, DOI, ISBN и Web-сайта. Распространяется бесплатно.

Лицензия Creative Commons [CC-BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Осуществляется переиздание (на русском и английском) при обнаружении ошибок и/или доработке проекта. Устранение нескольких ошибок и неточностей, обнаруженных при подготовке версии e2.2 на английском языке (DOI: [10.5281/zenodo.2667680](https://doi.org/10.5281/zenodo.2667680)), послужило причиной публикации данной версии.

Подробности по адресу www.psorias.info.

Основные Дополнения

A. Метагеномы крови и псориатической кожи. Проект исследования. Презентация и иллюстрации. (r2.2, pdf-формат, DOI: [10.5281/zenodo.2677818](https://doi.org/10.5281/zenodo.2677818))

B. Метагеномы крови и псориатической кожи. Проект исследования. Дополнения S1-S8. (r2.2, pdf-формат, DOI: [10.5281/zenodo.2677822](https://doi.org/10.5281/zenodo.2677822))

Аннотация

Выполнено обоснование и подробное описание первого этапа проекта, посвященного изучению, диагностике и лечению псориаза. Целью первого этапа является проверка базовых гипотез новой системной YN-модели патогенеза псориаза. Проверка представляет собой комплексное изучение метагенома цельной крови и метагенома (фагоцитов) псориазической кожи. Метагеном это вся нехозяйская DNA (здесь – не принадлежащая человеку), содержащаяся в биоматериале. Предложены и обоснованы алгоритмы, необходимые для комплексного изучения метагеномов.

Проведена обзорно-аналитическая оценка результатов основных работ по изучению метагеномов крови и кожи. Выполнен аналитический обзор всех (опубликованных до начала 2019 года) работ по определению концентрации бактериальной DNA в цельной крови здоровых людей.

Выполнено детальное сравнение характеристик 16S-теста и WMS-теста.

Сформулированы цели и задачи (включая порядок их решения) первого этапа. Поставлены основные вопросы, на которые по итогам первого этапа должны быть получены ответы. Предложен порядок подготовки и выполнения WMS-теста цельной крови.

Проведено детальное сравнение YN-модели патогенеза с ранее опубликованной Y-моделью. Выполнен аналитический обзор работ, посвященных изучению привлечения нейтрофилов крови в псориазическую кожу и последующего их возможного нетоза. Нетоз в псориазической коже нейтрофилов, являющихся носителями эндоцитированного в крови Y-антигена, назван необходимым звеном порочного цикла псориазического воспаления в рамках YN-модели. Предложена классификация псориазической болезни как нетопатии.

Дано определение псориазических бактерий, основанное на наличии генов, ответственных за формирование межпептидных мостиков. Определены наименьшие пептиды (фрагменты пептидогликана) – потенциальные Y-антигены.

Иллюстрации выполнены в виде презентации и находятся в дополнительном файле (перечень всех дополнительных файлов в разделе 5.12).

Ключевые слова

Бактериальная DNA, бактериальные продукты, биоинформатика, вирус папилломы человека, врожденный и приобретенный ответ, дендритные клетки, кератиноциты, кишечная проницаемость, липополисахарид, метагеном, микробиом, модель патогенеза, моноциты, мурамилдипептид, нейтрофилы, нетоз, нехозяйская DNA, пептидогликан, псориазические бактерии, псориаз, псориазическая болезнь, секвенирование, системный псориазический процесс, Т-лимфоциты, фагоциты, хемокины, кРАМР-носительство, РАМР-немия.

Содержание

1. Введение	6
1.1. Псориатическая болезнь	6
1.2. Модели патогенеза и неизвестный антиген	7
1.3. Предпосылки проекта	8
2. Метагеномное секвенирование	10
2.1. Метагеном крови	10
2.2. Концентрация bacDNA в цельной крови ЗП	17
2.3. Метагеном кожи	18
2.4. Фагоциты кожи в норме и при псориазе	24
2.5. Комплексное изучение метагенома цельной крови и метагенома (фагоцитов) псориатической кожи	24
3. Цели, задачи и основные вопросы	26
3.1. Цели	26
3.2. Задачи	26
3.2.1. Порядок решения задач	31
3.3. Основные вопросы	32
4. Научная новизна	34
5. Приложения.....	35
5.1. Сокращения и термины.....	35
5.2. YN-модель патогенеза. Сравнение с Y-моделью.....	39
5.3. Нейтрофилы в YN-модели.....	41
5.3.1. Нейтрофилы крови	41
5.3.2. Привлечение нейтрофилов в кожу из кровотока	42
5.3.3. Нетоз нейтрофилов в коже (LP3a)	45
5.3.4. Эндоцитоз продуктов нетоза в коже (LP6a)	47
5.3.5. Роли нейтрофилов	47
5.4. Виды бактерий, предполагаемые псориагенными	49
5.5. Пептиды – потенциальные Y-антигены	50
5.6. Определение концентраций PAMP в крови	51
5.7. Контроль контаминации. Образцы NTC	52
5.8. Элиминация hDNA из DNA-образцов.....	53
5.9. Определение пластома	57
5.10. Порядок подготовки пациентов и выполнения WMS-теста цельной крови.....	57
5.11. Изоляция DNA из (фагоцитов) псориатической кожи.....	59
5.12. Дополнения	60
6. Перечень иллюстраций (слайдов).....	61
7. Библиография	64

Таблицы

Таблица 1. Версии происхождения Y-антигена.	7
Таблица 2. Гипотезы, проверяемые в рамках проекта.....	10
Таблица 3. Исследования метагенома крови. Сводка.	15
Таблица 4. Исследования метагенома крови. Факт и план.....	16
Таблица 5. Концентрация bacDNA в крови ЗП. Сводка.....	17
Таблица 6. Исследования метагенома кожи. Сводка.	22
Таблица 7. Исследования метагенома кожи. Факт и план.	23
Таблица 8. Задачи.....	26
Таблица 9. Вопросы и ответы.	32
Таблица 10. Исследования, которые будут выполнены впервые.	34
Таблица 11. Y-модель и YN-модель. Процессы и подпроцессы.	40
Таблица 12. Хемокиновые рецепторы, хемокины и AMP, безусловно или вероятно причастные к траффику нейтрофилов крови при псориазе.	43
Таблица 13. Реальные и предполагаемые факторы нетоза при псориазе.....	46
Таблица 14. Роли нейтрофилов при псориазической болезни. Известные и предполагаемые.....	48
Таблица 15. Модели патогенеза псориаза и нейтрофилы.....	49
Таблица 16. Оценка веса пептидов.	51
Таблица 17. Корреляция между представленностью до и после элиминации hDNA.....	55

1. Введение

Предварительная версия проекта (v1.6) была подготовлена и опубликована ранее ([Песляк 2017a](#), [Песляк 2017b](#)). Затем мы представили проект на VII Межрегиональном форуме дерматовенерологов и косметологов ([Песляк & Короткий 2017](#)). Прошедшее с тех пор время позволило провести более детальную разработку проекта и учесть результаты важных работ, опубликованных недавно ([Tett 2017](#), [Codoner 2018](#), [Horiba 2018](#), [Li 2018](#), [Loesche 2018](#), [Marotz 2018](#), [Puri 2018](#), [Qian 2018](#)). И на основе Y-модели сформулировать новую YN-модель патогенеза псориаза, включающую нетоз в псориатической коже как звено порочного цикла (раздел 5.2).

При детализации проекта выяснилось, что включать в протокол изоляции фагоцитов из цельной крови нецелесообразно (раздел 2.1). Кроме того, решение о порядке изоляции DNA из биоптатов псориатической кожи (непосредственно из них или из предварительно изолированных фагоцитов) будет приниматься во время пилотного этапа (раздел 5.11).

Именно поэтому из названия проекта убрано слово «фагоциты» (которое было в версии v1.6).

1.1. Псориатическая болезнь

Самообновление эпидермиса происходит постоянно - в базальном слое рождаются новые клетки, созревают, и, меняясь, мигрируют наружу, образуют внешний роговой слой, а затем отмирают и отслаиваются. В норме для участков кожи средней толщины срок жизни клеток (срок полного обновления) эпидермиса составляет 20-25 дней. При псориазе самообновление ускоряется, жизнь клеток длится 4-10 дней. Мигрирующие наружу клетки не успевают сформироваться, и не вполне функциональны. Псориатические бляшки имеют красный оттенок, легкоранимы, из-за интенсивного отмирания клеток покрыты белыми чешуйками, значительно утолщены.

Псориаз (psoriasis) не заразен, имеет различные типы: вульгарный (пятнистый, бляшечный) (L40.0- vulgaris or plaque), интритригинозный (L40.83-4 - flexural or inverse), эритродермический (L40.85 - erythrodermic), пустулезный (L40.1-3, L40.82 - pustular), каплевидный (L40.4 - guttate). Коды болезней даны по классификатору ICD-10. Наиболее распространен пятнистый псориаз (более 80% от общего числа случаев) (слайд 2. *Psoriatic disease*), при этом до 15% псориатических пациентов имеют псориатический артрит (L40.5 - psoriatic arthritis).

Псориазом болеют около 2% населения земного шара (~150 млн. чел.), ежегодно в мире им впервые заболевают ~5 млн. человек. Заболевание возникает сразу после рождения, в подростковом или зрелом возрасте и даже в глубокой старости, а затем сопровождает больного всю жизнь, самопроизвольно или благодаря лечению ослабляясь, а затем вновь рецидивируя. Тяжелый псориаз может привести к инвалидности, от спровоцированных им болезней в мире ежегодно погибают до 10 тысяч человек. Течение псориаза одинаково у мужчин и женщин, реже он возникает у афроамериканцев, индейцев, китайцев и японцев и вовсе не поражает эскимосов.

На слайдах 3. *Patient Stat-C* и 4. *Patient Stat-R* представлена статистика заболеваемости псориазом по странам согласно ([Michalek 2017](#), часть таблицы 3). Она дополнена статистикой для США за 2004 г. для псориатических пациентов (ПП) старше 18 лет ([Vanderpuye 2015](#)). (список сокращений – раздел 5.1). Данные по России взяты из ([Знаменская 2012](#), [Мишина 2015](#)). Экономические данные, связанные с расходами на лечение псориаза и убытками по нетрудоспособности регулярно подсчитываются в развитых странах. В детальном исследовании ([Vanderpuye 2015](#)) выполненном для США указано, что на 5,3 миллионов ПП старше 18 лет, которые проживали на начало 2013 г. (около 2,2% населения) ежегодное экономическое бремя составляло \$35,2 млрд., из них \$12,2 млрд. составляли расходы на здравоохранение. Т.е. в среднем на одного ПП ежегодные расходы составляли \$6592, из них \$2307 на здравоохранение. В других работах, посвященных этой теме, суммы ежегодных расходов на лечение псориаза в США аналогичные.

Псориаз зарегистрирован в базе данных человеческих генов и генетических заболеваний под номером OMIM*177900. Предрасположенность к псориазу передается по наследству - однояйцевые близнецы проявляют 70% конкордантность, при наличии псориаза у одного из родителей вероятность заболевания ребенка составляет 15-25%, у обоих родителей – 40-60%. Доказана взаимосвязь аллели HLA-Cw*0602 (хромосома 6p21) с псориазом первого типа, характеризующегося ранним началом. Носителями этой аллели являются более 60% ПП (среди здоровых персон (ЗП) - не более 15%). Более слабые взаимосвязи установлены для локусов других хромосом. При этом только генетических отклонений для начала и поддержания псориаза недостаточно - необходимо воздействие со стороны внешней среды. Инфекции, травмы кожи, стрессы, реакция на лекарственные препараты, климатические изменения и другие причины могут спровоцировать начало болезни или рецидив ([Песляк 2012a](#)).

Псориаз нередко сочетается с системными заболеваниями, включая метаболический синдром, сахарный диабет II типа, ишемическую болезнь сердца, артериальную гипертензию, патологию гепатобилиарной системы. В принятых в РФ «Федеральных клинических рекомендациях по ведению больных псориазом» ([Федеральные 2015](#)) даны подробные рекомендации по применению топических препаратов, фототерапии, системных ретиноидов и иммуносупрессивных средств. Эти рекомендации направлены на снижение внешних проявлений псориаза, но не на устранение причин его возникновения и поддержки.

1.2. Модели патогенеза и неизвестный антиген

Есть несколько моделей патогенеза псориазической болезни (ПБ), но ни одна из них не является общепринятой. Системные BF-модель (слайд 12. BF-model) и Y-модель описаны в ([Baker 2006b](#)) и ([Песляк 2012а](#), [Песляк 2012b](#)) соответственно. Локальные N-модель ([Perera 2012](#)); GK-модель ([Guttman-Yassky 2011](#)) и TC-модель ([Tonel 2009](#)); GL-модель ([Gilliet 2008](#)) были проанализированы в сравнении в монографии ([Песляк 2012b](#)).

Таблица 1. Версии происхождения Y-антигена.

Y-антиген это	Статус версии
Версия А. Аутоантигены, происшедшие от хозяйских резидентных клеток кожи	<p>Все локальные модели патогенеза предполагают, что основные причины возникновения и поддержки псориаза находятся только в коже (и, в том числе, неизвестный антиген). Такие потенциальные аутоантигены изучались неоднократно (кератин 17, LL37, ADAMTSL5, PLA2G4D и другие) (Arakawa 2015, Cheung 2016, Fuentes-Duculan 2017, Valdimarsson 2009).</p> <p>Специфические Т-лимфоциты к ним обнаруживаются в псориазической коже, но не у всех псориазических пациентов. Поэтому ни один из них не может быть Y-антигеном, специфические Т-лимфоциты к которому должны обнаруживаться у _каждого_ псориазического пациента.</p> <p>Версия А не доказана.</p>
Версия В. Фрагменты химических веществ или бактерий, грибов, вирусов или протеинов, секретируемых ими поступающие на или в кожу из внешней среды.	<p>Еще в 20 веке эта версия существовала. Многие годы эта версия рассматривалась как основная. Но многочисленные исследования показали несостоятельность версии В (Baker 2008).</p>
Версия С. Фрагменты химических веществ или бактерий, грибов, вирусов или протеинов, секретируемых ими. Поступают в псориазическую кожу из других органов тела (например, внутри фагоцитов крови).	<p>Основная версия авторов системных моделей патогенеза: BF-модель. Barbara Baker и Lionel Fry (слайд 12. BF-model, Baker 2006a, Baker 2006b), Y-модель. Песляк М.Ю., Короткий Н.Г. (Короткий 2005, Песляк 2012а, Песляк 2012b), YN-модель (описана впервые в этом проекте). (раздел 5.2, слайды 22. SPPN-PAMP-nemia, 23. SPPN, 25. Local_processes_YN, 26. YN-model)</p> <p>Известные факты не противоречат версии С. В рамках проекта будут проверены несколько основных гипотез, общих для Y-модели и YN-модели.</p>
Версия D. Аутоантигены, происшедшие от хозяйских нерезидентных клеток. Поступают в кожу из других органов тела (например, фрагменты фагоцитов крови).	<p>Это часть из потенциальных аутоантигенов (LL37, ADAMTSL5, PLA2G4D), перечисленных в описании версии А.</p> <p>Они происходят не только от резидентных фагоцитов кожи (нейтрофилов, дендритных и тучных клеток), но также и от нерезидентных фагоцитов, привлеченных из кровотока во время псориазического воспаления.</p> <p>Версия D не доказана (по тем же причинам, что и версия А).</p>

За последние годы были опубликованы локальные модели других авторов (построенные в целом аналогично). Это уточненная GKH-модель ([Hawkes 2017](#)); FM-модель (слайд 68. FM-model, [Delgado-Rizo 2017](#)); SE-модель (слайд 69. SE-model, [Schon 2018](#)) и BMM-модель (слайд 71. BMM-model, [Benhadou 2018](#)).

Современное представление о функционировании кожной иммунной системы прекрасно выполнено в рамках видео «Immunology of skin», сделанного под руководством Miriam Merad и James Kruger (дополнение D, раздел 5.12). Во второй части видео подробно рассматривается ошибочная работа кожной иммунной системы во время псориатического воспаления и отмечена ключевая роль «неизвестного антигена» (всюду далее Y-антиген) в псориатическом воспалении (слайд 13. *Antigen-1*). За последующие годы были опубликованы множество новых исследований, посвященных псориатической болезни. Но ни одно из них пока не дало точных ответов на вопросы:

- Каково происхождение Y-антигена?
- Какова химическая структура Y-антигена?

Представлены четыре версии происхождения Y-антигена (Таблица 1, слайд 14. *Antigen-2*).

Вопрос о предполагаемой химической структуре Y-антигена рассмотрен далее (в т.ч. в разделе 5.5).

1.3. Предпосылки проекта

На слайде 5. *Basic research* перечислены некоторые из исследований, которые легли в основу данного проекта. Это работы, в которых доказано, что почти у всех псориатических пациентов наблюдается тонкокишечный СИБР. Здесь и далее термин «тонкокишечный СИБР» используется для обозначения синдрома избыточного бактериального роста пристеночного микробиома на любом участке (участках) или на всем протяжении слизистой тонкой кишки.

Впервые исследования просветного микробиома проксимального отдела тонкой кишки были проведены у 121 пациента с псориазом (PASI \geq 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 ([Гумаюнова 2009a](#), [Гумаюнова 2009b](#), [Гумаюнова 2009c](#)) и представлены на всемирной псориатической конференции в Стокгольме ([Peslyak 2012d](#)). 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 псориатиков обнаружены *Str.pyogenes* (9%) и *Str.viridans* (30%) (в контрольной группе не обнаружены) (слайды 8. *SIBO-1* и 9. *SIBO-2*).

Согласно результатам культуральных проксимальных СИБР-тестов ПП один или несколько из предполагаемых пораженными видов обнаруживаются в тонкокишечном микробиоме, взятом в зоне связки Трейца. Если исследовались два (или более) биоматериала, то указано максимальное значение. Большая часть обследований выполнена в НМХЦ им. Н.И.Пирогова в 2013-5 гг. (слайд 10. *SIBO_Moscow*).

Фрагменты бактериальных продуктов тонкокишечных бактерий содержат в себе PAMP: липополисахарид (LPS), пептидогликан (PG) и, в частности, специфический пептидогликан (PG-Y). При повышенной макромолекулярной тонкокишечной проницаемости ([Короткий 2005](#), [Харьков 2005](#), [Харьков 2006](#), [Харьков 2008](#), [Ely 2018](#), слайды 6. *Permeability-1* и 7. *Permeability-2*) у псориатических пациентов эти бактериальные продукты попадают в системный кровоток, формируют хронически повышенный уровень PAMP в крови и хронически повышенную PAMP-нагрузку на фагоциты крови. В частности формирует повышенный уровень LPS ([Гараева 2007](#)).

Фагоциты - это нейтрофилы, моноциты и дендритные клетки ([Naqi 2002](#)).

Специфический пептидогликан PG-Y содержит Y-антиген, т.е. пептид, который включает в себя межпептидные мостики (L-Ala)-(L-Ala) и/или (L-Ser)-(L-Ala). Такие мостики присутствуют почти у всех видов *Streptococcus*, у *Enterococcus faecalis*, а также у многих видов из родов *Leuconostoc* и *Weissella* (слайды 16. *PG_PsB-1* и 18. *PG_PsB-3*). Такие виды предполагаются пораженными ([Baker 2006a](#), [Baker 2006b](#), [Песляк 2012a](#), [Песляк 2012b](#), [Ely 2018](#)), всюду далее они обозначены PsB (раздел 5.4).

На слайде 5. *Basic research* также упомянуты работы по изучению влияния PAMP-нагрузки на фагоциты ([Adib-Conquy 2009](#), [Biswas 2009](#)). Из этих (и других аналогичных исследований) известно, что PAMP-нагрузка (а особенно синергичная PG- и LPS-нагрузка) действует на фагоциты крови,

активируя их. При этом часть активированных моноцитов и дендритных клеток толеризируется. В толеризованных моноцитах Мо-Т и дендритных клетках DC-Т понижен уровень протеинов, ответственных за деградацию эндоцитированных бактериальных продуктов. Вследствие этого толеризованные Мо-Т и DC-Т могут стать носителями недеградированных бактериальных продуктов, в частности Y-антигенов.

Совокупность перечисленных подпроцессов, приводящая к появлению в системном кровотоке толеризованных Мо-Т и DC-Т - носителей специфического антигенного материала, в рамках Y-модели патогенеза была названа системным псориазическим процессом SPP. Толеризованные Мо-Т и DC-Т приобретают хемостатус аналогичный неактивированному и поэтому могут быть привлечены к местам воспалений в любые ткани и, в частности, в дерму. Толеризованные Мо-Т и DC-Т, будучи привлеченными в воспаленную дерму, под воздействием цитокинов перепрограммируются и превращаются в зрелые дендритные клетки. Некоторые из них (моноциты Мо-R и дендритные клетки DC-R) содержат Y-антигены. Зрелые дендритные клетки (образованные из Мо-R и DC-R) презентуют Y-антигены специфическим Т-лимфоцитам (слайд 24. *Local_processes_Y*). Системная Y-модель патогенеза впервые была сформулирована в монографии ([Песляк 2012а](#), [Песляк 2012b](#)).

Уже после публикации Y-модели появились результаты новых исследований, в первую очередь связанные с нетозом нейтрофилов, в том числе при псориазической болезни. Стало известно, что существенный % нейтрофилов крови у псориазических пациентов находится в активированном (преднетозном) состоянии ([Hu 2016](#), слайды 62. *Net-blood-1*, 63. *Net-blood-2*, 64. *Net-blood-3*).

В рамках новой YN-модели такое состояние нейтрофилов крови также определяется хронически повышенной PAMP-нагрузкой (раздел 5.2).

Многие из нейтрофилов крови после поступления в воспаленную псориазическую кожу претерпевают нетоз ([Lin 2011](#), [Hu 2016](#), слайды 61. *Netosis*, 65. *Net-skin-1*, 66. *Net-skin-2*). В результате в межклеточном пространстве могут оказаться недеградированные бактериальные продукты, которые ранее были эндоцитированы нейтрофилами в крови. В том числе Y-антигены (слайд 25. *Local_processes_YN*). Потерянные во время нетоза бактериальные продукты эндоцитируются всеми фагоцитами кожи. Моноциты Мо и дендритные клетки DC, которые эндоцитируют недеградированные фрагменты PG-Y, становятся носителями Y-антигена (далее обозначены Мо-Y и DC-Y). Под влиянием провоспалительных цитокинов некоторые из моноцитов Мо-Y трансформируются в дендритные клетки MoDC-Y.

В провоспалительном окружении MoDC-Y и DC-Y продолжают трансформацию и превращаются в зрелые дендритные клетки maDC-Y. Эти maDC-Y презентуют Y-антиген эффекторным TL-Y (Y-специфическим Т-лимфоцитам) (подпроцесс LP8.1, слайды 25. *Local_processes_YN* и 26. *YN-model*).

Эта презентация инициирует и поддерживает ложный приобретенный ответ на мнимую кожную PsV-инфекцию, одним из последствий которого является гиперпролиферация кератиноцитов (подпроцесс LP8.2).

Подпроцесс LP8 полностью совпадает в рамках YN-модели и Y-модели.

Передача в псориазической коже Y-антигена от нейтрофилов к моноцитам и дендритным клеткам благодаря нетозу является основным отличием YN-модели от Y-модели (слайд 25. *Local_processes_YN*).

Подробное описание всех отличий YN-модели от Y-модели содержится в разделе 5.2.

В рамках проекта предполагается получить новые факты в поддержку нескольких основных гипотез, лежащих в основе системных Y-модели и YN-модели (Таблица 2, слайд 27. *NCS1_Hypo*). Полный перечень гипотез для Y-модели был сформулирован ранее (слайды 42 и 43, [Песляк 2012с](#)). Сравнение всех гипотез для Y-модели и YN-модели выполнено в Приложении S6, раздел 5.12).

Основной целью проекта является проверка и, как мы надеемся, подтверждение этих гипотез (прямое или косвенное).

Для этого будет применен новый подход, разработанный и реализованный в Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases, Toulouse, France (2011-2016) (слайды 5. *Basic_research* и 34. *Blood-bacDNA (France)*). Эта группа исследователей впервые определила метагеном цельной крови (16S-тест) у большой группы здоровых персон ([Paisse 2016](#)). Такие исследования (в т.ч. с применением WMS-тестов) все чаще проводятся при различных заболеваниях и позволяют выявить ранее неизвестные факты о роли микробиома в их патогенезе (разделы 2.1 и 2.2).

В данном проекте впервые будут определены и изучены метагеномы цельной крови псориазических пациентов и контрольной группы. Будет определена концентрация pHDNA (нехозяйской DNA) для отдельных видов и суммарная по подгруппам, определена макромолекулярная тонкокишечная проницаемость с помощью нового bacDNA-теста, выявлены их корреляции с тяжестью ПБ (проверка гипотез H1-1, H2 и HN3). Также будут определены метагеномы биоптатов псориазической кожи (или только ее фагоцитов – решение будет принято по итогам

пилотного этапа) и выполнено их комплексное изучение вместе с метагенами цельной крови (разделы 2.3 и 2.5). Это должно доказать поступление недеградированных бактериальных продуктов в псориатическую кожу внутри фагоцитов крови (проверка гипотез HN10 и HN10-S).

Таблица 2. Гипотезы, проверяемые в рамках проекта.

	Гипотеза	Проверка
HN1-1	Одной из двух главных причин системного псориатического процесса SPPN (также как и SPP) является повышенная макромолекулярная (в т.ч. для бактериальных продуктов) тонкокишечная проницаемость. (слайды 6. <i>Permeability-1</i> и 7. <i>Permeability-2</i>)	Прямая
HN2	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. (слайды 16. <i>PG_PsB-1</i> и 18. <i>PG_PsB-3</i>)	Косвенная
HN3	PAMP-немия и (PG-Y)-немия это главные подпроцессы. кPAMP это LPS, PG и bacDNA. (слайды 22. <i>SPPN-PAMP-nemia</i> и 23. <i>SPPN</i>)	Прямая
HN10	Привлечение (PG-Y)+ фагоцитов в кожу из кровотока – необходимое звено порочного цикла. Существование и тяжесть любого псориатического пятна определяется интенсивностью поступления Y-антигена, несомого этими фагоцитами крови. Подробнее в разделе 5.2.	Косвенная. Фактически будет проверяться HN10-S
HN10-S	Недеградированный нехозяйский биоматериал перемещается в псориатическую кожу внутри фагоцитов крови (слайд 29. <i>HN10-S</i>)	Прямая

2. Метагеномное секвенирование

2.1. Метагеном крови

Метагеном крови неоднократно определялся для различных ее фракций как для пациентов при различных заболеваниях, так и для здоровых персон. Как правило, в плазме или сыворотке (большинство работ), но также в лейкоцитарной пленке (массе), тромбоцитах и эритроцитах, цельной крови или в нейтрофилах ([Païssé 2016](#), [Li 2018](#), [Puri 2018](#), [Qian 2018](#)) (Таблица 3).

Концентрация bacDNA в плазме более чем на 3 порядка ниже, чем в лейкоцитарной пленке: $1,5 \cdot 10^4$ (копий 16S)/мл против $4,2 \cdot 10^7$ (копий 16S)/мл ([Païssé 2016](#)). Именно по этой причине во многих случаях bacDNA в плазме не обнаруживалась совсем, а если обнаруживалась, то только у части пациентов. Дело в том, что все бактериальные продукты (а также любые нехозяйские, в т.ч. и phDNA), которые попадают в кровь, постоянно утилизируются.

Их утилизацию условно можно разделить на два основных способа – фагоцит-зависимый (связывание, эндоцитоз) и фагоцит-независимый. Фагоцит-независимая утилизация обеспечиваются деградирующими энзимами, протеинами и антителами, которые связывают биопродукты в комплексы, которые затем выводятся из кровотока через органы элиминации (в первую очередь почки и печень). Утилизацию нехозяйских биопродуктов можно считать полностью фагоцит-независимой, если их деградация происходит без участия фагоцитов. Утилизация нехозяйских биопродуктов является фагоцит-зависимой, если они эндоцитируются (связываются) фагоцитами крови и на момент эндоцитоза (связывания) все еще могут быть распознаны как нехозяйские. Внутри фагоцитов процесс утилизации нехозяйских биопродуктов конечно продолжается, однако какое-то время они все еще могут быть распознаны. Именно это и происходит при разрушении фагоцитов крови и последующей идентификации всей DNA – какая-то часть ее оказывается phDNA. Концентрация phDNA в фагоцитах крови оказывается существенно выше, чем в плазме. Т.е. в каждый момент времени большая часть phDNA, находящейся в крови, находится внутри фагоцитов крови ([Païssé 2016](#)).

Исследования наличия bacDNA в крови ПП и ЗП начались еще в прошлом веке. Перейдем к подробному обзору результатов.

В работе ([Wang 1999](#)) исследовалась плазма крови пациентов с псориатическим артритом, у 9 из 19 ПП было показано присутствие bacDNA *Streptococcus pyogenes*, *Str.agalactiae* и *Str.pneumoniae*. Их присутствие было определено методом PCR по специфическим праймерам для этих видов. Метагеном не определялся.

В работе ([Okubo 2002](#)) по нескольким праймерам для 16S rRNA определялось присутствие bacDNA внутри моноцитов крови у 15 ПП и 12 ЗП (bacDNA была обнаружена у всех ПП и ЗП). Было обнаружено, что у ПП оно существенно выше, чем у ЗП. Концентрация bacDNA составила ~3,1 (копий 16S)/моноцит для ЗП и ~5,8 (копий 16S)/моноцит для ПП в среднем (fig.2, [Okubo 2002](#), слайд 31. *Okubo*).

Аналогичное сравнение было выполнено по нескольким праймерам для 18S rRNA (превышение для ПП по сравнению с ЗП в среднем в 1,5 раза). Авторы предположили, что основным источником bacDNA является кишечный микробиом. Метагеном не определялся.

В работе ([Munz 2010](#)) с помощью 16S-теста определялось присутствие bacDNA в плазме периферической крови 20 ПП и 12 ЗП, она была обнаружена у всех ПП и ни у одного ЗП. У 17 ПП обнаруженная bacDNA была определена как принадлежащая бактериям из родов *Streptococcus* или *Staphylococcus* (слайд 32. *Blood_Psor*). Их присутствие было определено методом PCR по специфическим праймерам для этих родов. Метагеном не определялся.

В краткой заметке ([Ramírez-Boscá 2015](#)) сообщено, что с помощью 16S-теста bacDNA в сыворотке крови обнаружена только у 16 из 54 ПП и не обнаружена ни у одного из 27 ЗП. На этом же материале недавно была опубликована статья ([Codoner 2018](#)), в которой также опубликованы результаты 16S-теста фекального метагенома 52 ПП.

Тот факт, что bacDNA не обнаруживалась в плазме крови у ЗП, а часто и у большей части ПП, (а исследования цельной крови не проводились) делал затруднительными какие-либо утверждения о роли ее присутствия в крови в патогенезе ПБ. Но в последние годы произошло усовершенствование техники исследований: методы элиминации hDNA, повышение точности и достоверности результатов при обнаружении малых количеств и самое главное феноменальное снижение стоимости полного метагеномного секвенирования (WMS-тестов). Подробное сравнение 16S-тестов и WMS-тестов дано в Приложении S1 (раздел 5.12).

Перечислим наиболее существенные результаты этих работ.

В работе ([James 2011](#)) изучалась концентрация bacDNA и hDNA в крови и слюне доноров, определялся их процент во всей DNA, изолированной из цельной крови и слюны соответственно. Метагеном не определялся.

В работах ([Amar 2013](#), [Amar 2011](#)) подводились итоги длительного исследования, в котором участвовало более 5 тыс. человек. Главной целью этого исследования был поиск причин и условий, способствующих развитию диабета. Инициатором данной работы была [D.E.S.I.R. Study Group](#). Среди большого числа обследований, которые проводились в течение 9 лет (с интервалом в 3 года) был количественный 16S-тест лейкоцитов крови. Была отлажена методика получения bacDNA с максимальной концентрацией в образце. В работе ([Amar 2011](#)) выполнено сравнение результатов для пациентов с диабетом и без него, в работе ([Amar 2013](#)) для пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и без них. В работе ([Amar 2011](#)) для небольшой части пациентов с диабетом (n=14) и контрольной группы без него (n=28) были выполнены качественные 16S-тесты, которые позволили определить представленность бактерий с точностью до рода. В работе ([Amar 2013](#)) метагеном не определялся.

В работе ([Dinakaran 2014](#)) было обследовано 80 пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и 40 ЗП. В качестве биоматериала использовалась плазма крови. Для всех применен 16S-тест, а для 3 пациентов и 3 ЗП дополнительно WMS-тест.

В работе ([Sato 2014](#)) было обследовано 50 пациентов с диабетом 2-го типа и 50 ЗП. С помощью 16S RT-PCR теста изучался микробиом фекалий и плазмы крови с применением ограниченного набора праймеров (для 21 вида, рода или типа бактерий). 16S RT-PCR тест плазмы крови был качественный (да/нет), присутствие bacDNA в плазме крови было зафиксировано у 14 пациентов и 2 ЗП. Метагеном не определялся. Поиск корреляций между родами бактерий, обнаруженных в фекалиях и крови, не проводился.

В работе ([Long 2016](#)) были обследованы 78 постоперационных пациентов и 10 ЗП. Выполнялся WMS-тест для плазмы крови, параллельно выполнялся культуральный посев (слайд 33. *Blood_WMS_and_Culture*). Определялось присутствие hDNA (бактерии с точностью до вида, грибы и вирусы), картирование выполнялось на референсные каталоги [NCBI Genome](#). Большинство ридов было картировано на человеческий геном (в среднем 95,6%), из оставшихся менее 1% было картировано на геномы конкретных бактерий, грибов или вирусов.

В работе ([Païssé 2016](#)) был выполнен 16S-тест цельной крови, а также ее фракций у 30 ЗП (доноров) на предмет обнаружения bacDNA. Применен метод, разработанный и опробованный авторами ранее ([Lluch 2015](#)). Оказалось, что bacDNA обнаруживается у **всех** ЗП (слайд 34. *Blood-bacDNA (France)*), а также, что большая ее часть содержится в лейкоцитарной пленке, т.е. во фракции лейкоцитов и тромбоцитов (93,7%), меньшая – связана с фракцией эритроцитов (6,2%) и плазмой крови (0,03%). Главным образом это bacDNA Gram(-) бактерий типа [Proteobacteria](#) (87%) и [Bacteroidetes](#) (классы [Sphingobacteriia](#), [Bacteroidia](#) и [Flavobacteriia](#)) (2,5%), но также преимущественно Gram+ бактерии типов [Actinobacteria](#) (6,7%), [Firmicutes](#) (класс [Bacilli](#)) (3%).

Это исследование не ставило целью установить источники происхождения bacDNA в крови. Поэтому осталось неясным

- живые или деградированные бактерии, оказавшиеся в крови, были источником обнаруженной bacDNA;

- каким образом bacDNA была связана с лейкоцитами, тромбоцитами и эритроцитами;

- откуда бактерии и/или бактериальные продукты, содержащие bacDNA, попали в кровь.

Отметим, что концентрация bacDNA, обнаруженная в плазме крови - $1,4 \cdot 10^4$ (копий 16S)/мл в среднем, имеет один порядок, с концентрацией bacDNA, обнаруженной в контрольном тесте одного из реагентов - $1,5 \cdot 10^4$ (копий 16S)/мл.

Достаточную достоверность имеют результаты для цельной крови, поскольку концентрация bacDNA составила от $1,8 \cdot 10^7$ до $7,6 \cdot 10^7$ (копий 16S)/мл. В среднем $4,2 \cdot 10^7$ (копий 16S)/мл. Показана прямая корреляция концентрации bacDNA с концентрацией лейкоцитов в крови.

В пересчете на лейкоциты концентрация bacDNA составила $\sim 5,7$ (копий 16S)/лейкоцит (Supplemental Fig. 2a, [Païssé 2016](#)). А поскольку за утилизацию нехозяинских биопродуктов в крови отвечают фагоциты, то это соответствует $\sim 8,5$ (копий 16S)/фагоцит. Это превышает концентрацию в $\sim 3,1$ (копий 16S)/моноцит для ЗП ([Okubo 2002](#)), хотя бы потому, что исследовалась постпрандиальная кровь.

Результаты этого исследования с точностью до рода представлены только для основных патогенов: [Acinetobacter](#) $\sim 6 \cdot 10^5$ (копий 16S)/мл; [Corynebacterium](#) $\sim 4 \cdot 10^6$ (копий 16S)/мл, [Escherichia](#) или [Shigella](#) $\sim 1,5 \cdot 10^5$ (копий 16S)/мл (16S-тест не различает эти два рода), [Pseudomonas](#) $\sim 1,5 \cdot 10^6$ (копий 16S)/мл, [Staphylococcus](#) $\sim 1,7 \cdot 10^5$ (копий 16S)/мл, [Stenotrophomonas](#) $\sim 2,3 \cdot 10^5$ (копий 16S)/мл. Указана концентрация 16S в среднем, обнаруженная в лейкоцитарной пленке (из расчета на 1 мл цельной крови). Род [Shewanella](#) $\sim 10^4$ (копий 16S)/мл обнаружен только в плазме ([Païssé 2016](#), рис. S3).

Авторы предполагают, что основным источником поступления bacDNA в кровь является кишечный микробиом. И действительно распределение bacDNA по типам аналогично выявленному в биоптатах слизистой тонкой кишки, взятых в зоне связки Трейца у ЗП ([Li 2015](#)). Более высокая суммарная концентрация bacDNA в крови (по сравнению с другими исследованиями) связана с тем, что ЗП являлись донорами и перед сдачей крови принимали пищу и питье (как часто рекомендовано донорам, а также в соответствии с условиями данного исследования).

Известно, что прием пищи влечет быстрый рост тонкокишечного просветного и пристеночного микробиома (более чем в 50 раз при целиакии и синдроме раздраженного кишечника). Это в свою очередь вызывает временный рост (предположительно такой же) поступления бактериальных продуктов в системный кровоток ([Ciampolini 1996](#)). Вначале это происходит в связи с ростом микробиома (продукты жизнедеятельности), а затем (по мере продвижения химуса по ЖКТ) из-за сокращения микробиома (продукты отмирания). В продуктах отмирания существенный процент составляет пептидогликан PG, липополисахарид LPS и другие PAMP.

В работе ([Lelouvier 2016](#)) был применен метод ([Lluch 2015](#)) для 16S-тестов лейкоцитарной пленки (пациенты в Испании) и цельной крови (пациенты в Италии). Каждая из групп пациентов была разделена на две части (нет или есть фиброз). Венепункция выполнялась после 12-часового воздержания от пищи. Была обнаружена существенно меньшая (по сравнению с [Païssé 2016](#)) концентрация bacDNA для групп без фиброза – около $2,4 \cdot 10^3$ (копий 16S)/мл и в 1,5-2 раза больше для групп с фиброзом.

В работе ([Grumaz 2016](#)) были обследованы следующие три группы: пациенты с сепсисом (n=60), пациенты, перенесшие полостную операцию (n=30) и ЗП (n=30). Изучалась DNA, свободно находящаяся в плазме крови (cell-free DNA). Ее концентрация была определена с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (LifeTechnologies). Затем выполнялся WMS-тест, аналитически исключались риды, принадлежащие hDNA (в среднем 96-98%).

Остальные риды картировались с точностью до вида с применением [NCBI RefSeq](#) (референсной геномной БД) (слайд 35. *Blood-Germany-1* - для части пациентов). В результате картировалось в среднем от 2,3% до 4,2% от неисключенных ридов, для 12 ЗП - в среднем 3,5% от

неисключенных ридов, что соответствует 0,064% в среднем от всех ридов. В результате была получена информация о представленности hDNA.

Это позволило нам с использованием результатов, полученных авторами для 15 ЗП (только для них данные опубликованы) оценить суммарную представленность предполагаемых псоррагенными видов (~5,7%). При этом вероятный кожный контаминант *P. asnes* был исключен (аналогично [Horiba 2018](#)) (слайд 36. *Blood-Germany-2*).

В работе ([Gyarmati 2016](#)) были обследованы только пациенты с подозрением на сепсис (n=9). Изучалась hDNA нехозяйских клеток, находящихся в крови. Перед секвенированием было выполнено последовательное обогащение биоматериала. Вначале был применен [MolYsis Complete5 kit](#). С помощью этого набора последовательно выполняется следующее:

а) в образце разрушаются все хозяйские клетки крови (большинство нехозяйских клеток при этом не затрагиваются);

б) нехозяйские клетки выделяются из образца (при этом практически все содержимое хозяйских клеток удаляется);

в) нехозяйские клетки разрушаются, и из них выделяется hDNA.

Затем для образцов, полученных в результате такой подготовки, было выполнено дополнительное обогащение hDNA путем снижения концентрации hDNA ([NebNext microbiome enrichment](#)) (об этом и аналогичных тест-наборах – раздел 5.7). Затем был выполнен WMS-тест, после чего аналитически исключены риды, принадлежащие hDNA (79%), остальные риды картировались с точностью до вида с применением [NCBI Genome](#). Удалось картировать только 0,07% ридов. Была обнаружена hDNA бактерий, вирусов и грибов в корреляции с состоянием пациентов.

В работе ([Gosiewski 2017](#)) были обследованы 62 пациента с сепсисом и 23 ЗП, с помощью 16S-теста изучалась цельная кровь, были получена информация о представленности bacDNA с точностью до рода. Техника изоляции DNA из цельной крови основана на собственном исследовании ([Gosiewski 2014](#)). Дополнительно были проведены тесты с образцами NTC (no template control), которые показали состав контаминации (загрязнение образцов и/или реагентов).

В работе ([Kowarsky 2017](#)) был обследован большой контингент пациентов, у которых была выполнена трансплантация (сердце, легкие, костный мозг), а также 32 женщины во время беременности (всего 188 пациентов). Забор крови осуществлялся неоднократно на разных стадиях трансплантации и беременности (всего 1351 образец). Для изучения плазменной (внеклеточной, циркулирующей) DNA применялся WMS-тест. Данных о ее концентрации в публикации нет. Акцент в исследовании сделан на обнаружении и изучении некартируемой hDNA (т.е. такой, которой невозможно сопоставить какой-либо из известных геномов бактерий, архей, вирусов и т.д.).

95% ридов прошли контроль качества, из них в среднем 99,55% картировалось на референсный геном человека ([GRCh38](#)), т.е. в среднем только 0,45% осталось для картирования на нехозяйский референс. И только в среднем 1% в среднем от неисключенных картировался на референс, содержащий геномы почти 8000 видов известных бактерий, архей, вирусов, грибов и других эукариотов (т.е. 0,0045% в среднем от всех ридов). Около 1800 видов (из почти 800 родов) были обнаружены во всех образцах крови.

В работе дана количественная характеристика картированного на уровне доменов и типов (phylums): Bacteria (всего 528), в т.ч. типы Actinobacteria(248), Firmicutes(183), Proteobacteria(86) и Deinococcus-Thermus(2); Eukaryota (всего 145), в т.ч. типы Ascomycota(96), Chordata(7), Bacillariophyta(5) и Streptophyta(4) и Viruses (всего 100) (диаграмма SF15, [Kowarsky 2017](#)). Более детальная информация (например, по родам или видам) в публикации и приложениях к ней отсутствует.

Результаты ([Kowarsky 2017](#)) существенно отличаются от ([Grumaz 2016](#)), в первую очередь очень высоким % ридов, картированных на человеческий геном (99,55% против 96-98%), а во вторую очередь более низким % ридов картированных на нехозяйский референс (0,0045% против 0,064% в среднем от всех ридов). Возможно, что это связано с процессом изоляции плазмы крови. Согласно ([Kowarsky 2017](#)) это происходило путем более интенсивного центрифугирования (1600g, 10 мин + 16000g, 10 мин), в то время как в ([Grumaz 2016](#)) только (292g, 10 мин + 1000g, 5 мин), что и привело к удалению из плазмы большей части крупных фрагментов hDNA. В данной работе был применен разносторонний контроль контаминации. В частности некоторые образцы NTC формировались из hDNA, полученной из заведомо стерильных культур человеческих клеток. Аналогичный подход к формированию образцов NTC будет реализован в проекте (раздел 5.7).

В работе ([Puri 2018](#)) были обследованы пациенты с алкогольным синдромом разной тяжести (n=56) и контрольная группа ЗП (n=20). Метод изоляции DNA из цельной крови был тот же, что и в ([Païssé 2016](#)). Далее определялась концентрация bacDNA и применялся 16S-тест. Для ЗП

концентрация bacDNA составила 66 (копий 16S)/(нг DNA) в среднем (fig.1A, [Puri 2018](#)). Для изоляции DNA из крови применялся NucleoSpin Blood kit (средний выход DNA составляет 25000 нг/мл). Поэтому можно оценить концентрацию bacDNA на 1 мл цельной крови в $1,65 \cdot 10^6$ (копий 16S)/мл = 66 (копий 16S)/(нг DNA) * 25000 нг/мл. Это меньше, чем $4,2 \cdot 10^7$ (копий 16S)/мл в среднем для постпрандиальной цельной крови ([Païssé 2016](#)). Возможно потому, что забор крови осуществлялся натощак. Из информации о метагеноме цельной крови ЗП следует, что представленность семейства (family) Streptococcaceae составила около ~2,8% (Suppl. fig.3A, [Puri 2018](#)).

В работе ([Li 2018](#)) были обследованы пациенты с панкреатитом (n=50) и контрольная группа ЗП (n=12). Метагеном изучался с помощью 16S-теста, в качестве биоматериала бралась цельная кровь, а также предварительно изолированные нейтрофилы крови. Концентрация bacDNA определялась только в цельной крови и для 12 ЗП в среднем составила $1,38 \cdot 10^8$ (копий 16S)/мл - слайд 37. *Blood-bacDNA (China)*. Забор крови осуществлялся натощак и она сразу (до изоляции DNA) обрабатывалась [RLT буфером \(Qiagen\)](#). Механическая гомогенизация (аналогичная [Païssé 2016](#) и [Puri 2018](#)) не применялась. Сразу после обработки RLT буфером применялся QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Можно предположить, что наиболее высокая концентрация bacDNA в цельной крови ЗП (по сравнению с остальными работами) получена благодаря быстрому применению (сразу после забора крови) RLT буфера. Его применение оказалось более эффективно (по сравнению с механической гомогенизацией) не только для разрушения клеток крови, но и для замедления процессов деградации bacDNA. Именно такой подход наиболее целесообразно применить в нашем проекте.

В работе ([Qian 2018](#)) были обследованы две группы пациентов с болезнью Паркинсона. Для первой группы (n = 45) в качестве контрольной группы ЗП были выбраны их супруги (n=45). Одним из условий отбора в первую группу было проживание в данном регионе не менее 20 лет. При отборе второй группы пациентов с болезнью Паркинсона (n=58) и контрольной группы ЗП (n=57) такие ограничения не применялись. Перед сдачей крови для пациентов и ЗП предварительный прием пищи не оговаривался, т.е. для конкретного пациента неизвестно бралась ли кровь натощак или постпрандиально (информация от авторов работы). Изоляция DNA выполнялась из лейкоцитарной массы (аналогично [Amar 2011](#) и [Amar 2013](#)). Концентрация bacDNA в лейкоцитарной массе определялась только для первой группы пациентов и ЗП. Также как и в ([Puri 2018](#)) она определялась в виде количества копий 16S, обнаруженных в 1 нг всей DNA. Средний выход DNA составил 15000 нг/мл цельной крови (информация от авторов работы). Концентрация bacDNA для ЗП в среднем составила $7,78 \cdot 10^3$ копий 16S на 1 нг всей DNA (correct Tab.2, [Qian 2018](#)). Что соответствует значению в $1,17 \cdot 10^8$ (копий 16S)/(мл цельной крови) в среднем.

Таблица 3 содержит краткое описание перечисленных выше исследований. Следует обратить внимание, что концентрация bacDNA в цельной крови (лейкоцитарной массе) у ЗП определялась только 16S-тестом и только в 4-х из перечисленных выше работ ([Païssé 2016](#), [Puri 2018](#), [Li 2018](#), [Qian 2018](#)). Как следует из другой таблицы (Дополнение С, лист «nhDNA in healthy blood», раздел 5.12) имеет место достаточно большой разброс результатов. Частично это объясняется следующими различиями: подготовкой перед сдачей крови (обязательная еда у доноров, 12-ти часовой период без еды у большинства групп пациентов); фракциями (цельная кровь, лейкоциты, лейкоцитарная пленка); методами изоляции DNA ([Psifidi 2015](#)), алгоритмами обработки ридов, методами измерения (оценки) концентрации bacDNA. На сохранность nhDNA (в т.ч. bacDNA), содержащейся в фагоцитах крови на момент забора крови, безусловно влияет время и условия хранения и транспортировки, а также предварительная обработка перед изоляцией DNA. Фагоциты крови (до тех пор, пока они не разрушены) продолжают деградацию ранее эндоцитированных нехозяинских продуктов (в т.ч. nhDNA). Темп этой деградации зависит от многих факторов (транспортной среды, температуры и т.д.).

При подготовке данной версии проекта было принято решение отказаться от предварительной изоляции фагоцитов из цельной крови, а осуществлять изоляцию всей DNA из цельной крови сразу с помощью одного из стандартных тест-наборов (раздел 5.10, п.6). Во-первых, такой подход максимально сократит время между забором крови и разрушением фагоцитов крови, что позволит сохранить максимальное количество nhDNA, во-вторых, фагоциты составляют 60-70% от всех лейкоцитов крови и поэтому отказ от их изоляции несущественно повысит % hDNA, в третьих отказ от выполнения изоляции фагоцитов крови (длительная процедура аналогичная 77. *Phagocytes selection*) уменьшит вероятность контаминации.

На результаты также может влиять контаминация (одного или нескольких реагентов, случайная и др.). Подробнее о контаминации в работе ([Glassing 2016](#)), которая полностью посвящена этой проблеме и содержит обоснованную критику некоторых из перечисленных выше работ. В разделе 5.7 содержится описание того, как предполагается контролировать уровень контаминации в данном проекте.

В таблице для каждой из работ есть примечание о том, осуществлялся ли контроль контаминации (если в публикации нет информации об этом, то предполагается, что такого контроля не было) (Таблица 3). Часть этой же информации дана в другом виде (Таблица 4), который демонстрирует новизну проекта.

Порядок подготовки пациентов и выполнения WMS-теста цельной крови, поиск корреляций с PASI более подробно описан в разделе 5.10.

Таблица 3. Исследования метагенома крови. Сводка.

Пациенты	Биоматериал	Тест	Определение концентрации	Контроль контаминации	nhDNA (в частности bacDNA)	Работа (год, страна), примечания, ссылка на биопроект.
ПП (псориазные пациенты) и ЗП						
19 ПП	Плазма	16S	нет	да	bacDNA у 9 из 19 ПП	Wang 1999 (USA), ПП с псориазным артритом. Метагеном не определялся.
15 ПП, 12 ЗП	Моноциты	16S, 18S	да	да	bacDNA у всех.	Okubo 2002 (Japan). Относительный уровень у ПП в 1,5-2 раза выше, чем у ЗП. Метагеном не определялся. Концентрация bacDNA оценивалась по отношению к концентрации гена human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).
20 ПП, 12 ЗП	Плазма	16S	нет	да	bacDNA у всех ПП, ни у одного из ЗП.	Munz 2010 (UK). Метагеном не определялся. Слайд 32. <i>Blood_Psor.</i>
54 ПП, 27 ЗП	Сыворотка	16S	нет	нет	У 16 из 54 ПП, ни у одного из ЗП.	Ramírez-Boscá 2015 (Spain) - заметка, подробно в Codoner 2018 .
52 ПП	Сыворотка	16S	нет	нет	У 13 из 52 ПП.	Codoner 2018 (Spain). На том же материале, что Ramírez-Boscá 2015
Непсориазные пациенты и/или ЗП						
50 ЗП	Лейкоцитарная масса	16S	да	нет	bacDNA у всех	James 2011 (Canada). Метагеном не определялся.
3280 человек	Лейкоциты	16S	да	нет	bacDNA	Amar 2011 (France), количественный 16S. Качественный 16S был выполнен только для 42 человек. Общий контингент с (Amar 2013), в т.ч. с диабетом.
3936 человек	Лейкоциты	16S	да	нет	bacDNA	Amar 2013 (France), оценка концентрации только Eubacteria и Proteobacteria phylum в целом. Метагеном не определялся. Общий контингент с (Amar 2011), в т.ч. с сердечно-сосудистыми заболеваниями.
80 пациентов и 40 ЗП	Плазма	16S и WMS	да	да, NTC	bacDNA у всех	Dinakaran 2014 (India), WMS-тест был выполнен для 3 пациентов и 3 ЗП. Применялся QIAamp DNA blood mini kit .
50 пациентов, 50 ЗП	Плазма	16S RT-PCR	нет	нет	bacDNA у 14 из 50 пациентов, у 2-х из 50 ЗП	Sato 2014 (Japan), Пациенты с диабетом 2-го типа. Тесты плазмы крови выполнялись в дополнение к тестам фекалий. Использовался ограниченный набор праймеров. Метагеном не определялся.
78 пациентов и 10 ЗП	Плазма	WMS	нет	нет	nhDNA у всех	Long 2016 (China), пациенты постоперационные, изучалась вся nhDNA, выполнялся культуральный посев. Слайд 33. <i>Blood_WMS_and_Culture.</i>
30 ЗП	Цельная кровь и 3 фракции	16S	да	да, NTC, 0,05%	bacDNA у всех	Paissé 2016 (France), ЗП – доноры (сдавали кровь после еды). Повышенную концентрацию bacDNA, обеспечил метод (Luch 2015). Слайд 34. <i>Blood-bacDNA (France)</i> . Применялся NucleoSpin Blood L .
2 группы пациентов (Испания – 37, Италия – 71)	Фракция ВС и цельная кровь	16S	да	нет	bacDNA у всех	Lelouvier 2016 (France), каждая из двух групп пациентов была разделена на две части (без фиброза, с фиброзом). ВС - Buffy coat (лейкоцитарная пленка)

Пациенты	Биоматериал	Тест	Определение концентрации	Контроль контаминации	nhDNA (в частности bacDNA)	Работа (год, страна), примечания, ссылка на биопроект.
30 ЗП, 90 пациентов	Плазма	WMS	да – только для всей DNA	да (не опубликовано)	nhDNA у всех	Grumaz 2016 (Germany), изучалась вся nhDNA, пациенты с сепсисом и постоперационные. Также выполнялся культуральный посев. ENA: PRJEB13247 Слайды 35. <i>Blood-Germany-1</i> и 36. <i>Blood-Germany-2</i>
9 пациентов	Нехозяйские клетки в цельной крови	WMS	нет	да	nhDNA у всех	Gyarmati 2016 (Sweden), острая лейкопения и подозрение на сепсис. Перед секвенированием выполнено последовательное обогащение (Molysis, NebNext). Изучалась вся nhDNA. Концентрация определялась только для cell-free DNA.
62 пациента и 23 ЗП	Цельная кровь	16S	нет	да	bacDNA у всех	Gosiewski 2017 (Poland), пациенты с сепсисом, техника изоляции DNA основана на собственном исследовании (Gosiewski 2014).
188 пациентов, 1351 образец	Плазма	WMS	нет	Да, NTC	nhDNA у всех	Kowarsky 2017 (USA), пациенты после пересадки (сердце, легкие, костный мозг) и женщины во время беременности. Неоднократный забор крови у одних и тех же пациентов во время наблюдения. NTC формировался из стерильной культуры человеческих клеток.
56 пациентов 20 ЗП	Цельная кровь	16S	да		bacDNA у всех	Puri 2018 (USA), пациенты с алкогольным синдромом, техника изоляции DNA аналогична Païssé 2016 .
50 пациентов и 12 ЗП	Цельная кровь, нейтрофилы	16S	да	да	bacDNA у всех	Li 2018 (China), пациенты с панкреатитом, слайд 37. <i>Blood-bacDNA (China)</i>
45 ЗП и 45 пациентов + 57 ЗП и 58 пациентов	Лейкоцитарная масса	16S	да	да, NTC=6, 0,14%	bacDNA у всех	Qian 2018 (China), пациенты с болезнью Паркинсона. Результаты по концентрации вызывают сомнение.
Проект исследования NCS1						
15 ПП, 5 ЗП	Цельная кровь	WMS	да	да	nhDNA у всех	(2019-20, Russia), забор крови через 3 часа после еды, предварительная элиминация hDNA, вся nhDNA. Аналогичные тесты (фагоцитов) псориазных биоптатов. Их комплексное изучение.

Таблица 4. Исследования метагенома крови. Факт и план.

	16S-тест (ПП)	16S-тест (ЗП)	WMS-тест (ПП)	WMS-тест (ЗП)
Плазма, сыворотка	Munz 2010 ; Codoner 2018	Païssé 2016 (+)		Dinakaran 2014 (+); Long 2016 ; Grumaz 2016 (+); Kowarsky 2017 (ЗП – беременность);
Цельная кровь, фагоциты	Okubo 2002 (моноциты – без метагенома, +);	Païssé 2016 (и ее фракции, +); Gosiewski 2017 ; Puri 2018 (+); Li 2018 (в т.ч нейтрофилы, +); Qian 2018 (лейкоцитарная масса, +)	NCS1 (+)	NCS1 (+)

Примечание: + - определялась (будет определяться) концентрация.

Поскольку в проекте предполагается определять концентрацию bacDNA и nhDNA в цельной крови, то этому вопросу посвящен следующий раздел.

2.2. Концентрация bacDNA в цельной крови ЗП

Мы собрали все опубликованные статистически значимые результаты исследований, в которых определялась концентрация bacDNA в цельной крови здоровых людей (Таблица 5). Все эти работы были описаны выше (раздел 2.1, Таблица 3).

Для целей проекта важно добиться максимально возможной концентрации и, как следствие, максимально высокой представленности bacDNA во всей DNA, изолированной из цельной крови. В результате после выполнения обогащения с помощью [NebNext Microbiome Enrichment](#) (NME) представленность bacDNA станет еще больше и, как следствие, на выходе (после WMS-теста) увеличится % ридов nhDNA. Об эффективности применения NME подробнее в разделе 5.7.

Как следует из серии работ французских исследователей ([Amar 2011](#), [Amar 2013](#), [Païssé 2016](#), [Lelouvier 2016](#)) максимальная концентрация bacDNA в цельной крови достигается в постпрандиальный период. Однако ни состав завтрака, ни время забора крови после завтрака в работе [Païssé 2016](#) не указаны, не сравнивалась концентрация bacDNA в цельной крови до и после еды для одних и тех же испытуемых.

Есть несколько исследований, посвященных измерению концентрации LPS (и других веществ) в крови после еды ([Bala 2014](#), [Erridge 2007](#), [Ghanim 2010](#), [Gnauck 2016a](#), [Milan 2017](#), [Munford 2016](#)). Динамика постпрандиальной концентрации bacDNA в цельной крови аналогична динамике постпрандиальной концентрации LPS (измеряемой впрочем, в плазме) ([Bala 2014](#)). При решении задач T1.1 и T1.2 (пилотный этап) будет учтена постановка и результаты этих исследований.

На концентрацию bacDNA в цельной крови влияет предобработка, а именно то, как быстро после забора крови будут прекращены процессы деградации бактериальных продуктов, находящихся вне и в клетках крови. Именно поэтому в работах ([Païssé 2016](#), [Puri 2018](#)) применялась 3-кратная механическая гомогенизация. Однако (судя по результатам) оптимальным является применение RLT буфера ([Li 2018](#)), что позволило получить более высокую концентрацию bacDNA в натошачной крови по сравнению с постпрандиальной кровью ([Païssé 2016](#)): $1,38 \cdot 10^8$ против $4,2 \cdot 10^7$ (копий 16S в 1 мл цельной крови). В нашем проекте после забора постпрандиальной крови предобработку RLT буфером нужно будет выполнить как можно раньше.

Таблица 5. Концентрация bacDNA в крови ЗП. Сводка.

Работа	Okubo 2002	James 2011	Païssé 2016	Puri 2018	Li 2018	Qian 2018
Страна	Japan	Canada	France	USA	China	China
Биоматериал	Моноциты	Лейкоцитарная масса	Цельная кровь (и другие фракции)	Цельная кровь	Цельная кровь	Лейкоцитарная масса
ЗП (здоровые персоны) и пациенты (чел)	12 ЗП и 15 ПП	50 ЗП (доноры)	30 ЗП (доноры)	20 ЗП (и другие)	12 ЗП (и другие)	45 ЗП (и другие)
Время забора крови	нет данных	нет данных	после еды и питья	нет данных	натошак	без контроля
Предобработка образцов перед изоляцией DNA			Гомогенизация	Гомогенизация	RLT буфер	Фенол/хлороформ изоляция
Цельная кровь. (копий 16S)/(мл всей крови)		$4,29 \cdot E7$ (пересчет)	$4,20 \cdot E7$	$1,65 \cdot E6$ (пересчет)	$1,38 \cdot E8$	$1,17 \cdot E8$ (пересчет)
Определение концентрации bacDNA	-	qPCR (V3, спец. праймера, 194 - ампликон)	qPCR (V3-V4, EUBF, EUBR, 467 - ампликон)	qPCR (V3-V4, унив. праймера, ND)	qPCR (V3, 357f/518r, 162 - ампликон)	qPCR (V3-V4, EUBF, EUBR, 467 - ампликон)
% веса bacDNA E.coli в среднем от всей DNA в цельной крови (пересчет)	0,022%	0,060%	0,059%	0,002%	0,194%	0,164%
(копий 16S)/моноцит (Okubo 2002) (копий 16S)/лейкоцит (Païsse 2016)	ЗП - 3,1; ПП - 5,8 (пересчет)		5,7 (пересчет)			
Диапазон концентраций	ЗП: 1,5 - 7,5	0 - 0,48% (в % веса)	$1,8E7$ - $7,6E7$	+ -50%	$8E7$ - $2E8$?
Контроль контаминации			NTC		NTC ≥ 5	NTC=6
Уровень контаминации			0,048% (среднее)		0,003% (максимум)	0,138% (среднее)

Полностью данные по концентрациям bacDNA представлены в таблицах на листах «nhDNA in blood», «nhDNA in healthy whole blood» в Дополнении С (раздел 5.12).

Помимо определения концентрации bacDNA (по количеству копий 16S) по результатам выполнения WMS-теста можно будет также определить концентрацию любых картированных видов, и, как следствие, суммарную концентрацию любых подмножеств картированных видов (Дополнение S2, раздел 5.12). И произвести сравнение суммарной концентрации bacDNA, полученной этими двумя различными способами.

Также будут выполнены биохимические тесты для определения концентрации липополисахарида и пептидогликана в крови (раздел 5.6).

2.3. Метагеном кожи

Микробиом нормальной и псориатической кожи исследовался и сравнивался неоднократно. Хорошо известно, что *Staphylococcus aureus*, *Malassezia* Species, *Candida Albicans* в псориатических пятнах обнаруживаются чаще нормы, что, как правило, усугубляет воспалительный процесс (Alekseyenko 2013, Fry 2016, Fry 2013, Gao 2008, Фомина 2009). Также известно, что у ПП инфекция здоровой кожи, затронувшая дерму, может вызвать появление псориатического пятна (эффект Кебнера). В некоторых случаях устранение инфекции с псориатического пятна может привести к его ослаблению и даже к постепенному исчезновению. Однако полное исчезновение происходит весьма редко. Ни один из кожных бактериальных патогенов не рассматривается в качестве основной причины инициации и поддержки псориатических высыпаний. Все они рассматриваются как триггеры (провокаторы инициации) и/или как факторы усугубляющие тяжесть псориатического пятна.

Метагеном кожи в норме, а также при различных ее заболеваниях последние 10 лет активно изучается. В большей части работ в качестве биоматериалов использовали мазки или соскобы, биоптаты изучались только в двух работах (Fahlen 2012, Nakatsuji 2013). WMS-тесты применялись только для мазков или соскобов.

В работе (Gao 2008) исследовалось присутствие bacDNA в мазках, взятых с кожи у ЗП и ПП. У ПП мазки брались с видимо здоровой кожи и с псориатических пятен. Была применена аналитическая обработка результатов 16S-теста, позволяющая интерпретировать OTU с точностью до вида (метод SLOTU). У 6 ПП было взято 19 мазков (13 с псориатических пятен и 6 - с видимо здоровой кожи). Всего было обнаружено 1925 клонов (2038 – у ЗП). На основании 98% идентичности 1841 клон (95,6%) был картирован на 6 типов, 86 родов или 189 видов. Представленность *Propionibacterium* sp. оказалась ниже на псориатических высыпаниях (~2,9%) чем у ЗП (~21%; $p < 0,001$) и чем на видимо здоровой коже ПП (~12,3%). И наоборот - представленность *Streptococcus* sp. была выше (~15,2%) на псориатических пятнах ($p < 0,001$), чем у ЗП (~7,1%) и чем на видимо здоровой коже ПП (~3,4%). Самый высокий % среди *Streptococcus* sp. обнаруженных у ПП, оказался у *Str.mitis* (~5,6%) и *Str.salivarius* (~2,3%). А *Str.pyogenes* вообще не был обнаружен. Концентрации не определялись. Авторы предположили, что отличия в кожном микробиоме могут иметь отношение к патогенезу ПБ, однако не сформулировали никаких гипотез.

В работе (Фомина 2009) исследовалось присутствие как HPV (PCR-тест), так и бактериального микробиома (культуральный посев) в мазках ПП. DNA HPV обнаруживается в 87% образцов ПП, и только в 44% образцов ЗП ($p < 0,001$). Определялась вирусная нагрузка $HPVL = \lg((\text{кол-во DNA HPV})/(10^5 \text{ клеток человека}))$. Оказалось, что $HPVL < 2$ для 40% HPV+образцов ПП и для 83% HPV+ЗП, $2 < HPVL < 3$ для 45% HPV+ образцов ПП и для 17% HPV+ЗП и $HPVL > 3$ для 15% HPV+ образцов ПП и для 0% HPV+ЗП. Т.е. оказалось, что HPVL для ПП достоверно выше, чем для ЗП. Также было показано, что HPVL достоверно ниже для ПП в стадии ремиссии по сравнению со стадией ухудшения. Увеличение HPVL в псориатической коже коррелирует с нарушениями микробиома, в частности существенно увеличивается количество *S.aureus*.

В работе (Fahlen 2012) впервые 16S-тест (переменные области V3-V4) был применен для исследования биоптатов кожи. Они (диаметр 2 мм) были взяты у 10 ПП и у 12 ЗП. ПП не получали местное лечение в течение двух недель, а также ультрафиолет или системное лечение в течение месяца до этого. Результаты сгруппировались в 19 типов, 265 таксонов и 652 OTU с 97% идентичностью. Три наиболее распространенными типами были Firmicutes (39% у ПП, 43% у ЗП), Proteobacteria (38% у ПП, 27% у ЗП) и Actinobacteria (5% у ПП, 16% у ЗП). *Streptococcus* sp. оказался хорошо представлен у ПП (32% - обнаружен во всех биоптатах) и у ЗП (26%). *Staphylococcus* sp. был менее представлен у ПП (5%), чем у ЗП (16%) (слайд 38. *Skin-bacDNA*).

В двух публикациях (Alekseyenko 2013, Statnikov 2013) содержится подробный анализ результатов 16S-тестов мазков большого контингента ПП (n=54) и ЗП (n=112). Все образцы удалось разделить на два кластера, представляющие несколько отличающиеся микробные сообщества.

Метагеном мазков псориазических высыпаний преимущественно оказался в кластере Firmicutes и Actinobacteria, а метагеном мазков кожи ЗП – в кластере Proteobacteria. Когда у части ПП с тех же высыпаний спустя несколько месяцев (во время которых проводилось лечение псориаза) мазки были взяты повторно, то принадлежность этому же кластеру сохранилась.

Также было обнаружено, что в псориазических образцах (по сравнению с ЗП) увеличена суммарная представленность родов *Corynebacterium*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* и, наоборот, уменьшена представленность родов *Cupriavidus*, *Flavisolibacter*, *Methylobacterium* и *Schlegelella*. Интересно, что представленность порядка Acidobacteria Gr4 положительно коррелировала с PASI. Никаких выводов о связи обнаруженных корреляций с патогенезом ПБ авторы не сделали.

В работе ([Jagielski 2014](#)) было исследовано только присутствие грибов в мазках, взятых у 6 ПП, 6 ЗП и 6 АД-пациентов (с атопическим дерматитом). *Malassezia sympodialis* оказался преобладающим видом (82.9%), обнаруженным во время культивирования 29 образцов. У АД-пациентов были обнаружены исключительно виды *M. sympodialis*, а виды *M. furfur* были обнаружены только у ПП. *M. sympodialis* чаще обнаруживался у АД-пациентов и ЗП, чем среди ПП. Конкордантность между фенотипическими и молекулярными методами была высокой (65%). Все виды *Malassezia* были восприимчивы к суслопироксоломину иazole, однако виды *M. furfur* были нечувствительны к большому количеству лекарственных препаратов, чем другие.

В работе ([Takemoto 2015](#)) исследовалось только присутствие грибов (образцы брались пинцетом или на специальную повязку) у 12 ПП и 12 ЗП. Было получено 317806 качественных последовательностей, которые соответствовали 142 родам грибов. У ПП обнаруживалось большее разнообразие родов, но меньшая представленность *Malassezia* (46,9%) по сравнению с ЗП (76%). *Malassezia* был самым богатым типом и для ПП и для ЗП. Отношение долей *Malassezia globosa* к *Malassezia restricta* было ниже у ПП, чем у ЗП. В этом, как и в предшествующих исследованиях, не было обнаружено никакой корреляции между представленностью каких-либо родов грибов и PASI.

В диссертационной работе ([Tanes 2015](#)) проанализированы результаты, полученные для ПП в рамках Human Microbiome Project (Дополнение S7, раздел 5.12). На основании результатов 16S-тестов для 155 мазков с помощью [QIIME](#) и [PICRUST](#) были изучены основные гены микробиома ПП (их перечень и количество определялось алгоритмически). Также изучались значимые изменения в хозяйских генах, осуществлялся поиск взаимосвязей. Работа интересна своим подходом, в рамках которого на основе ограниченной информации, которую дает 16S-тест, смоделирован и изучен генный состав микробиома.

Детальные обзоры вышеперечисленных и ряда других (более ранних и менее значимых) исследований кожного микробиома при псориазе выполнены в двух недавних работах ([Fry 2016](#), [Yan 2017](#)).

Далее рассмотрим несколько работ, в которых изучался микробиом кожи ЗП и/или при других заболеваниях (помимо псориаза). Причем либо изучались биоптаты, либо применялось WMS-тестирование.

В работе ([Nakatsuji 2013](#)) исследовалось присутствие bacDNA в кожных биоптатах (n=11). Биоптаты были получены следующим образом. Постхирургическая здоровая кожа очищалась стерильным скальпелем, а затем стерилизовалась тампоном. После этого с помощью 6 мм панча осуществлялся забор биоптата на глубину 2-3 мм - так, чтобы в него попадали эпидермис, дерма и часть жировой ткани, расположенной под дермой.

После чего биоптат в стерильных условиях был разделен на слои толщиной 30-50 микрон, которые затем по отдельности прошли 16S-тест. Результаты были сгруппированы по 4-м отделам: эпидермис, фолликулярная дерма, дерма и жировая ткань (adipose tissue). Оказалось, что bacDNA присутствует не только в эпидермисе и фолликулярной дерме, но в нижележащих слоях дермы (которые не содержат фолликулы и потовые железы) и в жировой ткани (слайд 39. *Derm-16S-1*).

Представленность bacDNA с точностью до порядка (order) указана в таблице (Supplements, [Nakatsuji 2013](#)) и с точностью до класса (class) на диаграмме (слайд 40. *Derm-16S-2*). Определение абсолютного количества (концентраций) было выполнено для нескольких характерных бактерий (*Propionibacterium acnes*, *Staph. epidermidis* и *Pseudomonas* sp.) в дополнительных 16S-тестах со специфическими праймерами. Бактерии рода *Pseudomonas* (из семейства Pseudomonadaceae) были обнаружены в фолликулярной дерме - в среднем 4200 КОЕ/мм³, а в дерме, которая не содержит фолликулы, - в среднем 500 КОЕ/мм³.

Согласно результатам ([Fahlen 2012](#)) 16S-тестов для контрольной группы ЗП (n=13) бактерии из семейства (family) Pseudomonadaceae составляют 2% от общего числа обнаруженных (слайд

38. *Skin-bacDNA*). Сравнивая результаты ([Fahlen 2012](#)) и ([Nakatsuji 2013](#)) для этого семейства можно оценить диапазон концентраций дермальной *bacDNA* в норме от 500/0,02 до 4200/0,02 КОЕ/мм³, т.е. от $2,5 \cdot 10^4$ до $2,1 \cdot 10^5$ КОЕ/мм³ (лист «Param2», Дополнение С, раздел 5.12).

Другие работы, в которых изучалось бы наличие *bacDNA* в биоптатах кожи методами метагеномного секвенирования, на данный момент отсутствуют ([Ferretti 2017](#)).

В работе ([Boulimani 2015](#)) с помощью 16S-теста для двух ЗП впервые была изучена биогеография распределения кожного микробиома (мазки с 400 участков для каждого из ЗП). На слайде 42. *Skin_Bacteria_3D* представлено 3D распределение для родов *Streptococcus* и *Staphylococcus*.

В работе ([Oh 2014](#)) впервые было выполнено систематическое WMS-тестирование мазков с человеческой кожи, взятых на различных участках (15 ЗП, 18 участков с различными микросредами - сухая, влажная, сальная, ноготь пальца ноги и т.д. – слайды 43. *Skin-WMS-18-1* и 44. *Skin-WMS-18-2*). Выполнялось картирование на следующие референсные БД: National Center for Biological Information ([NCBI](#)), Human Microbiome Project ([HMP](#)), *Saccharomyces* Genome Database ([SGD](#)), Fungal Genome Initiative ([FGI](#)), [FungiDB](#), также был применен нереперенсный метод. Определены сообщества микроорганизмов, включая DNA вирусы, грибы, бактерии, в т.ч. подвиды и штаммы доминирующих бактерий. Показано, как функциональные способности сообщества микроорганизмов зависят от локализации участка на теле, создан мультидоменный каталог генов кожных микроорганизмов. Идентифицированы кластеры видов, не имеющих референса. Показано, что биогеография и индивидуум в значительной степени определяют функциональные и таксономические характеристики сообществ микроорганизмов. Всего было изучено 263 мазка (9 мужчин, 6 женщин). Количество хозяйской DNA составило от 19,4% (внутренний эпителий ноздри) до 98,2% (пятак) ридов. Качество ридов и эффективное покрытие зависели от участков (от 38% до 81%). Всего было получено и проанализировано 289 Gbp ([giga base pairs](#)) отфильтрованных ридов *nhDNA*. Основные исходные данные и итоговые результаты опубликованы и свободно доступны [в формате Excel](#).

В работе ([Hannigan 2015](#)) впервые было проведено сравнительное WMS-тестирование вирома и полного метагенома кожи (16 ЗП, мазки с 8 контралатеральных участков). Для изучения вирома биоматериал вначале был очищен от всего, кроме вирусных частиц, из которых затем была извлечена DNA (оптимизированный метод обогащения). Картирование осуществлялось с применением собственного и существующего программного обеспечения. Показано, что как виром, так и полный метагеном сильно зависят от микросреды (т.е. от конкретных участков кожи). В виrome были преимущественно обнаружены гены умеренных фагов. Спейсеры CRISPR, обнаруженные в бактериальных геномах, частично позволили обосновать сосуществование фагов и бактерий в сообществах (как правило, с большим содержанием *Corynebacterium* sp.), а также биогеографию фагов. Такое детальное изучение вирома кожи ранее было невозможно из-за малой концентрации вирусной DNA в и на коже. Однако современные методы секвенирования, работающие с ультрамалыми количествами (< 1 ng) DNA, сделали возможным это исследование.

Вирусная DNA также была обнаружена в полном метагеноме кожи (0,4% от всех ридов). Часть ридов вирома (в среднем 17%) обнаруживалась в полном метагеноме. В виrome большую часть составили фаги, но также были обнаружены папилломавирусы человека (HPV), причем с максимальной представленностью на ладонях ЗП.

В работе ([Chng 2016](#)) были обследованы 39 человек (19 AtD+ - пациентов с историей атопического дерматита, 15 ЗП SPT(-) - с отрицательным скарификационным тестом и 5 ЗП SPT+ - с положительным скарификационным тестом). У каждого брались два мазка (с правой и левой локтевых складок - *antecubital fossae*) с применением [D-Squame Standard Sampling Discs](#) (метод *tape-stripping*). Результат двух WMS-тестов усреднялся. Для нескольких пациентов дополнительно был выполнен 16S-тест, что позволило сравнить его результаты с результатами WMS-теста и показать преимущества WMS-теста.

Авторы отметили семь родов и девять видов, по которым отличия между группами обследуемых оказались наиболее значимыми. На слайде 46. *Skin-AtD-WMS-genus* представлены результаты для родов *Streptococcus* и *Gemella* (повышенная представленность по сравнению с контролем) и *Dermacoccus* (пониженная представленность по сравнению с контролем). Среди девяти видов – три вида альфа-гемолитических стрептококков. Большинство видов, представленность которых у AtD+ пациентов повышена, являются комменсалами или условными патогенами ВДП.

Для родов *Streptococcus* и *Staphylococcus* изучена представленность по видам (слайды 47. *Skin-AtD-WMS-Strep*, 48. *Skin-AtD-WMS-Staph*), а для патогенного вида *Staphylococcus aureus* по штаммам (слайд 49. *Skin-AtD-WGS-Strain*). Авторы отметили, что *Str. pyogenes* не был обнаружен ни у одного из обследованных. Такая достоверная детализация по видам и любая детализация по штаммам возможна только по результатам WMS-тестов. На данный момент это первая и

единственная работа, в которой WMS-тест выполнялся для дерматологических пациентов, именно поэтому она важна для проекта. Основные исходные данные и итоговые результаты этой работы свободно доступны на [NCBI. Sequence Read Archive](#) и на сайте журнала [Nature Microbiology](#).

В работе ([Tett 2017](#)) было обследовано 28 ПП. У них были взяты 48 мазков с псориатических высыпаний и 49 мазков с видимо здоровой кожи (всего 97 мазков). Для мазков были выбраны наиболее характерные для высыпаний участки – заушная складка (RC - retroauricular crease) и локоть (OS - olecranon skin area) (правые и левые). Были отобраны такие ПП, у которых хотя бы один из этих участков был без высыпаний. После изучения результатов WMS-тестов выяснилось, что для 48 мазков, взятых с высыпаний, только 4,9% ридов в среднем были картированы на референсную БД, в то время как для мазков с видимо здоровой кожи количество таких ридов составило 23,1% в среднем. Главной причиной этого был более высокий процент hDNA в мазках с пораженных участков.

Независимо от наличия или отсутствия псориатического высыпания с помощью таксономического анализа ([MetaPhlan 2](#)), показано, что кожные метагеномы преимущественно состоят из типов (phylum) Actinobacteria и Firmicutes. Максимально представлены следующие виды - *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus caprae/capitis* и *Micrococcus luteus*, а также грибы рода *Malassezia* (слайд 50. *Psorskin-swab-WMS-1*).

Представленности *Staph.epidermidis* и *P.acnes* для мазков кожи ПП аналогичны полученным в других исследованиях кожных метагеномов ЗП. Авторы подчеркивают, что выводы этих предыдущих исследований совпадают с их выводом о том, что между метагеномами псориатической кожи и метагеномами кожи ЗП нет никакого специфического существенного отличия. Причем впервые это было показано с помощью WMS-тестов, т.е. на уровне видов.

Чтобы исследовать внутривидовое распределение были применены штамм-специфичные новые методы [StrainPhlan](#) и [MetaMLST](#). Это позволило построить два полногеномных филогенетических дерева для штаммов *Staph.epidermidis* и *P.acnes* для образцов с достаточным покрытием (>2) (слайд 51. *Psorskin-swab-WMS-2*). Картография ушных образцов трех пациентов демонстрирует подобие состава штаммов для правого и левого уха без высыпаний (пациенты P4 и P9) и отличие состава штаммов для левого уха с псориазом и правого - без (пациент P16). Точки на рисунках соответствуют контигам, которые имеют цвет, определяемый видом. Расположение контигов определено содержанием GC и представленностью, черный цвет означает неизвестный таксон, RC и OS обозначают образцы ушей и локтя, соответственно.

В работе ([Loesche 2018](#)) были изучены с помощью 16S-теста мазки с псориатических высыпаний и видимо здоровой кожи у 114 ПП. Мазки брались с 6 различных локализаций (рука, подмышка, ягодица, нога, волосистая часть головы, туловище) трехкратно (0, 4 и 28 неделя) во время длительного лечения устекинумабом. Метагеномы псориатической и видимо здоровой кожи одной локализации подобны по составу и представленностям (слайд 52. *Psorskin-6*). Также не были обнаружены какие-либо принципиальные отличия между метагеномами, определенными на разных стадиях лечения устекинумабом.

Заслуживают внимания несколько обзорных статей, поскольку в них, как правило, приводится описание наиболее интересных работ и дается сравнительная характеристика методов исследования. В работе ([Grice 2011](#)) приведены результаты исследования мазков, взятых у 4 ЗП с 20 различных мест на коже (16S-тест). Авторы подчеркивают, что WMS-тест сможет дать больше информации, если будет выполнена предварительная элиминация hDNA. На данный момент разработано несколько методов элиминации hDNA (раздел 5.8). Опубликованы результаты WMS-тестов кожи ([Chng 2016](#), [Ferretti 2017](#), [Oh 2014](#), [Hannigan 2015](#)), в которых в той или иной степени применялась предварительная элиминация hDNA. В работе ([Grice 2011](#)) также представлен обзор результатов исследований по присутствию вирусов, грибов и даже клещей на коже и в коже.

На слайде 41. *Healthy-skin* (слева) размещена схема присутствия микроорганизмов в здоровой коже, соответствующая представлению на момент подготовки обзора ([Grice 2011](#)). Схема справа (на этом же слайде) соответствует представлению о присутствии микроорганизмов (а точнее их bacDNA) на данный момент (с учетом результатов [Nakatsuji 2013](#), слайд 39. *Derm-16S-1*).

Обзор ([Корниенко 2015](#)) выполнен российским автором и содержит краткое описание результатов исследований метагенома кожи, выполненных зарубежными авторами. В нем сравниваются возможности 16S и WMS-тестов, приводятся характеристики метагенома кожи при различных заболеваниях (в частности при псориазе по результатам [Fahlen 2012](#) и [Statnikov 2013](#)).

Обзор ([Ferretti 2017](#)) содержит подробное сравнение характеристик 16S- и WMS-тестов. Перечисляет преимущества WMS-тестов, содержит описание преимуществ и недостатков различных методов изоляции hDNA, оценивает работы, в которых выполнялась предварительная элиминация hDNA. В обзоре подробно рассмотрен контроль контаминации. Выполнен анализ собственного исследования (WMS-тест мазков с 4 участков кожи, взятых у 3 ЗП, [Truong 2015](#)). Описана роль

разработанного авторами ПО [MetaPhiAn2](#), которое позволяет интерпретировать результаты WMS-тестов с точностью до штамма. Некоторые из авторов этого обзора – сотрудники лаборатории [SegataLab](#), которая разработала ряд ПО, имеющих аналогичные возможности.

Обзор ([Fry 2016](#)) в большей степени является историческим, поскольку подробно описывает все исследования метагенома псориазической кожи, начиная с самых ранних.

Обзор ([Yan 2017](#)) посвящен изучению метагеномов при ПБ. В нем детально проанализированы многие из перечисленных выше работ, отмечено, что еще не определялся виром псориазической кожи. И целый раздел посвящен результатам изучения фекального метагенома при ПБ.

Обзор ([Kong 2017](#)) содержит детальную информацию о планировании любого эксперимента по определению и исследованию метагенома кожи. Рекомендации, данные в этом обзоре, несомненно, должны быть учтены при детальной подготовке проекта.

Обзор ([Niemeyer 2018](#)) содержит наиболее подробный перечень исследований метагенома кожи, выполненных при следующих заболеваниях: атопический дерматит, акне, псориаз, гидраденит, себорейный дерматит и трофическая язва.

Перечисленные выше работы (содержащие результаты собственных исследований) собраны в сводку (Таблица 6). Следом часть этой же информации дана в другом виде (Таблица 7), который демонстрирует новизну проекта.

Таблица 6. Исследования метагенома кожи. Сводка.

Пациенты	Биоматериал, (образцов)	Тест	Определение концентраций	Контроль контаминации	nhDNA (в частности bacDNA)	Работа (год, страна), примечания, ссылка на биопроект.
ПП (псориазические пациенты) и ЗП						
6 ПП, 6 ЗП	мазок (19,20)	16S	нет		bacDNA	Gao 2008 (USA), см. <i>Streptococcus</i> sp.
69 ПП, 46 ЗП	мазок	cult, PCR	да		PCR для HPV	Фомина 2009 (Russia)
10 ПП, 12 ЗП	биоптат	16S	нет	да	bacDNA	Fahlen 2012 (UK), Слайд 38. <i>Skin-bacDNA</i> , см. <i>Streptococcus</i> sp.
54 ПП, 112 ЗП	мазок	16S	нет		bacDNA	Statnikov 2013 (USA) вместе с Alekseyenko 2013 , см. <i>Streptococcus</i> sp.
54 ПП, 37 ЗП	мазок	16S	нет		bacDNA	Alekseyenko 2013 (USA) dbGaP: phs000251 Genbank: PRJNA74929 (в статье не упомянут) вместе с Statnikov 2013 , см. <i>Streptococcus</i> sp.
6 ПП, 6 ЗП, 6 AD	мазок (29)	cult, PCR	нет		DNA грибов	Jagielski 2014 (Poland)
12 ПП, 12 ЗП	пинцет, повязка	26S	да		DNA грибов	Takemoto 2015 (Japan)
?	мазок (155)	16S	нет	-	bacDNA	Tanes 2015 (USA). По результатам HMP.
28 ПП	Мазок (97)	WMS	нет	-	nhDNA	Tett 2017 (Italy), изучение штаммов Genbank: PRJNA281366 , Слайды 50. <i>Psorskin-swab-WMS-1</i> и 51. <i>Psorskin-swab-WMS-2</i>
114 ПП	Мазок (114x6x3)	16S	нет	-	bacDNA	Loesche 2018 (USA), 6 локализаций в процессе лечения устекинумабом (0,4 и 28 неделя). Слайд 52. <i>Psorskin-6</i>
Непсориазические пациенты и/или ЗП						
11 пациентов	биоптат (> 6x4)	16S	да	да	bacDNA	Nakatsuji 2013 (Japan), впервые доказано дермальное присутствие бактерий. Genbank: PRJDB716 . Слайды 39. <i>Derm-16S-1</i> , 40. <i>Derm-16S-2</i> .

Пациенты	Биоматериал, (образцов)	Тест	Определение концентраций	Контроль контаминации	nhDNA (в частности bacDNA)	Работа (год, страна), примечания, ссылка на биопроект.
15 ЗП	мазок-соскоб (263)	WMS, 16S	нет	да	nhDNA (бактерии, грибы, вирусы, археи)	Oh 2014 (USA), объединенный референсный каталог > 4000 видов, картирование на штаммы для двух видов, 16S – для контроля. dbGAP: phs000266 Genbank: PRJNA46333 Слайды 43. <i>Skin-WMS-18-1</i> , 44. <i>Skin-WMS-18-2</i> и 45. <i>Skin-WMS-18-3</i> .
2 ЗП	мазок (2x400)	16S	нет	да	bacDNA	Bouslimani 2015 (USA, Germany), 3D биогеография. Слайд 42. <i>Skin_Bacteria_3D</i> , см. <i>Streptococcus</i> sp.
16 ЗП	мазок (16x2x8)	WMS	нет	да	Отдельно вирусная DNA, отдельно вся nhDNA (бактерии, грибы, вирусы)	Hannigan 2015 (USA) Genbank: PRJNA266117
19 AtD+ пациентов, 15 SPT(-) ЗП, 5 SRT+ ЗП	клеякий диск, смыв (> 78)	WMS, 16S	нет	да	nhDNA (бактерии, грибы, вирусы)	Chng 2016 (Singapore), 16S – только для сравнения по bacDNA для нескольких пациентов, картирование на штаммы для <i>Staph.aureus</i> Genbank: PRJNA277905 Слайды 46. <i>Skin-AtD-WMS-genus</i> , 47. <i>Skin-AtD-WMS-Strep</i> , 48. <i>Skin-AtD-WMS-Staph</i> и 49. <i>Skin-AtD-WGS-Strain</i> , см. <i>Streptococcus</i> sp.
Обзорные статьи, включающие собственные результаты						
10 ЗП	мазок (10x20)	16S	нет	нет	bacDNA	Grice 2011 (USA), обзор
3 ЗП	Мазок (3x4)	WMS	нет	нет	nhDNA	Ferretti 2017 (Italy), обзор и Truong 2015 (Italy), картирование на штаммы
Проект исследования NCS1						
15 ПП	псориа-тический биоптат	WMS	да	да	nhDNA	(2019-20, Russia), предварительная элиминация hDNA. По итогам пилотного этапа будет принято решение об изоляции DNA сразу из биоптата или из предварительно изолированных фагоцитов.

Таблица 7. Исследования метагенома кожи. Факт и план.

	16S-тест (ПП и ЗП)	16S-тест (только ЗП)	WMS-тест (ПП)	WMS-тест (ЗП)
Мазок, соскоб	Gao 2008 ; Statnikov 2013 ; Takemoto 2015 (грибы, +)	Oh 2014 Bouslimani 2015 (3D); Chng 2016	Tett 2017 ; Loesche 2018	Oh 2014 , Hannigan 2015 ; Chng 2016
Биоптат	Fahlen 2012	Nakatsuji 2013 (впервые, +)	NCS1 (+)	

Примечание: + - определялась (будет определяться) концентрация.

В некоторых из работ показана повышенная распространенность *Streptococcus* sp. на коже (преимущественно видов, комменсальных для ВДП) ([Gao 2008](#), [Fahlen 2012](#), [Aleksyenko 2013](#), [Statnikov 2013](#), [Bouslimani 2015](#), [Chng 2016](#)). На слайдах 42. *Skin_Bacteria_3D* и 44. *Skin-WMS-18-2* хорошо видно, что такая распространенность у ЗП имеет место на коже лица и рук (преимущественно кистей). Это вполне ожидаемый факт, поскольку любой человек регулярно трогает (осознанно и непроизвольно) пальцами рук, тыльной стороной кистей рот. А некоторые люди смачивают кончики пальцев (например, при перелистывании страниц), при этом слюна (содержащая комменсальные для ВДП бактерии) попадает на пальцы и кисти рук, а через них на кожу лица и другие части тела.

Отметим, что у ПП повышенная распространенность *Streptococcus* sp. имеет место на всех псориатических высыпаниях независимо от их расположения. Это также объяснимо, поскольку почти каждое из псориатических высыпаний подвержено регулярному касанию пальцами рук (осознанное и непроизвольное смачивание слюной, почесывание, отшелушивание, втирание гелей и мазей и т.д.). Исключение составляют высыпания, расположенные «неудобно», например, на спине (особенно на ее верхней части), для которых касание пальцами рук происходит гораздо реже. Поскольку почти все виды из *Streptococcus* sp. (в том числе и комменсалы ВДП) предполагаются псороагенными (слайд 18. *PG_PsB-3*), то присутствие в псориатическом биоптате их *bacDNA* нерезидентного происхождения (т.е. принесенное внутри фагоцитов из кровотока) ожидаемо. Для того чтобы снизить сложность, связанную с разделением метагенома (фагоцитов) псориатической кожи на резидентное (*bacDNA* от *Streptococcus* sp. на коже) и нерезидентное подмножество (*bacDNA* из фагоцитов) желательнее выбрать такие псориатические высыпания, на которых вероятность присутствия резидентных *Streptococcus* sp. ниже.

2.4. Фагоциты кожи в норме и при псориазе

На слайдах 54. *Skin_2D* и 55. *Skin_3D* представлено пространственное распределение лейкоцитов (в т.ч. моноцитов и дендритных клеток) в здоровой коже ([Wang 2014b](#)). В псориатической коже их состав и распределение существенно отличается от нормы. На слайде 57. *Macrophages* представлено распределение CD163+ макрофагов (моноцитов) ([Fuentes-Duculan 2010](#)), а на слайде 58. *Dendritic_Cells* представлено распределение CD11c+ и CD1a+ дендритных клеток в здоровой и псориатической коже при средне-тяжелом псориазе ([Komine 2007](#), [Zaba 2009a](#)).

На слайде 56. *Phagocytes-1* собрана сводная информация о фагоцитах крови и фагоцитах псориатической кожи. Количественные характеристики фагоцитов крови в норме и при псориатической болезни отличаются незначительно. Основные отличия имеют место в псориатической коже. В здоровой коже почти все фагоциты имеют резидентное происхождение, т.е. происходят от предшественников моноцитов и дендритных клеток - резидентных дермальных стволовых клеток. Но в псориатическом высыпании ситуация иная - до 80% фагоцитов имеют нерезидентное происхождение, т.е. либо они привлечены из кровотока, либо произошли от клеток, привлеченных из кровотока. Это все нейтрофилы и до 70% моноцитов-макрофагов и дендритных клеток. Как показывают расчеты, их концентрация в верхнем слое кожи толщиной 0,5 мм достигает ~ 41000 шт/мм³. Около 45% фагоцитов составляют нейтрофилы, около 35% - моноциты (макрофаги) и до 20% - дендритные клетки. Процентное соотношение между типами фагоцитов в псориатической коже определяется увеличением среднего времени жизни макрофагов и особенно дендритных клеток по сравнению этими же величинами для фагоцитов крови ([Kabashima 2016](#), [Gaspari 2017](#)).

В приложении (раздел 5.2) подробно проанализирована роль нейтрофилов в YN-модели патогенеза псориаза. Поэтому в рамках проекта предстоит определить и изучить метагеномы всех фагоцитов, а не только моноцитов (макрофагов) и дендритных клеток. Будут определены метагеном цельной крови (подавляющую часть которого составляет метагеном фагоцитов) и метагеном (фагоцитов) псориатической кожи.

2.5. Комплексное изучение метагенома цельной крови и метагенома (фагоцитов) псориатической кожи

Y-модель и YN-модель предполагают, что специфические бактериальные продукты, находящиеся внутри фагоцитов крови, поступают вместе с ними в псориатическую кожу и поддерживают воспалительный процесс. Это предположение сформулировано для Y-модели в виде гипотезы H10 (только для толеризованных моноцитов и дендритных клеток) (Дополнение S6, раздел 5.12) и в виде дополненной гипотезы HN10 для YN-модели, в которой речь идет и о нейтрофилах тоже (Таблица 2, слайд 27. *NCS1_Hypo*, раздел 5.2).

В рамках проекта предстоит доказать или опровергнуть гипотезу HN10-S, которая представляет собой расширение гипотезы HN10 (Таблица 2, слайды 28. *Biotransfer* и 29. *HN10-S*). Гипотеза HN10-S предполагает, что недеградированный нехозяйский биоматериал перемещается в псориатическую кожу внутри фагоцитов крови (в рамках гипотезы HN10 конкретизированы и фагоциты, и бактериальные продукты, ответственные за поддержку псориатического воспаления). Доказательство гипотезы HN10-S будет основано на комплексном изучении метагенома цельной крови и метагенома (фагоцитов) псориатической кожи. Обнаружение в метагеноме (фагоцитов) псориатической кожи *phDNA*, имеющей нерезидентное происхождение, т.е. поступившей в кожу внутри фагоцитов крови, будет прямым доказательством гипотезы HN10-S и серьезным фактом в поддержку гипотезы HN10.

На слайде 29. *HN10-S* детализирована схема предполагаемого поступления нехозяйского биоматериала (в т.ч. *phDNA*, LPS и PG) в псориатическую кожу внутри фагоцитов крови. Фагоциты

псориазической кожи (независимо от их происхождения) эндоцитируют hDNA, LPS, PG и другой нехозяйский биоматериал резидентного происхождения (т.е. от любых микроорганизмов, живущих на коже и в коже). При этом внутри фагоцитов крови предположительно сохраняется недеградированный нехозяйский биоматериал ранее эндоцитированный в крови. hDNA резидентного и нерезидентного происхождения можно отличить с помощью комплексного изучения метагенома цельной крови и метагенома (фагоцитов) псориазической кожи. К сожалению это невозможно сделать для другого (отличного от hDNA) нехозяйского биоматериала. Предполагается определить концентрацию hDNA и оценить концентрацию другого нехозяйского биоматериала нерезидентного происхождения в псориазической коже (в первую очередь пептидов – предполагаемых Y-антигенов) (раздел 5.5).

Предполагаемая схема влияния метагенома цельной крови на метагеном (фагоцитов) псориазической кожи в динамике изображена на слайде 73. *2Pools-D*, а на слайде 74. *2Pools-S* изображен мгновенный срез для стабильного псориазического пятна и предложены формулы, определяющие это влияние. Подробно это рассмотрено в Приложении S5 (раздел 5.12).

Для того чтобы обнаружить это влияние выполняются два независимых WMS-теста. Исходным биоматериалом для них является цельная кровь и (фагоциты) псориазической кожи, соответственно. Псориазический биоптат в стерильных условиях преобразуется в клеточную суспензию, из которой иммуномагнитным способом изолируются все фагоциты (нейтрофилы, моноциты и дендритные клетки) (слайд 77. *Phagocytes selection*) (альтернатива – изоляция всей DNA сразу из биоптата). Затем выполняется максимальная элиминация hDNA и выполняется WMS-тест, после чего аналитически исключаются риды, принадлежащие hDNA. Принадлежность остальных ридов определяется с точностью до вида с применением [NCBI RefSeq](#) (референсной геномной БД) ([Grumaz 2016](#)). Для части ридов не удается найти подходящий геном, однако множество картированных ридов, как правило, достаточно большое для того, чтобы выполнить детальное изучение метагенома.

На основе обработки информации по картированным ридам формируются два перечня представленности видов hDNA: MB – метагеном цельной крови и MPS – метагеном (фагоцитов) псориазической кожи.

Все, что предполагается делать только с результатами по MB, описано в разделах 2.1 и 3.2 (Задачи T2 и T3). Далее речь идет про интерпретацию и изучение результатов по MPS и MB в комплексе.

Простое сравнение с MB сразу позволяет разделить MPS на две фракции: R – резидентную и M – общую. Если конкретной hDNA из MPS нет в MB, то она сразу включается в фракцию R (слайд 75. *nhDNA-MPS*). Дальнейшее разделение общей фракции M на нерезидентную N и смешанную RuN фракции происходит алгоритмически (Дополнение S4, раздел 5.12).

Перечислим возможные причины существования смешанной фракции RuN:

- контаминация биоматериала крови кожным микробиомом во время венепункции;
- транспорт микроорганизма и/или его hDNA из кожи в кровь во время травмы и/или инфекционного воспаления дермы;
- наличие в микробиоме кожи и ЖКТ (ВДП) идентичных штаммов;
- картирование различных видов на один референсный;

Чтобы снизить размер смешанной фракции RuN кожные биоптаты рекомендуется брать с тех частей тела, на которые вероятность переноса микробиома ЖКТ (ВДП) минимальна (т.е. исключается лицевая кожа вокруг носа и рта, кожа кистей, кожа вблизи ануса и т.п.). При этом также следует учесть информацию о биогеографии *Streptococcus* sp. (раздел 2.3)

В результате комплексного изучения метагеномов будут получены ответы на поставленные вопросы (раздел 3.3). Итоговая ценность результатов проекта в целом зависит от того какие ответы будут получены.

3. Цели, задачи и основные вопросы

3.1. Цели

Цели	Задачи	Слайды
Изучение подпроцессов, лежащих в основе системного псориазического процесса. Определение роли макромолекулярной тонкокишечной проницаемости в патогенезе ПБ. Определение роли метагенома цельной крови в патогенезе ПБ. Определение роли PAMP-немии в патогенезе ПБ. Проверка базовых гипотез системной модели патогенеза псориазической болезни (H1-1, H2 и HN3).	T1,T2, T3	22. <i>SPPN-PAMP-nemia</i> 23. <i>SPPN</i> 27. <i>NCS1_Hypo</i>
Комплексное изучение метагенома цельной крови и метагенома (фагоцитов) псориазической кожи. Изучение поступления nhDNA из системного кровотока в псориазическую кожу. Получение фактов в поддержку гипотезы HN10 (HN10-S).	T1,T2, T4,T5	27. <i>NCS1_Hypo</i> 28. <i>Biotransfer</i> 29. <i>HN10-S</i> 75. <i>nhDNA-MPS</i>
Подведение итогов и подготовка к проведению NCS2 - второго этапа проекта (диагностико-лечебного).	Все	

Для достижения этих целей необходимо решить задачи (раздел 3.2) и получить ответы на вопросы (раздел 3.3).

Выполнение проекта NCS1 разделено на несколько этапов (слайд 84. *Part_Order_NCS1.*) На начальном этапе помимо сбора информации о ПП - кандидатах на участие в проекте и осуществления отбора, необходимо обеспечить разработку, формирование и апробацию ИЭМК (самостоятельно или в рамках приобретенного Программного обеспечения), специализированную для ПП. Вся информация (Анкета, результаты обследований и тестов) будет храниться в ИЭМК. Участники будут иметь доступ только к своей ИЭМК, специалисты будут иметь доступ ко всем ИЭМК.

3.2. Задачи

Таблица 8. Задачи.

Задачи T1 (практические – пилотный этап).	Примечания
T1.1. Оптимизация подготовки пациентов перед сдачей крови (питание в предшествующие дни и утром дня сдачи). Это необходимо для достижения максимальной суммарной концентрации bacDNA резидентного тонкокишечного микробиома в цельной крови и псориазической коже.	Позволит точнее и дешевле определять минорные виды метагенома цельной крови. Позволит включать большее количество образцов в библиотеку на один запуск производительного секвенатора и/или выполнять секвенирование на менее производительном секвенаторе.
T1.2. Оптимизация времени забора постпрандиальной крови (после окончания стандартного завтрака). Это необходимо для достижения максимальной суммарной концентрации bacDNA резидентного тонкокишечного микробиома в цельной крови.	
T1.3. Выбор стандартного тест-набора и оптимизация пробоподготовки и протокола по изоляции DNA из цельной крови. Это необходимо для обеспечения максимальной суммарной представленности bacDNA после выполнения протокола. Критерии: минимальный уровень контаминации реагентов (задача T1.6), параметры фрагментации DNA (медиана и девиация распределения).	(раздел 5.10, п.6)

<p>T1.4. Оптимизация протокола по элиминации hDNA из образцов цельной крови для максимального увеличения суммарной представленности bacDNA. В том числе оптимизация обработки образцов:</p> <p>T1.4.1. Изучение фрагментного распределения bacDNA (медиана и девиация) в DNA-образцах. Определение возможности эффективного фракционного обогащения bacDNA путем выделения (всей или части) низкомолекулярной фракции из DNA-образцов крови (вместо применения NME).</p> <p>T1.4.2. При неэффективности фракционного обогащения (T1.4.1) отработка удаления фракций размером ≤ 15 KB (подготовка DNA-образцов к применению NME). Оптимизация применения NME.</p>	<p>Для крови и NTC. (раздел 5.8).</p>
<p>T1.5. Разработка bacDNA-теста - нового способа определения макромолекулярной тонкокишечной проницаемости по отношению между концентрациями bacDNA в цельной крови, взятой постпрандиально (через фиксированное время после окончания стандартного завтрака) и натощак.</p>	<p>(раздел 5.10, п.8) Позволит определять макромолекулярную тонкокишечную проницаемость новым способом, причем одновременно с определением метагенома цельной крови</p>
<p>T1.6. Определение соотношения между максимальной суммарной концентрацией bacDNA в DNA-образцах NTC и средней суммарной концентрацией bacDNA в DNA-образцах крови. Это необходимо для принятия мер (при необходимости) по изменению протокола и/или по снижению уровня контаминации во время основного этапа проекта.</p>	<p>(раздел 5.7)</p>
<p>T1.7. Определение темпов деградации bacDNA в фагоцитах цельной крови. Способ - измерение концентрации bacDNA в одном образце цельной крови, предварительно разделенном на несколько равных частей. Измерение выполняется для каждой части независимо после того как она пробудет определенное время при температуре 37 C. Это позволит подготовить оптимальный протокол изоляции DNA из биоптатов псориазической кожи (непосредственно из них или из предварительно изолированных фагоцитов кожи). Протокол должен обеспечить максимальную суммарную представленность bacDNA нерезидентного происхождения в DNA-образцах кожи.</p>	<p>Если фракционное обогащение окажется успешным (задача T1.4.1), то данную задачу решать не понадобится. Поскольку оптимальным протоколом окажется изоляция DNA из биоптата кожи и последующее фракционное обогащение bacDNA (подробнее раздел 5.11).</p>

Задачи Т2 (практические). Определение МВ - метагенома цельной крови. Определение уровня РАМР-немии. Определение макромолекулярной тонкокишечной проницаемости.	Примечания
<p>T2.1. Разработка и применение полного метагеномного секвенирования (WMS) для обнаружения всего состава phDNA в цельной крови с точностью до вида, т.е. определение МВ – метагенома цельной крови. В том числе</p> <p>T2.1.1. Применение стандартного тест-набора для изоляции всей DNA (выбранного по итогам решения задачи T1.3).</p> <p>T2.1.2. Подготовка DNA-образцов: элиминация hDNA для максимального увеличения суммарной представленности bacDNA (протокол определен по итогам решения задачи T1.4).</p> <p>T2.1.3. Определение концентраций всей DNA и bacDNA.</p> <p>T2.1.4. Формирование библиотеки для DNA-образцов крови и DNA-образцов NTC.</p> <p>T2.1.5. Полное метагеномное секвенирование (WMS-тест) библиотеки с необходимым объемом выдачи (total output).</p>	<p>Для крови и NTC. Аналогична задаче T4.2.</p>
<p>T2.2. Определение концентрации каждой phDNA, обнаруженной в DNA-образцах по результатам WMS-теста.</p>	<p>Для крови и NTC. (раздел 2.2 и Дополнение S2, раздел 5.12)</p>
<p>T2.3. Определение Qsimp - макромолекулярной тонкокишечной проницаемости (OVA-тест или bacDNA-тест).</p>	<p>(раздел 5.10, п.8)</p>
<p>T2.4. Определение Qlpsb - концентрации LPS в биоматериале с помощью одного из стандартных тестов.</p>	<p>(раздел 5.6)</p>
<p>T2.5. Определение Qsum – концентрации PG с помощью одного из стандартных тестов.</p>	<p>(раздел 5.6)</p>

Задачи Т3 (аналитические). Изучение МВ – метагенома цельной крови, РАМР-немии и макромолекулярной тонкокишечной проницаемости по отдельности и в комплексе. Проверка гипотез H1-1, H2 и HN3.	Примечания
<p>T3.1. Определение соотношений между максимальной суммарной концентрацией bacDNA в DNA-образцах NTC и средней суммарной концентрацией bacDNA в DNA-образцах крови на основных шагах выполнения протокола.</p>	<p>На шагах ST1-ST2, ST1-ST3 и ST1-ST4 эти соотношения не должны превышать 0,05-0,1% (контроль во время выполнения протокола) (раздел 5.7).</p>
<p>T3.2. Изучение метагенома NTC. По результатам WMS-тестов для DNA-образцов NTC выявление мажорных контаминантов.</p>	
<p>T3.3. Коррекция МВ – метагенома цельной крови по результатам решения задач T3.1 и T3.2. Осуществляется по мажорным контаминантам и видам, чья концентрация в МВ оказалась такая же или ниже, чем максимальная суммарная концентрация bacDNA в DNA-образцах NTC.</p>	
<p>T3.4. Определение Qminus – суммарной концентрации bacDNA Gram(-) видов (ответственных за LPS-нагрузку).</p>	

<p>T3.5. Определение Qlpsm – суммарной концентрации bacDNA видов, ответственных за TLR4-активную LPS-нагрузку.</p> <p>При достаточном покрытии – путем определения генов, ответственных за TLR4 активность LPS. Вычисление Qlpsm (возможно с применением коэффициентов TLR4-активности).</p> <p>Согласование Qminus, Qlpsm и Qlpsb (см. задачу T2.4)</p>	<p>При недостаточном покрытии - определение Qlpsm через представленность родов (genus), почти все виды которых имеют гены LpxM и LpxL (лист «2017 LpxM Genus», Дополнение С, раздел 5.12).</p>
<p>T3.6. Определение Qplus – суммарной концентрации bacDNA Gram+ видов (ответственных за PG-нагрузку). Согласование Qplus и Qrgb (см. задачу T2.5).</p>	
<p>T3.7. Определение Qpsb - суммарной концентрации bacDNA всех видов, имеющих межпептидные мостики IB-Y.</p> <p>При достаточном покрытии - через определение наличия генов MurM, MurN, ответственных за образование в пептидогликане межпептидных мостиков IB-Y. Виды, имеющие эти гены (оба одновременно), предполагаются псоразными.</p>	<p>При недостаточном покрытии - использовать Qpsb - информацию о представленности заранее определенных видов (раздел 5.4). При этом теряется возможность определить новые псоразные виды, а также разбиение видов на штаммы в зависимости от наличия генов MurM, MurN.</p>
<p>T3.8. Поиск прямой корреляции между Qsimp – макромолекулярной тонкокишечной проницаемостью и тяжестью ПБ по PASI. Сравнение Qsimp у ПП и ЗП. Проверка гипотезы H1-1.</p>	<p>Обнаружение корреляции Qsimp с тяжестью ПБ и его превышения у ПП (по сравнению с ЗП) подтвердит H1-1 - одну из основных гипотез системной модели патогенеза.</p>
<p>T3.9. Поиск прямых корреляций между концентрациями в крови bacDNA: Qminus (Gram(-) видов), Qlpsm (Gram(-) TLR4-активные видов), Qplus (Gram(+) видов) и Qpsb (предполагаемых псоразными видов) и тяжестью ПБ по PASI. Сравнение этих параметров у ПП и ЗП. Метагеномная проверка гипотез H2 и HN3.</p>	<p>Обнаружение корреляций с тяжестью ПБ и их превышения у ПП (по сравнению с ЗП) подтвердит H2 и HN3 - основные гипотезы системной модели патогенеза.</p>
<p>T3.10. Поиск прямых корреляций между параметрами Qlpsb, Qrgb и тяжестью ПБ по PASI. Сравнение этих параметров у ПП и ЗП. Биохимическая проверка гипотезы HN3.</p>	<p>Обнаружение корреляций с тяжестью ПБ и их превышения у ПП (по сравнению с ЗП) подтвердит HN3 - одну из гипотез системной модели патогенеза.</p>
<p>T3.11. Поиск комплексных корреляций совокупности перечисленных выше параметров (а также, возможно, других) с тяжестью ПБ по PASI при решении задач T3.8, T3.9 и T3.10.</p> <p>Во-первых, согласно YN-модели патогенеза тяжесть SPPN определяется несколькими параметрами (Пример 1). Во-вторых – а если YN-модель потребует корректировки с учетом полученных результатов? Например, обнаружится корреляция тяжести ПБ с концентрацией bacDNA Staph.aures в цельной крови? (Пример 2).</p>	<p>Пример 1. Одна и та же тяжесть ПБ возможна при (большой Qpsb + малые Qlpsm и Qlpsb) и при (малый Qpsb + большие Qlpsm и Qlpsb). Пример 2. Staph.aures ухудшает тяжесть ПБ в случае его присутствия на высыпаниях. Но его пептидогликан не подобен пептидогликану Str.pyogenes и не содержит предполагаемый Y-антиген...</p>
<p>T3.12. Определение пластома в метагеноме цельной крови. Виды пластома - основа для нерезидентной фракции MPS (задачи T5.4 и T5.5).</p>	<p>(раздел 5.9)</p>

Задачи Т4 (практические). Определение MPS - метагенома (фагоцитов) псориазической кожи.	Примечания
Т4.1. Разработка и применение иммуномагнитного метода изоляции фагоцитов из псориазической кожи (раздел 5.11).	См. задачу Т1.7 - от ее решения зависит - нужно будет или нет решать эту задачу.
<p>Т4.2. Разработка и применение полного метагеномного секвенирования (WMS) для обнаружения всего состава phDNA (фагоцитов) псориазической кожи с точностью до вида, т.е. определение MPS. В том числе</p> <p>Т4.2.1. Применение протокола формирования DNA-образцов кожи, при котором суммарная представленность bacDNA нерезидентного происхождения будет максимальной.</p> <p>Т4.2.2. Подготовка DNA-образцов: элиминация hDNA для максимального увеличения суммарной представленности bacDNA.</p> <p>Т4.2.3. Определение концентраций всей DNA и bacDNA.</p> <p>Т4.2.4. Формирование библиотеки для DNA-образцов кожи и DNA-образцов NTC.</p> <p>Т4.2.5. Полное метагеномное секвенирование (WMS-тест) библиотеки с необходимым объемом выдачи (total output).</p>	Для кожи и NTC. Аналогична задаче Т2.1.
Т4.3. Определение концентраций каждой phDNA, обнаруженной в метагеноме (решается также как и задача Т2.2).	Для кожи и NTC.

Задачи Т5 (аналитические). Изучение MB - метагенома цельной крови и MPS – метагенома (фагоцитов) псориазической кожи в комплексе. Проверка гипотезы HN10-S.	Примечания
Т5.1. Определение соотношений между максимальной суммарной концентрацией bacDNA в DNA-образцах NTC и средней суммарной концентрацией bacDNA в DNA-образцах кожи на основных шагах выполнения протокола.	На шагах ST1.4, ST2.2 и ST2.4 эти соотношения не должны превышать 0,05-0,1% (контроль во время выполнения протокола) (разделы 3.2.1, 5.7).
Т5.2. Изучение метагенома NTC. По результатам WMS-тестов для DNA-образцов NTC выявление мажорных контаминантов.	(раздел 5.7).
Т5.3. Коррекция MPS – метагенома (фагоцитов) псориазической кожи по результатам решения задач Т5.1 и Т5.2. Осуществляется по мажорным контаминантам и видам, чья концентрация в MPS оказалась такая же или ниже, чем максимальная суммарная концентрация bacDNA в DNA-образцах NTC.	
Т5.4. Определение пластома в MPS - метагеноме (фагоцитов) псориазической кожи. Виды пластома - основа для выявления N - нерезидентной фракции MPS (задача Т5.5).	Общая с задачей Т3.12. (раздел 5.9)

<p>T5.5. Комплексное изучение MB - метагенома цельной крови и MPS – метагенома (фагоцитов) псориатической кожи. Определение фракций MPS: R – резидентной и M – общей. Разделение общей фракции на N - нерезидентную и RuN - смешанную. Определение представленности и концентраций hDNA в каждой фракции.</p> <p>Определение представленности и концентраций bacDNA патогенных и предполагаемых псориатическими бактериями резидентного и нерезидентного происхождения в каждой фракции. Проверка гипотезы HN10-S. (слайды 28. <i>Biotransfer</i>, 29. <i>HN10-S</i> и 75. <i>hDNA-MPS</i>).</p>	<p>Обнаружение и определение характеристик N – нерезидентной фракции (а также всего нерезидентного подмножества в MPS) подтвердит гипотезу HN10-S (и косвенно HN10). (Дополнения S4 и S5, раздел 5.12)</p>
<p>T5.6. Поиск и изучение корреляций между тяжестью ПБ и параметрами, характеризующими составы и концентрации bacDNA в MB и MPS.</p>	
<p>T5.7. Аналогичный подход при обнаружении существенной концентрации небактериальной hDNA (архей, грибов, растений, гельминтов, вирусов и т.д.) в MPS.</p>	<p>Виром псориатической кожи ранее не изучался (Yan 2017).</p>
<p>Задачи Т6 (итоговые). T6.1. Статистический анализ и оценка результатов. T6.2. Подготовка отчета. T6.3. Подготовка и публикация статей. T6.4. Доработка и подготовка второго этапа проекта (диагностико-лечебного).</p>	

3.2.1. Порядок решения задач

Ниже перечислены последовательные шаги (ST), которые предстоит реализовать для решения перечисленных выше задач.

ST1. Формирование DNA-образцов (и определение их характеристик) путем изоляции DNA из

ST1.1. Цельной крови (задачи T1.3 и T2.1.1)

ST1.2. Псориатической кожи (из фагоцитов или из биоптата в целом – решение после пилотного исследования) (задачи T1.4.1, T1.7 и T4.2.1)

ST1.3. NTC (для оценки контаминации через все протоколы необходимо пропустить несколько NTC) (задачи T2.1 и T4.2)

ST1.4. Определение концентраций всей DNA и bacDNA. Концентрацию bacDNA - например, с помощью [Femto Bacterial DNA Quantification Kit](#). (задачи T2.1.3 и T4.2.3)

ST2. Обогащение hDNA в DNA-образцах (повышение представленности)

(задачи T2.1.2, T4.2.2, T2.1.3, T4.2.3)

ST2.1. Подготовка к применению NME ([NebNext microbiome enrichment](#)):

удаление фракций DNA, имеющих размер ≤ 15 KB

(разделение фракций с помощью электрофореза на агарозном геле).

ST2.2. Определение концентраций всей DNA и bacDNA

ST2.3. Максимальная элиминация hDNA с помощью NME.

ST2.4. Определение концентраций всей DNA и bacDNA.

В случае успешной разработки фракционного обогащения hDNA на пилотном этапе (задача T1.4.1) вместо шагов ST2.1, ST2.2 и ST2.3 будет только один шаг:

ST2.1N. Фракционное обогащение hDNA в DNA-образцах (электрофорез на агарозном геле).

ST3. Обеспечение низкого уровня контаминации на ST1.4, ST2.2 и ST2.4 (отношение максимальной концентрации bacDNA в NTC к среднему уровню концентрации bacDNA в образцах крови и кожи), не выше чем 0,05-0,1%. (задачи T3.1 и T5.1).

ST4. Формирование библиотек для полного метагеномного секвенирования

ST4-1. Для DNA-образцов (крови и NTC) (задача T2.1.4).

ST4-2. Для DNA-образцов (кожи и NTC) (задача T4.2.4).

ST5. Полное метагеномное секвенирование с необходимым объемом выдачи (total output).

Два последовательных запуска секвенатора:

ST5.1. Для библиотеки ST4-1 (задача T2.1.5)

ST5.2. Для библиотеки ST4-2 (задача T4.2.5).

Необходимые объемы выдачи определяются по итогам пилотного этапа.

Во время пилотного этапа выполняются только шаги ST1-ST3 для образцов крови ПП и NTC, т.е. без формирования библиотек и секвенирования. При этом должны быть решены все задачи T1.

3.3. Основные вопросы

Таблица 9. Вопросы и ответы.

Вопросы	Возможные ответы	Информация
Q1.1. Коррелирует ли тяжесть ПБ с концентрацией каких-либо nhDNA в цельной крови? (85. Stage1-Q1)	Да - Прямое подтверждение гипотезы H2 и возможно HN3. Нет – Прим. 1.1.	Задачи T3.6 и T3.8.
Q1.2. Коррелирует ли тяжесть ПБ с уровнем PAMP-немии? (85. Stage1-Q1)	Да - Прямое подтверждение гипотезы HN3. Нет – Прим. 1.2.	Задачи T3.7 и T3.8.
Q1.3. Коррелирует ли тяжесть ПБ с повышенной макромолекулярной тонкокишечной проницаемостью?	Да - Прямое подтверждение гипотезы H1-1. Нет – Прим. 1.3.	Задача T3.5.
Q2.1. Поступает ли недеградированная nhDNA из крови в псориагическую кожу? (86. Stage1-Q2) Другая формулировка этого же вопроса: Обнаружена ли N - нерезидентная фракция MPS – метагенома (фагоцитов) псориагической кожи? (слайды 75. nhDNA-MPS и 76. MPS-example)	Да - Факт доказывает гипотезу HN10-S и поддерживает гипотезу HN10. Нет – Прим. 2.1.	Задача T5.2.
Вопросы Q2.2-Q2.3 имеют смысл только в случае ответа «Да» на вопрос Q2.1.		
Q2.2. Что собой представляет нерезидентная фракция N, каков ее состав и представленность в MPS? Состав фракции N подобен составу фракции MB? Коэффициент вариации для фракции N < 1/3 (т.е. распределение однородно?)	Да - Факт поддерживает гипотезу HN10. Нет – Прим 2.2.	(Дополнения S4 и S5, раздел 5.12)
Q2.3. Есть ли bacDNA видов предполагаемых псориагическими и/или патогенными бактерий в нерезидентной фракции N? В каких концентрациях?	Да - Факт поддерживает гипотезы H2 и HN3; Нет - Прим.2.3.	

Примечания (Таблица 9)

1.1.1. Вероятность отрицательного ответа на Вопрос Q1.1 существует, поскольку работ, в которых бы определялась концентрация bacDNA в цельной крови очень мало (раздел 2.2). Все они проводились с применением 16S-теста (который не позволяет определить виды бактерий, а информация по родам бактерий имеет существенную погрешность). И только в одной из них ([Okubo 2002](#), слайд 31. *Okubo*) были псориагические пациенты, а в качестве биоматериала использовались моноциты крови (но метагеном не изучался).

1.1.2. Отрицательный ответ на Вопрос Q1.1. возможен, если для большинства ПП максимальная из концентраций *bacDNA* (патогенных и/или предполагаемых псоррагенными видов) в цельной крови оказалась такой же или ниже, чем уровень контаминации. В этой ситуации необходимо принять меры для снижения уровня контаминации и заново выполнить весь протокол (раздел 5.10).

1.1.3. Возможно искать корреляции тяжести ПБ нужно для тех же самых параметров усредненного МВ – метагенома цельной крови, определенного по смеси нескольких образцов крови, взятых у пациента в течение некоторого периода? Подробнее в Дополнение S3 (раздел 5.12).

1.1.4. Отрицательный ответ на Вопрос Q1.1 возможен, если произошло маловероятное событие. А именно: в группе ПП, включенных в проект, случайно оказались ПП с очень высоким GRS ([genetic risk score](#)) - полигенным риском возникновения псориоза. PASI таких ПП в большей степени зависит от генетической предрасположенности, чем от концентрации бактериальных продуктов патогенных и/или предполагаемых псоррагенных бактерий в цельной крови (т.е. имеет место сильная реакция даже на малые их концентрации). Есть несколько методик подсчета GRS, зависящих от выбранного набора генов и оценки их роли в патогенезе ПБ ([Kisiel 2017](#), [Tsoi 2017](#)). Результаты исследований и, как следствие, методика подсчета GRS зависят от региона проживания (в РФ подсчеты GRS для ПП никогда не проводились). Известно, что есть корреляция между несколькими SNP ([Single nucleotide polymorphism](#)) и тяжестью ПБ, однако для GRS такой корреляции не выявлено ([Nikamo 2015](#), [Yin 2015](#)).

В этой ситуации возможно следующее решение:

- Выбрать методику расчета GRS (например, такую, которую применяет [23andMe](#)).
- Адаптировать ее к информации о роли генов для ПП в РФ ([Кубанов 2014](#)).
- Определить GRS для всех ПП.
- Попытаться обнаружить корреляцию между PASI и сочетанными параметрами: GRS и суммарными концентрациями *bacDNA* патогенных и/или предполагаемых псоррагенными видов в цельной крови (фактически повторно решать задачу T3.8 добавив еще один параметр GRS).

1.1.4. Если уровень контаминации не превысил допустимый (п.1.1.2) и попытка учесть параметр GRS (п.1.1.3) не привела к успеху, то необходимо попытаться откорректировать YN-модель патогенеза (в части гипотез H2 и HN3), основываясь на полученных результатах. Эта корректировка должна либо обеспечить положительные ответы на Вопросы Q1.1 и Q1.2, либо дать убедительные объяснения, почему эти ответы (один или оба) оказались отрицательными.

1.2. Отрицательный ответ на Вопрос Q1.2 практически невозможен, поскольку в нескольких работах с достаточно большим контингентом ПП и ЗП были получены результаты, которые предполагают только положительный ответ ([Гараева 2007](#), [Гумаюнова 2009a](#), [Гумаюнова 2009b](#), [Гумаюнова 2009c](#)). См. также слайды 9. *SIBO-2*, 10. *SIBO_Moscow*.

1.3. Отрицательный ответ на Вопрос Q1.3 маловероятен, поскольку в нескольких работах с достаточно большим контингентом ПП и ЗП были получены результаты, которые предполагают положительный ответ ([Рудковская 2003](#), [Стенина 2004](#), [Харьков 2005](#), [Харьков 2006](#), [Харьков 2008](#)), см. также слайд 7. *Permeability-2*.

2.1.1. Отрицательный ответ на Вопрос Q2.1 возможен, если для большинства ПП максимальная из концентраций *bacDNA*, поступивших из крови в псориатическую кожу (внутри фагоцитов крови) оказалась такой же или ниже, чем уровень контаминации. Если уровень контаминации превысил допустимый, то необходимо принять меры для снижения уровня контаминации и заново выполнить весь протокол.

2.1.2. Если уровень контаминации не превысил допустимый, то должна быть сделана попытка откорректировать YN-модель патогенеза (в части гипотезы HN10), основываясь на полученных результатах. Эта корректировка должна либо обеспечить положительный ответ на Вопрос Q2.1, либо дать убедительное объяснение, почему этот ответ оказался отрицательным.

Порядок действий для вопросов Q1.1, Q1.2 и Q2.1 проиллюстрирован на слайде 87. *Stage1-Q1&2*.

2.2. Возможно состав фракции N необходимо сравнивать с усредненным МВ – метагеномом цельной крови, определенным по смеси нескольких образцов крови, взятых у пациента в течение некоторого предшествующего (забору биоптата кожи) периода? Подробнее в Дополнение S3 (раздел 5.12).

2.3. Слишком малая выборка (2-3 биоптата от ПП)? Присутствие *bacDNA* конкретного вида в небольшой выборке может не коррелировать с присутствием LPS, PG и PG-Y. В этом случае нужно

брать у одного ПП больше биоптатов с нескольких характерных мест (5-10 биоптатов). Все биоптаты от одного ПП изучаются как один биоматериал.

4. Научная новизна

Научная новизна проекта NCS1 заключается в проверке основных гипотез системной YN-модели патогенеза ПБ. Причем для этого будут использованы новейшие методы исследования: полное метагеномное секвенирование цельной крови и (фагоцитов) псориатической кожи, а также и определение макромолекулярной тонкокишечной проницаемости bacDNA-тестом (слайд 88. *Stage1-new* и Таблица 10). Новизна проекта также определена путем сравнения (Таблица 4, Таблица 7).

Таблица 10. Исследования, которые будут выполнены впервые.

Наименование	Пациенты	Примечание
Определены параметры фрагментного распределения bacDNA, содержащихся в DNA-образцах из цельной крови.	ПП и ЗП	Впервые
Определен метагеном цельной крови методом полного метагеномного секвенирования.	ПП и ЗП	Впервые.
Определен пластом цельной крови (как часть ее метагенома).	ПП и ЗП	Впервые
Определен метагеном (фагоцитов) псориатической кожи методом полного метагеномного секвенирования (в том числе его нерезидентная фракция).	ПП	Впервые.
Определена концентрация phDNA в цельной крови.	ПП и ЗП	Впервые для ПП.
Определена концентрация phDNA (фагоцитов) псориатической кожи (в том числе их нерезидентной фракции).	ПП	Впервые для ПП.
Выполнено комплексное изучение метагеномов цельной крови и (фагоцитов) псориатической кожи.	ПП	Впервые.
Определена макромолекулярная тонкокишечная проницаемость bacDNA-тестом.	ПП и ЗП	Впервые
Определена концентрация основных PAMP в крови.	ПП и ЗП	Для PG – впервые.

Успешная реализация NCS1 (первого диагностического этапа проекта) создаст предпосылки для реализации NCS2 (второго диагностико-лечебного этапа проекта): “Разработка и применение методики лечения ПБ, основанной на стабильной корректировке микробиомов тонкой кишки и зева, макромолекулярной проницаемости тонкой кишки, с целью достижения долгосрочной и стабильной ремиссии”. Поскольку это и является целью проекта в целом.

5. Приложения

5.1. Сокращения и термины

Сокращение или термин	Description	Описание
ВДП	URT - Upper Respiratory Tract	Верхние дыхательные пути
БД	DB - Data Base	База данных
ЖКТ	GIT - Gastro-Intestinal Tract	Желудочно-кишечный тракт
ЗП	HP - Healthy person	Здоровая Персона
ИЭМК	ИЕМС - Integrated Electronic Medical Card	Интегральная Электронная Медицинская Карта
Метагеном	Metagenome. Set of all nhDNA (non-host DNA, i.e. in this project of non-human), contained in biomaterial.	Совокупность всех nhDNA (нехозяйских DNA, т.е. в данном проекте нечеловеческих), содержащихся в биоматериале.
ПБ	PD - Psoriatic disease	Псориатическая болезнь
ПП	PP - Psoriatic patient	Псориатический пациент
ПО	Software	Программное обеспечение
Представленность	Representation. Relative presence (percentage share) something in biomaterial (sample).	Относительное присутствие (процентная доля) чего-либо в биоматериале (образце).
СВНД	SVLD - Sterile variant of low-microbial diet (section 5.12).	Стерильный вариант низкомикробной диеты (раздел 5.12).
СИБР	SIBO - Small intestine bacterial overgrowth. Excess of total bacteria concentration over norm and/or pathogens presence in biomaterial. As biomaterial there can be smears, scrapes from mucous or aspirate.	Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке. Превышение суммарной концентрации бактерий над нормой и/или присутствие патогенов в биоматериале. В качестве биоматериала могут быть мазки, соскобы со слизистой или аспират.
АМР	Antimicrobial proteins (peptides)	Антимикробные протеины (пептиды)
bacDNA	Bacterial DNA	Бактериальная DNA
BC	Buffy coat . The fraction of leukocytes and platelets which is formed between erythrocytes and plasma after whole blood fractionation.	Лейкоцитарная пленка . Фракция лейкоцитов и тромбоцитов, образующаяся между эритроцитами и плазмой при фракционировании цельной крови.
DC	Dendritic cells	Дендритные клетки
DC-Y	(PG-Y)+DC Dendritic cells repleted by PG-Y	(PG-Y)+DC Дендритные клетки наполненные PG-Y
DC-T	• Tolerized DC.	Толеризованные DC.
DC-R	• Dendritic cells, which reprogrammed (tolerized) and repleted by PG-Y are subfraction of tolerized fraction DC-T.	Перепрограммированные (толериованные) и наполненные PG-Y дендритные клетки являются подфракцией толеризованной фракции DC-T.
IB-Y	Interpeptide bridges of peptidoglycan Str. pyogenes: (L-Ala)-(L-Ala) or (L-Ser)-(L-Ala).	Межпептидные мостики пептидогликана Str. pyogenes: (L-Ala)-(L-Ala) или (L-Ser)-(L-Ala).
hDNA	Host DNA (in this project human DNA)	Хозяйская DNA (в данном проекте – человеческая)
hRNA	Host RNA (in this project human RNA)	Хозяйская RNA (в данном проекте – человеческая)
HPV	Human Papilloma Virus	Вирус папилломы человека
КС	Keratinocytes	Кератиноциты
kPAMP	Key PAMP: LPS, PG and (in YN-model) bacDNA.	Главные (ключевые) PAMP: LPS, PG и (в YN-модели) bacDNA.

Сокращение или термин	Description	Описание
LPS	Lipopolysaccharide	Липополисахарид (эндотоксин)
maDC-Y	Mature DC presenting Y-antigen, derived from Y-model: DC-R or MoDC-R, YN-model: DC-Y or MoDC-Y	Зрелые DC, презентирующие Y-антиген, происшедшие от Y-модель: DC-R или MoDC-R YN-модель: DC-Y или MoDC-Y
MB	Whole blood metagenome - set of all nhDNA, contained in whole blood.	Метагеном цельной крови - совокупность всех nhDNA, содержащихся в цельной крови.
MDP	Muramyl dipeptide - component Gram+ and Gram(-) PG, ligand of NOD2	Мурамилдипептид - компонента Gram+ и Gram(-) PG, лиганд NOD2
MF	Macrophages , derived from Mo or from MoDP	Макрофаги, происшедшие от Mo или от MoDP
MF-T	● Macrophages, derived from Mo-T	Макрофаги, происшедшие от Mo-T
MF-R	● Macrophages, derived from Mo-R	Макрофаги, происшедшие от Mo-R
MHC	Major histocompatibility complex	Главный комплекс гистосовместимости.
Mo	Monocytes	Моноциты
Mo-Y	(PG-Y)+Mo Monocytes repleted by PG-Y	(PG-Y)+Mo Моноциты наполненные PG-Y
Mo-T	● Tolerized Mo	Толеризованные Мо
Mo-R	● Monocytes, which reprogrammed (tolerized) and repleted by PG-Y are subfraction of tolerized fraction Mo-T.	Перепрограммированные (толериованные) и наполненные PG-Y моноциты являются подфракцией толеризованной фракции Мо-T.
MoDP	Skin resident stem cells - precursors of part of MoDC and MF	Резидентные стволовые клетки в коже - предшественники части MoDC и MF
MoDC	DC, derived from Mo or from MoDP (slide 29. <i>HN10-S</i>)	Дендритные клетки, происшедшие от Mo или от MoDP (слайд 29. <i>HN10-S</i>)
MoDC-Y	(PG-Y)+MoDC MoDC repleted by PG-Y	(PG-Y)+MoDC MoDC наполненные PG-Y
MoDC-T	● DC, derived from Mo-T	Дендритные клетки, производные от Mo-T
MoDC-R	● DC-R, derived from Mo-R	DC-R, производные от Mo-R
MPS	Metagenome (phagocytes*) of psoriatic skin - set of all nhDNA from (phagocytes*) psoriatic skin. * Whether phagocytes from skin biopsies will be isolated (for subsequent DNA isolation from them) or DNA will be directly isolated from biopsies? - The decision is made after pilot stage.	Метагеном (фагоцитов) псориатической кожи - совокупность всех nhDNA из (фагоцитов*) псориатической кожи. * Будут ли изолироваться фагоциты из биоптатов кожи (для последующей изоляции из них DNA) или DNA будет изолироваться непосредственно из биоптатов? - Решение принимается после пилотного этапа.
Neu	Neutrophils	Нейтрофилы
Neu-Y	(PG-Y)+Neu Neutrophils repleted by PG-Y	(PG-Y)+Neu Нейтрофилы наполненные PG-Y
NET	Neutrophil extracellular traps (= netosis products) - are formed at netosis (slide 61. <i>Netosis</i>).	Нейтрофильные внеклеточные сети (= продукты нетоза) - образуются при нетозе (слайд 61. <i>Netosis</i>).
NCS	Nature Clean Skin - name of the project which consists of two stages: NCS1 (diagnostic) - is described here and NCS2 (diagnostic-medical) - will be described in the future in detail.	Название проекта, состоящего из двух этапов: NCS1 (диагностический) – описан здесь и NCS2 (диагностико-лечебный) – подробнее будет описан в будущем.
nhDNA	Any non-host DNA (here non-human) – from bacteria, archean, fungi, plants, helminths, viruses, phages, etc.	Любая нехозяйская DNA (здесь нечеловеческая) – от бактерий, архей, грибов, растений, гельминтов, вирусов, фагов и т.д.

Сокращение или термин	Description	Описание
NLS	Non-lesional (prepsoriatic, uninvolved) skin – PP skin without symptoms of psoriasis	Препсориатическая кожа – бессимптомная кожа псориатического пациента.
NME	NebNext Microbiome Enrichment . Kit for hDNA elimination and, as a result, enrichment of nhDNA representation.	Тест-набор для элиминации hDNA и, как следствие, увеличения представленности nhDNA.
NOD1	Intracellular receptor - ligand to DAP (slide 15. <i>PAMP, TLR, NOD</i> , Pashenkov 2018)	Внутриклеточный рецептор к DAP (слайд 15. <i>PAMP, TLR, NOD</i> , Pashenkov 2018)
NOD2	Intracellular receptor - ligand to MDP (slide 15. <i>PAMP, TLR, NOD</i> , Pashenkov 2018)	Внутриклеточный рецептор к MDP (слайд 15. <i>PAMP, TLR, NOD</i> , Pashenkov 2018)
NTC	No Template Control . Control samples which do not contain DNA what is supposed to be found in the main samples. Are applied to determination of contamination level and concrete contaminants (section 5.7).	Контрольные образцы, которые не содержат DNA, которую предполагается обнаружить в основных образцах. Применяются для определения уровня контаминации и конкретных контаминантов (раздел 5.7).
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns . (in particular LPS, PG, bacDNA and (1,3) - beta - D - glucan) (Fukui 2016) (slide 15. <i>PAMP, TLR, NOD</i>).	Патоген-ассоциированные молекулярные структуры (в частности LPS, PG, bacDNA и (1,3)-beta-D-глюкан) (Fukui 2016) (слайд 15. <i>PAMP, TLR, NOD</i>).
РАМР-немия	PAMP-nemia. Definition in YN-model: Chronic increase kPAMP-load (binding, endocytosis) on blood phagocytes resulting - increasing of kPAMP concentration in blood; - increased kPAMP-carriage of blood phagocytes. Main kPAMP are LPS, PG and bacDNA. (slides 22. <i>SPPN-PAMP-nemia</i> , 23. <i>SPPN</i> , section 5.3.1.). Definition in Y-model (Таблица 11, SP4)	Определение в YN-модели: Хроническое повышение кРАМР-нагрузки (связывание, эндоцитоз) на фагоциты крови, приводящее - к повышению концентрации кРАМР в кровотоке; - к повышенному кРАМР-носительству фагоцитов крови. Главные кРАМР это LPS, PG и bacDNA. (слайды 22. <i>SPPN-PAMP-nemia</i> , 23. <i>SPPN</i> раздел 5.3.1.) Определение в Y-модели (Таблица 11, SP4)
PASI	Psoriasis Area and Severity Index	Индекс тяжести псориаза (Кубанов 2016)
PDC	Plasmacytoid dendritic cells	Плазмацитоидные дендритные клетки
PG	Peptidoglycan . Any (including PG-Y)	Любой пептидогликан (в т.ч. PG-Y)
PG-Y	Peptidoglycan A3alpha with interpeptide bridges IB-Y (but can contain and others also)	Пептидогликан A3alpha, содержащий межпептидные мостики IB-Y (но может содержать и другие также).
PLS	Psoriatic lesional skin	Псориатическая кожа
PsB	Psoriagenic bacteria - species of bacteria presumed psoriagenic (with PG-Y peptidoglycan)	Виды бактерий предполагаемые псоригенными (с пептидогликаном PG-Y)
SPP	Systemic psoriatic process (basis of Y-model of pathogenesis) (Peslyak 2012a)	Системный псориатический процесс (основа Y-модели патогенеза) (Песляк 2012a)
SPPN	Systemic psoriatic process in YN-model - differs from SPP (section 5.2) (slides 22. <i>SPPN-PAMP-nemia</i> , 23. <i>SPPN</i>).	Системный псориатический процесс в YN-модели патогенеза – отличается от SPP (раздел 5.2). (слайды 22. <i>SPPN-PAMP-nemia</i> , 23. <i>SPPN</i>)
TL	T-lymphocytes	T-лимфоциты

Сокращение или термин	Description	Описание
TL-Y	Y-specific TL (they have receptors ligandic to Y-antigen epitopes)	Y-специфические TL (имеют рецепторы лигандные к эпитопам Y-антигена)
TLR2	Membranous receptor - ligand to PG-fragments LTA, BLP	Мембранный рецептор – лиганд к PG-фрагментам LTA, BLP (слайд 15. <i>PAMP, TLR, NOD</i>)
TLR4	Membranous receptor - ligand to LPS	Мембранный рецептор – лиганд к LPS (слайд 15. <i>PAMP, TLR, NOD</i>)
TLR7	Endosomal receptor – ligand to ssRNA, bacRNA, but also and to hRNA-LL37 complexes.	Эндосомальный рецептор – лиганд к вирусной ssDNA, bacRNA, но также и к комплексам hRNA-LL37.
TLR8	Endosomal receptor – ligand to ssRNA, bacRNA, but also and to hRNA-LL37 complexes.	Эндосомальный рецептор – лиганд к вирусной ssDNA, bacRNA, но также и к комплексам hRNA-LL37.
TLR9	Receptor - ligand to CpG - fragment of bacterial or virus DNA. As a rule, intracellular (endosomal), but at neutrophils it expressed on membrane also (Lindau 2013). (slide 15. <i>PAMP, TLR, NOD</i>)	Рецептор к CpG – фрагменту бактериальной или вирусной DNA. Как правило, внутриклеточный (эндосомальный), но у нейтрофилов также экспрессируется на мембране (Lindau 2013). (слайд 15. <i>PAMP, TLR, NOD</i>)
WMS	Whole metagenome sequencing (shotgun)	Полное метагеномное секвенирование (методом «дробовика»).
Y-антиген	Y-antigen = part(s) of interpeptide bridge IB-Y (sections 5.4, 5.5)	Y-антиген = часть(и) межпептидного мостика IB-Y (разделы 5.4, 5.5)
Y-модель	Y-model - model of pathogenesis of psoriasis offered in the monograph (Peslyak 2012a , Peslyak 2012b)	Модель патогенеза псориаза, предложенная в монографии (Песляк 2012а , Песляк 2012b)
YN-модель	YN-model - model of pathogenesis of psoriasis offered in this work	Модель патогенеза псориаза, предложенная в данной работе.

Жирный шрифт означает общепринятые сокращения.

● – используется только в Y-модели.

5.2. YN-модель патогенеза. Сравнение с Y-моделью.

В этом разделе будут перечислены основные отличия YN-модели от Y-модели. Y-модель патогенеза предполагает ключевую роль фагоцитов крови (моноцитов и дендритных клеток) в развитии и поддержке псориатических пятен ([Песляк 2012a](#), [Песляк 2012b](#)). В рамках Y-модели именно толеризованные моноциты и дендритные клетки приносят в псориатическую дерму недеградированные бактериальные продукты, LPS и PG (в том числе PG-Y). Роль нейтрофилов крови в Y-модели учитывалась только вспомогательная, как посредников, отвечающих за костномозговую подготовку предшественников моноцитов и дендритных клеток на стадии гемопоэза ([Песляк 2012a](#), Прил.5). Роль нейтрофилов, привлеченных в псориатическую кожу, рассматривалась как активных (но не ключевых) участников врожденного иммунного ответа на иницирующий процесс LP2, что соответствует их роли и в других моделях патогенеза, в частности, в GL-модели ([Gilliet 2008](#)).

Такой подход был основан на интерпретации информации из работы ([Numerof 2006](#)), в которой обсуждался малоэффективный эксперимент по внутривенному введению антител к CXCL8 (IL-8) (подробно описан в [Krueger 2002](#)). При максимальной дозе (3 мг/кг веса) это привело в итоге к снижению PASI на 50% у 30% ПП. Также в хорошем обзоре ([Sabat 2007](#)) этот же эксперимент описан как полностью неудачный, поскольку якобы никаких изменений в PASI не было. В этом же обзоре также упомянуто о снижении уровня нейтрофилов в псориатической коже во время этого эксперимента (об этом нет никакой информации в [Krueger 2002](#) и [Numerof 2006](#)). Других значимых исследований роли нейтрофилов в патогенезе псориаза на момент подготовки монографии ([Песляк 2012a](#), [Песляк 2012b](#)) не было известно.

Важную роль нейтрофилам в патогенезе псориаза отводят в других моделях патогенеза ([Gilliet 2008](#), [Guttman-Yassky 2011](#), [Perera 2012](#), [Tonel 2009](#)). В первую очередь речь идет об активной секреции LL37, которая рассматривается как звено порочного цикла. В Y-модели LL37 секреция нейтрофилами является частью процесса LP3, безусловно, влияет на инициацию и поддержку LP4, но не рассматривается как звено порочного цикла (Таблица 11).

Результаты работ, опубликованных недавно и посвященных изучению нейтрофилов при псориазе, заставили пересмотреть их роль в патогенезе и сформулировать новую YN-модель патогенеза. Ее основные отличия связаны с тем, что существенная часть нейтрофилов после привлечения в псориатическую кожу претерпевают нетоз и при этом во внеклеточном пространстве оказываются продукты нетоза ([Lin 2011](#), [Skrzeczynska 2012](#), [Lowe 2014](#), [Hu 2016](#), [Schon 2017](#), [Schon 2018](#), слайд 61. *Netosis*). Подробнее об этом в разделе 5.3.

Все отличия между двумя моделями содержит Таблица 11. В Y-модели главная роль по доставке Y-антигена в псориатическую кожу отводится толеризованным моноцитам и дендритным клеткам, в YN-модели эта роль отдана нейтрофилам, часть из которых после привлечения в кожу претерпевают нетоз. В YN-модели сохранена общая структура Y-модели, максимально сохранены обозначения и нумерация процессов и подпроцессов. Новый подпроцесс LP3a (нетоз некоторых Neu и Neu-Y) включен в порочный цикл В (слайды 25. *Local processes_YN* и 26. *YN-model*).

Процесс LP5 и подпроцессы LP6.4, LP7.1 в Y-модели были необходимы для инициации псориатического пятна, поскольку подпроцесс LP6.1 (потеря толерантности к кРАМР у Мо-Т и DC-Т) мог начаться только после LP5 (приобретенного ответа против LP2). В YN-модели процесс LP5 и подпроцессы LP6.4, LP7.1 возможны, но не обязательны и поэтому не отображены на схеме YN-модели. В YN-модели обязательным условием инициации псориатического пятна является транзитный процесс LP4 (триггер приобретенного ответа), а подпроцесс LP3a (нетоз некоторых Neu и Neu-Y) состоит в LPN3 (врожденный ответ) и является ключевым звеном порочного цикла В.

YN-модель проще Y-модели и в большей степени обоснована. Эти модели не противоречат друг другу. Возможно, что патогенез ПБ происходит сразу согласно этим двум моделям (т.е. реальны и важны все процессы и подпроцессы обеих моделей). Гипотезы, проверяемые в рамках данного проекта, не позволят сделать выбор в пользу одной из моделей. Действительно, H1-1 и H2 – общие для обеих моделей, а H3 и H10 являются расширениями H3 и H10, соответственно (Дополнение S6, раздел 5.12).

В случае успешного выполнения проекта более точное определение модели патогенеза будет сделано во время будущих исследований.

Таблица 11. Y-модель и YN-модель. Процессы и подпроцессы.

Y-модель	YN-модель.
Системные	
SPP. Системный псориазический процесс. Повышенное кРАМР-носительство толеризованных фагоцитов. Повышенное (PG-Y)-носительство R-фагоцитов.	SPPN. Системный псориазический процесс. Повышенное кРАМР-носительство и, в частности, (PG-Y)-носительство фагоцитов крови (слайды 22. <i>SPPN-PAMP-nemia</i> , 23. <i>SPPN</i>)
SP1. Повышенная тонкокишечная проницаемость для фрагментов бактериальных продуктов, содержащих PAMP (в т.ч. кРАМР).	да
SP2. Рост популяций Gram(-) TLR4-активных и Gram(+) NOD2-активных бактерий на слизистой тонкой кишки.	да
SP2.1. Рост популяций псоррагенных PsB на слизистой тонкой кишки.	да
SP3. Нарушение производства и/или циркуляции желчных кислот.	да
SP4. РАМР-немия: Хроническое повышение кРАМР-нагрузки (связывание, эндоцитоз) на фагоциты крови, приводящее а) к формированию фракции толеризованных фагоцитов; б) к повышению уровня кРАМР в кровотоке с) к повышенному кРАМР-носительству толеризованных фагоцитов. Главные кРАМР это PG и LPS.	SPN4. РАМР-немия: Хроническое повышение кРАМР-нагрузки (связывание, эндоцитоз) на фагоциты крови, приводящее - к повышению концентрации кРАМР в кровотоке; - к повышенному кРАМР-носительству фагоцитов. Главные кРАМР это LPS, PG и bacDNA. (раздел 5.3.1.). Формирование в кровотоке фракции толеризованных моноцитов Мо-Т и дендритных клеток DC-Т (являющихся кРАМР-носителями) возможно, но не обязательно.
SP4.1. (PG-Y)-немия.	да
SP5. Перегрузка и/или нарушение систем детоксикации	да
SP6. Тонзиллярная PsB-инфекция	да
SP7. Отклонение во внутриклеточном сигнальном пути от распознавания MDP (NOD2-лиганда) до смены хеомстатуса.	нет
SP8. Рост толеризованных фракций Мо-Т и DC-Т. Повышенное кРАМР-носительство.	SPN8. Повышенное кРАМР-носительство фагоцитов крови. (раздел 5.3.1.)
SP8.1. Рост фракций Мо-R и DC-R. Повышенное (PG-Y)-носительство.	SPN8.1. Повышенное (PG-Y)-носительство фагоцитов крови. (раздел 5.3.1.)
Локальные	
LP1. Привлечение иммуноцитов из кровотока.	да
LP1.1. Привлечение Мо и DC, Мо-Т и DC-Т (в т.ч. Мо-R и DC-R) из кровотока.	LP1a. Привлечение нелимфоцитарных иммуноцитов (Neu, Neu-Y, Мо, DC, PDC, NK и др.) из кровотока.
LP1.2. Привлечение прочих иммуноцитов из кровотока.	LP1b. Привлечение Т-лимфоцитов из кровотока.
LP2. Иницирующий и усугубляющий процесс. LP2(IN) и LP2(HPV) детально разобраны (Песляк 2012b)	да
LP2(IN). Открытая травма дермы	да
LP2(HPV). HPV-носительство кератиноцитов	да
LP3. Врожденный ответ против LP2	LPN3. Врожденный ответ, в т.ч.:

Y-модель	YN-модель.
	LP3a. Нетоз некоторых Neu и Neu-Y. Во внеклеточном пространстве оказываются нетозные продукты NET, в т.ч. Y-антигены. (слайды 25. <i>Local_processes_YN</i> и 26. <i>YN-model</i>).
LP3.1. Образование комплексов hDNA-LL37 и hRNA-LL37	LP3b. Образование комплексов hDNA-LL37 и hRNA-LL37
LP4. Триггер приобретенного ответа против LP2	LP4. Триггер приобретенного ответа
LP5. Приобретенный ответ против LP2	Возможен, но не обязателен.
LP6. Трансформации Мо и DC	LPN6. Трансформации Мо и DC
	LP6a. MF, Мо и DC эндоцитируют нетозные продукты NET. Фагоциты, которые эндоцитировали Y-антигены, обозначаются MF-Y, Мо-Y и DC-Y (слайды 25. <i>Local_processes_YN</i> и 26. <i>YN-model</i>).
LP6.1. Потеря толерантности к kPAMP: у Мо-T, DC-T, MoDC-T (в т.ч. у Мо-R, DC-R, MoDC-R)	Возможен, но не обязателен.
LP6.2. Образование MF и MoDC: из любых Мо и из Мо-T, Мо-R	LP6b. Образование MF и MoDC: из любых Мо и из Мо-Y
LP6.3. Образование maDC-Z: из любых DC, MoDC и из PG-Y(-)DC-T, PG-Y(-)MoDC-T	Возможен, но не обязателен.
LP6.4. Образование maDC-Y: из DC-R, MoDC-R	LP6c. Образование maDC-Y: из DC-Y и MoDC-Y
LP7. Лимфоузлы. Клональная пролиферация.	да
LP7.1. Образование TL-Z	Возможен, но не обязателен.
LP7.2. Образование TL-Y	да
LP8. Ложный приобретенный ответ на мнимую PsB-инфекцию.	да
LP8.1. Презентация Y-антигена maDC-Y эффекторным TL-Y.	да
LP8.2. Гиперпролиферация кератиноцитов KC. Изменение архитектуры кожи. Рост васкуляриности и площади базальной мембраны.	да

5.3. Нейтрофилы в YN-модели

В этом разделе последовательно будут перечислены аргументы в пользу измененных процессов (по сравнению с Y-моделью), а также новых процессов и подпроцессов YN-модели патогенеза. А поскольку эти изменения и дополнения связаны с нейтрофилами, то и раздел называется соответственно.

5.3.1. Нейтрофилы крови

Выше были перечислены причины, по которым в YN-модели помимо моноцитов и дендритных клеток крови важную роль играют нейтрофилы. Также снято требование толеризации фагоцитов крови, которое в Y-модели было принципиальным (для моноцитов и дендритных клеток). Активированные нейтрофилы крови (в отличие от моноцитов и дендритных клеток) сохраняют возможность быть привлеченными в воспаленные ткани, поскольку воздействие LPS на них хотя и снижает экспрессию CXCR4, но одновременно способствует существенной экспрессии CCR2 ([Shen 2017](#)).

Стареющие нейтрофилы могут приносить в костный мозг (этому способствует рост экспрессии CXCR4) эндоцитированные в кровотоке бактериальные продукты, которые оказываются во внеклеточном пространстве после апоптоза этих нейтрофилов. При этом бактериальные продукты сохраняют свои PAMP свойства. Такая функция стареющих нейтрофилов предназначена для обучения клеток-предшественников моноцитов во время их созревания в костном мозге ([Tacke 2006](#), [Rankin 2010](#)).

Во время системного псориатического процесса SPPN (из-за хронической kPAMP-нагрузки) какая-то часть стареющих нейтрофилов крови (наряду с остальными нейтрофилами) постоянно привлекается в воспаленную псориатическую кожу вместо костного мозга. Это происходит благодаря постоянной экспрессии CCR1 и, вероятно, из-за смены экспрессии CXCR4 на экспрессию CCR2

([Uhl 2016](#), [Ortmann 2018](#)). В псориазической коже активно секретируются CCL2 и CCL5 (лиганды CCR1) и CCL2, HBD2 и HBD3 (лиганды CCR2) (Таблица 12).

В результате эти стареющие нейтрофилы крови оказываются не в том месте, в котором должны были оказаться, при этом (предположительно) сохранив в себе недеградированные бактериальные продукты. А поскольку в псориазической коже присутствуют многие факторы нетоза (Таблица 13), то и происходит нетоз части этих нейтрофилов (раздел 5.3.3). Тем более что стареющие нейтрофилы имеют большой потенциал к нетозу ([Ortmann 2018](#)).

В YN-модели расширен список основных кPAMP – к LPS и PG добавлена bacDNA. Это сделано потому, что нейтрофилы имеют не только эндосомальный, но и мембранный рецептор TLR9 ([Lindau 2013](#), слайд 15. *PAMP, TLR, NOD*). Это означает, что bacDNA (как и LPS) может способствовать активации (приведению в преднетозное состояние) нейтрофилов уже при внешнем контакте или связывании. Интенсивность активации существенно зависит от % содержания фрагментов CpG в bacDNA, зависящей от вида бактерий ([Dalpke 2006](#)). Взаимодействие фрагментов CpG с TLR9 также снижает склонность нейтрофилов к апоптозу ([Jozsef 2004](#)), что может способствовать увеличению доли нейтрофилов, завершающих существование нетозом.

В разделе 5.3.3 подробно проанализированы факторы (реальные и предполагаемые), которые способствуют нетозу при псориазе (Таблица 13). Среди них нет bacDNA, так как на данный момент исследования, в которых бы изучалось влияние bacDNA на нетоз, не опубликованы.

По результатам WMS-теста цельной крови и определения концентрации bacDNA будет определена суммарная концентрация фрагментов CpG. Это позволит оценить суммарное воздействие на рецептор TLR9 также как будет оценено суммарное воздействие на рецептор TLR4 (раздел 5.6).

Интенсивность активации фагоцитов под воздействием нескольких PAMP существенно возрастает (синергичный эффект). Также имеет место синергичное воздействие нескольких факторов (не только PAMP) на нетоз (Таблица 13). В рамках проекта предполагается оценить синергичный эффект на системный псориазический процесс SPPN для трех кPAMP (LPS, PG и bacDNA).

5.3.2. Привлечение нейтрофилов в кожу из кровотока

Нейтрофилы составляют большую часть фагоцитов крови (> 85%) и ответственны за эндоцитоз большей части бактериальных продуктов ([Mayadas 2014](#)). И для того, чтобы получить максимально представительный метагеном крови, необходимо извлекать hDNA из всех фагоцитов.

В здоровой коже нейтрофилы практически отсутствуют ([Kabashima 2016](#), [Gaspari 2017](#), слайд 59. *Neutrophils*). Они привлекаются в кожу на самой ранней стадии возникновения псориазического пятна (еще до видимых изменений кожи). Их особенно много в первичных точечных псориазических высыпаниях ([van de Kerkhof 2007](#), [Christophers 2014](#)).

Существенная их часть может группироваться в верхних слоях эпидермиса, образуя абсцессы Мунро (слайд 60. *Neutrophils-Munro*). В хроническом псориазическом пятне нейтрофилы составляют большую часть фагоцитов кожи (до 45% при средне-тяжелом псориазе), почти все они имеют нерезидентное происхождение (слайд 56. *Phagocytes-1*, [Gottlieb 2005](#), [Fuentes-Duculan 2010](#), [Zaba 2009a](#)).

Препсориазическая кожа, смежная с активными пятнами и ранними пятнами, характеризуется наличием CD15+Neu ([Albanesi 2009](#), [Albanesi 2010](#)).

Предположение о том, что привлечение нейтрофилов крови в псориазическую кожу под воздействием хемокина CXCL8 (IL-8) и последующая секреция этого же хемокина нейтрофилами являются звеньями порочного цикла, было сделано давно ([Terui 2000](#), [Gilliet 2008](#)). В других моделях патогенеза ([Guttman-Yassky 2011](#), [Perera 2012](#), [Tonel 2009](#)), подробно проанализированных в ([Песляк 2012b](#)) привлечение нейтрофилов в псориазическую кожу в порочные циклы не включалось. Хотя секреция LL37 нейтрофилами рассматривалась, как звено порочного цикла.

После того как стало известно, что часть нейтрофилов в псориазической коже претерпевают нетоз (слайды 65. *Net-skin-1*, 66. *Net-skin-2* и 67. *KB-schema*, [Lin 2011](#), [Skrzeczynska 2012](#)), это обсуждалось авторами GK-модели ([Lowes 2014](#), [Hawkes 2017](#), Laboratory for Investigative Dermatology, The Rockefeller University, New York, USA), но в их модель патогенеза нетоз не был включен (слайд 70. *GKH-model*). Схема GKH-модели сильно упрощена по сравнению со схемой GK-модели. Еще более строгий подход выбрали авторы детальной обзорной статьи, посвященной патогенезу псориаза ([Benhadou 2018](#)), в свою модель патогенеза они не включили не только нетоз, но и нейтрофилы (слайд 71. *BMM-model*). BMM-модель фактически также является упрощенной GK-моделью.

В порочный цикл привлечение нейтрофилов в кожу и их нетоз недавно включили авторы следующих моделей патогенеза (слайд 68. *FM-model*, [Delgado-Rizo 2017](#)), (слайд 69. *SE-model*, [Schon 2018](#)). В работе ([Herster 2018](#)) комплексам hRNA-LL37 предложена роль самоусиления

процессов привлечения нейтрофилов в псориатическую кожу, секреции хемокинов и цитокинов и, собственно, нетоза.

Недавно были проведены исследования *in vitro*, показавшие влияние нетоза на Т-лимфоциты и секрецию ими IL-17 ([Lambert 2018](#)). Клетки крови были получены от здоровых доноров, но главная цель была показать, что такое влияние возможно в псориатической коже.

За привлечение нейтрофилов в кожу ответственны их хемокиновые рецепторы и, конечно, их агонисты: хемокины и протеины, обладающие свойствами хемокинов. Подробная информация о хемокиновых рецепторах нейтрофилов и их агонистах собрана и проанализирована ниже (Таблица 12).

Нейтрофилы привлекаются в кожу в рамках подпроцесса LP1a наряду с другими нелимфоцитарными иммунными клетками крови. Подпроцесс LP1a начинается в рамках LPN3 – врожденного ответа, а после инициации PLS-воспаления поддерживается внутри порочного цикла В (слайд 25. *Local_processes_YN*).

Таблица 12. Хемокиновые рецепторы, хемокины и AMP, безусловно или вероятно причастные к трафику нейтрофилов крови при псориазе.

Хемокиновые рецепторы		CCR1	CCR2	CCR5	CCR6	CXCR1	CXCR2	CXCR4	FPR1 (FPR2/ALX)
Хемокины и AMP									
Общая информация			L	M		I	I, J	I, K, L	
Новые	Старые								
CCL2	MCP-1	9,4	10,2 – B	7,5					
CCL3	MIP-1alpha	8,8 – A		8,9					
CCL5	RANTES	8,2		9,7					
CCL20	MIP-3alpha				8,5 - D				
CXCL1	Gro-alpha					6,4 – F	9,7 – F		
CXCL2	Gro-beta						9,1 – F		
CXCL3	Gro-gamma						9,2 – F		
CXCL5							9,0 - F		
CXCL8	IL-8					9,5 – F	9,5 – F		
CXCL12	SDF-1alpha							8,2 – G	
HBD-2			* - C		# - E				
HBD-3			* - C						
LL37									6,0 - H
FMLP									6,4

Примечания (Таблица 12).

Подобная информация ранее была собрана в ([Kobayashi 2008](#), [Soehnlein 2010](#), [Blanchet 2012](#)). В данную таблицу включены все хемокины и AMP, имеющие отношение к трафику нейтрофилов крови. В ячейках указано значение максимального аффинитета между агонистами согласно [DB IUPHAR](#). Если значение в IUPHAR отсутствует, но информация о лиганде есть, то в ячейке стоит #. Если информация об агонистах получена из другого источника, то в ячейке стоит *. Зеленый цвет – взаимодействие рецептор/хемокин при гомеостазе, розовый – во время привлечения нейтрофилов в PLS. Заглавная латинская буква ведет на одно из следующих примечаний:

- A)** CCR1 и хемокин CCL3 ответственны за привлечение CCR1+ фагоцитов в псориатическую кожу ([Nickoloff 2007b](#)). Нейтрофилы экспрессируют CCR1 под воздействием GM-CSF ([Kobayashi 2008](#)).
- B)** CCR2 и хемокин CCL2. CCL2 секретируется в норме ([Ginhoux 2007](#)), но в PLS его существенно выше нормы секретируют KC ([Vestergaard 2004](#)). KC также секретируют CCL2 в препсориатической коже (NLS), находящейся рядом с пятном. В PLS и NLS секреция сконцентрирована в базальном слое ([Gillitzer 1993](#)). Neu могут экспрессировать CCR2 ([Rohrl 2010](#)).
- C)** CCR2 и HBD-2, HBD-3. Антимикробные протеины HBD-2 и HBD-3 также являются активными хемокинами и способствуют привлечению из кровотока всех CCR2+ фагоцитов ([Rohrl 2010](#)). Повышенный уровень HBD-2 в кровотоке коррелирует с тяжестью псориаза по PASI ([Jansen 2009](#)). Секреция AMP (в т.ч. HBD-2 и HBD-3) количественно и пространственно зависит от LP2 (инициирующего и усугубляющего процесса) и от толщины псориатического пятна. Возможно этим объясняется различное количество обнаруживаемого при псориазе mRNA HBD-2: превышение по отношению к норме в 2 раза ([Li 2004](#)), в 5000 раз ([Gambichler 2008](#)), в 20000 раз ([De Jongh 2005](#)). В псориатическом эпидермисе большая часть HBD-2 секретируется KC в верхнем шиповатом и зернистом слоях, его концентрация в межклеточном пространстве достигает максимума в роговом слое, где полностью обволакивает все KC ([Huh 2002](#)). В нормальной коже присутствие HBD-2 в основном наблюдается в базальном слое ([Poindexter 2005](#)).
- D)** CCR6 и хемокин CCL20. CCL20 секретируется в нормальной коже ([Ginhoux 2007](#)). Нейтрофилы экспрессируют CCR6 под воздействием TNF-alpha ([Kobayashi 2008](#)).
- E)** CCR6 и антимикробный протеин HBD-2. HBD-2 в PLS очень сильно выражен ([De Jongh 2005](#)). HBD-2 является лигандом CCR6 ([Yang 1999](#)), т.е. хемоаттрактантом для CCR6+ фагоцитов.
- F)** CXCR1, CXCR2 и хемокины CXCL1, CXCL8. CXCL1 и CXCL8, секретируется KC, важен для привлечения Neu в PLS ([Baker 2006c](#)). AMP, CXCL1, CXCL2 и CXCL8 обнаруживаются на чрезвычайно высоком уровне в псориатическом эпидермисе ([Lin 2011](#)). CXCL8 постоянно секретируется в псориатической коже ([Gottlieb 2005](#)), в том числе нейтрофилами ([Duan 2001](#)). CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 активно секретируются в псориатической коже, привлекая CXCR2+ нейтрофилы ([Guttman-Yassky 2011](#)). CXCL1 также является лигандом рецептора CXCR1 ([Lowes 2013](#)). В провоспалительном окружении нейтрофилы активно секретируют хемокин CXCL8, который способствует привлечению новых нейтрофилов через их рецепторы CXCR1 и CXCR2 ([Soehnlein 2010](#)). Протеаза MMP9 увеличивает хемокиновую активность CXCL1 и CXCL8, тем самым усиливая привлечение нейтрофилов. Аналогично действует протеаза MMP8 на CXCL5 и CXCL8 ([Soehnlein 2010](#)).
- G)** CXCR4 и хемокин CXCL12 – гомеостатическая пара. CXCL12 постоянно секретируется в нормальной коже ([Bogunovic 2006](#), [Urosevic 2005](#)).
- H)** FPRL1 и протеин LL37. LL37 является лигандом FPRL1 – рецептора, который экспрессируют фагоциты крови. Взаимодействие LL37 и FPRL1 поддерживает хемотаксис FPRL1+ фагоцитов к месту воспаления ([Sozzani 2005](#), [De Yang 2000](#)).
- I)** Neu хорошо экспрессируют рецептор CXCR2, который определяет их привлечение к местам воспаления ([Reddy 2010](#)). Экспрессия рецепторов меняется по мере старения: CXCR1 – экспрессируется постоянно, экспрессия CXCR4 увеличивается, а CXCR2 уменьшается ([Rankin 2010](#)). Это связано с выходом новых Neu из костного мозга (CXCR2 – CXCL1) и возвратом стареющих нейтрофилов в костный мозг (CXCR4 – CXCL12).
- J)** Воздействие LTA на рецептор TLR2 понижает экспрессию рецептора CXCR2 у нейтрофилов, что отрицательно влияет на трафик нейтрофилов крови к местам секреции хемокинов CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 и CXCL8 ([Reddy 2010](#)).
- K)** Воздействие LPS на нейтрофилы снижает экспрессию CXCR4. Степень снижения зависит от времени воздействия и концентрации LPS, снижение имеет место не более чем в два раза ([Kim 2007](#)).
- L)** Воздействие LPS (через TLR4) и PG (через TLR2) на нейтрофилы снижает экспрессию CXCR4 и одновременно способствует существенной экспрессии CCR2 ([Souto 2011](#), [Shen 2017](#)). Этот факт принципиально отличает нейтрофилы от моноцитов и дендритных клеток, у которых воздействие LPS вызывает снижение экспрессии CCR2. Поэтому находящиеся под хронической кРАМП-нагрузкой нейтрофилы крови сначала переходят в активированное (преднетозное) состояние (Таблица 13). А затем (если не претерпят нетоз в крови) могут быть привлечены к местам воспаления под влиянием хемокина CCL2 и протеинов HBD-2, HBD-3.

М) CCR5 экспрессируется только на апоптотных телах нейтрофилов. Одной из целей такой экспрессии является привлечение и связывание хемокинов CCL2, CCL3, CCL5, что снижает привлечение к месту воспаления новых нейтрофилов ([Soehnlein 2010](#)). Массовый апоптоз нейтрофилов – это признак ремиссии псориатического пятна и, как следствие, отсутствие необходимости в привлечении новых нейтрофилов.

5.3.3. Нетоз нейтрофилов в коже (LP3a)

После привлечения в кожу нейтрофилы могут претерпевать апоптоз, а апоптотные тела эндоцитируются другими фагоцитами ([Greenlee-Wacker 2016](#), [Soehnlein 2010](#)). Склонность нейтрофилов к апоптозу, в частности, определяется концентрациями TNF-alpha, IFN-gamma и GM-CSF ([van den Berg 2001](#), [Soehnlein 2010](#)). Как именно оканчат свое существование нейтрофилы в коже (апоптозом или нетозом) зависит от развития воспалительного процесса. Преимущественный апоптоз и последующий эндоцитоз (эффероцитоз) продуктов апоптоза другими фагоцитами, как правило, означает завершение воспалительного процесса ([Soehnlein 2010](#), [Schuster 2013](#), [Malachowa 2016](#)). Макрофаги, осуществляющие эндоцитоз продуктов апоптоза, секретируют противовоспалительные цитокины TGF-beta, IL-10, и PGE-2 ([Wang 2014a](#)). Дендритные клетки, осуществляющие эндоцитоз продуктов апоптоза, приостанавливают свое созревание, т.е. способность превратится в mDC и презентировать антигены ([Schuster 2013](#)). Хемокиновый рецептор CCR5 экспрессируется только на апоптотных телах нейтрофилов. Одной из целей такой экспрессии является привлечение и связывание хемокинов CCL2, CCL3, CCL5, что способствует снижению привлечения к месту воспаления новых нейтрофилов и завершению воспалительного процесса ([Soehnlein 2010](#)).

Нетоз же происходит преимущественно в воспалительном окружении и продукты нетоза способствуют усилению воспалительного процесса ([Sangaletti 2012](#)). Можно предположить, что в псориатическом пятне, стабильном или растущем, нейтрофилы преимущественно оканчивают существование нетозом. И только в случае ремиссии пятна они преимущественно оканчивают существование апоптозом. Ремиссия псориатического пятна и его превращение в нормальную кожу приводит к почти полному исчезновению в ней нейтрофилов, ибо ранее поступившие из кровотока претерпели нетоз или апоптоз, а поступление новых нейтрофилов из кровотока почти прекращается.

В активном псориатическом пятне многие нейтрофилы претерпевают нетоз, нетозные продукты активно влияют на кожную иммунную систему ([Lin 2011](#), [Skrzeczynska 2012](#), [Pinegin 2015](#), [Hu 2016](#), слайды 65. *Net-skin-1* и 66. *Net-skin-2*). В порочный цикл нетоз включили авторы двух моделей патогенеза (слайд 68. *FM-model*, [Delgado-Rizo 2017](#)) и (слайд 69. *SE-model*, [Schon 2018](#)).

Наиболее подробно возможная роль нетоза в псориатическом воспалении проанализирована в обзорной работе ([Pinegin 2015](#)). Во-первых, это участие продуктов нетоза (LL37, NE – нейтрофильная эластаза и др.) в формировании комплексов с hDNA (воздействуют на PDC через TLR9) и RNA (воздействуют на DC через TLR7 и TLR8). Во-вторых, это стимуляция секреции провоспалительных цитокинов (IL-17 и др.) и, в-третьих, это образование нетозных продуктов, которые могут стать аутоантигенами.

В работе ([Herster 2018](#)) комплексам hRNA-LL37 предложена роль самоусиления процессов привлечения нейтрофилов в псориатическую кожу, секреции хемокинов и цитокинов и, собственно, нетоза. Впервые показано, что в продуктах нетоза содержится hRNA. Также показано, что LL37, который, во-первых, активно секретируется нейтрофилами, а, во-вторых, содержится в продуктах нетоза, образует с потерянной во время нетоза hRNA комплексы. Также показано, что только эти комплексы (а не hRNA или LL37 отдельно) могут воздействовать на нейтрофилы через эндосомальный рецептор TLR8. Также показана колокализация NE (нейтрофильной эластазы), hRNA и LL37 в псориатической коже. Авторы работы предположили, что нетоз может быть самоусиливающим фактором псориатического высыпания.

Роль нетоза в патогенезе различных заболеваний (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, ANCA- васкулит, артериальный и венозный тромбоз, фиброз легких, псориаз, подагра) систематизирована в работе (рис.1, рис.2, [Mitsios 2017](#)). Предложена двухфакторная схема роли нетоза в патогенезе этих заболеваний. Первый фактор (hit trigger) – это условия, при которых внутри нейтрофилов оказываются (формируются) протеины, провоцирующие конкретное заболевание, второй фактор (hit trigger) – это условия, при которых происходит нетоз, сопровождающийся выбросом этих протеинов. Авторы этой работы предложили новый термин «нетопатия» для обозначения заболеваний, в патогенезе которых нетоз играет ключевую роль.

В рамках YN-модели нетоз нейтрофилов в коже обусловлен, во-первых, хронической kPAMP-нагрузкой на эти нейтрофилы в кровотоке до их привлечения в псориатическую кожу. Эта нагрузка делает часть из них kPAMP-носителями и приводит в активированное (преднетозное) состояние. Причем часть нейтрофилов претерпевают нетоз непосредственно в кровотоке ([Lin 2011](#), [Hu 2016](#), слайды 62. *Net-blood-1*, 63. *Net-blood-2* и 64. *Net-blood-3*). Во-вторых, нетоз в коже определяется

условиями, в которых оказываются нейтрофилы крови (часть из которых уже в преднетозном состоянии) в препсориатической и псориатической коже (Таблица 13).

Таблица 13. Реальные и предполагаемые факторы нетоза при псoriasisе.

Фактор	Источники	Системный кровоток во время SPPN	NLS - препсориатическая кожа	PLS - псориатическая кожа
	Нетоз подтвержден	Lin 2011 , Hu 2016	?	Lin 2011 , Hu 2016
Тромбоциты	Pinegin 2015 , Grayson 2016 , Schon 2018 , Papayannopoulos 2018	Да (Clark 2007 , Воробьева 2014 , Гараева 2007)	нет	
ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody)	Grayson 2016 , Hasler 2016 , Delgado-Rizo 2017	?	?	?
ACPA (anti-citrullinated peptide antibody)	Hasler 2016 , Delgado-Rizo 2017	?	?	?
CXCL8 (IL-8), самоусиление(?)	Grayson 2016 , Hasler 2016 , Ortmann 2018	да	да	
Комплексы hRNA-LL37, самоусиление (?)	Herster 2018	?	?	да
IL-18	Grayson 2016 , Hasler 2016	да	Да, в эпидермисе во время травмы (см. LP2 (INJ), Песляк 2012b)	Да, в эпидермисе
IL-1beta	Grayson 2016 , Hasler 2016 , Delgado-Rizo 2017	возможна секреция моноцитами крови	Да, при наличии HPV (см. LP3 (HPV), Песляк 2012b)	да, активно секретируется
Бактерии, грибы	Delgado-Rizo 2017 , Kenny 2017 , Papayannopoulos 2018	только при бактериальной или грибковой инфекции (сепсис)	Да, особенно в эпидермисе	
Вирусы	Schonrich 2016 , Delgado-Rizo 2017 , Papayannopoulos 2018	только при вирусной инфекции	Да, в эпидермисе при наличии HPV (см. LP2 (HPV), Песляк 2012b) или других вирусных кожных инфекциях	
Протозойные паразиты	Grayson 2016 , Hasler 2016 , Papayannopoulos 2018	только при протозойной инфекции	нет	
M1-протеин (стрептококки группы А) + фибриногеновый комплекс	Oehmcke 2009 , Воробьева 2014	да, при стрептококковой инфекции (например тонзиллярной)	нет	
LPS	Hasler 2016 , Pieterse 2016 , Delgado-Rizo 2017 , Lipp 2017 , Papayannopoulos 2018 , Ortmann 2018	да (Гараева 2007)	Да, особенно в эпидермисе	
PG	Hasler 2016 , Alyami 2018	возможно	Да, особенно в эпидермисе	
FMLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) (синтезируется бактериями)	Hasler 2016 , Lipp 2017	?	Да, особенно в эпидермисе	
Ionomycin и ionophore (синтезируются Streptomyces sp.)	Delgado-Rizo 2017 , Kenny 2017	?	Да, в случае применения наружно препаратов, которые их содержат	

В препсориатической коже имеют место LP2 (иницирующий и усугубляющий процесс) и LPN3 (врожденный ответ), эти процессы в частности приводят к секреции CXCL8 и IL-1beta. В эпидермисе всегда присутствуют бактерии (и бактериальные продукты, в частности LPS и PG). Также возможно присутствие грибов и если LP2(HPV), то и вирусов HPV. Все эти факторы способствуют нетозу.

В псориатической коже усиливается секреция CXCL8 (в частности нейтрофилами) и IL-1beta, добавляется интенсивная секреция IL-18, образуются комплексы hRNA-LL37. Также увеличивается

концентрация микробиома на единицу площади кожи из-за утолщения эпидермиса. Все это способствует нетозу.

Во время нетоза части нейтрофилов в коже во внеклеточное пространство выбрасываются недеградированные протеины – кРАМР (в частности PG-Y).

Роль нетоза в YN-модели патогенеза вписывается в схему, предложенную ([Mitsios 2017](#)) и, если окажется, что YN-модель верна, то псориазическая болезнь будет классифицирована как нетопатия.

Подпроцесс LP3а начинается в рамках LPN3 – врожденного ответа, а после инициации PLS-воспаления поддерживается внутри порочного цикла В (слайд 25. *Local_processes_YN*).

5.3.4. Эндоцитоз продуктов нетоза в коже (LP6а)

После нетоза образуются NET (нетозные продукты). Они активно влияют на другие клетки, но также эндоцитируются фагоцитами кожи ([Soehnlein 2010](#), [Schuster 2013](#), [Wang 2014a](#), [Grayson 2016](#)). Эндоцитоз осуществляют другие нейтрофилы, макрофаги, моноциты и дендритные клетки кожи. Когда эндоцитоз осуществляют моноциты Мо (имеющие потенциал трансформироваться в дендритные клетки МоDC) и дендритные клетки DC и, если в эндоцитированном материале сохранились недеградированные антигены (в частности PG-Y), то образуются Мо-Y и DC-Y (LP6а).

Далее возможна трансформация Мо-Y в МоDC-Y (LP6b), а затем трансформация DC-Y и МоDC-Y в зрелые дендритные клетки mDC-Y (LP6c). В результате становится возможна презентация Y-антигенов эффекторным лимфоцитам TL-Y (слайды 25. *Local_processes_YN* и 26. *YN-model*).

Фагоциты (моноциты и дендритные клетки), эндоцитирующие продукты апоптоза нейтрофилов, могут захватывать даже живые внутриклеточные бактерии, потерянные нейтрофилами ([Schuster 2013](#), [McCracken 2014](#), [Karaji 2017](#)). И таким образом оказаться зараженными.

Взаимодействие дендритных клеток с продуктами апоптоза изучается достаточно давно. Показано, что они в состоянии осуществить процессинг и презентацию антигенов, которые были эндоцитированы вместе с продуктами апоптоза ([Schuster 2013](#), [Nauseef 2013](#)).

Было выполнено сравнение этих процессов на примере [ANCA-васкулитов](#), когда аутоантитела образуются к протеинам PR3 или MPO, являющимися продуктами апоптоза и нетоза нейтрофилов. Показано, что эти протеины гораздо в большей степени сохраняют свои аутоантигенные свойства во время нетоза. Образование аутоантител происходит с активным участием дендритных клеток, которые эндоцитируют продукты нетоза, а затем процессируют и презентуют содержащиеся в них аутоантигены ([Sangaletti 2012](#), [видео эндоцитоза](#)).

С учетом вышеперечисленной информации эндоцитоз моноцитами и дендритными клетками потерянных во время нетоза недеградированных бактериальных продуктов в псориазической коже представляется вполне возможным. А последующий процессинг и презентация, содержащихся в них Y-антигенов, являются их прямой обязанностью (моноциты Мо-Y осуществляют это после трансформации в дендритные клетки МоDC-Y).

Подпроцесс LP6а начинается вследствие LPN3 (врожденного ответа), а после инициации PLS-воспаления поддерживается внутри порочного цикла В (слайды 25. *Local_processes_YN* и 26. *YN-model*).

5.3.5. Роли нейтрофилов

Ниже собрана и дополнена вся информация об известных и предполагаемых ролях нейтрофилов при псориазической болезни (Таблица 14).

Таблица 14. Роли нейтрофилов при псориатической болезни. Известные и предполагаемые.

	Роли	Локализация	Статус	Примечания
1	Эндоцитоз любых нехозяйских продуктов, содержащихся в крови	Системный кровоток	доказано	Общеизвестно
2	Нетоз, выброс во внеклеточное пространство продуктов нетоза.	Системный кровоток	доказано	Lin 2011 , Skrzeczynska 2012 , Hu 2016 , слайды 62. <i>Net-blood-1</i> , 63. <i>Net-blood-2</i> , 64. <i>Net-blood-3</i>
3	Привлечение из системного кровотока в препсориатическую и псориатическую кожу		доказано	Van de Kerkhof 2007 , Christophers 2014 , Gilliet 2008 (GL-модель), Perera 2012 (N-модель), Песляк 2012b (Y-модель), YN-модель (раздел 5.2). слайды 59. <i>Neutrophils</i> и 60. <i>Neutrophils-Munro</i>
4	Нетоз, выброс во внеклеточное пространство продуктов нетоза.	Псориатическая кожа	доказано	Lin 2011 (KB-схема), Skrzeczynska 2012 , Lowe 2014 , Hu 2016 , Schon 2017 , Schon 2018 (SE-модель), YN-модель (раздел 5.2). слайды 65. <i>Net-skin-1</i> и 66. <i>Net-skin-2</i>
4.1	LL37 - активная секреция, а также выброс во время нетоза	Псориатическая кожа	доказано	Только секреция: Gilliet 2008 , Ganguly 2009 (GL-модель), Guttman-Yassky 2011 (GK-модель), Perera 2012 (N-модель), Песляк 2012b (Y-модель). Lowe 2014 , Hawkes 2017 (GKN-модель), Секреция и выброс во время нетоза: Lin 2011 (KB-схема), Pinegin 2015 , Delgado-Rizo 2017 (FM-модель), Schon 2018 (SE-модель), YN-модель (раздел 5.2).
4.2	Активная секреция IL-17			Lin 2011 (KB-схема), Pinegin 2015 , Schon 2018 (SE-модель), YN-модель (раздел 5.2).
4.3	Активная секреция TNF-alpha, IL-22			Schon 2018 (SE-модель), YN-модель (раздел 5.2).
4.4	Выброс hDNA во время нетоза			Lin 2011 (KB-схема), Pinegin 2015 , Delgado-Rizo 2017 (FM-модель), YN-модель (раздел 5.2).
4.5	Выброс hRNA во время нетоза			Herster 2018
4.6	Выброс MPO (миелопероксидазы) во время нетоза			Schon 2018 (SE-модель).
5	Воздействие через комплексы hDNA-LL37 на плазмацитоидные дендритные клетки PDC, способствующее активной секреции IFN-alpha.	Псориатическая дерма	доказано	Источник hDNA – поврежденные кератиноциты: Gilliet 2008 , Ganguly 2009 (GL-модель), Tonel 2009 (TC-модель), Guttman-Yassky 2011 (GK-модель), Perera 2012 (N-модель), Песляк 2012b (Y-модель). Источник hDNA – продукты нетоза: Lin 2011 (KB-схема), Skrzeczynska 2012 , Delgado-Rizo 2017 (FM-модель) Schon 2018 (SE-модель). Panda 2017 (обзор свойств PDC), YN-модель (раздел 5.2).
6	Воздействие через комплексы hRNA-LL37 на дендритные клетки DC, способствующее их созреванию.	Псориатическая дерма	доказано	Источник hRNA – поврежденные кератиноциты: Gilliet 2008 , Ganguly 2009 (GL-модель). Источник hRNA – продукты нетоза: Herster 2018
7	Продукты нетоза могут содержать недеградированные нехозяйские продукты ранее эндоцитированные в крови (в частности Y-антиген).	Псориатическая кожа	возможно	Гипотеза H12. YN-модель (раздел 5.2).
8	Нейтрофилы Neu-Y могут самостоятельно презентировать Y-антиген специфическим TL-Y-лимфоцитам.	Псориатическая кожа	возможно	Davey 2014 , Lin 2017 . Под воздействием GM-CSF, IFN-gamma, IL-4 и TNF-alpha, а также при взаимодействии с CD4+ Т-лимфоцитами памяти, нейтрофилы могут выполнять функции антиген-презентирующих клеток.

Таблица 15. Модели патогенеза псориаза и нейтрофилы.

Модель патогенеза	Источники	Нейтрофилы в системном кровотоке	Нейтрофилы в псориатической коже	Комплексы hDNA-LL37, действующие на PDC и/или hRNA-LL37, действующие на DC	Нетоз в псориатической коже	Примечания
BF-модель	Baker 2006b	нет	нет	нет	нет	Системная. Предполагаемый антиген – фрагмент пептидогликана.
N-модель	Perera 2012	нет	есть	LL37 и hDNA от поврежденных кератиноцитов	нет	Неизвестный антиген (кератин?).
GK-модель	Guttman-Yassky 2011	нет	Секреция LL37	hDNA от поврежденных кератиноцитов	нет	Неизвестный антиген (кератин?). Порочный цикл.
ТС-модель	Tonel 2009	нет	нет	LL37 и hDNA от поврежденных кератиноцитов	нет	
GL-модель	Gilliet 2008 , Ganguly 2009	нет	Секреция LL37	hDNA и hRNA от поврежденных кератиноцитов	нет	Порочный цикл.
Y-модель	Песляк 2012a , Песляк 2012b	Костномозговая трансформация Мо и DC с участием апоптозных нейтрофилов	Секреция LL37	hDNA и hRNA от поврежденных кератиноцитов	нет	Системная. Предполагаемый Y-антиген – фрагмент пептидогликана. Включает доказанные звенья моделей BF, N, GK, GL и ТС. Совместима с YN-моделью. Два порочных цикла.
KB-схема	Lin 2011	нет	Секреция LL37, IL-17	hDNA от нетоза	Да. Выброс hDNA, LL37.	Порочный цикл (включает нетоз). Нетоз учтен впервые.
FM-модель	Delgado-Rizo 2017	нет	Секреция LL37	hDNA от нетоза	Да. Выброс hDNA, LL37.	Неизвестный антиген (только на схеме). Порочный цикл (включает нетоз). Расширение KB-схемы.
SE-модель	Schon 2018	нет	Секреция LL37, IL-17, TNF-alpha, IL-22	Нет (в тексте упомянуто, но на схемах нет)	Да. Выброс LL37, IL-17, MPO	Потенциальные антигены – кератин 17, стрептококковый протеин M1, LL37, ADAMTSL5. Порочный цикл.
GKH-модель	Lowe 2014 , Hawkes 2017	нет	Секреция LL37	LL37, hDNA и hRNA от поврежденных кератиноцитов	нет	Уточнение GK-модели. Потенциальные антигены – кератины, стрептококковые протеины, ADAMTSL5. Порочный цикл.
BMM-модель	Benhadou 2018	нет	нет	Нет (в тексте упомянуто, но на схеме нет)	нет	Потенциальные антигены – LL37, ADAMTSL5. Порочный цикл.
YN-модель	раздел 5.2	Эндоцитоз kPAMP, в т.ч. Y-антигена.	Секреция LL37, IL-17, HBD-2, AMP	LL37, hDNA и hRNA при хронизации преимущественно от нетоза	Да. Выброс hDNA, hRNA, LL37. Выброс недеградированных kPAMP, в т.ч. Y-антигена.	Системная. Предполагаемый Y-антиген – фрагмент пептидогликана. Включает доказанные звенья моделей BF, N, GK, GL, TC, FM, SE. Совместима с Y-моделью. Два порочных цикла – первый включает нетоз.

5.4. Виды бактерий, предполагаемые псоразными

У псориатических пациентов имеет место тонкокишечный СИБР ([Peslyak 2012d](#), [Гумаюнова 2009a](#), [Гумаюнова 2009b](#), [Гумаюнова 2009c](#)). Предполагается, что тонкокишечный микробиом в избытке содержит бактерии, названные псоразными ([Песляк 2012a](#), [Песляк 2012b](#)). Это бактерии, которые имеют пептидогликан аналогичный *Str.pyogenes*, т.е. содержащий

межпептидные мостики типа (L-Ala)-(L-Ala) и/или (L-Ser)-(L-Ala). Формирование этих мостиков в [пептидогликане](#) обусловлено наличием энзимов типа [murM](#) и [murN](#) (слайд 17. *PG_PsB-2*).

[murM](#) - энзим, обеспечивающий присоединение серина/аланина (первой аминокислоты начиная от Lys) при формировании межпептидного мостика у пептидогликана. При отсутствии этого энзима мостиков почти не будет. Что именно присоединяется (серин или аланин) зависит от аллели [murM](#)-гена ([Filipe 2001](#), [Fiser 2003](#)).

[murN](#) - энзим, обеспечивающий присоединение аланина (второй аминокислоты начиная от Lys) при формировании межпептидного мостика у пептидогликана. При отсутствии этого энзима, мостик будет длиной в одну аминокислоту.

В разных бактериях формирование межпептидных мостиков обеспечивают различные [murMN](#)-гены. По БД [KEGG](#) можно определить все (внесенные в нее) штаммы бактерий, которые имеют гены, обеспечивающие секрецию обоих энзимов, т.е. и типа [murM](#) и типа [murN](#). На слайде 18. *PG_PsB-3* перечислены виды таких бактерий. Все штаммы каждого из этих видов имеют межпептидные мостики типа (L-Ala)-(L-Ala) и/или (L-Ser)-(L-Ala), т.е. их пептидогликан аналогичен пептидогликану *Str.pyogenes*. Все эти виды предполагаются псоррагенными (обозначены PsB).

Если будет доказано, что *Enterococcus faecalis* является псоррагенным, то можно будет сделать вывод, что только те штаммы являются псоррагенными, у которых аллель [murM](#)-гена обеспечивает преимущественное присоединение аланина, т.е. формирование мостика (L-Ala)-(L-Ala). Как следствие, будет ограничен перечень пептидов - потенциальных Y-антигенов (раздел 5.5). Среди них останутся только те, которые содержат (L-Ala)-(L-Ala) на эпитопном участке. Такой вывод можно будет сделать, ибо все известные штаммы *Enterococcus faecalis* имеют только межпептидный мостик (L-Ala)-(L-Ala).

5.5. Пептиды – потенциальные Y-антигены

Поскольку презентуется не весь антиген, а только его центральная часть, называемая эпитопом, то под понятием Y-антиген подразумевается некий набор пептидов, имеющих общие эпитопы (т.е. почти идентичные центральные части).

Во время псоррагического воспаления имеет место преимущественная презентация неизвестного Y-антигена зрелыми дендритными клетками через МНС II. Таким образом, они презентуют Y-антиген специфическим CD4+TL.

На начальной стадии псоррагического воспаления и далее (но в меньшей степени) также имеет место кросс-презентация Y-антигена зрелыми дендритными клетками через МНС I. Таким образом, они презентуют Y-антиген специфическим CD8+TL.

Характеристики МНС определяют структуру и размеры презентуемых пептидов. Структура должна быть близка к линейной, а длина пептидов должна быть в диапазоне 8-11 аминокислот (для МНС I) и 11-17 аминокислот (для МНС II). Разветвленные молекулы и молекулы большого размера перед презентацией процессируются так, чтобы эти требования были выполнены, но при этом сохранялся характерный эпитоп.

На слайде 19. *PG_PsB-4* изображены муропептиды и пептиды, которые образуются при деградации пептидогликана *Str.pneumonia* (один из видов, предполагаемых псоррагенными). Муропептиды 20, 21, 23 и 25 после воздействия амидазы NAMLAA ([EC 3.5.1.28](#)) образуют линейные пептиды 5 и 6а (нумерация по [Bui 2012](#)). Эти пептиды содержат эпитоп IB-Y и имеют длину 9 аминокислот, что позволяет им презентироваться через МНС I. MDP, будучи адьювантом, обеспечивает интенсивность процессирования и презентации. Линейные пептиды 5 и 6а являются потенциальными Y-антигенами.

На слайде 20. *PG_PsB-5* изображен пептид B15-3 (имя условное), который после воздействия амидазы NAMLAA ([EC 3.5.1.28](#)) образуется из муропептидов 33, 34 и 35 (нумерация по [Bui 2012](#)). В зависимости от числа разрезов, выполняемых эндопептидазой GDGDA (имя условное, [EC 3.4.14.13](#)), из пептида B15-3 получаются пептиды из 13-ти аминокислот (три варианта - один из них это B13-2), из 11-ти (три варианта) или из 9-ти аминокислот.

Пептид B15-3 (и его аналоги), а также и некоторые из его производных (не менее чем из 11 аминокислот) - потенциальные Y-антигены, презентуемые через МНС II. В качестве эпитопов при этом будут один или оба мостика IB-Y. MDP, будучи адьювантом, обеспечивает интенсивность процессирования и презентации.

На слайде 21. *PG_PsB-6* изображен пептид IX (аналогичный пептидам VII и VIII), которые после воздействия амидазы NAMLAA ([EC 3.5.1.28](#)) образуются из муропептидов 36 и 37 (нумерация пептидов и муропептидов по [Bui 2012](#) и [Filipe 2000](#)). В зависимости от числа разрезов, выполняемых

эндопептидазой GDGDA ([EC 3.4.14.13](#)), из пептида IX получают пептиды из 15 аминокислот (три варианта), из 13-ти (три варианта) или линейный пептид Y-B11 из 11-ти аминокислот.

Пептид IX (и его аналоги – пептиды VII и VIII), а также и некоторые из их производных (не менее чем из 11 аминокислот) - потенциальные Y-антигены, презентуемые через MHC II. В качестве эпитопов при этом будут один или оба центральных мостика IB-Y. MDP, будучи адьювантом, обеспечивает интенсивность процессирования и презентации.

В Дополнении С, лист «B13-2_Y-B11» (раздел 5.12) содержится оценка количества и суммарного веса пептидов B13-2 и Y-B11, которые могут образоваться при деградации пептидогликана одной бактериальной клетки PsB. Первая оценка выполнена исходя из % содержания MDP в пептидогликане ([Sekine 1985](#)), предполагаемой плотности межпептидных мостиков в 50% ([Vollmer 2010](#)) и соотношением между содержанием MDP и B13-2 (или Y-B11) в пептидогликане.

Вторая оценка для B13-2 выполнена исходя из суммарного содержания муропептидов 33, 34 и 35 (~1,5%) в пептидогликане Str.pneumonia штамм R6 и соотношения веса пептида B13-2 и среднего веса этих муропептидов ([Bui 2012](#)). Вторая оценка для Y-B11 выполнена исходя из суммарного содержания муропептидов 36 и 37 (~1,3%) в пептидогликане Str.pneumonia штамм R6 и соотношения веса пептида Y-B11 и среднего веса этих муропептидов ([Bui 2012](#)).

Таблица 16. Оценка веса пептидов.

Пептид – потенциальный Y-антиген	Оценка	шт/клетка	г/клетка	% от веса клетки
B13-2	1	$\sim 10^6$	$2,1 \cdot 10^{-15}$	0,21%
	2	$\sim 6 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^{-15}$	0,12%
Y-B11	1	$\sim 5,3 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^{-16}$	0,08%
	2	$\sim 5 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^{-16}$	0,08%

Оценки дали близкие результаты и на их основании можно будет оценить концентрацию B13-2 и Y-B11 в псориазической коже. Это можно сделать по суммарной концентрации bacDNA видов (штаммов) бактерий, предполагаемых пораженными, в MPSN – подмножестве нерезидентного происхождения в MPS (Дополнение S4.2, раздел 5.12). При этом нужно будет учесть плотность и состав межпептидных мостиков этих бактерий. Такой способ оценки допустим, если концентрации бактериальных продуктов, таких как bacDNA, муропептиды и пептиды, производные от пептидогликана, при поступлении в кровоток, эндоцитировании (связывании) и деградации фагоцитами и транспортировке недеградированных частей в псориазическую кожу, изменяются пропорционально.

5.6. Определение концентраций PAMP в крови

В рамках задачи T2 предполагается выполнить несколько стандартных биохимических тестов по определению уровня PAMP-немии (задачи T2.4 и T2.5). Биоматериал – цельная кровь или цельная кровь после разрушения клеток. Это один из стандартных тестов для определения концентрации LPS: [LAL-тест](#) (Limulus Amebocyte Lysate с подавлением влияния (1,3)-beta-D-глюкана на результат). Этот тест позволит определить Qlpsb - концентрацию LPS стандартным проверенным методом и сравнить с ее с Qminus - суммарной концентрацией bacDNA Gram(-) видов (задача T3.5).

Для группы из 16 пациентов, имеющих псориаз средней тяжести (среднее PASI = 16,5) концентрация LPS (липополисахарид, он же эндотоксин) составила в среднем 7,2 Еу/мл, а для группы из 30 пациентов с тяжелым псориазом (среднее PASI = 24) - 35,8 Еу/мл. У пациентов с эритродермией и экссудативным псориазом она достигала 1000-2800 Еу/мл. В группе контроля (112 здоровых человек) концентрация LPS в среднем составила 0,1 Еу/мл (Еу~0,1 нг) ([Габаева 2007](#)). Концентрация LPS в крови определялась с помощью модифицированного LAL-теста.

Альтернативным методом оценки концентрации LPS в крови является [EAA-тест](#) (Spectral Medical Inc.) ([Ishihata 2013](#)). Этот метод точнее LAL-теста при концентрации LPS < 0,25 Еу/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.

А также определение Qsum - суммарной концентрации PG и (1,3)-beta-D-глюкана с помощью [SLP-теста](#) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) и Qglu – концентрации (1,3)-beta-D-глюкана в биоматериале с помощью одного из стандартных тестов: [Fungitell](#) (Cape Cod, Inc.), [Endosafe-PTS glucan assay](#) (Charles River Laboratories International, Inc.), [Fungus \(1-3\)-β-D-Glucan Assay](#) (Dynamiker Biotechnology Co., Ltd.) или [Goldstream Fungus \(1-3\)-β-D-glucan](#) (Era Biology Group) (задача T2.5) ([Barreto-Bergter 2014](#), [Wright 2011](#)). Это позволит определить Qpqb (через Qsum и Qglu) - концентрацию PG стандартными проверенными методами и сравнить с ее с Qplus - суммарной

концентрацией bacDNA Gram+ видов (задача Т3.6). Оценка концентрации PG в крови пациентов с псориазом никогда не проводилась.

Также можно будет сравнить Qglu с суммарной концентрацией грибковой DNA. Результаты этих тестов позволят дополнить и уточнить информацию, полученную с помощью WMS-тестов, а также определить их корреляцию с тяжестью ПБ. Оценка концентрации (1,3)-beta-D-глюкана в крови пациентов с псориазом никогда не проводилась.

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](#)).

Для определения Qpqb вместо применения SLP-теста в сочетании с одним из стандартных тестов для (1,3)-beta-D-глюкана можно применить один из Human Peptidoglycan Elisa kit: [CEO769Ge](#) (Cloud Clone), [MBS751887](#) (конкурентный или сэндвич поликлональный) (MyBiosource), [NB-E11251](#) (Novateinbio), [22749](#) (Bmassay), [AMS.E01P0182](#) (AMS Biotechnology), [BC-EH102570](#) (Biocodon Technologies), [RS02E1322](#) (BioTecNika Labs), [E028552](#) (Biobool). При выборе Elisa-набора следует обратить внимание на универсальность, т.е. на то, что набор одинаково хорошо определяет концентрацию пептидогликана любых Gram(+) родов бактерий и минимально зависит от присутствия LPS или (1,3)-beta-D-глюкана. Использование такого Elisa-набора будет оптимальным решением.

В дополнение к задаче Т2.4 предполагается оценить Qlpsm - суммарную концентрацию в цельной крови bacDNA бактерий, содержащих TLR4-активный LPS (задача Т3.5). Это возможно сделать, определив одновременное присутствие KO (KEGG ортологов) бактериальных генов типа LpxL ([K02517](#)) и LpxM ([K02560](#)) в геномах Gram(-) видов. Эти гены отвечают за [биосинтез LPS](#) в Gram(-) бактериях, которые обладают максимальной TLR4-активностью ([Maeshima 2013](#), [Gnauck 2016b](#)). В результате может быть выявлена корреляция между Qlpsm и тяжестью ПБ ([Fukui 2016](#)).

При недостаточном покрытии - определение Qlpsm через представленность родов (genus), почти все виды которых имеют гены LpxM и LpxL (лист «2017 LpxM Genus», Дополнение С, раздел 5.12).

Недавно была выявлена существенно различная способность влиять на нетоз у LPS разных видов и штаммов бактерий ([Pieterse 2016](#)). Можно предположить, что это также связано с их различной TLR4-активностью.

В дополнение к задачам Т3.6 и Т3.7 можно определить и сравнить суммарную концентрацию KO (KEGG ортологов) бактериальных генов типа murM ([K12554](#)) и murN ([K05363](#)), содержащихся в геномах Gram+ видов. Это можно выполнить так, как было выполнено для пациентов с атеросклерозом, когда в фекальном метагеноме было выявлено превышение над нормой KO (KEGG ортологов), ответственных за [биосинтез пептидогликана](#) ([Karlsson 2012](#)). Таким образом, во-первых, может быть дополнен и откорректирован список видов бактерий, предполагаемых псориагенными (слайд 18. PG_PsB-3). А, во-вторых, дополнена информация о корреляции между Qpsb и тяжестью ПБ (задача Т3.7).

5.7. Контроль контаминации. Образцы NTC.

Следует максимально снизить контаминацию образцов крови кожным микробиомом во время венопункции. Если не принять элементарные меры предосторожности, то, например, концентрация bacDNA *Propionibacterium acnes* (и других кожных комменсалов) может оказаться одного порядка с суммарной концентрацией bacDNA в плазме ([Grumaz 2016](#), [Horiba 2018](#), [Kimer 2018](#)). Одной из мер является сбор образцов крови для метагеномных исследований в последние пробирики (не ранее третьей) из последовательно присоединяемых к игле (образцы из первых пробирок могут использоваться для биохимических исследований).

При выполнении проекта контролю уровня контаминации и принятию мер для максимального снижения этого уровня будет уделено особое внимание. Для этого одновременно с образцами крови (кожи) формируются несколько образцов NTC (no template control) ([Grumaz 2016](#), [Païssé 2016](#), [Kim 2017](#), [Kong 2017](#), [Puri 2018](#), [Li 2018](#), [Qian 2018](#)). Вместо крови (кожи) в пробирки помещается культура стерильных человеческих клеток и (при необходимости) биологически чистая вода (например [RT-PCR Grade Water](#)) ([Kowarsky 2017](#)). Образцы NTC должны быть аналогичны (по объему, концентрации DNA и т.д.) образцам крови (кожи).

Образцы NTC формируются в день забора крови (кожи), в том же помещении, где он осуществляется. Это выполняет тот же сотрудник, который осуществляет забор крови (кожи). Если забор крови (кожи) осуществляется в течение нескольких дней, то образцы NTC формируются в каждый из этих дней. Далее хранение, транспортировка и обработка образцов NTC с максимальной возможной точностью повторяет обработку образцов крови (кожи). Общее число образцов NTC, порядок их формирования и обработки будет определен во время пилотного этапа проекта.

Во время выполнения протокола (раздел 5.10) несколько раз будет осуществляться проверка уровня контаминации. После конкретных шагов протокола (n – номер шага) будут определяться $AB(n,j)$ – суммарная концентрация *bacDNA* в образцах крови и $TB(n,j)$ – в образцах NTC, а затем вычисляться уровень контаминации по формуле (1).

$$(1) \quad ContB(n) = TBM(n) / ABM(n),$$

где $ABM(n)$ – концентрация *bacDNA* в среднем по всем образцам после шага $B(n)$, определяемая по формуле (2), а $TBM(n)$ – концентрация *bacDNA* в среднем по всем NTC после шага $B(n)$, определяемая по формуле (3).

$$(2) \quad ABM(n) = (1/KB) * \sum AB(n,j), \quad j=1, \dots, KB, \quad n - \text{номер шага в протоколе, } KB - \text{число образцов крови.}$$

$$(3) \quad TBM(n) = (1/KTB) * \sum TB(n,j), \quad j=1, \dots, KTB. \quad n - \text{номер шага в протоколе, } KTB - \text{число образцов NTC, исследованных вместе с образцами крови.}$$

Возможно правильной вычислять $TBM(n)$ по формуле (4), т.е. брать не среднее, а максимум. Это будет решено во время пилотного этапа.

$$(4) \quad TBM(n) = \max(TB(n,j)), \quad j=1, \dots, KTB. \quad n - \text{номер шага в протоколе, } KTB - \text{число образцов NTC, исследованных вместе с образцами крови.}$$

В результате каждой проверки уровень контаминации $ContB(n)$ не должен превышать 0,05% (точнее будет определено во время пилотного этапа). Это достижимый и необходимый в данном проекте предел для уровня контаминации. Достижимый, поскольку такой или еще ниже уровень может быть обеспечен (Таблица 5): [Paisse 2016](#) (0,048% - нормальный, хороший), [Li 2018](#) (0,003% - очень низкий, отличный), [Qian 2018](#) (0,14% - высокий, неудовлетворительный).

Необходимый, поскольку это определяется целью проекта – изучением *bacDNA* концентрации PsV - видов предполагаемых псоррагенными (каждого по отдельности и суммарной). По данным ([Paisse 2016](#)) суммарная представленность PsV не превышает 2,25% (грубая оценка, поскольку использовался 16S-тест). По данным ([Grumaz 2016](#)) суммарная представленность PsV составляет 5,75%, а представленность восьми основных PsV лежит в диапазоне от 0,3% до 1,2% (слайд 36. *Blood-Germany-2*). Для того, чтобы значения представленности для основных видов PsV были достоверны для каждого из ПП и ЗП уровень контаминации должен быть существенно ниже ожидаемых величин, т.е. не выше 0,05%.

Полная информация о составе контаминации (метагеном NTC) будет получена по итогам WMS-теста. Это позволит исключить результаты по всем *nhDNA*, концентрация которых в образцах крови окажется не выше, чем максимальная суммарная концентрация *nhDNA* в образцах NTC.

Альтернативный подход предполагает исключение результатов только по тем *nhDNA*, концентрация которых в образцах крови окажется не выше, чем максимальная концентрация этих же *nhDNA* в образцах NTC.

Также возможно исключать результаты по *nhDNA*, которые предполагаются наиболее вероятными контаминантами ([Horiba 2018](#), [Kimer 2018](#)). Такой подход имеет смысл, если контроль контаминации с применением образцов NTC был недостаточен или не осуществлялся совсем.

Во время работы с образцами кожи будет осуществляться точно такой же контроль за уровнем контаминации.

В проекте заранее будут приняты все меры для снижения контаминации, чтобы она не оказала существенного влияния на результаты. В частности вся работа с образцами должна происходить в лаборатории имеющей класс не ниже «biosafety class II».

Если средний уровень контаминации превысит допустимый (величина которого будет зафиксирована в техническом задании), то причина этого должна быть выявлена и устранена, а шаги протокола, во время которых это произошло, должны быть выполнены повторно.

5.8. Элиминация *hDNA* из DNA-образцов

Задачи T3.5 и T3.7 невозможно выполнить с помощью 16S-теста. Причина этого в существенно меньших возможностях 16S-теста по сравнению с WMS-тестом (Дополнение S1, раздел 5.12). Следовательно, в рамках проекта предстоит выполнять WMS-тесты. WMS-тест применялся ранее для определения *nhDNA* только в плазме крови ([Grumaz 2016](#), [Gyarmati 2016](#), [Long 2016](#)), причем предварительная элиминация *hDNA* не проводилась. Однако предварительная элиминация успешно применялась в других работах ([Archer 2010](#), [Fitting 2012](#), [Opota 2015](#), [Song 2014](#), [Yigit 2016](#), [Marotz 2018](#)) и будет применена в рамках проекта.

Метод предварительной элиминации hDNA, реализованный в тест-наборе [NebNext Microbiome DNA Enrichment](#) (далее NME), описан и изучен в работах ([Feehery 2013](#), [Yigit 2016](#)). Обогащение достигается связыванием hDNA и ее последующей элиминацией (при этом также может быть частично связана и элиминирована DNA некоторых видов бактерий) (слайды 78. NME-1 и 80. NME-2). В работе ([Feehery 2013](#)) было изучено обогащение нескольких искусственных биоматериалов (смеси hDNA и bacDNA E.coli в разных пропорциях), а также двух образцов слюны и одного образца крови. Для образцов слюны обогащение было успешным. % hDNA снизился приблизительно в 20 раз (элиминировалось 94-96% hDNA), а % картированных ридов bacDNA увеличился в среднем в 8 раз (слайд 81. NME-3). Картирование осуществлялось на референсную базу данных орального микробиома (HOMD). При этом представленности bacDNA обогащенного образца вполне соответствовали исходным (за исключением bacDNA видов, обнаруженных только в обогащенном образце и видов с малой представленностью) (диаграмма для R2, рис.6, [Feehery 2013](#)). Средние коэффициенты корреляции Пирсона между представленностью видов (до и после применения NME) даны ниже (Таблица 17).

Обогащение образца крови (лейкоцитарная пленка) дало сомнительный (по мнению авторов [Feehery 2013](#)) результат по причине очень малого абсолютного количества bacDNA, а также возможной контаминации образца. До сих пор нет других публикаций об исследованиях, в которых бы NME применялся для DNA-образцов цельной крови.

В работе ([Yigit 2016](#)) содержится подробный протокол выполнения NME.

В работе ([Marotz 2018](#)) авторы предлагают свой метод предварительной элиминации, аналогичный реализованному в тест-наборе [Molysis](#). Методы [Molysis](#) и ([Marotz 2018](#)) не подходят для целей проекта, поскольку предназначены для диагностики сепсиса - определения метагенома целых нехозяйских клеток, которые находятся вне клеток крови. В основе этих методов лежит предварительное разрушение клеток крови, а затем полная деградация и элиминация всей DNA, которая в них находилась (при этом естественно также теряется вся nhDNA, которая была внутри фагоцитов крови). После чего в образце преимущественно остаются целые нехозяйские клетки (их оболочки прочнее, чем у клеток крови), их разрушают и извлекают nhDNA.

Однако для целей проекта работа ([Marotz 2018](#)) важна другим, а именно тем, что в ней сравниваются несколько различных методов элиминации hDNA на образцах слюны, в том числе NME. В этой работе были взяты образцы слюны у 8 ЗП и для каждого из образцов выполнено по три WMS-теста до и после применения NME. Часть результатов (касающаяся NME) представлена на слайде 82. NME-4. К сожалению, авторы исследования не выполнили подготовку образцов перед применением NME, а именно не удалили фрагменты DNA размером менее 15 KB (о чем строго сказано в руководстве к NME). Это привело к неэффективному применению NME (концентрация DNA снизилась почти в 10 раз, однако представленность hDNA не изменилась: до - 89,3% и после - 90,8%). Подробно о причинах этого авторы сообщили (Discussion, [Marotz 2018](#)).

Метагеномы слюны были получены путем последовательной обработки ридов (Sequencing data analysis, [Marotz 2018](#)). При этом алгоритмически фильтрованные от hDNA риды были опубликованы в БД European Nucleotide Archive (ENA, [PRJEB24090](#)). Тем самым у нас появилась возможность оценить влияние NME на представленность видов. Для этого использовался онлайн ресурс [usegalaxy.org](#). На нем мы применили к 48 наборам ридов (8 пациентов x 3 аликвоты на образец x 2 (до и после NME)) последовательно «Kraken assign taxonomic labels to sequencing reads» на референсную БД «bacteria», а затем «Kraken-filter classification by confidence score» с параметром 0,5. Для сравнения (до и после) были выбраны только те риды, которые картировались на таксонный ранг виды (species) или ниже (при расчете была выбрана опция «Summation of lower ranks into higher ranks»).

Средние коэффициенты корреляции Пирсона между представленностью нескольких подмножеств видов до и после применения NME собраны вместе (Таблица 17). Как видно наименьшая корреляция наблюдается для минорных видов (представленность которых в исходных образцах не превышает 1%). Однако по мере повышения представленности корреляция становится высокой. Мы предполагаем, что одной из главных причин этого является слишком малое покрытие минорных видов в исходных образцах. Так в образцах пациента «А» (до обогащения) мажорные виды *Veillonella parvula*, *Prevotella melaninogenica* и *Haemophilus parainfluenzae* имели представленность в среднем 25,1%, 24,0% и 22,3% соответственно, их покрытие (с учетом размера геномов) составило в среднем 3,4. А для видов, представленных менее 1%, покрытие не превышало 0,15. Для этих же видов после обогащения покрытие для образцов этого же пациента было еще меньше (1,47 и 0,06, соответственно), что связано отсутствием подготовки образцов перед применением NME.

В случае применения NME в нашем проекте предстоит обеспечить как точное соблюдение требований подготовки образцов, так и более высокое покрытие для видов с представленностью от 0,1% до 1% (за счет увеличения числа ридов на один образец).

Таблица 17. Корреляция между представленностью до и после элиминации hDNA.

Подмножество бактерий, с представленностью (в образцах до элиминации hDNA)	Коэффициент корреляции Пирсона между представленностью до и после элиминации hDNA		
	Слюна, NME, виды, WMS-тест, n=2, Feehery 2013	Слюна, NME, виды, WMS-тест, n=8, 3 аликвоты на образец, Marotz 2018	Биоптаты подслизистой тонкой кишки, LOOXSTER, рода, 16S-тест, n=4, Glassing 2015
Все	0,960 ***	0,902 ***	0,826 **
> 0,1%	0,953 ***	0,889 **	0,789 **
> 1%	0,923 ***	0,820 **	0,721 **
От 0,1% до 10%	0,925 ***	0,858 **	0,632 *
От 0,1% до 5%	0,863 **	0,767 **	0,693 *
От 0,1% до 1%	0,754 **	0,609 *	0,536 *

[Сила корреляционной связи по Чеддоку](#): *** - весьма высокая, ** - высокая, * - заметная.

Расчет коэффициентов выполнен авторами этой книги.

Есть важный вопрос, ответ на который предстоит получить во время пилотного этапа (задача T1.4). Необходимо проверить какой % hDNA будет теряться во время исключения фрагментов DNA размером < 15KB (обязательная подготовка образцов DNA к NME). Информация о том, каково фрагментное распределение hDNA в цельной крови ЗП, на данный момент отсутствует. Во время пилотного этапа предполагается получить эту информацию для bacDNA в цельной крови ЗП и ПП (задача T1.4.1).

Во-первых, основным источником поступления фрагментов bacDNA является тонкокишечный микробиом и, следовательно, их размер ограничен характеристиками тонкокишечной проницаемости, во-вторых, фрагменты bacDNA сначала оказываются в кровотоке, где подвергаются деградации ферментами, и, в-третьих, эндцитируются фагоцитами крови, внутри которых деградация продолжается.

Попадая в кровоток, bacDNA подвергается всем тем воздействиям, под которыми находится внеклеточная hDNA. В норме внеклеточная hDNA имеет низкомолекулярную фрагментацию (от 140 до 250 bp), что, в частности, определяется деградирующим действием ферментов крови ([Брызгунова 2015](#), [Auscamp 2018](#), [Suzuki 2008](#)).

Если окажется, что медиана фрагментного распределения bacDNA заметно меньше 15 KB, то при исключении фрагментов DNA размером < 15 KB будет потерян существенный % исходной bacDNA. Такой, что применение NME для оставшейся фракции DNA (> 15 KB) не обеспечит эффективного обогащения по сравнению с исходным DNA-образцом.

Более того может оказаться, что вместо использования крупной (> 15 KB) фракции DNA и ее обработки с помощью NME целесообразно использовать мелкую фракцию без обработки NME. Причем оптимальная граница разделения на мелкую и крупную фракции может отличаться от 15 KB (это будет ясно по итогам решения задачи T1.4.1).

Действительно, пусть

$$(5) \quad D = DL + DH, \text{ где}$$

D – количество всей DNA, подлежащей разделению (электрофорезом на агарозном геле) на две фракции: мелкую и крупную, а DL – количество DNA в мелкой фракции и DH – в крупной фракции.

$$(6) \quad DB = DBL + DBH, \text{ где}$$

DB – количество bacDNA, подлежащей разделению на две фракции: мелкую и крупную, а DBL – количество bacDNA в мелкой фракции и DBH – в крупной фракции.

D и DB определяются до фракционирования, DH и DBH – после выделения крупной фракции. Пусть k_0 – коэффициент эффективности обогащения с помощью NME. И если количество DL достаточно для формирования библиотеки и выполнено неравенство (7), то применение NME нецелесообразно и для подготовки библиотеки нужно брать DL - мелкую фракцию.

$$(7) \quad DBL / DL > DBH / (DBH + k_0*(DH-DBH))$$

Например пусть $DL = 0,1*D$; $DH = 0,9*D$; $DB = 0,01*D$; $DBL=0,5*DB$; $DBH=0,5*DB$; $k_0 = 0,2$; тогда при подстановке в (7) получим слева 0,05, а справа 0,027 и, если количество DL достаточно для

подготовки библиотеки, то применение NME нецелесообразно. Нужно извлечь всю DNA из нижней части агарозного геля (мелкая фракция) и именно ее использовать для дальнейшего исследования.

Однако, если $ko = 0,02$ (при тех же остальных параметрах), то в (7) слева будет та же самая величина 0,05, а справа $\sim 0,22$ и применение NME целесообразно. Отметим, что согласно результатам корректного применения NME ([Feehery 2013](#)) коэффициент ko не превышает 0,02, но это пока не подтверждено другими исследованиями.

Использование мелкой фракции в качестве обогащенной зависит от характеристик набора по изоляции DNA, в первую очередь от фрагментного распределения всей DNA (предоставляется производителем тест-набора), а также от (неизвестного) распределения *bacDNA*. И, если бы оказалось, что медиана распределения *bacDNA* существенно меньше медианы распределения всей DNA, то обогащение возможно путем отделения мелкой фракции (линия разделения между медианами определяется эмпирически и может отличаться от 15 KB). Конечно, качество такого обогащения зависит не только от расположения медиан, но и от каждого из двух распределений в целом.

Рассмотрим распределение фрагментации всей DNA для Gentra Pure Gene Blood kit (Qiagen) ([Malentacchi 2015](#), слайд 79. NME-1a, (A)). Цельность (фрагментное распределение) DNA (согласно T0) оценена приблизительно (медиана 70 KB, девиация 10 KB). Ниже даны три диаграммы (B1, B2 и B3) возможных распределений *bacDNA*, содержащейся в этой DNA. Для наглядности суммарный объем *bacDNA* составляет 1% от всей DNA (известные результаты показывают от 0,03% до 0,2%).

- (B1) Распределение *bacDNA* с медианой 70 KB - нет смысла в исключении фракций размером меньше 15 KB. Применение NME обязательно.
- (B2) Распределение *bacDNA* с медианой 50 KB - обогащение может быть достигнуто путем исключения фракций размером более 55 KB, применение NME под вопросом.
- (B3) Распределение *bacDNA* с медианой 10 KB - нельзя исключать фракцию размером менее 15 KB, но можно исключить фракции размером более 30 KB и далее NME не применять!

Отметим, что существуют тест-наборы и стандартные методы, которые сохраняют цельность изолируемой из цельной крови DNA в большей степени (медиана до 130 KB). По итогам решения задачи T1.4.1 возможно выбрать наиболее подходящий тест-набор (или стандартный метод) в рамках которого медиана распределения *bacDNA* будет максимально отдалена (вероятно меньше) от медианы распределения всей DNA. Что позволит максимально эффективно проводить элиминацию *hDNA*, причем возможно без применения NME.

В тест-наборе [LOOXSTER® Enrichment Kit](#) реализован метод обогащения PureProve, основанный на связывании существенной части бактериальной и грибковой DNA и последующей элиминации всего остального. Метод основан на различной частоте присутствия в DNA фрагментов, с которыми происходит связывание (бактерии: 1:50, грибы: 1:160, человек: 1:2200). В результате обогащения элиминируется существенная часть *hDNA*, вирусная DNA, а также некоторая часть несвязанной бактериальной и грибковой DNA, причем доля элиминированной DNA сильно зависит от рода (вида) бактерий. Наиболее подробно тест-набор изучен в работе ([Glassing 2015](#)). В качестве образцов использована подслизистая часть биоптатов тонкой кишки, содержащая высокий % хозяйских клеток (4 образца). Концентрация *hDNA* после обогащения снизилась в среднем в 2,4 раза, количество копий 16S увеличилось в среднем в 3,4 раза. Средние значения коэффициента корреляции Пирсона, рассчитанные по ридам, полученным в результате 16S-тестов до и после применения LOOXSTER рассчитаны и собраны вместе (Таблица 17, данные по ридам взяты из Приложения к [Glassing 2015](#)). Диаграмма для образца 4 приведена на (рис.3, [Glassing 2015](#)). Авторы статьи признают, что нарушение представленности *bacDNA* после обогащения неизбежно.

Метод LOOXSTER также применялся и в других исследованиях, но в них не выполнялась качественная оценка эффекта обогащения на естественных образцах (иногда осуществлялась проверка на искусственно созданной смеси *hDNA* и *bacDNA*). В Дополнении С (лист «EHD») содержится сводка и оценка результатов обогащения биоматериалов, выполненного этими двумя тест-наборами (раздел 5.12).

Еще один метод элиминации *hDNA* основан на применении [дуплекс-специфической нуклеазы DSN](#) ([Gijvanekar 2012](#), [Song 2014](#)). Изолированная DNA фрагментируется, денатурируется, а затем заново гибридизируется в *dsDNA*. Гибридизация преимущественно происходит для тех *ssDNA*, которые содержатся в большей концентрации, а это преимущественно *hDNA*. Затем применяется DSN, которая связывает и способствует деградации только *dsDNA* – тем самым существенно сокращая содержание *hDNA* (для цельной крови почти в 100 раз) ([Song 2014](#)). Исследований, в которых проверялось бы влияние такой элиминации на представленность *hDNA* (аналогично тому,

как это сделано для [Feehery 2013](#), [Glassing 2015](#) и [Marotz 2018](#)) не проводилось. Также не существует стандартного тест-набора, основанного на этом методе.

5.9. Определение пластома

При исследованиях метагенома плазмы регулярно обнаруживается растительная DNA (далее *plastDNA*). Суммарно виды растительной DNA называются пластомом. Это происходит как при исследовании результатов WMS-теста, так и при использовании уникальных праймеров, специфичных для генов растений ([Rizzi 2012](#), [Spisak 2013](#), [Levitsky 2016](#)). В норме источником поступления фрагментов *plastDNA* в кровоток является DNA продуктов растительного происхождения, которая не полностью деградируется во время пищеварения в тонкой кишке.

В зависимости от степени и типа обработки пищи, каждый человек съедает до 1 грамма DNA в день (она называется диетической). Спустя несколько часов после еды, большая часть диетической DNA (не менее 95%) деградируется во время пищеварения. Тем не менее, малые количества диетической DNA, длиной от нескольких сотен до 1700 нуклеотидов не деградируют в ЖКТ, и попадают через кровоток и/или лимфоток к различным органам. Диетическая DNA обнаруживается в эпителиоцитах кишки, периферических лейкоцитах, клетках селезенки и печени. По другим оценкам от 10^{-8} до 10^{-7} от всей диетической DNA, в течение нескольких часов после приема пищи обнаруживается в плазме и в лейкоцитарной фракции, фрагментами в 300 нуклеотидов в среднем ([Rizzi 2012](#)).

Большинство публикаций посвящены изучению поступления DNA от генетически модифицированных продуктов. Причем как напрямую из продуктов питания человека, так и через продукты животноводства ([Levitsky 2016](#)).

В рамках проекта предполагается получить информацию о пластомах благодаря добавлению в референсный каталог ограниченного (не более 50) списка геномов основных растительных продуктов (в [Spisak 2013](#) более 200). Этот список будет составлен с учетом перечня основных растительных продуктов, включенных в диету, рекомендуемую пациентам на период предшествующий забору образцов цельной крови и биоптатов псориатической кожи (раздел 5.10. п.2).

Благодаря этому пластомам в рамках проекта будет определен и изучен как часть метагенома.

Все виды пластома, обнаруженные в образцах кожи, сразу войдут в NL – нерезидентную фракцию метагенома MPS (определяемое логически) (слайды 75. *nhDNA-MPS* и 76. *MPS-example*, Дополнение S4.2, раздел 5.12). Это позволит точнее провести комплексный анализ метагенома цельной крови и метагенома (фагоцитов) псориатической кожи, а поскольку это одна из основных задач проекта, то и определение пластома оправданно. Определение пластома не увеличит стоимость и сложность практических задач, поскольку является аналитической задачей (Т3.12 и Т5.4).

Информация о пластомах постпрандиальной цельной крови и (фагоцитах) псориатической кожи будет получена впервые. Информация о пластомах цельной крови позволит проверить результаты, которые были получены для натошакковой плазмы ([Spisak 2013](#)).

5.10. Порядок подготовки пациентов и выполнения WMS-теста цельной крови

1. **Отбор ПП и ЗП.** Участвуют только ПП и ЗП (далее пациенты), которые удовлетворяют критериям отбора (будут детализированы во время пилотного этапа проекта). В число участников рекомендуется включить ПП с широким диапазоном тяжести ПБ по PASI, но без инфекционных проблем ([Rademaker 2018](#)). Для того чтобы максимально снизить поступление бактериальных продуктов в кровь помимо тех, которые постоянно поступают из тонкой кишки. Широкий диапазон PASI необходим для поиска корреляций между PASI и составом (качественным и количественным) *nhDNA* цельной крови. Первоначальный отбор осуществляет Оргкомитет проекта по информации, предоставленной кандидатами на участие. Это происходит путем изучения Анкет (Дополнение E, раздел 5.12), результатов обследований (выполненных в течение последних 6 месяцев) и фотографий, позволяющих оценить состояние ПБ (фото – только для ПП).

2. **Подготовка к сдаче образцов.** До сдачи WMS-теста пациенты соблюдают 5-7 дней СВНД (стерильный вариант низкомикробной диеты, дополнение F, раздел 5.12) для того, чтобы максимально снизить присутствие транзитного тонкокишечного микробиома, поступление в кровь его бактериальных продуктов, а также их накопление в фагоцитах крови. Предстоит разработать примерное меню.

В этот период запрещен прием каких-либо лекарственных препаратов, которые могут влиять на микробиом ЖКТ. После любого инфекционного заболевания до сдачи образцов должно пройти не менее 2 недель и т.п.

3. Завтрак перед второй (постпрандиальной) сдачей крови. Для WMS-теста и теста на макромолекулярную тонкокишечную проницаемость каждый пациент сдает кровь дважды в один день. Первый раз – натощак (порция А), второй – через несколько часов после обильного завтрака, т.е. постпрандиально (порция В). Оптимальное время для сдачи порции В будет определено во время пилотного этапа. Меню завтрака должно быть в рамках СВНД, по объему в 1,5 раза больше нормы, пища должна быть быстро усваиваемая. Предстоит разработать несколько вариантов меню с примерно одинаковой калорийностью.

После завтрака химус должен пройти тонкую кишку вплоть до илеоцекального клапана (баугиниевой заслонки) и дальше. Главной целью завтрака является необходимость подпитать весь тонкокишечный микробиом так, чтобы максимально увеличить темп поступления бактериальных продуктов в кровоток.

Прием пищи влечет быстрый рост тонкокишечного просветного и пристеночного микробиома. Это в свою очередь вызывает рост поступления бактериальных продуктов в кровоток, причем в максимальной степени во время сокращения (отмирания следующего за ростом) микробиома по мере прохождения химуса в толстую кишку ([Ciampolini 1996](#), [Bala 2014](#), [Erridge 2007](#), [Ghanim 2010](#), [Gnauck 2016a](#), [Milan 2017](#), [Munford 2016](#)).

4. Сдача образцов. Пациент сдает кровь дважды в один день. Первый раз натощак (порция А), второй - через определенное время после завершения завтрака (постпрандиальная порция В). При этом применяются все меры предосторожности ([Mangul 2016](#), [Païssé 2016](#), [Potgieter 2015](#)), которые позволяют исключить (максимально снизить) контаминацию образцов крови кожным микробиомом через иглу во время забора из вены, а также при их хранении, транспортировке и обработке. Количество и объем образцов крови, взятых у одного пациента, определяется требованиями последующих тестов. Между моментом сдачи крови и моментом изоляции из нее DNA образец крови должен храниться и транспортироваться в условиях, которые максимально снижают темп деградации фагоцитами крови бактериальных продуктов (как эндоцитированных ранее, так и содержащихся в биоматериале). С этой же целью должно быть минимизировано время между этими двумя моментами.

Образцы псориазической кожи (несколько биоптатов от каждого ПП) должны быть сданы сразу после сдачи постпрандиальной порции крови. Точечные высыпания интересны тем, что в них предполагается большая концентрация нейтрофилов и может обнаруживаться DNA HPV (как один из триггеров кебнеризации). Такой биоптат предпочтителен при условии локализации высыпания на участке с наименьшей вероятностью присутствия резидентных *Streptococcus* sp. (раздел 2.5).

5. Образцы NTC. С целью контроля уровня контаминации одновременно с образцами крови формируются несколько образцов NTC (no template control) (раздел 5.7)

6. Изоляция DNA. Исследуется цельная кровь. Разрушаются все клетки крови, чтобы из них высвободилась вся ранее эндоцитированная (связанная) nhDNA. При этом также высвобождается hDNA. Затем образец стандартно очищается от всего, кроме DNA. Будет использован один из стандартных наборов по изоляции DNA из крови: NucleoSpin Blood (XL,L) (Macherey-Nagel); Blood DNA Isolation (Mini, Midi, Maxi) Kit (Norgen Biotek); innuPREP Blood DNA Master Kit (Analytik Jena AG); Wizard Genomic Purification Kit PreAnalytiX (Promega); Blood DNA Kit (PAXgene); QIAamp DNA Blood (Mini, Midi, Maxi) Kit (Qiagen). Какой именно - предстоит определить во время пилотного этапа (задача T1.3).

Важную роль играет подготовка образцов цельной крови. Максимально быстрое разрушение клеток крови после ее забора останавливает процессы деградации ранее эндоцитированной nhDNA, что обеспечивает максимизацию суммарной представленности bacDNA. В работе ([Li 2018](#)) был применен специальный буфер, что обеспечило максимальную представленность bacDNA (раздел 2.2). Важными критериями выбора тест-набора будут минимальный уровень контаминации реагентов (задача T1.6) и параметры фрагментации DNA (медиана и девиация распределения). Подробнее в разделе 5.7.

7. Определение концентраций всей DNA и bacDNA (кровь и NTC). Определяется концентрация всей DNA (для постпрандиальной порции В) и bacDNA (в натощачной порции А и в постпрандиальной порции В, а также в образце NTC). Это необходимо для подготовки биоматериала к секвенированию, нормировки результатов WMS-теста, контроля уровня контаминации, определения макромолекулярной тонкокишечной проницаемости.

Концентрация всей DNA выполняется на [Qubit Fluorometric Quantitation](#), концентрация bacDNA с использованием [Femto™ Bacterial DNA Quantification Kit \(E2006\)](#) (единый метод для образцов крови и образцов NTC). Натощачная кровь (порция А) далее не используется.

Определение концентраций всей DNA и bacDNA в образцах крови и NTC по мере их подготовки к формированию библиотек и секвенированию выполняется несколько раз. Одной из главных целей этого является контроль уровня контаминации (раздел 3.2.1.)

Альтернативно может быть применен метод «внутреннего стандарта» - добавления в образец DNA характерной бактерии (например, 1% от объема всей DNA). Такой бактерии, DNA которой заведомо не может присутствовать в данном биоматериале ([Tan 2015](#)). Это позволит выполнить нормировку по соотношению между ее исходной концентрацией в образце и количеству ридов, которые будут картированы на ее геном по данным WMS-теста.

8. Определение макромолекулярной тонкокишечной проницаемости. Отношение CB - концентрации bacDNA в постпрандиальной крови к CA - концентрации bacDNA в натошачной крови является величиной характеризующей макромолекулярную тонкокишечную проницаемость (8). В определении этой безразмерной величины для каждого из пациентов и состоит задача T2.3. Возможность этого будет проверена во время пилотного этапа (задача T1.5). Такой подход аналогичен определению тонкокишечной проницаемости с помощью овальбуминового теста ([Парфенов 1999](#), [Мазо 2008](#), [Песляк 2012a](#)).

$$(8) \quad Q_{simp} = CB / CA$$

Q_{simp} может быть использован для расчета коэффициента NORM (9) с целью приближения параметров Q_{minus} , Q_{lpsm} , Q_{plus} , Q_{psb} , Q_{lpsb} , Q_{rgb} (задача T3.9) (определяемых для постпрандиальной крови) к среднесуточным. Такая нормировка необходима, если предположить, что тяжесть ПБ по PASI лучше коррелирует со среднесуточными значениями этих величин. В рамках проекта не предполагается выполнять суточный мониторинг концентрации bacDNA (для этого пациенты должны были бы находиться в стационаре и многократно сдавать кровь).

$$(9) \quad NORM = (1 + Q_{simp}) / (2 * Q_{simp})$$

9. Элиминация hDNA. Постпрандиальная кровь. Из образца максимально элиминируется hDNA, но так, чтобы сохранилась nhDNA. Целью является максимальное обогащение (повышение концентрации) nhDNA в образце (при максимальном сохранении представленности минорных видов). От того насколько успешное и качественное будет это обогащение зависит трудоемкость, качество и степень достоверности результатов последующего WMS-теста ([Song 2014](#)).

Существует много различных методов предварительной элиминации hDNA ([Applications 2015](#), [Archer 2010](#), [Ferretti 2017](#), [Fitting 2012](#), [Gyarmati 2016](#), [Opota 2015](#), [Song 2014](#), [Yigit 2016](#), [Zhou 2012](#)). Для целей проекта подходят только два стандартных тест-набора [NebNext Microbiome DNA Enrichment](#) и [LOOXSTER® Enrichment Kit](#) (раздел 5.7, задача T1.4.1).

10. WMS-тест. Для образца, полученного после элиминации hDNA, выполняется стандартный WMS-тест. Полученные результаты обрабатываются: удаляются риды низкого качества, риды, принадлежащие hDNA и др. Затем осуществляется сборка оставшихся ридов в контиги и картирование на заранее подготовленный референс.

В результате получим представленность каждой nhDNA. Концентрации nhDNA в цельной крови вычисляются после нормирования исходя из того, какой метод был выбран (см. выше пункт 6).

WMS-тесты, выполненные для образцов NTC, позволят оценить уровень и состав контаминации и исключить из метагеномов информацию о тех nhDNA, представленность которых сравнима с уровнем контаминации и/или являющихся с большой вероятностью контаминантами.

11. Определение уровня PAMP-немии. (Таблица 8. Задачи T2.4 и T2.5).

12. bacDNA и plastDNA - аналитика и поиск корреляций. (Таблица 8. Задачи T3).

13. nhDNA (отличная от bacDNA). WMS-тест дает возможность выявить DNA грибов, гельминтов, вирусов, фагов. Для этого будет необходимо выполнить картирование на дополнительный референс. При обнаружении существенного количества DNA грибов, гельминтов и вирусов должны быть назначены дополнительные исследования, направленные на поиск локализации инфекционного процесса.

5.11. Изоляция DNA из (фагоцитов) псориатической кожи

В процессе подготовки данной версии проекта стало ясно, что процедура изоляции фагоцитов из псориатической кожи (слайд 77. *Phagocytes selection*) имеет определенные недостатки. Эта процедура является подготовительной к изоляции всей DNA из фагоцитов кожи. Причем конечной целью является обнаружение nhDNA нерезидентного происхождения (т.е. поступившей в кожу внутри фагоцитов крови) в максимально возможной концентрации.

При изоляции кожных фагоцитов иммуномагнитным или другим способом из клеточной суспензии проходит достаточно много времени до того, как можно будет начать разрушение фагоцитов и изоляцию DNA (Ferretti 2017, Garcia-Garcera 2013, Meisel 2016, Oh 2014).

Для получения клеточной суспензии можно применить тест-набор [Whole-skin-dissociation-kit-human](#) (Miltenyi Biotec). Минимальное время получения клеточной суспензии составляет 3 часа. Далее из кожной суспензии нужно изолировать фагоциты (например, нейтрофилы). Для этого подходит тест-набор для положительной селекции [EasySep™ Human CD15 Positive Selection Kit](#) (STEMCELL Technologies). Его выполнение занимает не меньше 1 часа. В случае изоляции всех типов фагоцитов (нейтрофилов, моноцитов, макрофагов и дендритных клеток) можно применить коктейль для положительной иммуномагнитной селекции, содержащий антитела к CD11c, CD14, CD15 и CD16.

В результате проходит не менее 4-х часов до того момента, когда можно начать разрушать фагоциты и изолировать содержащуюся в них DNA. Все это время живые фагоциты находились при температуре 37 C и продолжают деградацию всего, что эндоцитировали ранее. И могут деградировать очень большой % нерезидентной hDNA, которая находилась в них на момент забора биоптатов...

Фагоциты псориатической кожи (в биоптате глубиной 1 мм) при средне-тяжелом псориазе составляют до 10-15% от общего числа клеток. Понятно, что изолируя фагоциты от остальных нефагоцитарных клеток кожи, мы облегчаем работу для последующего выполнения NME. Поскольку объем hDNA в образце уменьшается в 7-10 раз (ибо нефагоцитарные клетки отбрасываются). Но если во время выполнения этого (получение кожной суспензии и иммуномагнитная изоляция из нее фагоцитов) объем искомой hDNA уменьшается (за счет ее деградации внутри живых фагоцитов) в большее число раз?

Альтернативой изоляции DNA из предварительно изолированных фагоцитов является изоляция DNA из биоптата сразу. Однако при этом мы получим помимо "лишней" hDNA еще и "лишнюю" hDNA резидентного происхождения. Такой hDNA в коже более чем достаточно в т.ч. и вне клеток и даже в дерме (слайды 39. *Derm-16S-1* и 40. *Derm-16S-2*). Это нормальная кожа, в которой практически нет фагоцитов нерезидентного происхождения, так что вся bacDNA - от бактерий резидентного происхождения (причем находящихся вне CD11c+DC) (Nakatsuji 2013).

Оптимальный протокол будет сформулирован после решения задач T1.4.1 и (при необходимости) T1.7.

Перечислим плюсы определения метагенома псориатической кожи вместо метагенома фагоцитов псориатической кожи.

Во-первых, YN-модель предполагает нахождение hDNA нерезидентного происхождения в межклеточном пространстве в результате нетоза. При определении метагенома фагоцитов псориатической кожи эта часть будет потеряна.

Во-вторых – при определении метагенома псориатической кожи сохранится возможность определения виroma всей кожи (в частности HPV), поскольку кератиноциты не будут исключены. При определении метагенома фагоцитов псориатической кожи существенная часть виroma будет потеряна (в частности HPV, который заражает преимущественно кератиноциты).

В-третьих - если успешно будет решена задача T1.4.1 (фракционное обогащение bacDNA из DNA цельной крови), то возможно, что оно окажется также эффективным и для обогащения bacDNA из DNA биоптата псориатической кожи. В частности потому, что позволит исключить высокомолекулярные фракции не только hDNA, но и bacDNA резидентного происхождения.

5.12. Дополнения

- A. Метагеномы крови и псориатической кожи. Проект исследования. Презентация и иллюстрации. (NCS1-pres, r2.2, pdf-формат, DOI: [10.5281/zenodo.2677818](https://doi.org/10.5281/zenodo.2677818))
- B. Метагеномы крови и псориатической кожи. Проект исследования. Дополнения S1-S8. (NCS1_Supplements, r2.2, pdf-формат, DOI: [10.5281/zenodo.2677822](https://doi.org/10.5281/zenodo.2677822))
 - S1. Сравнительные характеристики 16S и WMS-тестов
 - S2. Определение концентраций hDNA по результатам WMS-теста
 - S3. Альтернативная схема забора крови
 - S4. Алгоритм разделения MPS на фракции
 - S5. Постановка и анализ задачи о hDNA в двух емкостях, однонаправленно связанных.
 - S6. Y-модель и YN-модель. Гипотезы.
 - S7. Ресурсы по метагеномным исследованиям и секвенированию
 - S8. Обозначения и определения переменных, массивов и множеств
- C. Метагеномы крови и псориатической кожи. Проект исследования. Параметры и Примеры. (NCS1_Parameters_Examples, r2.1, xls – формат, DOI: [10.5281/zenodo.2571445](https://doi.org/10.5281/zenodo.2571445)).

- D. [Видео “Кожная иммунная система и псориаз”](#)
(~10 минут на английском с русскими субтитрами)
- E. [Анкета псориатического пациента](#) (doc – формат).
- F. [Низкомикробная диета](#) (doc – формат).

6. Перечень иллюстраций (слайдов)

Все иллюстрации находятся в Дополнении А (раздел 5.12). Основные условные обозначения, используемые в иллюстрациях, собраны на слайде 11. *Symbols*.

Номер и краткое наименование	Полное наименование
1. <i>Section1</i>	Раздел 1. Тонкокишечный СИБР (синдром избыточного бактериального роста) при псориазе. Предполагаемые Y-антиген и пептиды. PsB - бактерии предполагаемые псориагенными. Системные модели патогенеза псориаза (BF-модель, Y-модель и YN-модель). Системный псориатический процесс SPPN и проверяемые гипотезы.
2. <i>Psoriatic_disease</i>	Эпидермис при псориазе и в норме
3. <i>Patient_Stat-C</i>	Статистика заболеваемости ПБ по странам.
4. <i>Patient_Stat-R</i>	Статистика заболеваемости в РФ. Оценка числа псориатических пациентов в мире.
5. <i>Basic_research</i>	Базовые исследования
6. <i>Permeability-1</i>	Трансклеточная тонкокишечная проницаемость при псориазе. Тест с D-ксилозой.
7. <i>Permeability-2</i>	Межклеточная тонкокишечная проницаемость при псориазе. Овальбуминовый тест.
8. <i>SIBO-1</i>	Тонкокишечный СИБР (синдром избыточного бактериального роста) при псориазе
9. <i>SIBO-2</i>	Тонкокишечный СИБР. Просветный микробиом проксимальной части.
10. <i>SIBO_Moscow</i>	Микробиом тонкой кишки псориатических пациентов в зоне связи Трейца, Ig(KOE/мл).
11. <i>Symbols</i>	Условные обозначения
12. <i>BF-model</i>	BF-модель патогенеза (B.Baker & L.Fry, 2006-7).
13. <i>Antigen-1</i>	Зрелая дендритная клетка презентует неизвестный Y-антиген Т-лимфоциту.
14. <i>Antigen-2</i>	Версии происхождения неизвестного антигена
15. <i>PAMP,TLR,NOD</i>	PAMP, структура и локализация TLR2, TLR4, TLR9, NOD1 и NOD2
16. <i>PG_PsB-1</i>	Структура пептидогликана и PsB.
17. <i>PG_PsB-2</i>	Биосинтез пептидогликана.
18. <i>PG_PsB-3</i>	Виды Gram+ бактерий с межпептидными мостиками IB-Y. IB-Y = (L-Ala)-(L-Ala) или (L-Ser)-(L-Ala). (База данных KEGG).
19. <i>PG_PsB-4</i>	Муропептиды и пептиды, образующиеся при деградации пептидогликана <i>Str.pneumonia</i> .
20. <i>PG_PsB-5</i>	Пептид B13-2 – потенциальный Y-антиген.
21. <i>PG_PsB-6</i>	Пептид Y-B11 – потенциальный Y-антиген.
22. <i>SPPN-PAMP-nemia</i>	YN-модель. Системный псориатический процесс SPPN и PAMP-немия.
23. <i>SPPN</i>	YN-модель. Системный псориатический процесс SPPN. Взаимовлияние подпроцессов.
24. <i>Local_processes_Y</i>	Y-модель. Привлечение из крови и преобразование моноцитов и дендритных клеток в псориатической дерме.

25. <i>Local_processes_YN</i>	YN-модель. Привлечение из крови нейтрофилов и нетоз некоторых из них. Эндоцитоз и презентация Y-антигенов, потерянных Neu-Y во время нетоза.
26. <i>YN-model</i>	YN-модель патогенеза. Взаимовлияние локальных процессов.
27. <i>NCS1_Hypo</i>	4 гипотезы (H1-1, H2, HN3 и HN10) на проверку.
28. <i>Biotransfer</i>	Присутствие и перемещение нехозяйского биоматериала между органами
29. <i>HN10-S</i>	Нехозяйский биоматериал поступает в псориаатическую кожу внутри фагоцитов крови (гипотеза HN10-S).
30. <i>Section2</i>	Раздел 2. Метагеномное секвенирование. Метагеном крови. Метагеном кожи.
31. <i>Okubo</i>	Суммарная <i>bacDNA</i> в моноцитах крови ПП и ЗП (16S-тест, Okubo 2002)
32. <i>Blood_Psor</i>	<i>BacDNA</i> в плазме крови псориаатических пациентов (16S-тест, Munz 2010)
33. <i>Blood_WMS_and_Culture</i>	Патогены, определенные культуральным методом (BC) и NGS (WMS-тест) в плазме крови (Long 2016)
34. <i>Blood-bacDNA (France)</i>	<i>BacDNA</i> в цельной крови (30 ЗП, 16S, Paisse 2016)
35. <i>Blood-Germany-1</i>	Характеристики плазмы крови (7 пациентов с сепсисом, 12 ЗП, WMS-тест, Grumaz 2016)
36. <i>Blood-Germany-2</i>	Метагеном плазмы крови (12 ЗП, WMS-тест, Grumaz 2016)
37. <i>Blood-bacDNA (China)</i>	<i>BacDNA</i> в цельной крови (12 ЗП, 16S-тест, Li 2018)
38. <i>Skin-bacDNA</i>	Бактериальная <i>DNA</i> в псориаатической и здоровой коже (10 ПП, 12 ЗП, 16S-тест, Fahlen 2012)
39. <i>Derm-16S-1</i>	Бактериальная <i>DNA</i> в эпидермисе и дерме непсориаатических пациентов (16S-тест, Nakatsuji 2013) - 1
40. <i>Derm-16S-2</i>	Бактериальная <i>DNA</i> в эпидермисе и дерме непсориаатических пациентов (16S-тест, Nakatsuji 2013) -2
41. <i>Healthy-skin</i>	Микроорганизмы (в т.ч. бактерии и <i>bacDNA</i>) в здоровой коже. Предположения и факты.
42. <i>Skin_Bacteria_3D</i>	Бактериальная <i>DNA</i> на здоровой коже мужчины (1) и женщины (2). (16S-тест, Boulimani 2015).
43. <i>Skin-WMS-18-1</i>	Биогеография кожи (15 ЗП, WMS-тест, Oh 2014). Мазки с 18 участков.
44. <i>Skin-WMS-18-2</i>	Биогеография кожи (15 ЗП, WMS-тест, Oh 2014). Основные результаты.
45. <i>Skin-WMS-18-3</i>	Биогеография кожи (15 ЗП, WMS-тест, Oh 2014). Детализация для двух распространенных видов (<i>P.acnes</i> и <i>Staph.epidermidis</i>) с точностью до штаммов.
46. <i>Skin-AtD-WMS-genus</i>	Метагеном кожи (15 ЗП SPT(-), 19 AtD+, 5 ЗП SPT+, WMS-тест, Chng 2016). Представленность нескольких родов.
47. <i>Skin-AtD-WMS-Strep</i>	Метагеном кожи (15 ЗП SPT(-), 19 AtD+, 5 ЗП SPT+, WMS-тест, Chng 2016). Представленность видов <i>Streptococcus</i> sp.
48. <i>Skin-AtD-WMS-Staph</i>	Метагеном кожи (19 AtD+, 15 ЗП SPT(-), 5 ЗП SPT+, WMS-тест, Chng 2016). Представленность видов <i>Staphylococcus</i> sp.
49. <i>Skin-AtD-WGS-Strain</i>	Метагеном кожи (19 AtD+, 15 ЗП SPT(-), 5 ЗП SPT+, WMS-тест, Chng 2016). Представленность штаммов <i>Staphylococcus aureus</i> .
50. <i>Psorskin-swab-WMS-1</i>	Метагеном кожи (28 ПП, мазки, WMS-тест, Tett 2017). Представленность видов.
51. <i>Psorskin-swab-WMS-2</i>	Метагеном кожи (28 ПП, мазки, WMS-тест, Tett 2017). Подобие и отличие состава штаммов.
52. <i>Psorskin-6</i>	Метагеном кожи (114 ПП, мазки, 16S-тест, Loesche 2018). Состав и пропорции основных таксонов.
53. <i>Section3</i>	Раздел 3. Фагоциты кожи в норме и при псориаатизе. NET - нейтрофильные внеклеточные сети в крови и в псориаатической коже. Новые модели патогенеза.
54. <i>Skin_2D</i>	Дендритные клетки, макрофаги и Т-лимфоциты в здоровой коже

55. <i>Skin_3D</i>	Дендритные клетки, макрофаги и Т-лимфоциты в здоровой коже (3D)
56. <i>Phagocytes-1</i>	Привлечение фагоцитов крови в кожу при средне-тяжелом псориазе.
57. <i>Macrophages</i>	Макрофаги в здоровой и псориатической коже
58. <i>Dendritic_Cells</i>	Дендритные клетки в здоровой и псориатической коже
59. <i>Neutrophils</i>	Нейтрофилы в здоровой и псориатической коже
60. <i>Neutrophils-Munro</i>	Нейтрофилы в псориатическом эпидермисе (абсцессы Мунро)
61. <i>Netosis</i>	Нетоз – формирование нейтрофильной внеклеточной сети NET (neutrophil extracellular trap)
62. <i>Net-blood-1</i>	NET в здоровой и псориатической крови (Lin 2011)
63. <i>Net-blood-2</i>	NET в здоровой и псориатической крови (Hu 2016)
64. <i>Net-blood-3</i>	Корреляция между PASI и % нетозных нейтрофилов крови (Hu 2016)
65. <i>Net-skin-1</i>	NET в псориатической коже (Lin 2011)
66. <i>Net-skin-2</i>	NET в псориатическом эпидермисе (Hu 2016)
67. <i>KB-schema</i>	Первая схема патогенеза псориаза с учетом NET (Lin 2011)
68. <i>FM-model</i>	Модель патогенеза псориаза с учетом NET и MCET (Delgado-Rizo 2017)
69. <i>SE-model</i>	Модель патогенеза псориаза с учетом NET (Schon 2018)
70. <i>GKH-model</i>	Модель патогенеза псориаза без учета NET (Hawkes 2017)
71. <i>BMM-model</i>	Модель патогенеза псориаза без учета Neu и NET (Benhadou 2018)
72. <i>Section4</i>	Раздел 4. Комплексное изучение метагеномов крови и псориатической кожи. Методы и проблемы элиминации хозяйской DNA.
73. <i>2Pools-D</i>	Метагеном цельной крови и метагеном (фагоцитов) псориатической кожи в динамике.
74. <i>2Pools-S</i>	Метагеном цельной крови и метагеном (фагоцитов) псориатической кожи при ее стабильном состоянии. Мгновенный срез.
75. <i>nhDNA-MPS</i>	Предполагаемые фракции MPS - метагенома (фагоцитов) псориатической кожи
76. <i>MPS-example</i>	Алгоритм разделения MPS - метагенома (фагоцитов) псориатической кожи на фракции и подмножества. Пример.
77. <i>Phagocytes selection</i>	Отбор фагоцитов из псориатической кожи иммуномагнитным методом
78. <i>NME-1</i>	Подготовка и последующее обогащение образцов крови с помощью NebNext Microbiome Enrichment kit
79. <i>NME-1a</i>	Цельность (фрагментное распределение) DNA изолированной из цельной крови
80. <i>NME-2</i>	Отбор нехозяйской DNA из биоматериала, содержащего преимущественно хозяйскую DNA (клетки крови или кожи). Набор NebNext Microbiome Enrichment
81. <i>NME-3</i>	Обогащение образцов слюны и крови с помощью NebNext Microbiome Enrichment kit
82. <i>NME-4</i>	Элиминация hDNA из образцов слюны несколькими способами, в т.ч. NME (ЗП, n=8, Marotz 2018)
83. <i>Section5</i>	Раздел 5. Порядок участия пациентов. Основные вопросы и новизна.
84. <i>Part_Order_NCS1</i>	Этап 1. Порядок участия псориатических пациентов (ПП) и здоровых персон (ЗП) в проекте NCS1.
85. <i>Stage1-Q1</i>	Вопрос 1. Коррелирует ли тяжесть псориатической болезни с концентрацией каких-либо nhDNA в цельной крови и/или с уровнем PAMP-немии?
86. <i>Stage1-Q2</i>	Вопрос 2. Поступает ли недеградированная nhDNA из крови в псориатическую кожу?
87. <i>Stage1-Q1&2</i>	Проект NCS1. Два главных вопроса.
88. <i>Stage1-new</i>	Проект NCS1. В чем заключается новизна?

7. Библиография

- Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost*. 2009 Jan;101(1):36-47. [19132187](#).
- Albanesi C, Scarponi C, Bosisio D, Sozzani S, Girolomoni G. Immune functions and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in psoriasis. *Autoimmunity*. 2010 Apr;43(3):215-9. [20166874](#).
- Albanesi C, Scarponi C, Pallotta S. et al. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J Exp Med*. 2009 Jan 16;206(1):249-58. [19114666](#).
- Alekseyenko AV, Perez-Perez GI, De Souza A. et al. Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis. *Microbiome*. 2013 Dec 23;1(1):31. [24451201](#).
- Alyami H. NOD1/NOD2 Upregulation in Fusobacterium Nucleatum Induced NETosis. (2018). *Dental Teses*. 29, [link](#).
- Amar J, Lange C, Payros G. et al. Blood microbiota dysbiosis is associated with the onset of cardiovascular events in a large general population: the D.E.S.I.R. study. *PLoS One*. 2013;8(1):e54461. [23372728](#).
- Amar J, Serino M, Lange C. et al. Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia*. 2011 Dec;54(12):3055-61. [21976140](#).
- Applications of Clinical Microbial Next-Generation Sequencing. Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, in April 2015. p.56. [link](#).
- Arakawa A, Siewert K, Stohr J. et al. Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *J Exp Med*. 2015 Dec 14;212(13):2203-12. [26621454](#).
- Aransay AM, Trueba JLL. *Field Guidelines for Genetic Experimental Designs in High-Throughput Sequencing*. Springer International Publishing Switzerland, 2016, 399 p. [ISBN: 978-3-319-31350-4](#).
- Archer MJ, Long N, Lin B. Effect of probe characteristics on the subtractive hybridization efficiency of human genomic DNA. *BMC Res Notes*. 2010 Apr 20;3:109 [20406484](#).
- Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2018 Aug;93(3):1649-1683. [29654714](#).
- a Baker BS, Laman JD, Powles AV. et al, Peptidoglycan and peptidoglycan-specific Th1 cells in psoriatic skin lesions, *J Pathol* 2006 Jun;209(2):174-81. [16493599](#).
- b Baker BS, Powles A, Fry L. Peptidoglycan: a major aetiological factor for psoriasis? *Trends Immunol*. 2006 Dec;27(12):545-51. [17045843](#).
- c Baker BS. *Skin Immune Mechanisms in Health and Disease*, Garner Press, 2006, 328 p. [ISBN 0955160308](#).
Baker BS. *From Arsenic To Biologicals: A 200 Year History Of Psoriasis*, Garner Press, 2008, 128 p. [ISBN 978-0955160325](#).
- Bala S, Marcos M, Gattu A. et al. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. *PLoS One*. 2014 May 14;9(5):e96864. [24828436](#).
- Barreto-Bergter E, Figueiredo RT. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014 Oct 14;4:145. [25353009](#).
- Benhadou F, Mintoff D, del Marmol V Psoriasis: Keratinocytes or Immune Cells – Which Is the Trigger? *Dermatology* 2018. doi: [10.1159/000495291](#).
- Bhat S, Emslie KR. Digital polymerase chain reaction for characterisation of DNA reference materials. *Biomol Detect Quantif*. 2016 May 3;10:47-49. [27990349](#).
- Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009 Oct;30(10):475-87. [19781994](#).
- Blanchet X, Langer M, Weber C, Koenen RR, von Hundelshausen P. Touch of chemokines. *Front Immunol*. 2012 Jul 12;3:175. [22807925](#).
- Bogunovic M, Ginhoux F, Wagers A et al. Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2627-38. [17116734](#).
- Bouslimani A, Porto C, Rath CM et al. Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 28;112(17):E2120-9. [25825778](#).
- 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](#).
- Cheung KL, Jarrett R, Subramaniam S. et al. Psoriatic T cells recognize neolipid antigens generated by mast cell phospholipase delivered by exosomes and presented by CD1a. *J Exp Med*. 2016 Oct 17;213(11):2399-2412. [27670592](#).

- 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](#).
- Ciampolini M, Bini S, Orsi A. Microflora persistence on duodenum-jejunal flat or normal mucosa in time after a meal in children. *Physiol Behav.* 1996 Dec;60(6):1551-6. [8946504](#).
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA. et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):463-9. [17384648](#).
- Codoñer FM, Ramírez-Bosca A, Climent E, et al. Gut microbial composition in patients with psoriasis. *Sci Rep.* 2018 Feb 28;8(1):3812. [29491401](#).
- Christophers E, Metzler G, Röcken M. Bimodal immune activation in psoriasis. *Br J Dermatol.* 2014 Jan;170(1):59-65. [24117368](#).
- Dalpke A1, Frank J, Peter M, Heeg K. Activation of Toll-Like Receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect Immun.* 2006 Feb;74(2):940-6. [16428738](#).
- Davey MS, Morgan MP, Liuzzi AR. et al. Microbe-specific unconventional T cells induce human neutrophil differentiation into antigen cross-presenting cells. *J Immunol.* 2014 Oct 1;193(7):3704-16. [25165152](#).
- De Jongh GJ, Zeeuwen PL, Kucharekova M. et al., High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis *J Invest Dermatol.* 2005 Dec;125(6):1163-73. [16354186](#).
- De Yang, Chen Q, Schmidt AP. et al. LL37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med.* 2000 Oct 2;192(7):1069-74. [11015447](#).
- Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L. et al. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation. *Front Immunol.* 2017 Feb 6;8:81. [28220120](#).
- Dinakaran V, Rathinavel A, Pushpanathan M. et al. Elevated levels of circulating DNA in cardiovascular disease patients: metagenomic profiling of microbiome in the circulation. *PLoS One.* 2014 Aug 18;9(8):e105221. [25133738](#).
- Duan H, Koga T, Kohda F, Hara H, Urabe K, Furue M. Interleukin-8-positive neutrophils in psoriasis., *J Dermatol Sci.* 2001 Jun;26(2):119-24. [11378328](#).
- Ely PH. Is psoriasis a bowel disease? Successful treatment with bile acids and bioflavonoids suggest it is. *Clin Dermatol.* 2018 May - Jun;36(3):376-389. [29908580](#).
- Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr.* 2007 Nov;86(5):1286-92. [17991637](#).
- 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](#).
- Feehery GR, Yigit E, Oyola SO. et al. A method for selectively enriching microbial DNA from contaminating vertebrate host DNA. *PLoS One.* 2013 Oct 28;8(10):e76096. [24204593](#).
- Ferretti P, Farina S, Cristofolini M. et al. Experimental metagenomics and ribosomal profiling of the human skin microbiome. *Exp Dermatol.* 2017 Mar; 26(3):211-219. [27623553](#).
- 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](#).
- Filipe SR, Severina E, Tomasz A. Functional analysis of *Streptococcus pneumoniae* MurM reveals the region responsible for its specificity in the synthesis of branched cell wall peptides. *J Biol Chem.* 2001 Oct 26;276(43):39618-28. [11522792](#).
- 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. [22719987](#).
- Fiser A, Filipe SR, Tomasz A. Cell wall branches, penicillin resistance and the secrets of the MurM protein. *Trends Microbiol.* 2003 Dec;11(12):547-53. 14659686.
- Frey KG, Bishop-Lilly KA. Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection and Identification. Chapter 15 in *Methods in Microbiology.* Volume 42, 2015, 525–554. ISSN 0580-9517. [link](#).
- Fry L. Microbiome of chronic plaque psoriasis. Chapter 21 in *The Human Microbiota and Chronic Disease: Dysbiosis as a Cause of Human Pathology.* 2016, John Wiley & Sons, Inc. ISBN [9781118982877](#), [link](#).
- Fry L, Baker BS, Powles AV, Fahlen A, Engstrand L. Is chronic plaque psoriasis triggered by microbiota in the skin? *Br J Dermatol.* 2013 Jul;169(1):47-52. [23521130](#).
- 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](#).

- Fuentes-Duculan J, Bonifacio KM, Hawkes JE. et al. Autoantigens ADAMTSL5 and LL37 are significantly upregulated in active Psoriasis and localized with keratinocytes, dendritic cells and other leukocytes. *Exp Dermatol*. 2017 Nov;26(11):1075-1082. [28482118](#).
- Fukui H. Endotoxin and Other Microbial Translocation Markers in the Blood: A Clue to Understand Leaky Gut Syndrome. *Cell Mol Med* 2016, 2:3. [link](#).
- Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS. et al. Differential mRNA Expression of Antimicrobial Peptides and Proteins in Atopic Dermatitis as Compared to Psoriasis Vulgaris and Healthy Skin. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008 Apr 30;147(1):17-24. [18446049](#).
- Ganguly D, Chamilos G, Lande R et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med*. 2009 Aug 31;206(9):1983-94. [19703986](#).
- Gao Z, Tseng CH, Strober BE. et al. Substantial alterations of the cutaneous bacterial biota in psoriatic lesions. *PLoS ONE*. 2008 Jul 23;3(7):e2719. [18648509](#).
- Garcia-Garcera M, Garcia-Etxebarria K, Coscolla M, Latorre A, Calafell F. A new method for extracting skin microbes allows metagenomic analysis of whole-deep skin. *PLoS One*. 2013 Sep 20;8(9):e74914. [24073227](#).
- Gaspari AA, Tyring SK, Kaplan DH, *Clinical and Basic Immunodermatology*. Springer, 2017, 889 p. [ISBN 978-3-319-29785-9](#).
- Gijavanekar C, Strych U, Fofanov Y, Fox GE, Willson RC. Rare target enrichment for ultrasensitive PCR detection using cot-rehybridization and duplex-specific nuclease. *Anal Biochem*. 2012 Feb 1;421(1):81-5. [22155054](#).
- Gilliet M, Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2008 Aug;20(4):401-7. [18611439](#).
- Gillitzer R, Wolff K, Tong D et al. MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. *J Invest Dermatol*. 1993 Aug;101(2):127-31. [8345212](#).
- Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M et al. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med*. 2007 Dec 24;204(13):3133-46. [18086862](#).
- Ghanim H, Sia CL, Upadhyay M. et al. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. *Am J Clin Nutr*. 2010 Apr;91(4):940-9. [20200256](#).
- Glassing A, Dowd SE, Galandiuk S. et al. Changes in 16s RNA Gene Microbial Community Profiling by Concentration of Prokaryotic DNA. *J Microbiol Methods*. 2015 Dec;119:239-42. [26569458](#).
- Glassing A, Dowd SE, Galandiuk S, Davis B, Chiodini RJ. Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathog*. 2016 May 26;8:24. [27239228](#).
- a Gnauck A, Lentle RG, Kruger MC. Chasing a ghost?--Issues with the determination of circulating levels of endotoxin in human blood. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(3):197-215. [26732012](#).
- b Gnauck A, Lentle RG, Kruger MC. The Characteristics and Function of Bacterial Lipopolysaccharides and Their Endotoxic Potential in Humans. *Int Rev Immunol*. 2016 May 3;35(3):189-218. [26606737](#).
- Gosiewski T, Ludwig-Galezowska AH, Huminska K. et al. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method - the observation of DNAemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Feb;36(2):329-336. [27771780](#).
- Gosiewski T, Szała L, Pietrzyk A. et al. Comparison of methods for isolation of bacterial and fungal DNA from human blood. *Curr Microbiol*. 2014 Feb;68(2):149-55. [24026449](#).
- Gottlieb AB, Chamian F, Masud S. et al. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol*. 2005 Aug 15;175(4):2721-9. [16081850](#).
- Grayson PC, Kaplan MJ. At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2016 Feb;99(2):253-64. [26432901](#).
- Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*. 2016 Sep;273(1):357-70. [27558346](#).
- Grice EA, Kong HH, Renaud G. et al. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res*. 2008 Jul;18(7):1043-50. [18502944](#).
- Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Apr;9(4):244-53. [21407241](#).
- 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](#).

- Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis-Part II: Immune cell subsets and therapeutic concepts. *J Allergy Clin Immunol.*, 2011 Jun;127(6):1420-32. [21419481](#).
- Gyarmati P, Kjellander C, Aust C. et al. Metagenomic analysis of bloodstream infections in patients with acute leukemia and therapy-induced neutropenia. *Sci Rep.* 2016 Mar 21;6:23532. [26996149](#).
- Hannigan GD, Meisel JS, Tyldsley AS. et al. The human skin double-stranded DNA virome: topographical and temporal diversity, genetic enrichment, and dynamic associations with the host microbiome. *MBio.* 2015 Oct 20;6(5):e01578-15. [26489866](#).
- Hasler P, Giaglis S, Hahn S. Neutrophil extracellular traps in health and disease. *Swiss Med Wkly.* 2016 Oct 10;146:w14352. [27723901](#).
- Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Sep;140(3):645-653. [28887948](#).
- Herster F, Bittner Z, Dickhoefer S. et al. RNA-antimicrobial peptide complexes fuel a TLR- and NETosis mediated inflammatory cycle of neutrophil activation in psoriasis. *bioRxiv* 324814; Epub Sep 5, 2018, doi: <https://doi.org/10.1101/324814>.
- Holler E, Butzhammer P, Schmid K. et al. Metagenomic Analysis of the Stool Microbiome in Patients Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation: Loss of Diversity Is Associated with Use of Systemic Antibiotics and More Pronounced in Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 May;20(5):640-5. [24492144](#).
- Horiba K, Kawada JI, Okuno Y. et al. Comprehensive detection of pathogens in immunocompromised children with bloodstream infections by next-generation sequencing. *Sci Rep.* 2018 Feb 28;8(1):3784. [29491477](#).
- Hu SC, Yu HS, Yen FL. et al. Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human β -defensin-2 production in epidermal keratinocytes. *Sci Rep.* 2016 Aug 5;6:31119. [27493143](#).
- Huh WK, Oono T, Shirafuji Y. et al. Dynamic alteration of human beta-defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin. *J Mol Med.* 2002 Oct;80(10):678-84. [12395153](#).
- 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. [link](#)
- Jagielski T, Rup E, Ziolkowska A. et al. Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. *BMC Dermatol.* 2014 Mar 7;14(1):3. [24602368](#).
- James C, Iwasiow RM, Birnboim HC. Human genomic DNA content of saliva samples collected with the Oragene self-collection kit. *PD-WP-011 Issue 4/2011-11*, [link](#).
- Jansen PA, Rodijk-Olthuis D, Hollox EJ. et al. Beta-defensin-2 protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin. *PLoS ONE.* 2009;4(3):e4725. [19266104](#).
- Jozsef L, Khreiss T, Filep JG. CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes. *FASEB J.* 2004 Nov;18(14):1776-8. [15345690](#).
- Jovel J, Patterson J, Wang W. et al. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Front Microbiol.* 2016 Apr 20;7:459. [27148170](#).
- Kabashima K. Immunology of the Skin. *Basic and Clinical Sciences in Skin Immune Responses.* 2016, Springer Japan, 510 p. [ISBN 978-4-431-55855-2](#).
- Karaji N, Sattentau QJ. Efferocytosis of Pathogen-Infected Cells. *Front Immunol.* 2017 Dec 22;8:1863. [29312342](#).
- Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, Tremaroli V, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun.* 2012;3:1245. [23212374](#).
- Kenny EF, Herzig A, Krüger R. et al. Diverse Stimuli engage different Neutrophil Extracellular Trap pathways. *Elife.* 2017 Jun 2;6. pii: e24437. [28574339](#).
- Kimer N, Pedersen JS, Tavenier J. et al. Rifaximin has minor effects on bacterial composition, inflammation, and bacterial translocation in cirrhosis: A randomized trial. *J Gastroenterol Hepatol.* 2018 Jan;33(1):307-314. [28671712](#).
- Kisiel B, Kisiel K, Szymański K. et al. The association between 38 previously reported polymorphisms and psoriasis in a Polish population: High predictive accuracy of a genetic risk score combining 16 loci. *PLoS One.* 2017 Jun 15;12(6):e0179348. [28617847](#).
- Kim D, Hofstaedter CE, Zhao C, et al. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome.* 2017 May 5;5(1):52. [28476139](#).

- Kim HK, Kim JE, Chung J. et al. Surface expression of neutrophil CXCR4 is down-modulated by bacterial endotoxin. *Int J Hematol.* 2007 Jun;85(5):390-6. [17562613](#).
- Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:2400-7. [17981721](#).
- 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](#).
- Kong HH, Andersson B, Clavel T. et al. Performing Skin Microbiome Research: A Method to the Madness. *J Invest Dermatol.* 2017 Mar;137(3):561-568. [28063650](#).
- Kowarsky M, Camunas-Soler J, Kertesz M. et al. Numerous uncharacterized and highly divergent microbes which colonize humans are revealed by circulating cell-free DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Sep 5;114(36):9623-9628. [28830999](#).
- Krueger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol.* 2002 Jan;46(1):1-23; quiz 23-6. [11756941](#).
- Lambert S, Hambro CA, Johnston A, Stuart PE, Tsoi LC, Nair RP, Elder JT. Neutrophil Extracellular Traps Induce Human Th17 Cells: Effect of Psoriasis-Associated TRAF3IP2 Genotype. *J Invest Dermatol.* 2018 Dec 5. pii: S0022-202X(18)32913-0. [30528823](#).
- Lelouvier B, Servant F, Païssé S. et al. Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis. *Hepatology.* 2016 Dec;64(6):2015-2027. [27639192](#).
- Levitsky E.L. Problem of genetically modified foods safety: a toxicologist's view. *BIOTECHNOLOGIA ACTA,* 2016, 1, 7-26. [elib](#).
- Li D, Li J, Duan Y, Zhou X. Expression of LL37, human beta defensin-2, and CCR6 mRNA in patients with psoriasis vulgaris. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2004;24(4):404-6. [15587410](#).
- Li G, Yang M, Zhou K. et al. Diversity of Duodenal and Rectal Microbiota in Biopsy Tissues and Luminal Contents in Healthy Volunteers. *J Microbiol Biotechnol.* 2015 Jul;25(7):1136-45. [25737115](#).
- Li Q, Wang C, Tang C, Zhao X, He Q, Li J. Identification and Characterization of Blood and Neutrophil-Associated Microbiomes in Patients with Severe Acute Pancreatitis Using Next-Generation Sequencing. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Jan 23;8:5. [29423379](#).
- Lin A, Loré K. Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family. *Front Immunol.* 2017 Dec 11;8:1781. [29321780](#).
- 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](#).
- Lindau D, Mussard J, Wagner BJ. et al. Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *Eur J Immunol.* 2013 Aug;43(8):2101-13. [23686399](#).
- Lipp P, Ruhnau J, Lange A, Vogelgesang A, Dressel A, Heckmann M. Less Neutrophil Extracellular Trap Formation in Term Newborns than in Adults. *Neonatology.* 2017;111(2):182-188. [27884010](#).
- Lluch J, Servant F, Païssé S. et al. The Characterization of Novel Tissue Microbiota Using an Optimized 16S Metagenomic Sequencing Pipeline. *PLoS One.* 2015 Nov 6;10(11):e0142334. [26544955](#).
- Loesche MA, Farahi K, Capone K. et al. Longitudinal Study of the Psoriasis-Associated Skin Microbiome during Therapy with Ustekinumab in a Randomized Phase 3b Clinical Trial. *J Invest Dermatol.* 2018 Sep;138(9):1973-1981. [29559344](#).
- Long Y, Zhang Y, Gong Y et al. Diagnosis of Sepsis with Cell-free DNA by Next-Generation Sequencing Technology in ICU Patients. *Arch Med Res.* 2016 Jul;47(5):365-371. [27751370](#).
- Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014 Mar 21;32:227-55. [24655295](#).
- Lowes MA, Russell CB, Martin DA, Towne JE, Krueger JG. The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. *Trends Immunol.* 2013 Jan 3. pii: S1471-4906(12)00199-8. [23291100](#).
- Maeshima N, Fernandez RC. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Feb 12;3:3. [23408095](#).
- Malachowa N, Kobayashi SD, Quinn MT, DeLeo FR. NET Confusion. *Front Immunol.* 2016 Jun 28;7:259. [27446089](#).
- Malentacchi F, Ciniselli CM, Pazzagli M. et al. Influence of pre-analytical procedures on genomic DNA integrity in blood samples: the SPIDIA experience. *Clin Chim Acta.* 2015 Feb 2;440:205-10. [25485853](#).
- Mangul S, Loohuis LMO, Ori A. et al. Total RNA Sequencing reveals microbial communities in human blood and disease specific effects. *bioRxiv* 057570; <http://dx.doi.org/10.1101/057570>.

- Marotz CA, Sanders JG, Zuniga C. et al. Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion. *Microbiome*. 2018 Feb 27;6(1):42. [29482639](#).
- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:181-218. [24050624](#).
- McCracken JM, Allen LA. Regulation of Human Neutrophil Apoptosis and Lifespan in Health and Disease. *J Cell Death*. 2014 May 8;7:15-23. [25278783](#).
- Meisel JS, Hannigan GD, Tyldsley AS. et al. Skin Microbiome Surveys Are Strongly Influenced by Experimental Design. *J Invest Dermatol*. 2016 May;136(5):947-56. [26829039](#).
- 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](#).
- Milan AM, Pundir S, Pileggi CA. et al. Comparisons of the Postprandial Inflammatory and Endotoxaemic Responses to Mixed Meals in Young and Older Individuals: A Randomised Trial. *Nutrients*. 2017 Apr 2;9(4). [28368340](#).
- Mitsios A, Arampatzioglou A, Arelaki S, Mitroulis I, Ritis K. NETopathies? Unraveling the Dark Side of Old Diseases through Neutrophils. *Front Immunol*. 2017 Jan 11;7:678. [28123386](#).
- Munford RS. Endotoxemia-menace, marker, or mistake? *J Leukoc Biol*. 2016 Oct;100(4):687-698. [27418356](#).
- 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](#).
- Nagl M, Kacani L, Müllauer B. et al. Phagocytosis and Killing of Bacteria by Professional Phagocytes and Dendritic Cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002, Nov;9(6):1165-8. [12414745](#).
- Nakatsuji T, Chiang HI, Jiang SB. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. *Nat Commun*. 2013;4:1431. [23385576](#).
- Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 2014 Jul;15(7):602-11. [24940954](#).
- Nayfach S, Pollard KS. Toward Accurate and Quantitative Comparative Metagenomics. *Cell*. 2016 Aug 25;166(5):1103-1116. [27565341](#).
- Niemeyer-van der Kolk T, van der Wall HEC, Balmforth C. et al. A systematic literature review of the human skin microbiome as biomarker for dermatological drug development. *Br J Clin Pharmacol*. 2018 Oct;84(10):2178-2193. [29877593](#).
- Nikamo P, Lysell J, Ståhle M. Association with Genetic Variants in the IL-23 and NF-κB Pathways Discriminates between Mild and Severe Psoriasis Skin Disease. *J Invest Dermatol*. 2015 Aug;135(8):1969-1976. [25789703](#).
- b Nickoloff BJ, Xin H, Nestle FO, Qin JZ. The cytokine and chemokine network in psoriasis. *Clin Dermatol*. 2007 Nov-Dec;25(6):568-73. [18021894](#).
- Numerof RP, Asadullah K. Cytokine and anti-cytokine therapies for psoriasis and atopic dermatitis. *BioDrugs*. 2006;20(2):93-103. [16626167](#).
- Oehmcke S, Mörgelin M, Herwald H. Activation of the human contact system on neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun*. 2009;1(3):225-30. [20375580](#).
- 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](#).
- Okubo Y, Oki N, Takeda H, Amaya M. et al. Increased microorganisms DNA levels in peripheral blood monocytes from psoriatic patients using PCR with universal ribosomal RNA primers. *J Dermatol*. 2002 Sep;29(9):547-55. [12392062](#).
- Opota O, Jatou K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Apr;21(4):323-31. [25686695](#).
- Ortmann W, Kolaczowska E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. *Cell Tissue Res*. 2018 Mar;371(3):473-488. [29250748](#).
- 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](#).
- 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](#).
- Panda SK, Kolbeck R, Sanjuan MA. Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2017 Feb;44:20-25. [27855321](#).
- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018 Feb;18(2):134-147. [28990587](#).

- Pashenkov MV, Dagil YA, Pinegin BV. NOD1 and NOD2: Molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases. *Int Immunopharmacol*. 2018 Jan;54:385-400. [29207344](#).
- Peabody MA, Van Rossum T, Lo R, Brinkman FS. Evaluation of shotgun metagenomics sequence classification methods using in silico and in vitro simulated communities. *BMC Bioinformatics*. 2015 Nov 4;16:363. [26537885](#).
- Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 2012. 7:385–422 [22054142](#).
- d Peslyak MY, Gumayunova NG, Nesterov AS, Potaturkina-Nesterova NI, Small intestine microflora at psoriasis. Its possible role in pathogenesis, Abstracts of the 3rd World Psoriasis & Psoriatic Arthritis Conference 2012, Stockholm, *Dermatol Ther* 2012, 2(10), S12. [link](#), [link-R](#).
- Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, Hilbrands LB, van der Vlag J. Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol*. 2016 Nov 4;7:484. [27867387](#).
- Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2015 Jul;14(7):633-40. [25797532](#).
- Poindexter BJ. Immunofluorescence deconvolution microscopy and image reconstruction of human defensins in normal and burned skin. *J Burns Wounds*. 2005 Apr 25;4:e7. [16921412](#).
- Potgieter M, Bester J, Kell DB, Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol Rev*. 2015 Jul;39(4):567-91. [25940667](#).
- Psifidi A, Dovas CI, Bramis G. et al. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PLoS One*. 2015 Jan 30;10(1):e0115960. [25635817](#).
- Puri P, Liangpunsakul S, Christensen JE, et al. The circulating microbiome signature and inferred functional metagenomics in alcoholic hepatitis. *Hepatology*. 2018 Apr;67(4):1284-1302. [29083504](#).
- Qian Y, Yang X, Xu S. et al. Detection of Microbial 16S rRNA Gene in the Blood of Patients With Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2018 May 24;10:156. [29881345](#).
- Rademaker M, Agnew K, Anagnostou N. et al. Psoriasis and infection. A clinical practice narrative. *Australas J Dermatol*. Epub 2018 Aug 5. [30079566](#).
- Ramírez-Boscá A, Navarro-López V, Martínez-Andrés A. et al. Identification of Bacterial DNA in the Peripheral Blood of Patients With Active Psoriasis. *JAMA Dermatol*. 2015 Jun;151(6):670-1. [25760018](#).
- Ranjan R, Rani A, Metwally A. et al. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 22;469(4):967-77. [26718401](#).
- Rankin SM. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol*. 2010 Aug;88(2):241-51. [20483920](#).
- Reddy RC, Standiford TJ. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr Opin Hematol*. 2010 Jan;17(1):18-24. [19864946](#).
- 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](#).
- Rizzi A, Raddadi N, Sorlini C. et al. The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals: implications for horizontal gene transfer and the biosafety of GMOs. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012;52(2):142-61. [22059960](#).
- Rohrl J, Yang D, Oppenheim JJ, Hehlgans T. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J Immunol*. 2010 Jun 15;184(12):6688-94. [20483750](#).
- Sabat R, Philipp S, Höflich C. et al. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol*. 2007 Oct;16(10):779-98. [17845210](#).
- Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C. et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood*. 2012 Oct 11;120(15):3007-18. [22932797](#).
- Sato J, Kanazawa A, Ikeda F. et al. Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2014 Aug;37(8):2343-50. [24824547](#).
- Sekine K, Toida T, Saito M. et al. A New Morphologically Characterized Cell Wall Preparation (Whole Peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a Higher Efficacy on the Regression of an Established Tumor in Mice. *Cancer Res*. 1985 Mar;45(3):1300-7. [3971375](#).
- Schuster S, Hurrell B, Tacchini-Cottier F. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *J Leukoc Biol*. 2013 Oct;94(4):671-5. [23250891](#).
- Schon MP, Broekaert SM, Erpenbeck L. Sexy again: The renaissance of neutrophils in psoriasis. *Exp Dermatol*. 2017 Apr;26(4):305-311. [27194625](#).

- Schon MP, Erpenbeck L. The interleukin-23/interleukin-17 Axis Links Adaptive and innate immunity in Psoriasis. *Front Immunol.* 2018 Jun 15;9:1323. [29963046](#).
- Schonrich G, Raftery MJ. Neutrophil Extracellular Traps Go Viral. *Front Immunol.* 2016 Sep 19;7:366. [27698656](#).
- Sharpston TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front Plant Sci.* 2014 Jun 16;5:209. [24982662](#).
- Shen XF, Cao K, Jiang JP, Guan WX1, Du JF. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J Cell Mol Med.* 2017 Sep;21(9):1687-1697. [28244690](#).
- Skrzeczynska-Moncznik J, Wlodarczyk A, Zabieglo K. et al. Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor-Competent DNA Deposits Are Potent Stimulators of Plasmacytoid Dendritic Cells: Implication for Psoriasis. *J Immunol.* 2012 Aug 15;189(4):1611-7. [22786767](#).
- Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun;10(6):427-39. [20498669](#).
- Song Y, Giske CG, Gille-Johnson P. et al. Nuclease-assisted suppression of human DNA background in sepsis. *PLoS One.* 2014 Jul 30;9(7):e103610. [25076135](#).
- Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM. et al. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Jan 15;183(2):234-42. [20732989](#).
- Sozzani S. Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Dec;16(6):581-92. [15963754](#).
- Spisák S, Solymosi N, Ittész P. et al. Complete genes may pass from food to human blood. *PLoS One.* 2013 Jul 30;8(7):e69805. 23936105.
- Statnikov A, Alekseyenko AV, Li Z. et al. Microbiomic signatures of psoriasis: feasibility and methodology comparison. *Sci Rep.* 2013 Sep 10;3:2620. [24018484](#).
- Stevenson M, Pandor A, Martyn-St James M, et al. Sepsis: the LightCycler SeptiFast Test MGRADE®, SepsisTest™ and IRIDICA BAC BSI assay for rapidly identifying bloodstream bacteria and fungi - a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2016 Jun;20(46):1-246. [27355222](#).
- Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta.* 2008 Jan;387(1-2):55-8. [17916343](#).
- Tacke F, Ginhoux F, Jakubzick C, van Rooijen N, Merad M, Randolph GJ. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Exp Med.* 2006 Mar 20;203(3):583-97. [16492803](#).
- Takemoto A, Cho O, Morohoshi Y, Sugita T, Muto M. Molecular characterization of the skin fungal microbiome in patients with psoriasis. *J Dermatol.* 2015;42(2):166-70. [25510344](#).
- Tan B, Ng C, Nshimiyimana JP. et al. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Front Microbiol.* 2015 Sep 25;6:1027. [26441948](#).
- Tanes CE. Psoriasis: A Study of the Skin Transcriptome and Microbiome. 2015. Drexel University, 107 p. [link](#).
- Tett A, Pasolli E, Farina S. et al. Unexplored diversity and strain-level structure of the skin microbiome associated with psoriasis. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2017 Jun 22;3:14. [28649415](#).
- Terui T, Ozawa M, Tagami H. Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. *Exp Dermatol.* 2000 Feb;9(1):1-10. [10688368](#).
- Tonel G, Conrad C. Interplay between keratinocytes and immune cells - Recent insights into psoriasis pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 May;41(5):963-8. [19027868](#).
- Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL. et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nat Methods.* 2015 Oct;12(10):902-3. [26418763](#).
- Tsoi LC, Stuart PE, Tian C. et al. Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nat Commun.* 2017 May 24;8:15382. [28537254](#).
- Uhl B, Vadlau Y, Zuchriegel G. et al. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood.* 2016 Nov 10;128(19):2327-2337. [27609642](#).
- Urošević M, Dummer R, Conrad C. et al. Disease-Independent Skin Recruitment and Activation of Plasmacytoid Dendritic Cells Following Imiquimod Treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Aug 3;97(15):1143-53. [16077073](#).
- Valdimarsson H, Thorleifsdóttir RH, Sigurdardóttir SL, Gudjonsson JE, Johnston A. Psoriasis - as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol.* 2009 Oct;30(10):494-501. [19781993](#).

- van den Berg JM1, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2001 Mar;69(3):467-73. [11261795](#).
- van de Kerkhof P.C.M. The evolution of the psoriatic lesion. *British Journal of Dermatology* 2007, 157, pp4–15 [17578434](#).
- Vanderpuye-Orgle J, Zhao Y, Lu J. et al. Evaluating the economic burden of psoriasis in the United States. *J Am Acad Dermatol.* 2015 Jun;72(6):961-7.e5. [25882886](#).
- Vestergaard C, Just H, Baumgartner Nielsen J et al. Expression of CCR2 on monocytes and macrophages in chronically inflamed skin in atopic dermatitis and psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 2004;84(5):353-8. [15370700](#).
- Vetrovsky T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One.* 2013;8(2):e57923. [23460914](#).
- Vincent AT, Derome N, Boyle B. et al. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J Microbiol Methods.* 2017 Jul;138:60-71. [26995332](#).
- Vojdani A. For the assessment of intestinal permeability, size matters. *Altern Ther Health Med.* 2013 Jan-Feb;19(1):12-24. [23341423](#).
- Vollmer W1, Seligman SJ. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.* 2010 Feb;18(2):59-66. [20060721](#).
- Wang Q, Vasey FB, Mahfood JP, Valeriano J, Kanik KS, Anderson BE, Bridgeford PH. V2 regions of 16S ribosomal RNA used as a molecular marker for the species identification of streptococci in peripheral blood and synovial fluid from patients with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999 Oct;42(10):2055-9. [10524676](#).
- a Wang J, Arase H. Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 Jun;1319:66-81. [24850053](#).
- b 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](#).
- Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 2014 Mar 3;15(3):R46. [24580807](#).
- Wright W.F, Overman S.B, Ribes J.A. (1–3)-beta-D-Glucan Assay: A Review of its Laboratory and Clinical Application. *Laboratory Medicine*, Volume 42, Issue 11, 1 November 2011, Pages 679–685, [link](#).
- Yan D, Issa N, Afifi L. et al. The Role of the Skin and Gut Microbiome in Psoriatic Disease. *Curr Derm Rep* (2017). [doi:10.1007/s13671-017-0178-5](#).
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN. et al. beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6, *Science.* 1999 Oct 15;286(5439):525-8. [10521347](#).
- Yin X, Cheng H, Lin Y. et al. A Weighted Polygenic Risk Score Using 14 Known Susceptibility Variants to Estimate Risk and Age Onset of Psoriasis in Han Chinese. *PLoS One.* 2015 May 1;10(5):e0125369. [25933357](#).
- Yigit E, Feehery GR, Langhorst BW. et al. A Microbiome DNA Enrichment Method for Next-Generation Sequencing Sample Preparation. *Curr Protoc Mol Biol.* 2016 Jul 1;115:7.26.1-7.26.14. [27366894](#).
- a 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](#).
- Zhou L, Pollard AJ. A novel method of selective removal of human DNA improves PCR sensitivity for detection of *Salmonella Typhi* in blood samples. *BMC Infect Dis.* 2012 Jul 27;12:164. [22839649](#).
- Брызгунова О.Е., Лактионов П.П. Формирование пула циркулирующих ДНК крови: источники, особенности строения и циркуляции. *Биомедицинская Химия.* 2015, 4, 409–426. [elib](#).
- Воробьева Н.В., Пинегин Б.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии (обзор), *Биохимия.* 2014. Т. 79. № 12. С. 1580-1591. [25716722](#), [elib](#).
- 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. [elib](#).
- a Гумаюнова Н.Г. Синдром избыточного роста бактерий в тонкой кишке при псориатической болезни на фоне бластоцистной инвазии. дис. к.мн, Челябинск, 2009, 169 с., [link](#).
- b Гумаюнова Н.Г., Потатуркина-Нестерова Н.И., Нестеров А.С., Магомедов М.А. Новые подходы к диагностике кишечного дисбиоза у пациентов с псориатической болезнью. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина,* 2009;(2):93-97. [elib](#).

- с Гумаюнова Н.Г. Выявление синдрома избыточного роста бактерий в тонкой кишке при псориазической болезни. Аспирантский вестник Поволжья, 2009(3-4):162-4. [elib](#).
- Знаменская Л.Ф., Мелехина Л.Е., Богданова Е.В., Минеева А.А. Заболеваемость и распространенность псориаза в РФ. Вестник дерматологии и венерологии. 2012. № 5. с. 20-29. [elib](#)
- Корниенко В.Ю. Микробиом кожи: взаимосвязь между изменением микробного сообщества и болезнью (обзор литературы), Молодой ученый. 2015. № 10 (90). 477-483. [elib](#).
- Короткий Н.Г., Песляк М.Ю. Псориаз как следствие включения beta-стрептококков в микробиоценоз кишечника с повышенной проницаемостью (концепция патогенеза). Вестник дерматологии и венерологии, 2005;(1): 9-18, [link1](#), [link2](#), [elib](#)
- Кубанов А.А., Карамова А.Э., Знаменская Л.Ф., Чикин В.В., Кондрашова В.В. Индекс PASI (psoriasis area and severity index) в оценке клинических проявлений псориаза. Вестник дерматологии и венерологии. 2016. № 4. С. 33-38. [elib](#).
- Кубанов А.А., Кубанова А.А., Карамова А.Э., Минеева А.А. Распространенность генетических факторов риска псориаза среди населения Российской Федерации. Вестник дерматологии и венерологии. 2014. № 6. С. 69-76. [elib](#).
- Мазо В.К., Гмошинский И.В., Саблина В.В., Зорин С.Н. Проницаемость стенки тонкой кишки для белковых антигенов у человека и лабораторных животных. Вопросы питания. 2008. Т. 77. № 2. С. 10-22. [elib](#).
- Мишина О.С. Тенденции заболеваемости псориазом в России в 2009-2013 гг. Социальные аспекты здоровья населения. 2015. т.41. № 1. с.7. [elib](#)
- Парфенов А.И., Мазо В.К., Гмошинский И.В., Сафонова С.А., Екисенина Н.И. Клиническое значение определения овальбумина в крови после пероральной нагрузки дозой белков куриных яиц, Российский Гастроэнтерологический журнал, 1999;(2), [link](#)
- а Песляк М.Ю. Модель патогенеза псориаза. Часть 1. Системный псориазический процесс, Москва, МУРЕ, 2012, 94 с, ISBN 9785905504013, [link](#).
- б Песляк М.Ю. Модель патогенеза псориаза. Часть 2. Локальные процессы, Москва, МУРЕ, 2012, 116 с, ISBN 9785905504037, [link](#).
- с Песляк М.Ю. Псориаз как реакция кожи на системный псориазический процесс SPP. Y-модель патогенеза. Презентация теоретического исследования. Москва, 2012, 44 с, DOI: [10.5281/zenodo.1977244](https://doi.org/10.5281/zenodo.1977244).
- а Песляк М.Ю. Монография «Метагеномы фагоцитов крови и фагоцитов псориазической кожи. Проект НИР.», v1.6, Москва, 2017, 40 с, DOI: [10.5281/zenodo.1415419](https://doi.org/10.5281/zenodo.1415419).
- б Песляк М.Ю. Презентация «Метагеномы фагоцитов крови и фагоцитов псориазической кожи. Проект НИР.», v1.6, Москва, 2017, 77 с, DOI: [10.5281/zenodo.1439322](https://doi.org/10.5281/zenodo.1439322).
- с Песляк М.Ю., Короткий Н.Г. Проект научно-исследовательской работы «Метагеномы фагоцитов крови и фагоцитов псориазической кожи» (НИР1). 38 слайдов, Доклад-презентация. VII Межрегиональный форум дерматовенерологов и косметологов, IFDC Moscow 2017, [link](#).
- Рудковская Ж.В., Клинико-лабораторный мониторинг эффективности применения метода интервальной нормобарической гипоксии в комплексном лечении псориаза у детей. Дис. к.м.н., Москва, 2003, 137 с
- 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. [elib](#).
- Тягт А.В. Функциональный анализ метагенома кишечника человека. дис. к.м.н., Москва, 2014, 131 с. [link](#).
- Федеральные клинические рекомендации по ведению больных псориазом. [РОДВК](#), Москва. 2015, 59 с, [link](#), [ФЭМБ](#)
- Фомина Е.С. Ассоциация вирусов папилломы человека и стафилококков в формировании нарушений микрофлоры кожи при псориазе. дис., к.м.н., Москва, 2009, 110 с. [link](#)
- Харьков Е.И., Прохоренков В.И., Ширяева Ю.А. Показатели функциональной активности тонкой кишки у больных псориазом. Сибирское медицинское обозрение, 2008;(6):55-58. [elib](#).
- Харьков Е.И., Ширяева Ю.А., Терешина Д.С. Синдром мальабсорбции и псориаз: способ коррекции. Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2006;(7):61-63. [elib](#).
- Харьков Е.И., Ширяева Ю.А. Синдром мальабсорбции при псориазе: клинико-лабораторные параллели. Сибирское медицинское обозрение, 2005;(2-3):62-64. [elib](#).
- Ширяева Ю.А. Синдром мальабсорбции у больных псориазом. дис. к.м.н., Красноярск, 2007, 150 с. [link](#).