На правах рукописи

ПАШКИН

Алексей Юрьевич

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВ СЕМЕЙСТВА ИНТЕРЛЕЙКИНА-36 В КОЖЕ ПАЦИЕНТОВ С БЛЯШЕЧНЫМ ПСОРИАЗОМ

14.01.10 – кожные и венерические болезни
14.03.02 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Научные руководители:

Хайрутдинов Владислав Ринатович, доктор медицинских наук, доцент.

Белоусова Ирена Эдуардовна, доктор медицинских наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Смирнова Ирина Олеговна – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Правительства Российской Федерации, кафедра инфекционных болезней, эпидемиологии и дерматовенерологии медицинского факультета, профессор кафедры.

Катунина Оксана Рахимовна – доктор медицинских наук, доцент, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения города Москвы», главный научный сотрудник отдела научно-прикладных методов исследования.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «17» мая 2021 года в 12 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 215.002.01 на базе Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова» Министерства обороны России (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.6)

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на официальном сайте ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Автореферат разослан «___»_____2021 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук профессор
Пономаренко Геннадий Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

На сегодняшний день псориаз является одной из актуальных проблем дерматовенерологии, что обусловлено значительной распространённостью заболевания (0,6–6,5% среди мирового населения) и увеличением случаев тяжелых форм, таких как псориатический артрит, псориатическая эритродермия и пустулезный псориаз [Кубанова А.А. и др., 2010; Олисова О.Ю. и др., 2010; Перламутров Ю.Н. и др., 2013]. Примерно у половины пациентов псориаз имеет среднетяжелую и тяжелую степень тяжести [Бакулев А.Л. и др., 2018]. Ежегодно в Российской Федерации регистрируется около 100 000 новых случаев заболевания [Кубанов А.А. и др., 2014]. Псориаз часто ассоциирован с коморбидными заболеваниями, такими как абдоминальное ожирение, артериальная гипертензия, сахарный диабет, что в значительной степени ухудшает качество жизни пациентов [Потекаев Н.Н. и др., 2012; Олисова О.Ю. и др., 2016; Кочергин Н.Г. и др., 2012; Бакулев А.Л. и др., 2018].

В настоящее время ключевую роль в развитии воспаления при псориазе играют цитокины – фактор некроза опухоли-α, IL-1, -12, -17, -22 и -23, которые секретируются Т-лимфоцитами, дендритными клетками и кератиноцитами [Потекаев Н.Н. и др., 2012; Олисова О.Ю. и др., 2010; Кубанова А.А., и др., 2014; Самцов А.В., и др., 2016; Хайрутдинов В.Р. и др., 2016; Хобейш М.М. и др., 2013; Смирнова С.В. и др. 2014].

Сравнительно недавно было открыто новое семейство цитокинов IL-36, к которому принадлежат агонисты: IL-36α (IL-1F6), IL-36β (IL-1F8), IL-36γ (IL-1F9); рецепторный антагонист IL-36Ra (IL-1F5) и IL-38 (IL-1F10). Основным источником IL-36 в коже являются кератиноциты [Buhl A.L. et al., 2019]. Цитокины IL-36α, IL-36β и IL-36γ оказывают выраженный провоспалительный эффект, посредством их связи со специфическим рецептором IL-36R, локализующимся на кератиноцитах, дендритных клетках, макрофагах и Т-лимфоцитах. Результатом взаимодействия является индукция секреции иммунными клетками провоспалительных цитокинов, хемокинов, факторов роста и антимикробных пептидов [Murrieta-Coxca J.M. et al., 2019; Sims J.E. et al. 2010].

Цитокины IL-36 экспрессируются клетками в виде неактивных предшественников и для их активации требуется протеолиз [Henry C.M., et al., 2016]. При псориазе в очаг поражения всегда мигрируют нейтрофильные гранулоциты. В ряде исследований было установлено, что сериновые протеазы нейтрофилов – катепсин G, нейтрофильная эластаза и протеиназа-3 являются мощными активаторами агонистов IL-36, повышающими их активность путем протеолиза в сотни раз [Коротина О.Л. и др. 2012; Schön, M.P. et al., 2016; Henry C.M. et al., 2016].

Разнообразие клинических проявлений псориаза нередко усложняет дифференциальную диагностику. При нетипичной клинической картине псориаза выполняют диагностическую биопсию кожи с последующим

гистологическим исследованием. Патоморфологические изменения при псориазе – равномерный акантоз, паракератоз, папилломатоз, периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты в сосочковом слое дермы – не являются строго специфичными и встречаются при ряде других дерматозов – красном плоском лишае, нейродермите, нуммулярной экземе, грибовидном микозе [Chau, T. et al., 2017; Cohen J.N. et al., 2020]. В последние годы были предприняты попытки найти патогномоничные признаки заболевания. Однако большинство изученных маркеров неспецифичны и выявляются при других хронических заболеваниях кожи [Enerbck C., 2011].

В настоящее время таргетная терапия находит все более широкое применение в дерматовенерологии, поэтому изучение патоморфологических изменений и выявление специфичных медиаторов воспаления при иммуноопосредованных заболеваниях кожи приобретает большое значение в клинической практике. Исследование цитокинов семейства IL-36 и протеаз, участвующих в их активации, является актуальной научной задачей, которая будет способствовать лучшему пониманию патогенеза псориаза, открытию новых подходов в диагностике и лечении заболевания. Дальнейшее изучение цитокинов IL-36 может стать одним из приоритетных направлений научной деятельности в рамках реализации нового государственного проекта «Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года», разработанного в соответствии с указом Президента Российской Федерации от 7 мая 2018 года №204 «О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года».

Степень разработанности темы исследования

В последние годы изучению роли цитокинов семейства IL-36 в патогенезе псориаза отводится важное место в исследованиях зарубежных авторов. Наиболее значимые работы представлены Blumberg (2007), Towne J.E. (2011) и Sims J.E. (2010), которые впервые установили значение цитокинов IL-36 в инициации воспалительного процесса в коже экспериментальных животных и больных псориазом [Blumberg H. et al., 2007; Towne J.E. et al., 2011; Sims J.E. et al., 2010]. Ganesan R. (2017) и Todorović V. (2019) разработали и провели аппробацию препаратов, блокирующих активность IL-36 – моноклональных антител к рецептору IL-36R и антител к IL-36γ [Ganesan R., 2017; Todorović V., 2019]. Другим направлением исследований стало изучение протеаз, влияющих на активность IL-36. В 2018 г. Sullivan G.P. и соавт. идентифицировали ряд низкомолекулярных соединений, которые ингибируют сериновые протеазы, и тем самым препятствуют активации цитокинов IL-36 [Henry C.M. et al., 2016; Sullivan G.P. et al., 2018].

В тоже время в отечественной литературе роль цитокинов IL-36 в патогенезе псориаза недостаточно освещена. В 2015 г. Заславский Д.В. и соавт. описали биологические свойства цитокинов семейства IL-36 и исследовали диагностическую значимость IL-36γ при псориатической эритродермии [Заславский Д.В. и др. 2015]. Колобов А.А. с соавт. (2017) изучили физико-химические свойства рецепторного антагониста IL-36 (IL-36RA) и разработали технологию его получения [Колобов А.А. и др. 2017]. Однако не изученными

остаются аспекты, связанные с регуляцией экспрессии и активацией цитокинов IL-36, роли сериновых протеаз нейтрофильных гранулоцитов, значение каждого из агонистов IL-36 в воспалительном процессе при бляшечном псориазе в разные его периоды.

Цель – исследовать экспрессию цитокинов семейства интерлейкина-36 и сериновых протеаз в коже пациентов с бляшечным псориазом.

Задачи исследования:

1. Исследовать уровень экспрессии цитокинов IL-36α, IL-36γ, IL-36R и сериновых протеаз (нейтрофильная эластаза, катепсин G) в коже больных псориазом в разные периоды заболевания.
2. Выявить клинико-морфологические корреляции между степенью тяжести псориаза и уровнем экспрессии цитокинов семейства IL-36, а также сериновых протеаз в коже пациентов.
3. Выполнить сравнительный анализ уровней экспрессии IL-36γ в коже пациентов с бляшечным псориазом и другими хроническими дерматозами.
4. На основании оценки уровня экспрессии IL-36γ разработать критерии дифференциальной диагностики бляшечного псориаза и оценить их диагностическую значимость.

Научная новизна исследования

Установлено, что уровень экспрессии IL-36α, IL-36γ и сериновых протеаз (нейтрофильная эластаза и катепсин G) в пораженной коже больных псориазом в прогрессирующем периоде выше по сравнению со стационарным периодом, с непоражёнными участками кожи и со здоровыми людьми. Обнаружено, что количество клеток, экспрессирущих на своей поверхности рецептор IL-36R, в пораженных участках кожи больных псориазом более чем в 3 раза выше, чем в непораженных участках и в группе контроля. Выявлена ассоциация между уровнем экспрессии в коже сериновых протеаз и цитокинов IL-36.

Отмечена выраженная экспрессия IL-36γ в пораженной коже больных бляшечным псориазом. Установлена взаимосвязь между продукцией IL-36γ и степенью тяжести псориаза: у пациентов со средней и тяжелой степенью определяется более высокий уровень IL-36γ в эпидермисе.

Выявлены особенности экспрессии IL-36γ в коже больных с другими хроническими дерматозами на примере нуммулярной экземы, ограниченного нейродермита, красного плоского лишая, грибовидного микоза. У пациентов с нуммулярной экземой и ограниченным нейродермитом обнаружена слабая или умеренная секреция IL-36γ, у больных красным плоским лишаем, грибовидным микозом – слабая или отсутствовала.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты исследования позволяют изучить участие врожденного иммунитета в развитии псориаза, указывают на значимую роль цитокинов семейства IL-36 и сериновых протеаз в патогенезе бляшечного псориаза и могут быть использованы для разработки таргетных препаратов для подавления иммунного воспаления.

Установлены закономерности распределения клеток, экспрессирующих рецептор IL-36R, в эпидермисе и дерме больных псориазом в сравнении с

непоражёнными участками кожи и группой контроля. Выявлены иммуногистохимические особенности экспрессии цитокинов IL-36α, IL-36γ и нейтрофильных протеаз в пораженной и непораженной коже пациентов с бляшечным псориазом в зависимости от клинической картины заболевания.

Научно обоснована возможность использования показателя экспрессии IL-36γ в коже больных псориазом в качестве дополнительного критерия оценки степени тяжести заболевания у пациентов с часто рецидивирующим и торпидным к терапии течением, что может применяться в целях оптимизации тактики лечения.

Разработан высокоинформативный диагностический патоморфологический критерий бляшечного псориаза, позволяющий проводить дифференциальную диагностику с нуммулярной экземой, ограниченным нейродермитом, красным плоским лишаем, грибовидным микозом – выявление 4-х и более рядов IL-36γ^+-клеток в верхних слоях эпидермиса (Se=98%, Sp=91%).

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационного исследования явилось последовательное применение методов научного познания с применением клинических, инструментальных и статистических методов. Работа выполнена в дизайне клинического исследования случай-контроль. Объектами изучения стали пациенты с бляшечным псориазом. Исследование проведено с соблюдением требований национального стандарта Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» ГОСТ Р 52379-2005.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Относительная площадь экспрессии IL-36α, IL-36γ, рецептора IL-36 (IL-36R), катепсина G и нейтрофильной эластазы в области высыпаний у пациентов с бляшечным псориазом выше, чем в непораженных участках кожи и у здоровых людей. Наиболее высокие показатели экспрессии IL-36α, IL-36γ и сериновых протеаз наблюдается у больных в прогрессирующем периоде заболевания.
2. Экспрессия IL-36γ в коже больных псориазом повышается при увеличении степени тяжести заболевания. Выявление 8-ми и более рядов IL-36γ^+-клеток в эпидермисе является патоморфологическим признаком среднетяжелого и тяжелого течения бляшечного псориаза (Se=92,5%, Sp=54,5%).
3. Определение уровня экспрессии IL-36γ в эпидермисе позволит с высокой чувствительностью и специфичностью провести дифференциальную диагностику бляшечного псориаза с нуммулярной экземой, ограниченным нейродермитом, грибовидным микозом, красным плоским лишаем (Se=98%, Sp=91%).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена на репрезентативности и достаточном количестве пациентов, включенных в исследование, объеме анализируемого материала, высокой информативности и адекватности методов исследования, а также правильном применении статистических методов обработки данных. Методологические подходы, использованные в исследовании, правильные и современные. Морфологическое

исследование образцов кожи проводилось на сертифицированном оборудовании. Сформулированные в работе выводы и рекомендации подкреплены достоверными данными.

Результаты диссертационной работы внедрены в научную, учебную и лечебную работу кафедры кожных и венерических болезней федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, из них 3 статьи, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий ВАК Минобрнауки Российской Федерации, зарегистрирован 1 патент на изобретение.

Основные положения работы доложены и обсуждены на: 27-м конгрессе Европейской Академии дерматологии и венерологии (EADV) (Вена, Австрия, 2018); XVIII Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2018); Всероссийском конгрессе «Боткинские Чтения» (Санкт-Петербург, 2018); XXXVI Научно-практической конференции «Рахмановские чтения» (Москва, 2019); Всероссийском конгрессе «Боткинские Чтения» (Санкт-Петербург, 2019); 24 Всемирном конгрессе по дерматологии (WCD) (Милан, Италия, 2019); XIII Всероссийской научно-практической конференции «Санкт-Петербургские дерматологические чтения» (Санкт-Петербург, 2019); Заседании Санкт-Петербургского научного общества дерматовенерологов им. В.М. Тарновского (Санкт-Петербург, 2019); XXXVII Научно-практической конференции «Рахмановские чтения» (Москва, 2020); XIV Всероссийской научно-практической конференции «Санкт-Петербургские дерматологические чтения» (Санкт-Петербург, 2020).

Личное участие автора в получении результатов

Автор проанализировал литературные данные по теме диссертационного работы, разработал дизайн исследования, провел отбор пациентов и их клиническое обследование. Личный вклад автора состоял в сборе первичного материала для гистологического и иммуногистохимического исследования, в обработке, статистическом анализе полученных результатов, в формулировании выводов и рекомендаций.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, 3-х глав, обсуждений, выводов, рекомендаций и библиографического списка. Работа представлена на 100 страницах, содержит 40 рисунков и 25 таблиц. Список используемой литературы включает 137 наименований, из которых 27 — отечественных авторов и 110 — зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Всего в диссертационное исследование было включено 160 человек, проходивших обследование и лечение в клинике кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова» МО РФ.

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Рисунок 1. Дизайн исследования

На первом этапе было сформировано три группы пациентов: группа исследования, группа сравнения и группа контроля. В группу исследования были включены больные бляшечным псориазом (n=60). Пациентов разделили на 2 подгруппы: прогрессирующий и стационарный период заболевания. В группу сравнения вошли пациенты с нуммулярной экземой, ограниченным нейродермитом, красным плоским лишаем (гипертрофическая форма),

грибовидным микозом (бляшечная стадия). У всех пациентов диагноз был подтвержден гистологическим методом, при необходимости – иммуногистохимическим методом исследования. Группу контроля составили 20 образцов здоровой кожи. При формировании групп сравнения и контроля использовали архивный материал клиники кожных и венерических болезней Военно-медицинской академии (истории болезней и гистологические (парафиновые) блоки).

На втором этапе в группе исследования проводилось клиническое обследование с установлением периода заболевания и оценкой степени тяжести (по PASI).

На третьем этапе выполнялась диагностическая биопсия. Предметами морфологического исследования были пораженные участки кожи, взятые методом инцизионной биопсии, а также непораженные участки больных бляшечным псориазом. Биопсия пораженного участка кожи выполнялась из активного (более красного и шелушащегося участка) в пределах 1 см от края очага. Биопсия непораженного участка кожи выполнялась на расстоянии 2 см от края псориатической бляшки.

На четвёртом этапе проводили гистологическое исследование с применением метода окраски гематоксилин-эозином. Для изучения препаратов применялся световой микроскоп «Olympus BX-46» (Olympus, Япония), оборудованный цифровой камерой «Olympus DP-71». С помощью программного обеспечения «Cell A» изучали патоморфологические изменения в каждом препарате при увеличении ×100 и ×200 в 3 различных полях зрения, выбранных с учетом наиболее выраженных патологических изменений, выполняли цифровые снимки.

На пятом этапе выполняли непрямое иммуногистохимическое исследование с целью определения экспрессии IL-36α, IL-36γ, рецептора IL-36 (IL-36R), сериновых протеаз (нейтрофильная эластаза и катепсин G) в пораженных и непораженных участках кожи пациентов с бляшечным псориазом в разные периоды заболевания в сравнении с группой контроля. В группе сравнения проводилось непрямое иммуногистохимическое исследование для выявления в коже экспрессии IL-36γ. Для детекции IL-36α, IL-36γ, IL-36R и сериновых протеаз использовали первичные античеловеческие антитела (таблица 1).

Таблица 1 – Первичные античеловеческие антитела, использованные при ИГХ-исследовании

Антиген	Вид	Каталожный №, производитель	Разведение антител
IL-36α	Кролик моноклон	Ab180909 (Abcom, USA)	1:100
IL-36γ	Мышь моноклон	Ab156783 (Abcom, USA)	1:100
IL-36R (IL1RL2)	Кролик моноклон	Ab180894(Abcom, USA)	1:200
Катепсин G	Кролик моноклон	Ab192793 (Abcom, USA)	1:100
Нейтрофильная эластаза	Кролик моноклон	Ab131260 (Abcom, USA)	1:300

Для выявления результатов реакции «антиген-антитело» применялась полимерная система визуализации Envision (Dako, Дания) и хромоген диаминобензидин (Dako, Швеция). С целью количественной оценки экспрессии цитокинов IL-36 и сериновых протеаз был использован показатель относительной площади экспрессии – отношение площади окрашенных IL-36^{+}-участков к общей площади среза в поле зрения, выраженный в процентах. Для определения площади окрашенных участков использовали программное обеспечение «Морфология 5.2 (ВидеоТесТ, Россия)», в котором анализировали 3 поля зрения при увеличении ×100, выбранных с учетом наибольшего количества меченых участков. Для каждого препарата определяли медиану относительной площади экспрессии.

Для сравнительной оценки уровня экспрессии IL-36γ в коже больных бляшечным псориазом и группы сравнения использовали полуколичественный критерий по количеству окрашиваемых рядов клеток эпидермиса (без учета рогового слоя) в пораженной коже: 0 – отсутствие экспрессии, 1 – слабый (выявляется 1 ряд IL-36γ^{+}-клеток), 2 – умеренный (2–3 ряда IL-36γ^{+}-клеток), 3 – выраженный (≥4 рядов IL-36γ^{+}-клеток).

На шестом этапе проводилась статистическая обработка полученных данных с использованием программы «SPSS 10.0 for Windows» (SPSS, Inc). Нормальность распределения полученных количественных данных оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Для оценки различий между изучаемыми показателями в исследуемых группах и группе контроля применяли U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались отличия при $p<0,05$ (95 %-уровень значимости). Для выявления и оценки тесноты связи между количественными показателями использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Тесноту связи между признаками считали слабой при $r<0,3$, умеренной – при $0,3\leq r<0,7$, сильной – при $r\geq 0,7$. С целью оценки информативности диагностического признака вычислялись основные показатели критериальной валидности: чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов [Власов В.В., 2001, Флетчер Р., 1998].

Результаты исследования

Клиническая характеристика больных

Всего обследовано 60 пациентов с бляшечным псориазом. Заболевание носило преимущественно сезонный характер с обострением в осенне-зимний период года (зимняя форма) – 90% (54/60), пациенты со смешанной формой составили 10% (6/60); интермиттирующее течение было выявлено у 56,7% (34/60) больных, непрерывное – у 43,3% (26/60). Продолжительность заболевания составила 8,9±5,8 лет. Больные в прогрессирующем периоде заболевания составили 32 человека (53,3%), в стационарном периоде – 28 (46,7%); с легкой степенью тяжести (PASI<10) было 20 человек (33,3%), средней (10≤PASI<20) – 22 (36,3%), тяжелой (PASI≥20) – 18 (30,4%). Среднее значение PASI составило 15,43 (±8,34), медиана – 14,6 [8;17]. Средняя площадь поражения кожи (BSA) была 14% [6,75;18]. Процесс поражения кожи носил

преимущественно распространённый характер (наличие множественных (3 и более) бляшек на коже различных анатомических областей) у 73,3% (44/60), ограниченный – у 26,7% (16/60) пациентов.

Результаты гистологического исследования кожи

В каждом препарате была измерена толщина эпидермиса (ТЭ) в 5-ти, хаотично выбранных, точках измерения (таблица 2). ТЭ в прогрессирующем периоде составила 534,2 мкм, что в 1,4 раза больше, чем в стационарном – 391,4 мкм и в 6,5 раз выше, чем в группе контроля – 82,7 мкм ($p<0,05$). Статистически значимых различий между ТЭ непоражённых участков и группы контроля выявлено не было ($p>0,05$).

Таблица 2 – Толщина эпидермиса больных псориазом и группы контроля

Группа исследования	ТЭ, мкм X [$x_{0.25}$; $x_{0.75}$]	p	
Бляшечный псориаз (пораженный участок кожи) (n=60) $^{\varphi}$	448,5 [387,3;562,3]		<0,05$^{\varphi}$
- прогрессирующий период (n=32)*	534,2 [445,8;572,2]	<0,05*	
- стационарный период (n=28) *	391,4 [318,4;438,9]		
Непоражённый участок кожи (n= 52) **/$^{\varphi}$	82,7 [75,1; 88,4]	>0,05**	
Контрольная группа (n=20) **/$^{\varphi}$	75,8 [62,6; 90,5]		

$^{\varphi}$ - p-value при каждом попарном сравнении групп.

Установлено более выраженное увеличение ТЭ у больных с тяжелой степенью заболевания – 533,6 [480,6; 550,5] мкм по сравнению с группой пациентов легкой и средней степени тяжести – 406,1 [334,8; 460,6] мкм ($p<0,05$). При корреляционном анализе была обнаружена умеренная прямая связь между ТЭ и индексом PASI ($r=0,62$, $p<0,05$).

Результаты непрямого иммуногистохимического исследования кожи

Экспрессия сериновых протез. Относительная площадь экспрессии нейтрофильной эластазы и катепсина G в пораженной коже в 11,7 и 2,1 раза соответственно превышала показатель экспрессии в непораженных участках кожи и в 23,3 и 2,7 раза – в группе контроля ($p<0,01$). Уровень экспрессии NE в прогрессирующем периоде был в 3,2 раза выше, Cat G – в 2,2 раза выше, чем в стационарном периоде ($p<0,05$). Установлено увеличение экспрессии протеаз в образцах непораженной псориазом кожи по сравнению с группой контроля, но статистически значимых различий выявлено не было ($p>0,05$) (таблица 3). Корреляционный анализ показал наличие слабой прямой связи между уровнем секреции NE и ТЭ ($r=0,24$, $p<0,05$)

Таблица 3 – Относительная площадь экспрессии нейтрофильной эластазы и катепсин G в коже больных бляшечным псориазом и группы контроля

Группа исследования	Относительная площадь экспрессии NE, % X [$x_{0.25}$; $x_{0.75}$]	Относительная площадь экспрессии Cat G, % X [$x_{0.25}$; $x_{0.75}$]	p	
Бляшечный псориаз (пораженный участок кожи) (n=60) φ	0,35 [0,2; 0,7]	0,3 [0,2; 0,63]		<0,01φ
- прогрессирующий период (n=32)*	0,65 [0,4; 2,05]	0,51 [0,34; 1,07]	<0,05*	
- стационарный период (n=28)*	0,2 [0,14; 0,27]	0,235 [0,18; 0,3]		
Непоражённый участок кожи (n= 52)**/φ	0,03 [0,01; 0,05]	0,14 [0,08; 0,2]	>0,05**	
Контрольная группа (n=20)**/φ	0,015 [0,00; 0,03]	0,1 [0,08; 0,13]		

φ - p-value при каждом попарном сравнении групп.

Экспрессия цитокина IL-36α. Сравнительный анализ показал увеличение относительной площади экспрессии IL-36α в пораженной коже пациентов с бляшечным псориазом в 18 раз по сравнению с непораженными участками и в 26 раз выше, чем в группе контроля (p<0,01). Уровень экспрессии IL-36α в прогрессирующем периоде был в 2 раза выше данного показателя в стационарном периоде заболевания (p<0,05). В непораженных участках кожи отмечалось статистически значимое увеличение уровня экспрессии цитокина в 1,4 раза по сравнению с группой контроля (p<0,05) (таблица 4).

Таблица 4 – Относительная площадь экспрессии IL-36α в коже больных бляшечным псориазом и группы контроля

Группа исследования	Относительная площадь экспрессии IL-36α, % X [$x_{0.25}$; $x_{0.75}$]	p	
Бляшечный псориаз (пораженный участок кожи) (n=60)*/φ	2,0 [0,85; 2,95]		<0,01φ
- прогрессирующий период (n=32)*	2,8 [1,4; 3,4]	0,013*	
- стационарный период (n=28)*	1,4 [0,82; 2,2]		
Непоражённый участок кожи (n= 52)**/φ	0,11 [0,07; 0,14]	<0,05**	
Контрольная группа (n=20)**/φ	0,07 [0,04; 0,10]		

φ - p-value при каждом попарном сравнении групп.

Анализируя экспрессию у больных псориазом с различной степенью тяжести, мы не установили достоверных различий в уровне секреции IL-36α между изучаемыми группами (p>0,05).

Корреляционный анализ показал умеренную прямую связь между уровнями экспрессии IL-36α и Cat G (r=0,6, p<0,05), а также между IL-36α и NE (r=0,42, p<0,05).

Экспрессия цитокина IL-36γ. При количественном анализе нами установлено увеличение относительной площади экспрессии IL-36γ в пораженной коже пациентов с бляшечным псориазом – 7,0% по сравнению с непораженными участками – 0,2% и группой контроля – 0% (p<0,01). Уровень секреции цитокина в прогрессирующем периоде был в 1,6 раза выше, чем в стационарном периоде заболевания (p<0,01). В непораженных участках кожи выявлено увеличение уровня экспрессии по сравнению с группой контроля, однако статистически значимых различий не установлено (p>0,05) (таблица 5).

Таблица 5 – Относительная площадь экспрессии IL-36γ в коже больных бляшечным псориазом и группы контроля

Группа исследования	Относительная площадь экспрессии IL-36γ, % X [$x_{0.25}$; $x_{0.75}$]	p	
Бляшечный псориаз (пораженный участок кожи) (n=60) φ	7,0 [5,75; 9,8]		<0,01φ
- прогрессирующий период (n=32)*	9,45 [7,1; 12,7]	<0,01*	
- стационарный период (n=28)*	5,8 [5,28; 7,14]		
Непоражённый участок кожи (n= 52)**/ φ	0,2 [0,05; 1,2]	0,13**	
Контрольная группа (n=20)**/ φ	0 [0,00; 0,04]		

φ - p-value при каждом попарном сравнении групп.

Исследование уровня экспрессии IL-36γ в пораженной коже пациентов с различной степенью тяжести представлено в таблице 6

Таблица 6 – Уровень экспрессии IL-36γ в коже больных бляшечным псориазом с различной степенью тяжести

Группа исследования	Относительная площадь экспрессии IL-36γ, % X [$x_{0.25}$; $x_{0.75}$]	Количество рядов IL-36γ^+-клеток	p
- легкая степень тяжести (n=20)	5,7% [4,7; 7,2]	5 [4; 6]	<0,05
- средняя / тяжелая степень (n=40)	8,3% [6,4; 11,9]	8 [6; 9]	

Установлено, что относительная площадь экспрессии IL-36γ, а также количество окрашенных рядов IL-36γ^{+}-клеток эпидермиса в группе пациентов со средней и тяжелой степенью была выше, чем у пациентов с легкой степенью тяжести ($p<0,05$). Достоверных различий в уровне экспрессии IL-36γ между группами пациентов средней степени тяжести и тяжелой не выявлено ($p>0,05$).

Нами была рассчитана диагностическая значимость показателя экспрессии IL-36γ – количество окрашенных рядов клеток эпидермиса в пораженной коже. Установлено, что для группы пациентов со средней и тяжелой степенью показатель уровня экспрессии IL-36γ – окраска ≥8 рядов IL-36γ^{+}-клеток обладает высокой чувствительностью (92,5%), умеренной специфичностью (54,5%), умеренной прогностической ценностью положительного результата (62,5%) и высокой прогностической ценностью отрицательного результата (90%). Следовательно, данный показатель может быть использован в качестве критерия для диагностики бляшечного псориаза среднетяжелого и тяжелого течения.

При проведении корреляционного анализа установлена сильная прямая связь между уровнем экспрессии IL-36γ в пораженной коже и индексом PASI ($r=0,71$, $p<0,05$); умеренная прямая связь между IL-36γ и ТЭ ($r=0,49$, $p<0,05$); слабая прямая связь между IL-36γ и NE ($r=0,25$, $p<0,05$).

Экспрессия рецептора IL-36 (IL-36R). Количество IL-36R^{+}-клеток в коже больных псориазом было в 3,4 раза выше, чем в непораженных участках кожи ($p<0,01$) и в 4,2 раза больше, чем в контрольной группе ($p<0,05$). Статистических значимых различий между уровнем экспрессии IL-36R в прогрессирующем и стационарном периоде, а также между непораженными участками кожи и группой контроля установлено не было (>0,05). Анализ тканевого распределения рецептора IL-36R показал, что в пораженной коже доля IL-36R^{+}-клеток в эпидермисе составила 75%, в непоражённых участках кожи – 62,5%, в контрольной группе – 17,6%. (таблица 7).

Таблица 7 – Численность и распределение IL-36R^{+}-клеток в коже больных бляшечным псориазом и группы контроля

Группа исследования	IL-36R^{+}-клетки X [$x_{0.25}$–$x_{0.75}$]/ 1,55 мм^2	Распределение IL-36R^{+}-клеток, %		Э/Д	p	
		Эпидермис	Дерма			
Бляшечный псориаз (n=60) φ	34[24; 57]	75	25	3:1		<0,01φ
- прогрессирующий период (n=32)*	35[25; 48]	75,4	24,6	3:1	>0,05*	
- стационарный период (n=28)*	34[24; 58]	72,4	27,6	2,6:1		
Непоражённый участок кожи (n= 52)**/ φ	10[3; 17]	62,5	37,5	1,7:1	>0,05**	
Контрольная группа (n=20)** /φ	8[3; 19]	17,6	82,4	1:8		

Э/Д – эпидермо-дермальное соотношение количества IL-36^{+}-клеток;

φ - p-value при каждом попарном сравнении групп

Экспрессия IL-36γ в коже пациентов группы сравнения. В биоптатах кожи пациентов с нуммулярной экземой, ограниченным нейродермитом, красным плоским лишаем, грибовидным микозом изучали экспрессию цитокина IL-36γ и определяли количество меченых рядов IL-36γ$^+$-клеток. Выявлено, что в коже пациентов с нуммулярной экземой и ограниченным нейродермитом наблюдалась слабая или умеренная секреция IL-36γ (1-3 ряда IL-36γ$^+$-клеток), у больных красным плоским лишаем, грибовидным микозом – слабая или отсутствовала (≤1 ряда IL-36γ$^+$-клеток).

При сравнительном анализе уровня экспрессии IL-36γ в образцах кожи группы исследования с группой сравнения были получены следующие результаты. В пораженной коже больных псориазом в 85% случаях наблюдалась выраженная экспрессия IL-36γ – в верхних слоях эпидермиса выявляется 4 и более рядов IL-36γ$^+$-клеток (≥4 рядов IL-36γ$^+$-клеток), умеренная экспрессия – в 15% случаях. В группе сравнения выраженная секреция IL-36γ наблюдалась в единичном случае у пациента с нуммулярной экземой, во всех остальных образцах кожи выраженной экспрессии IL-36γ обнаружено не было (таблица 8).

Таблица 8 – Распределение обследованных больных в зависимости от уровня экспрессии IL-36γ в коже

Уровень экспрессии IL-36γ	БП (n=60), абс. (отн.)	ОН (n=20), абс. (отн.)	НЭ (n=20), абс. (отн.)	КПЛ (n=20) абс. (отн.)	ГМ (n=20), абс. (отн.)	ГК (n=20), абс. (отн.)
отсутствует	0/60 (0%)	4/20 (20%)	0/20 (0%)	3/20 (15%)	15/20 (75%)	18/20 (90%)
слабый (1 ряд IL-36γ$^+$-клеток)	0/60 (0%)	14/20 (70%)	11/20 (55%)	16/20 (80%)	4/20 (20%)	2/20 (10%)
умеренный (2-3 ряда IL-36γ$^+$-клеток)	8/60 (15%)	2/20 (10%)	8/20 (40%)	1/20 (5%)	1/20 (5%)	0/20 (0%)
выраженный (≥4 рядов IL-36γ$^+$-клеток)	52/60 (85%)	0/20 (0%)	1/20 (5%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)

При проведении оценки информативности и диагностической значимости показателя уровня экспрессии IL-36γ (количество рядов IL-36γ$^+$-клеток эпидермиса) было установлено, что значение экспрессии IL-36γ (≥4 рядов IL-36γ$^+$-клеток) у пациентов с бляшечным псориазом обладает высокой чувствительностью (98%), специфичностью (91%), прогностической ценностью положительного (86,7%) и отрицательного результатов (98,8%).

Таким образом, высокий уровень экспрессии IL-36α, IL-36γ, IL-36R, катепсина G, нейтрофильной эластазы в пораженной коже свидетельствует о значимой роли данных медиаторов в патогенезе псориаза, а увеличение секреции IL-36α, IL-36γ и сериновых протеаз у пациентов в прогрессирующем периоде заболевания предполагает их активное участие в инициации и прогрессировании воспаления.

ВЫВОДЫ

1. В пораженной коже больных псориазом в прогрессирующий период уровень экспрессии IL-36α в 2 раза выше, IL-36γ – в 1,6 раза выше, нейтрофильной эластазы – в 3,2 раза выше, катепсин G – в 2,2 раза выше, чем у пациентов в стационарном периоде заболевания и значительно больше, чем у здоровых людей. Количество IL-36R$^+$-клеток в области высыпаний в разные периоды заболевания значимо не отличалось и было в 4,2 раза выше, чем у здоровых лиц.

2. Установлена сильная прямая корреляционная связь ($r=0,71$, $p<0,05$) между степенью тяжести псориаза (значением PASI) и уровнем экспрессии в коже IL-36γ. Клинико-морфологических ассоциаций между уровнем экспрессии IL-36α, IL-36R, сериновых протеаз и степенью тяжести заболевания выявлено не было.

3. Бляшечный псориаз характеризуется высоким уровнем экспрессии IL-36γ (окраска ≥4 рядов IL-36γ$^+$-клеток). При других хронических дерматозах уровень экспрессии менее выражен: у больных нуммулярной экземой, ограниченным нейродермитом выявлена умеренная секреция IL-36γ (2-3 ряда IL-36γ$^+$-клеток), у больных красным плоским лишаем, гипертрофическая форма и грибовидным микозом, бляшечная стадия – слабая или ее отсутствие (≤1 ряда IL-36γ$^+$-клеток).

4. Определён патоморфологический критерий дифференциальной диагностики бляшечного псориаза с другими хроническими дерматозами: наличие 4-х и более окрашенных рядов IL-36γ$^+$-клеток в верхних слоях эпидермиса является специфичным иммуногистохимическим диагностическим признаком псориаза (Se=98%, Sp=91%).

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В сложных диагностических случаях пациентам с бляшечным псориазом рекомендуется выполнить непрямое иммуногистохимическое исследование пораженного участка кожи с определением экспрессии IL-36γ. При выявлении 4-х и более окрашенных рядов IL-36γ$^+$-клеток в верхних слоях эпидермиса диагностируют псориаз.

2. В качестве дополнительного критерия определения степени тяжести псориаза пациентам с часто рецидивирующим и торпидным к терапии течением рекомендуется использовать показатель уровня экспрессии IL-36γ пораженного участка кожи – количество окрашенных рядов IL-36γ$^+$-клеток в эпидермисе. Выявление 8-ми и более рядов IL-36γ$^+$-клеток является признаком среднетяжелого/тяжелого течения псориаза.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Дальнейшего изучения требуют вопросы регуляции экспрессии и активации цитокинов, различия между активными и неактивными формами IL-36, изучение роли рецепторного антагониста IL-36RA и IL-38.

2. Дополнительные исследования необходимы для определения роли каждого агониста IL-36 в воспалительном процессе.

3. Дальнейшее исследование цитокинов семейства IL-36 и сериновых протеаз нейтрофильных гранулоцитов может быть перспективно для разработки новых препаратов таргетной терапии псориаза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пашкин, А.Ю. Роль цитокинов семейства интерлейкина-36 в иммунопатогенезе псориаза / А.Ю. Пашкин, Е.И. Воробьева, В.Р. Хайрутдинов, И.Э. Белоусова, А.В. Самцов, А.В. Гарабаджиу // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20, №2. – С. 163–170.

2. Пашкин, А.Ю. Экспрессия сериновых протеаз в коже больных бляшечным псориазом / А.Ю. Пашкин, А.С. Жуков, В.Р. Хайрутдинов, А.В. Самцов // Сборник тезисов XVIII Всероссийского съезда дерматовенерологов и косметологов. – 2018. – С. 22.

3. Пашкин, А.Ю. Экспрессия нейтрофильной эластазы и катепсина G в коже больных бляшечным псориазом / А.Ю. Пашкин, А.С. Жуков, В.Р. Хайрутдинов, А.В. Самцов // Сборник тезисов всероссийского конгресса Боткинские Чтения. – 2018. – С.142–143.

4. Pashkin, A.Yu. Serine proteases expression in skin of patients with plaque psoriasis / A.Yu. Pashkin, A.S. Zhukov, V.R. Khairutdinov, A.V. Samtsov // 27th EADV Congress. –2018.

5. Пашкин, А.Ю. Уровень нейтрофильной эластазы в коже больных бляшечным псориазом / А.Ю. Пашкин, В.Р. Хайрутдинов, А.В. Самцов // Сборник тезисов XXXVI Научно-практической конференции Рахмановские чтения. – 2019. – С.71–72.

6. Пашкин, А.Ю. Экспрессия интерлейкин-36 γ в коже больных бляшечным псориазом / А.Ю. Пашкин, В.Р. Хайрутдинов, А.В. Самцов // Сборник тезисов всероссийского конгресса Боткинские Чтения. – 2019. – С. 195–196.

7. Pashkin, A.Yu. Immunohistochemical study of interleukin-36 γ in the skin of patients with chronic dermatosis / A.Yu. Pashkin, A.S. Zhukov, V.R. Khairutdinov, A.V. Samtsov // 24 th WORLD Congress of dermatology. – Milan, 2019.

8. Pashkin, A.Yu. The levels of neutrophilic serine proteases in the skin of patients with lesional psoriasis / A.Yu. Pashkin, A.S. Zhukov, V.R. Khairutdinov, A.V. Samtsov // 24 th WORLD Congress of dermatology. – Milan, 2019.

9. Красавин, М.Ю. Ингибирование нейтрофильной эластазы и катепсина G как новый подход к лечению псориаза: от фундаментальной биологии к разработке мишень-специфичных препаратов / М.Ю. Красавин, М.А. Гуреев, А. В. Гарабаджиу, А.Ю. Пашкин, А.С. Жуков, В.Р. Хайрутдинов, А.В. Самцов, В.И. Швец // Доклады Академии наук. – 2019. – Т. 487, № 4. – С. 455–459.

10. Пашкин, А.Ю. Исследование уровня экспрессии интерлейкина-36γ в коже больных бляшечным псориазом / А.Ю. Пашкин, А.С. Жуков, В.Р. Хайрутдинов, И. Э. Белоусова, А.В. Самцов, А.В. Гарабаджиу // Вестник дерматологии и венерологии. – 2019. - № 95(4). – С. 31–39.

11. Пашкин, А.Ю. Интерлейкин-36γ – новый диагностический маркер псориаза / А.Ю. Пашкин, А.С. Жуков, В.Р. Хайрутдинов, И.Э. Белоусова, А.В. Самцов // Сборник тезисов XIII Всероссийской научно-практической конференции «Санкт-Петербургские дерматологические чтения». – 2019. – С. 93–94.

12. Жуков, А.С. Тканевое распределение CD8+- и MELAN+-клеток в коже больных псориазом / А.С. Жуков, А.Ю. Пашкин, В.Р. Хайрутдинов, А.В. Самцов // Сборник тезисов XIII Всероссийской научно-практической конференции «Санкт-Петербургские дерматологические чтения». – 2019. – С. 38–39.

13. Пат. 2703314 C1 Российская Федерация, МПК G01N 33/53. Способ дифференциальной диагностики бляшечного псориаза с другими хроническими заболеваниями кожи / Пашкин А.Ю., А.С. Жуков, В.Р. Хайрутдинов и др.; опубл. 16.10.2019, Бюл. № 29. – 7 с.

14. Пашкин, А.Ю. Гиперэкспрессия интерлейкина-36α и сериновых протеаз в коже пациентов с бляшечным псориазом / А.Ю. Пашкин, А.С. Жуков, В.Р. Хайрутдинов, А.В. Самцов // Сборник тезисов XXXVII Научно-практической конференции научных работ Рахмановские чтения. – 2020. – С. 62–63.

15. Пашкин, А.Ю. Экспрессия интерлейкина-36γ в коже больных бляшечным псориазом с различной степенью тяжести / А.Ю. Пашкин, А.С. Жуков, В.Р. Хайрутдинов // Сборник тезисов XIV Всероссийской научно-практической конференции «Санкт-Петербургские дерматологические чтения». – 2020. – С. 86–88.

16. Пашкин, А.Ю. Особенности экспрессии цитокинов семейства IL-36 и сериновых протеаз нейтрофильных гранулоцитов в коже пациентов с бляшечным псориазом с различной степенью тяжести / А.Ю. Пашкин, А.С. Жуков, В.Р. Хайрутдинов // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2020. – №39(S3-1). – С. 127–131.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Cat G – катепсин G
IL – интерлейкин
NE – нейтрофильная эластаза
PASI (Psoriasis Area Severity Index) – индекс тяжести и распространенности псориаза
БП – бляшечный псориаз
ГМ – грибовидный микоз
ИГХ – иммуногистохимия, иммуногистохимический
КПЛ – красный плоский лишай
НЭ – нуммулярная экзема
ОН – ограниченный нейродермит
ТЭ – толщина эпидермиса