

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

Песляк Михаил Юрьевич,

Антипсориатическая Ассоциация «ЕСТЕСТВЕННЫЙ ПУТЬ»,

Короткий Николай Гаврилович,

ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, ФГБУ Российская детская клиническая больница МЗ РФ

Тонкокишечный СИБР (синдром избыточного бактериального роста) при псориазе.

PsB - бактерии предполагаемые псориагенными.

Две системные модели патогенеза псориаза (BF-модель и Y-модель).

Системный псориатический процесс и проверяемые гипотезы.

NET - нейтрофильные внеклеточные сети в крови и в псориатической коже.

Возможная новая роль нейтрофилов в Y-модели патогенеза псориаза.

Главные вопросы, на которые НИР1 должна дать ответы.

Презентация проекта выполнена 19.10.2017 на

[VII Межрегиональном форуме дерматовенерологов и косметологов - IFDC Moscow 2017](#)

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

Комментарии к данной
презентации (формат *.doc)

Вся информация по проекту НИР1
"Метагеномы фагоцитов крови и фагоцитов
псориатической кожи" в онлайн-версии

Статистика заболеваемости псориазом по странам

2

Patient_Stat-C

Страна	Годы	Обследованных	% с псориазом	Годы	Пациентов в год на 100 000
China	1984	6 617 917	0.12		
China, Taiwan	2006	23 000 000	0.24		
China	1974–1981	670 000	0.35		
Germany	2005	1 344 071	2.53		
Germany	2003	2 238 000	2.0		
Italy	2006	4 109	2.9	2005	230 #
Japan	2010–2011	128 000 000	0.44		
Norway	1985	10 576	1.41		
Poland	2005–2009	2 161 832	1.45		
Portugal	1994	1 037	1.9		
Russia*	2004		~2 - 4	2009-13	216
Spain	1998	12 938	1.43		
Spain	2013	12 711	2.31		
Sweden	1998–2010	–	1.95		
UK	2009	7 520 293	1.87		
UK	1987–2002	7 533 475	1.52	1996-7	140
USA	1971–1974	20 749	1.43	1991	60
USA	2004	27 220	2.2	1970-2000	78,9 #
USA	2009	2 573	5.1		

* Мишина О.С. Тенденции заболеваемости псориазом в России в 2009-2013 гг. Социальные аспекты здоровья населения. 2015. т.41. № 1. с.7. .

* 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. .

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., # - только для взрослых (старше 18 лет).

Тонкокишечный СИБР (синдром избыточного бактериального роста). Просветная микрофлора проксимальной части.

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

Большинство пациентов с псориазом имеют СИБР (синдром избыточного бактериального роста в тонком кишечнике).

Н.И. Потатуркина-Нестерова с соавторами (2009-11).


Ульяновский Государственный университет.


Презентировано на всемирной конференции по лечению псориаза и псориатического артрита в 2012 г.

Весь доклад (русская версия) на Интернет-ресурсе.

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

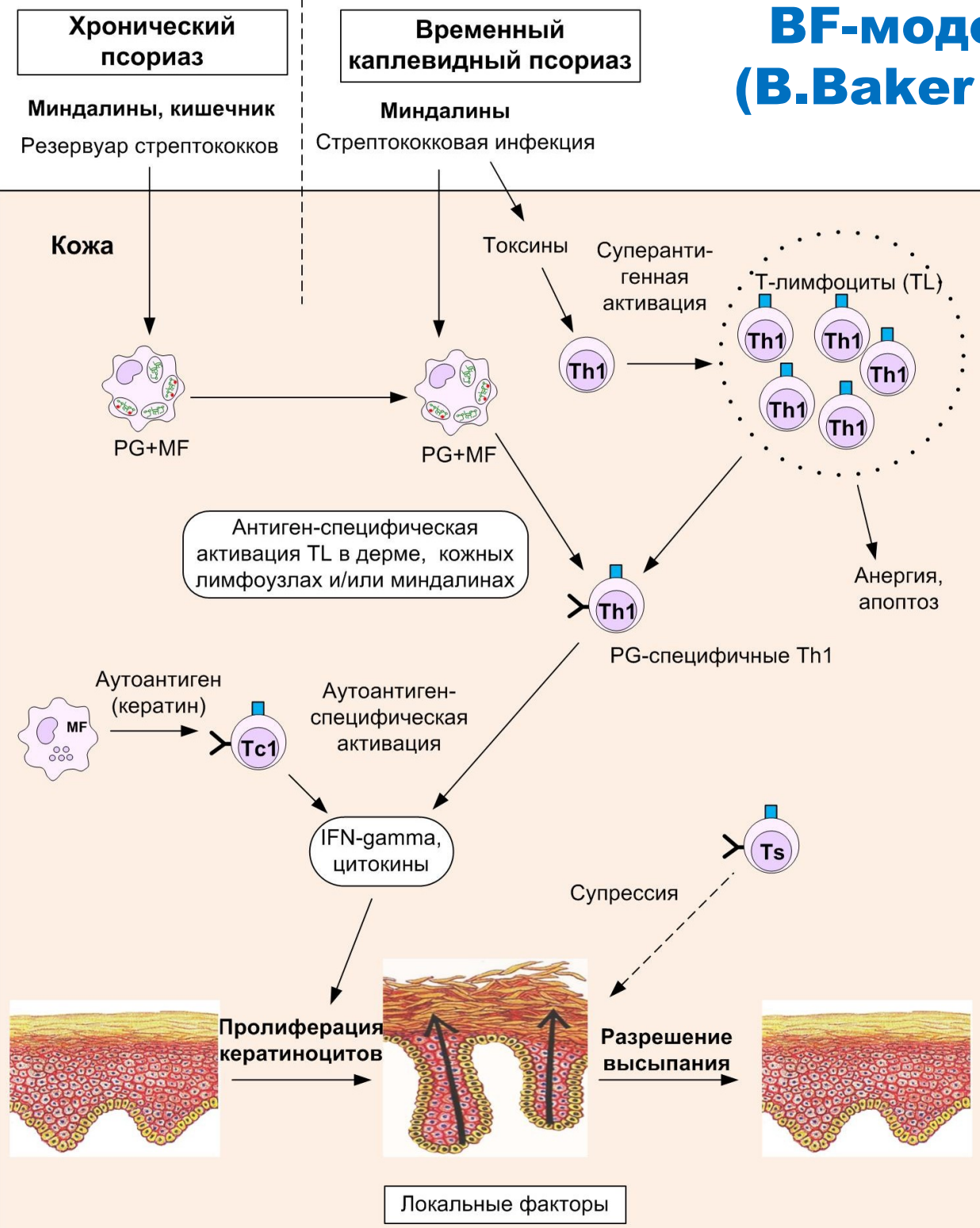
Микрофлора тонкой кишки псориатических пациентов в зоне связки Трейца, Ig(КОЕ/мл). Исследования выполнены в НМХЦ им.Н.И.Пирогова (2013-6).

 Вид предполагается псорогенным

 Некоторые виды (или штаммы) предполагаются псорогенными.

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

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



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

BF-модель не дает ответов на следующие вопросы:

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

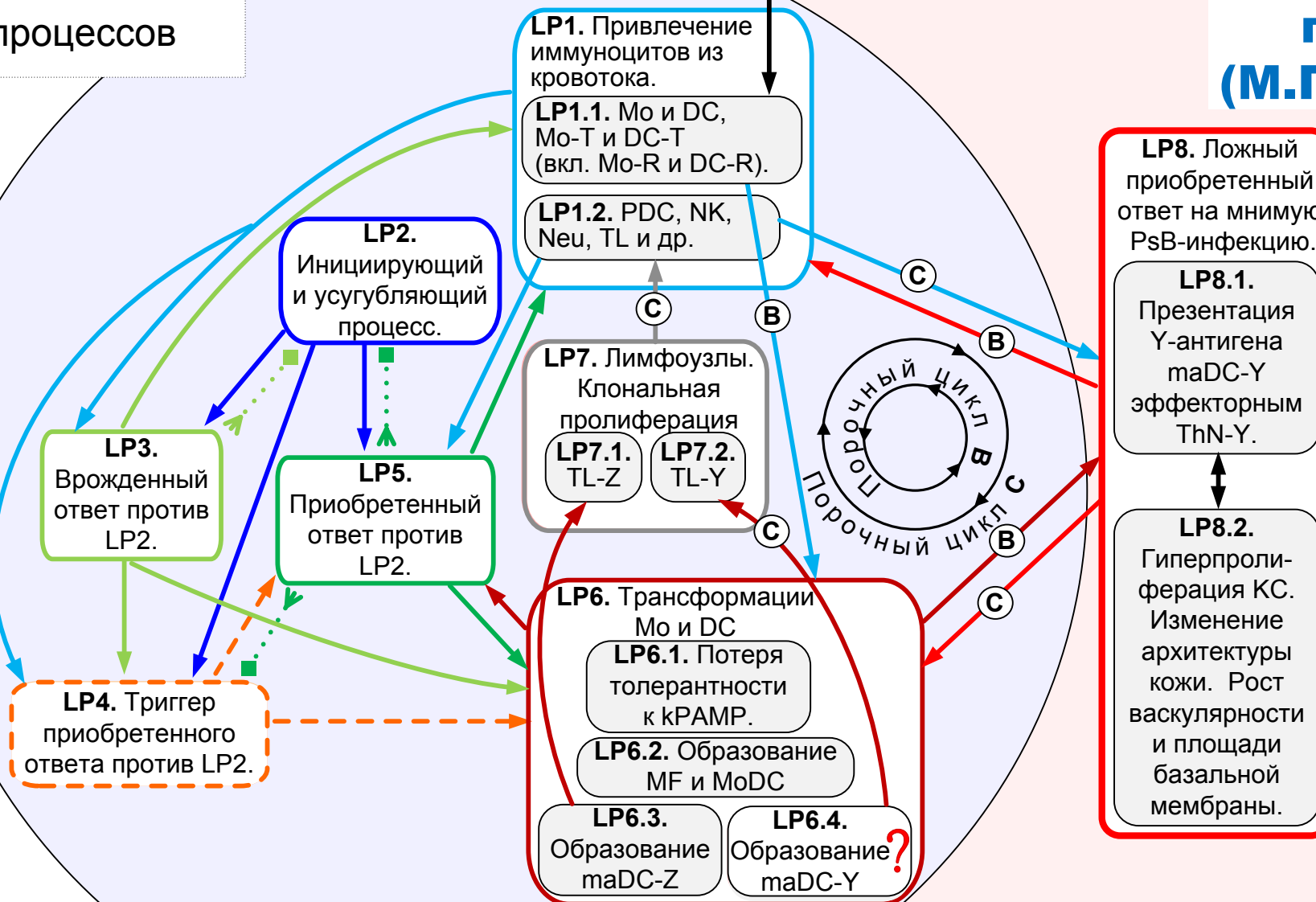
Y-модель патогенеза (М.Песляк, 2012).

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

Взаимовлияние локальных процессов

LP2-воспаление

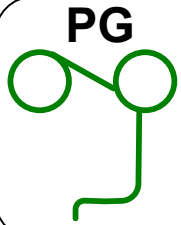
PLS-воспаление



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

Модель патогенеза псориаза. Часть 1. Системный псориатический процесс. Москва, МПРЕ, 2012, 94 с., ISBN 9785905504013
Модель патогенеза псориаза. Часть 2. Локальные процессы. Москва, МПРЕ, 2012, 116 с., ISBN 9785905504037
 Эти e-книги свободно доступны на www.psoriasis.info/ru

Структура пептидогликана и PsB.



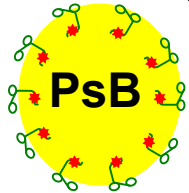
PG

Пептидогликан
(типа A3a)

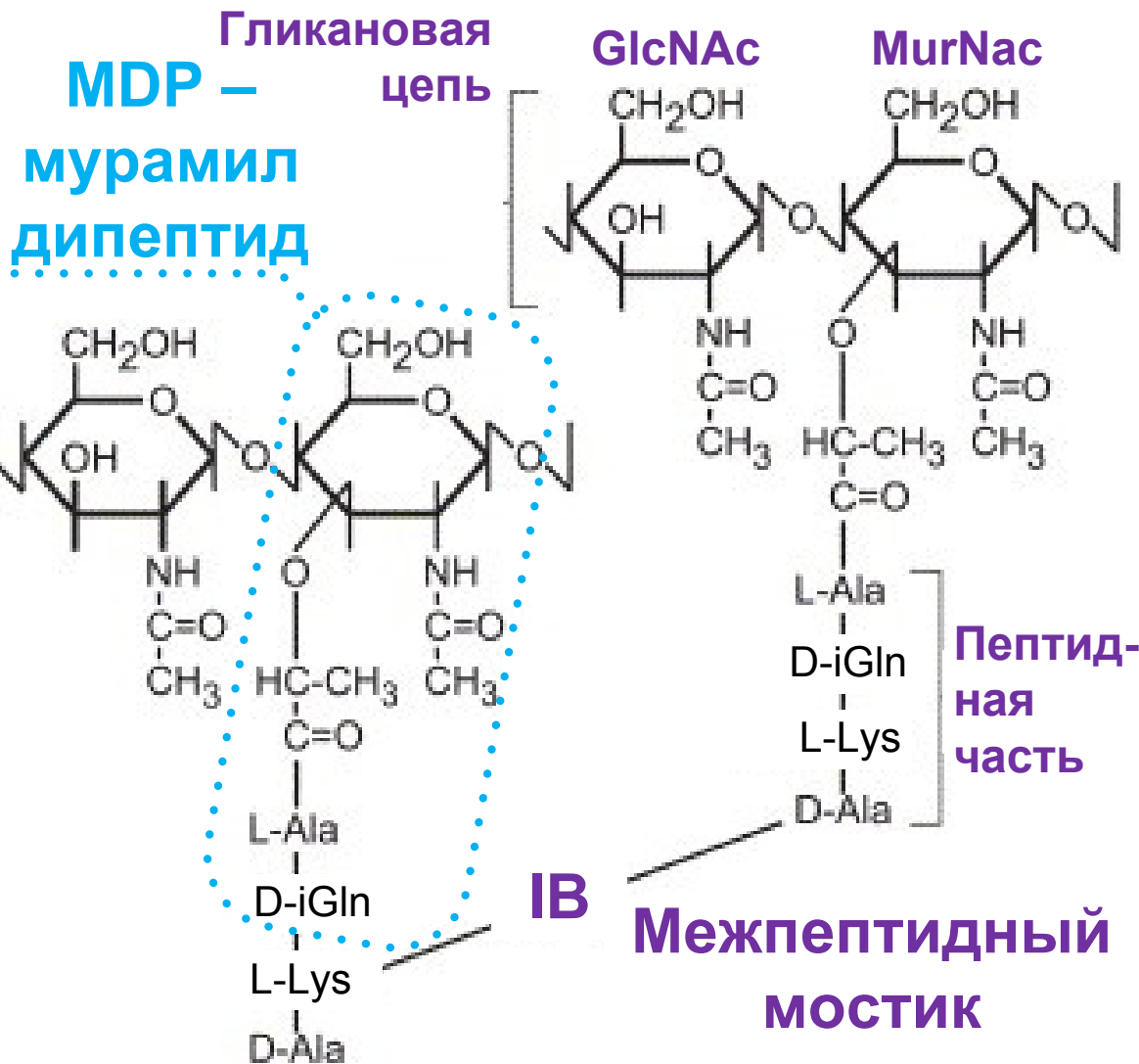


PG-Y

PG-Y -
пептидогликан
с IB-Y



PsB



PsB - бактерии предполагаемые псорогенными	Межпептидный мостик	Источники
<i>Str.pyogenes</i>	(L-Ala)(2-3) или (L-Ser)-(L-Ala)	#, KEGG
Почти все из <i>Streptococcus sp.</i>	(L-Ala)(1-3) или (L-Ser)-(L-Ala)	#, KEGG
<i>Enterococcus faecalis</i>	(L-Ala)(2-3)	#, KEGG
Многие из <i>Leuconostoc sp.</i>	(L-Ala)(2) или (L-Ala)-(L-Ser) или	#, KEGG
Многие из <i>Weissella sp.</i>	(L-Ser)-(L-Ala)(1-2)	
Некоторые из <i>Bifidobacterium sp.</i>	(L-Ala)(2-3) или (L-Ser)-(L-Ala)	#

- научные публикации

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

? Y-антиген = часть(и) межпептидного мостика IB-Y

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

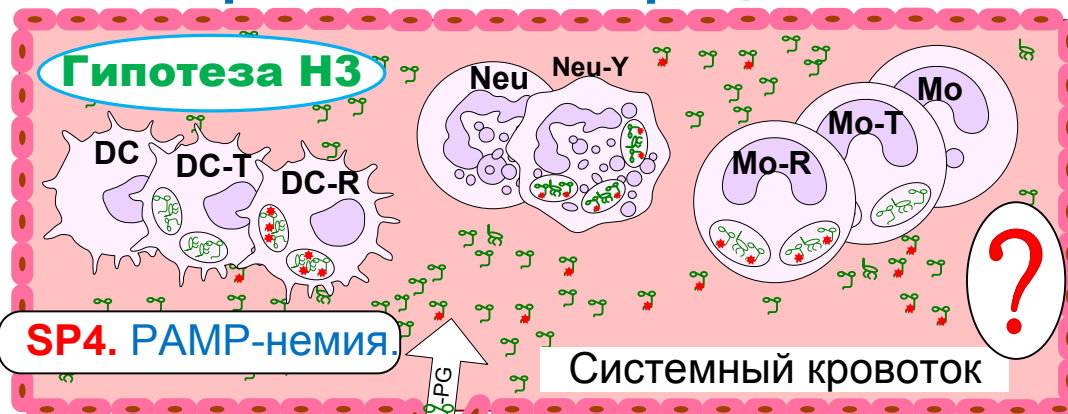
Streptococcus sp.		Виды из других родов
Streptococcus agalactiae	Streptococcus pneumoniae	Enterococcus faecalis
Streptococcus anginosus	Streptococcus pseudopneumoniae	Enterococcus silesiacus
Streptococcus constellatus	Streptococcus pyogenes	Eubacterium sulci
Streptococcus cristatus	Streptococcus salivarius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



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

Y-модель патогенеза. Системный псориатический процесс SPP.

Гипотеза H3



PAMP - Pathogen-associated molecular patterns

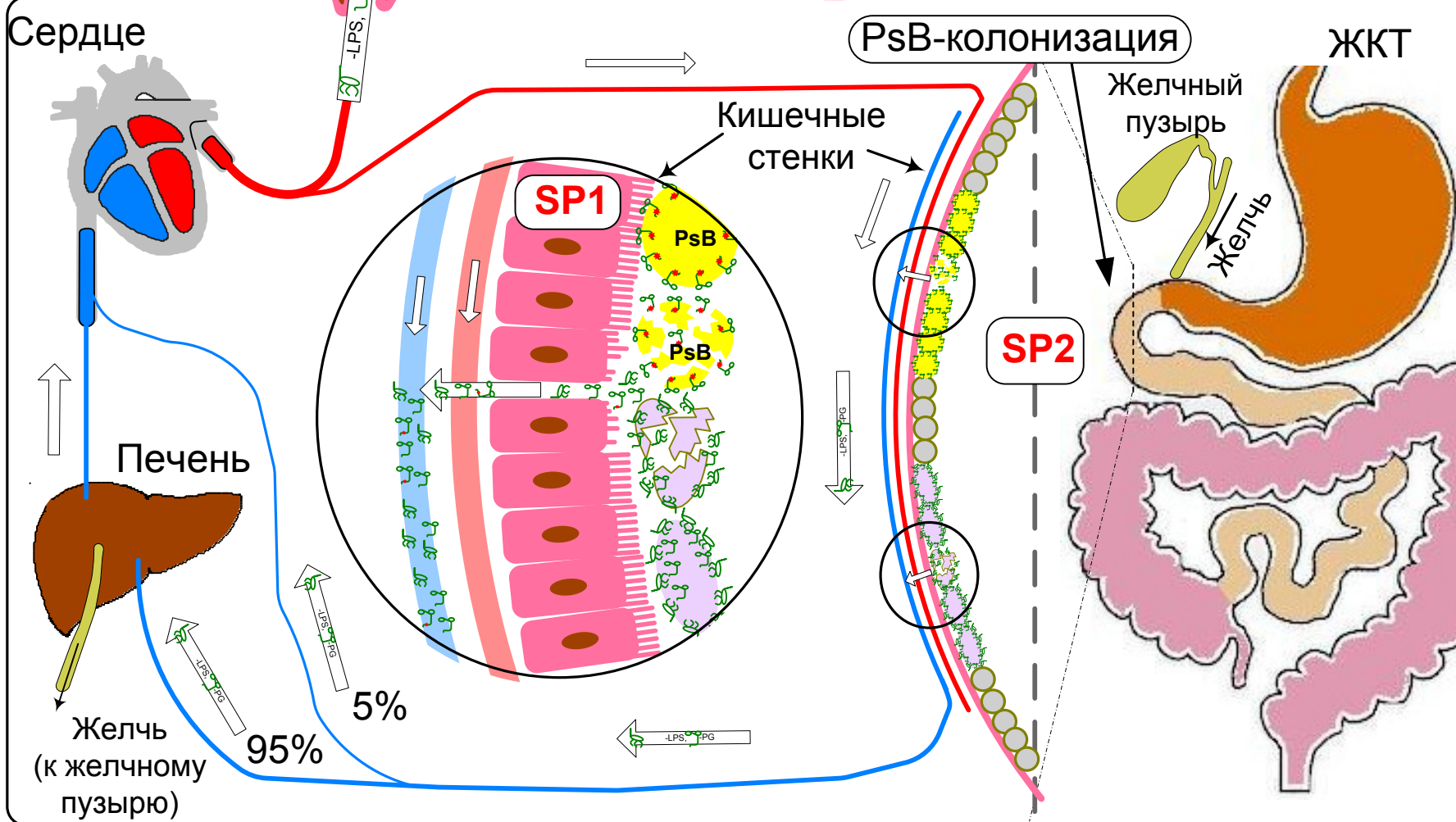
PAMP-немия – это хроническое повышение кРАМР-нагрузки (связывание, эндоцитоз) на фагоциты крови, приводящее к

- формированию существенной доли толеризованных фагоцитов;
- повышению концентрации кРАМР в кровотоке;
- повышенному кРАМР-носительству нейтрофилов, толеризованных моноцитов и дендритных клеток.

Главные кРАМР (key PAMP) это

LPS
(липополисахарид)

и PG
(пептидогликан).



SPP. Первопричинные подпроцессы в тонкой кишке: **SP1.** Повышенная проницаемость для бактериальных продуктов.

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

?

Определение концентрации LPS, PG и 1,3-beta глюкана в крови.

Определение уровня PAMP-немии - проверка гипотезы НЗ.

LAL-тест (Limulus Amebocyte Lysate).

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). Исследования были выполнены З.Ш. Гараевой с соавторами (2005-7), Казанская медицинская академия. Концентрация LPS в крови определялась с помощью модифицированного LAL-теста.

LPS

EAA (Endotoxin Activity Assay, Spectral Medical Inc.).

Альтернативным методом оценки концентрации LPS в крови является 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.

SLP (Silkworm Larvae Plasma, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Тест-система для оценки концентрации PG в крови только одна (реагирует также и на 1,3-beta-глюкан). Концентрация PG в крови в норме (группа контроля 14 человек) в среднем - 20 пг/мл (от 0 до 90), концентрация PG в крови у пациентов с сепсисом от 50 пг/мл (Fitting 2012) до 190 нг/мл (Kobayashi 2000). Оценка концентрации PG в крови пациентов с псориазом никогда не проводилась.

PG и
1,3-beta-
глюкан

- **Fungitell (Cape Cod, Inc.)**
- **Endosafe-PTS glucan assay (Charles River Laboratories International, Inc.)**
- **Fungus (1-3)-β-D-Glucan Assay (Dynamiker Biotechnology Co., Ltd.)**
- **Goldstream Fungus (1-3)-β-D-glucan (Era Biology Group).**

Оценка концентрации 1-3-beta-глюкана в крови пациентов с псориазом никогда не проводилась.

1,3-beta-
глюкан

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

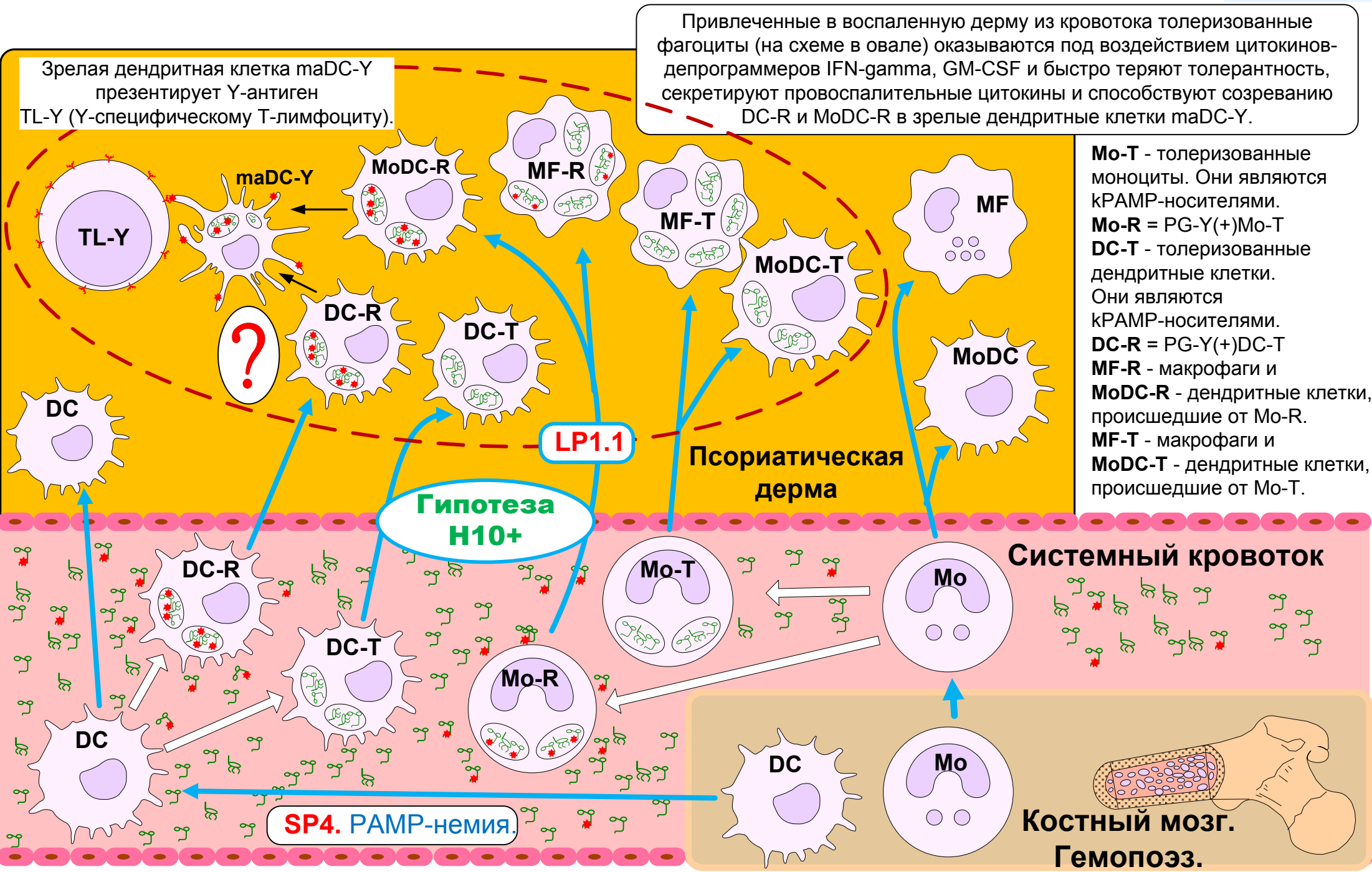
Гараева З.Ш., Сафина Н.А., Тюрин Ю.А., Куклин В.Т., Зинкевич О.Д. Дисбиоз кишечника как причина системной эндотоксинемии у больных псориазом. Вестник дерматологии и венерологии, 2007;(1):23-27. и Гараева З.Ш. Эндотоксинемия в патогенезе псориаза. Лечащий врач, 2013, 5.

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

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

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

Y-модель патогенеза. Привлечение из крови и преобразование моноцитов и дендритных клеток в псориазической дерме.

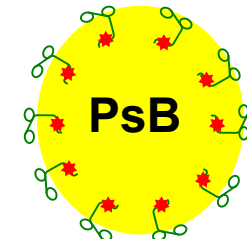




Три гипотезы (H2, H3 и H10+) на проверку.

Системный псориатический процесс SPP.

H2 PsB имеют PG-Y - пептидогликан с межпептидными мостиками IB-Y, т.е. (L-Ala)-(L-Ala) и-или (L-Ser)-(L-Ala). Y-антиген это часть(и) межпептидного мостика IB-Y.



H2

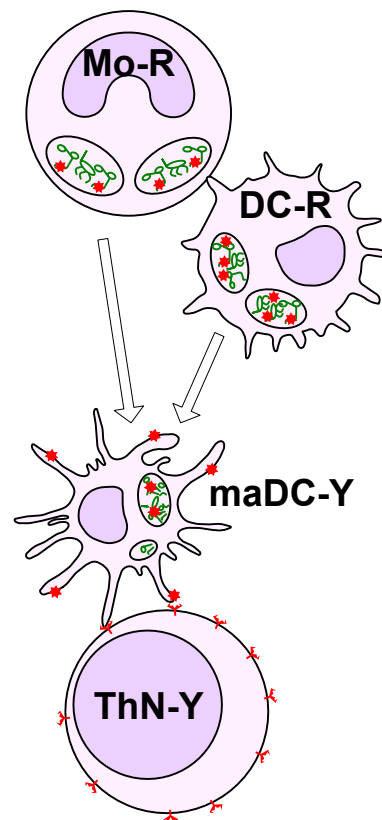
H3 PAMP-немия и (PG-Y)-немия это главные подпроцессы. kPAMP это LPS и PG.



H3

Один из локальных процессов.

H10+ Привлечение нейтрофилов Neu-Y, а также толеризованных моноцитов Mo-R и дендритных клеток DC-R в дерму из кровотока – необходимое звено порочного цикла. Существование и тяжесть любого пятна определяется интенсивностью поступления в дерму Y-антигена, несомого этими фагоцитами крови.



Гипотезы H2 и H10+ будут проверяться косвенно.

Модель патогенеза псориаза. Часть 1. Системный псориатический процесс.

Москва, МУРЕ, 2012, 94 с., ISBN 9785905504013

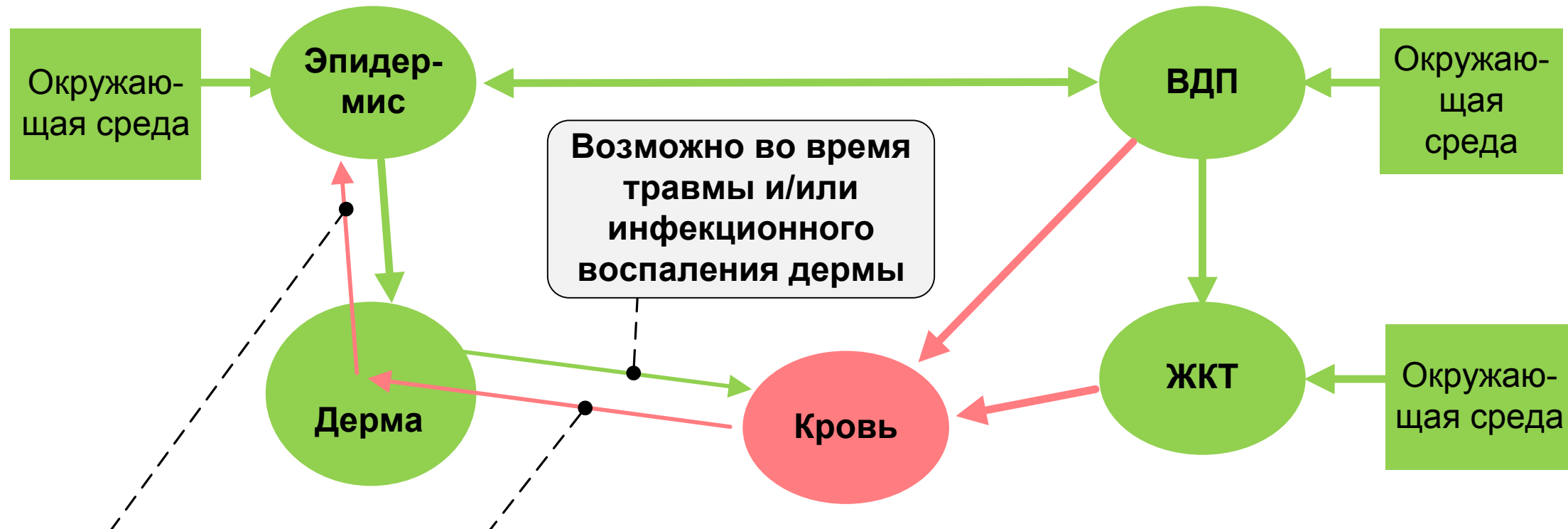
Модель патогенеза псориаза. Часть 2. Локальные процессы.

Москва, МУРЕ, 2012, 116 с., ISBN 9785905504037

Эти е-книги свободно доступны на www.psorias.info/ru

Схема присутствия и перемещения нехозяйского биоматериала между органами

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



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

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

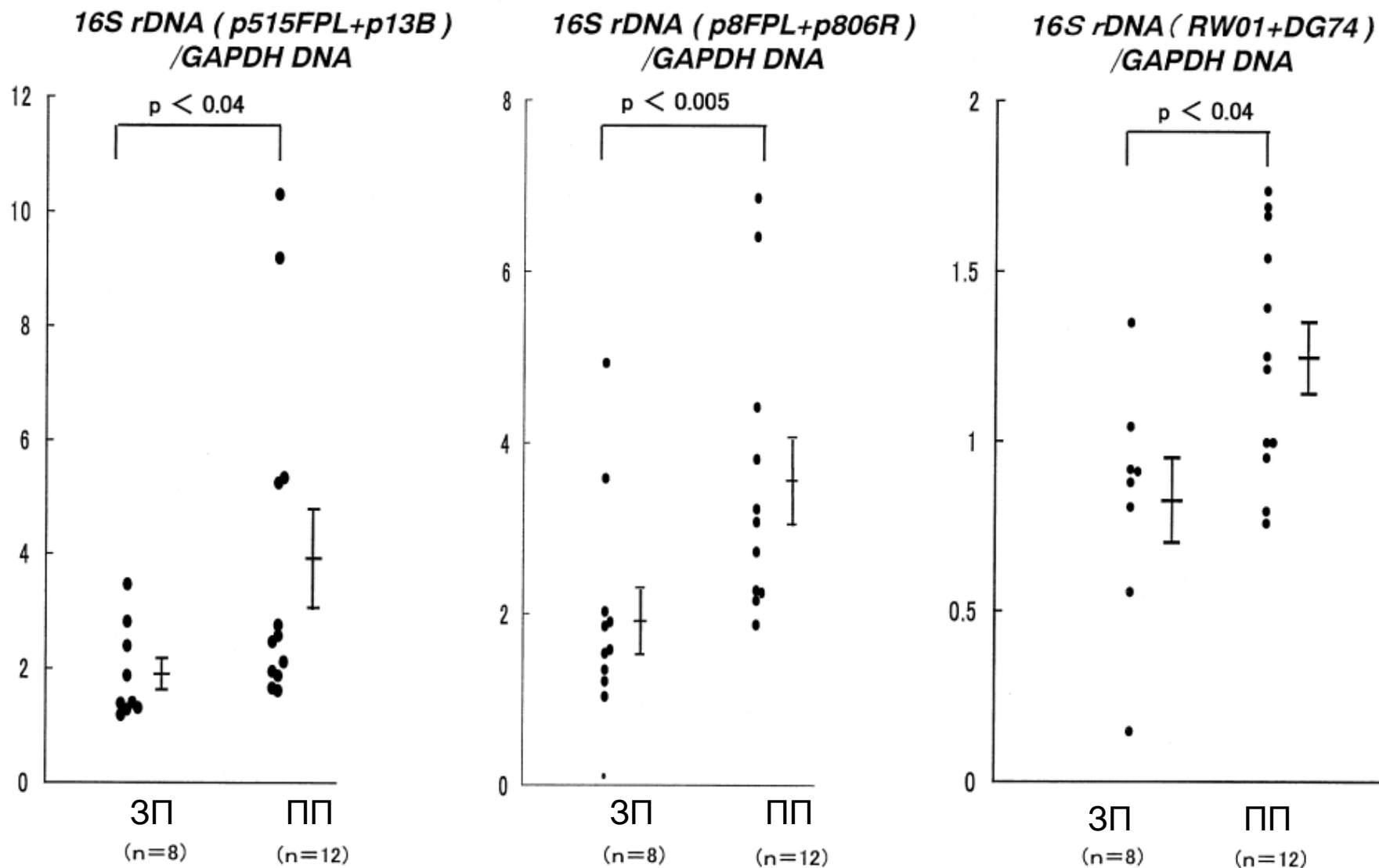
Все метагеномные исследования крови и кожи при псориазе

Пациенты (ПП – псориаз, ЗП – здоровые)	Биоматериал	Тест	Концентрация	Контроль контаминации	nhDNA (в частности bacDNA)	Работа (год, страна), примечания
Кровь (4)						
19 ПП	Плазма	16S	нет	да	bacDNA у 9 из 19 ПП	Wang 1999 (USA), ПП с псориатическим артритом
15 ПП, 12 ЗП	Моноциты	16S, 18S	да	да	bacDNA у всех.	Okubo 2002 (Japan). Относительный уровень у ПП выше в 1,5-2 чем у ЗП. Слайд Okubo.
20 ПП, 12 ЗП	Плазма	16S	нет	да	bacDNA у всех ПП, ни у одного из ЗП.	Munz 2010 (UK). Слайд Blood Psor.
54 ПП, 27 ЗП	Плазма	нст	нет	?	У 16 из 54, ни у одного из ЗП.	Ramírez-Boscá 2015 (Spain), нст- метод нестандартный. Краткая заметка
Кожа (8)						
6 ПП, 6 ЗП	мазок (19,20)	16S	нет		bacDNA	Gao 2008 (USA), см. Streptococcus 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 Skin-bacDNA
54 ПП, 112 ЗП	мазок	16S	нет		bacDNA	Statnikov 2013 (USA) вместе с Alekseyenko 2013 ,
54 ПП, 37 ЗП	мазок	16S	нет		bacDNA	
6 ПП, 6 ЗП, 6 AD	мазок (29)	cult, PCR	нет		DNA грибков	Jagielski 2014 (Poland)
12 ПП, 12 ЗП	пинцет, повязка	26S	да		DNA грибков	Takemoto 2015 (Japan)
?	мазок (155)	16S	нет	-	bacDNA	Tanes 2015 (USA). По результатам HMP.

НИР1 - исследование псориаза, в котором впервые будут

- применены WMS-тесты
- определена концентрация nhDNA в фагоцитах крови
- определен (до видов и штаммов) метагеном фагоцитов крови
- определен (до видов и штаммов) метагеном фагоцитов псориатической кожи
- выполнено комплексное изучение этих двух метагеномов

Суммарная басDNA в моноцитах крови ПП и ЗП (16S-тест, Okubo 2002)



Уровень 16S rDNA в моноцитах крови ПП (псориастических пациентов) и ЗП (здоровых персон) в виде отношения к уровню человеческого гена GAPDH. Значения для каждой из пар праймеров p515FPL-p13B, p8FPL-p806R и RW01-DG74 значительно увеличены у ПП по сравнению с ЗП.

ВасDNA в плазме крови псориатических пациентов (16S-тест, Munz 2010)

Table 1 Summary of bacterial genera identified in psoriasis patients

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

а - количество пациентов, у которых обнаружен данный род бактерий;

GP – Guttage psoriasis (временный каплевидный псориаз);

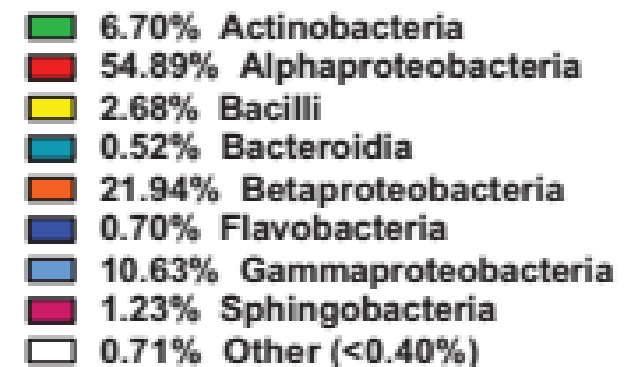
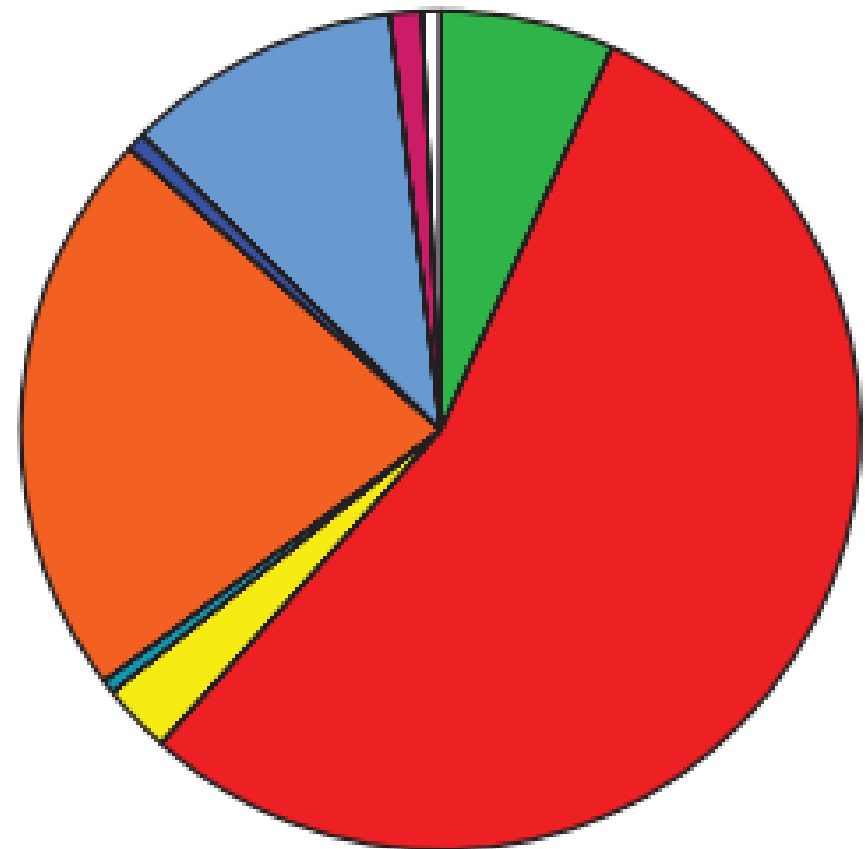
CPP – Chronic plaque psoriasis (хронический псориаз).

ВасDNA была обнаружена у всех 20 ПП и ни у одного из 12 ЗП.

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

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

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



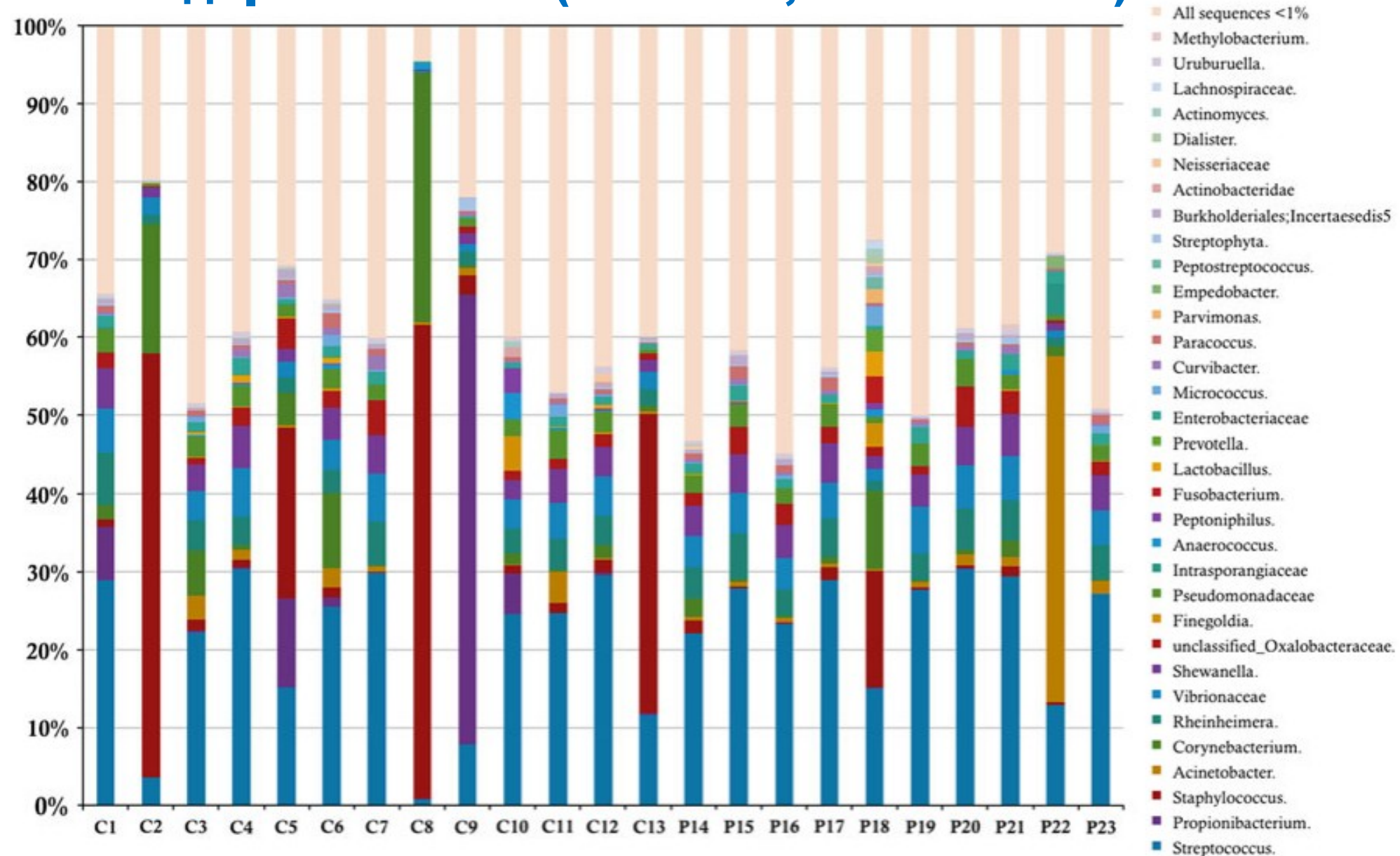
Характеристики плазмы крови (7 пациентов с сепсисом, 12 ЗП, WMS-тест, Grumaz 2016)

Table 1 Patient characteristics, cfDNA concentration, and sequencing statistics (cfDNA = cell-free DNA)

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

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

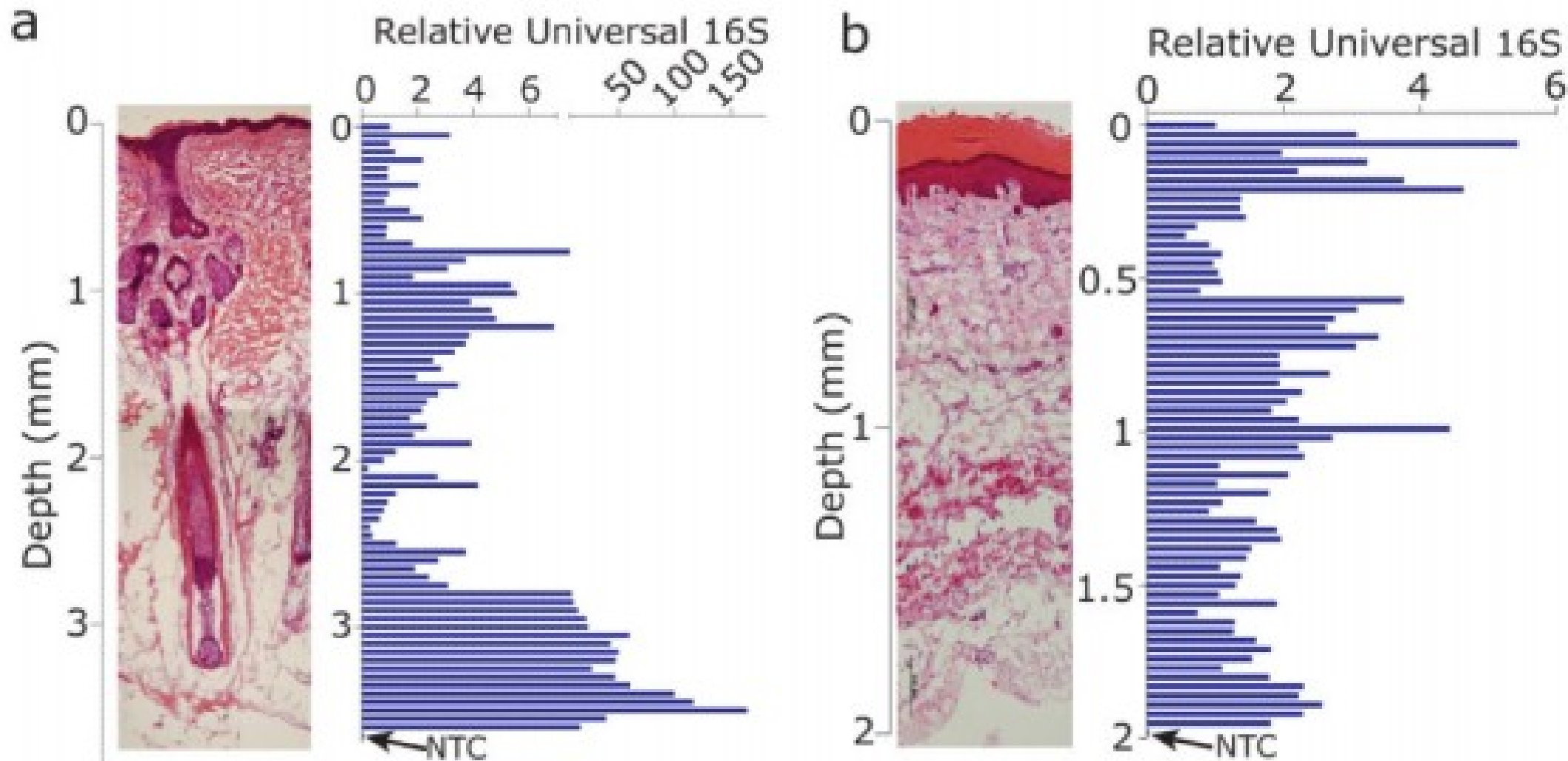
Бактериальная ДНК в псориатической и здоровой коже (16S-тест, Fahlen 2012)



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

Рис.5 из Fahlen A, Engstrand L, Baker BS, Powles A, Fry L. Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin. Arch Dermatol Res. 2012 Jan;304(1):15-22. [22065152](https://doi.org/10.1007/s001070110152).

Бактериальная ДНК в эпидермисе и дерме непсориазных пациентов (16S-тест, Nakatsuji 2013)



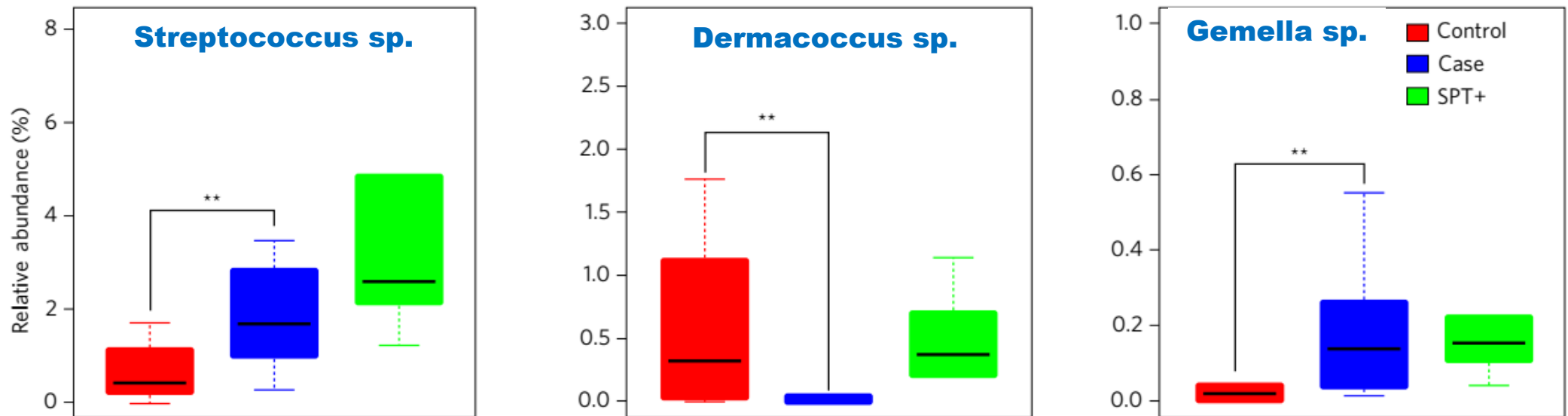
bacDNA в нормальной коже обнаруживается на глубине 2-3 мм
(а – лицевой участок с волосяным фолликулом, б – ладонный участок)

Фрагмент рис.1 из Nakatsuji T, Chiang HI, Jiang SB. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. Nat Commun. 2013;4:1431. [23385576](https://doi.org/10.1038/ncom1431).

Метагеном кожи

(15 ЗП SPT(-), 19 AtD+, 5 ЗП SPT+, WMS-тест, Chng 2016).

Относительное присутствие нескольких родов.



Control. 15 ЗП с отрицательным скарификационным тестом.

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

SPT+. 5 ЗП с положительным скарификационным тестом

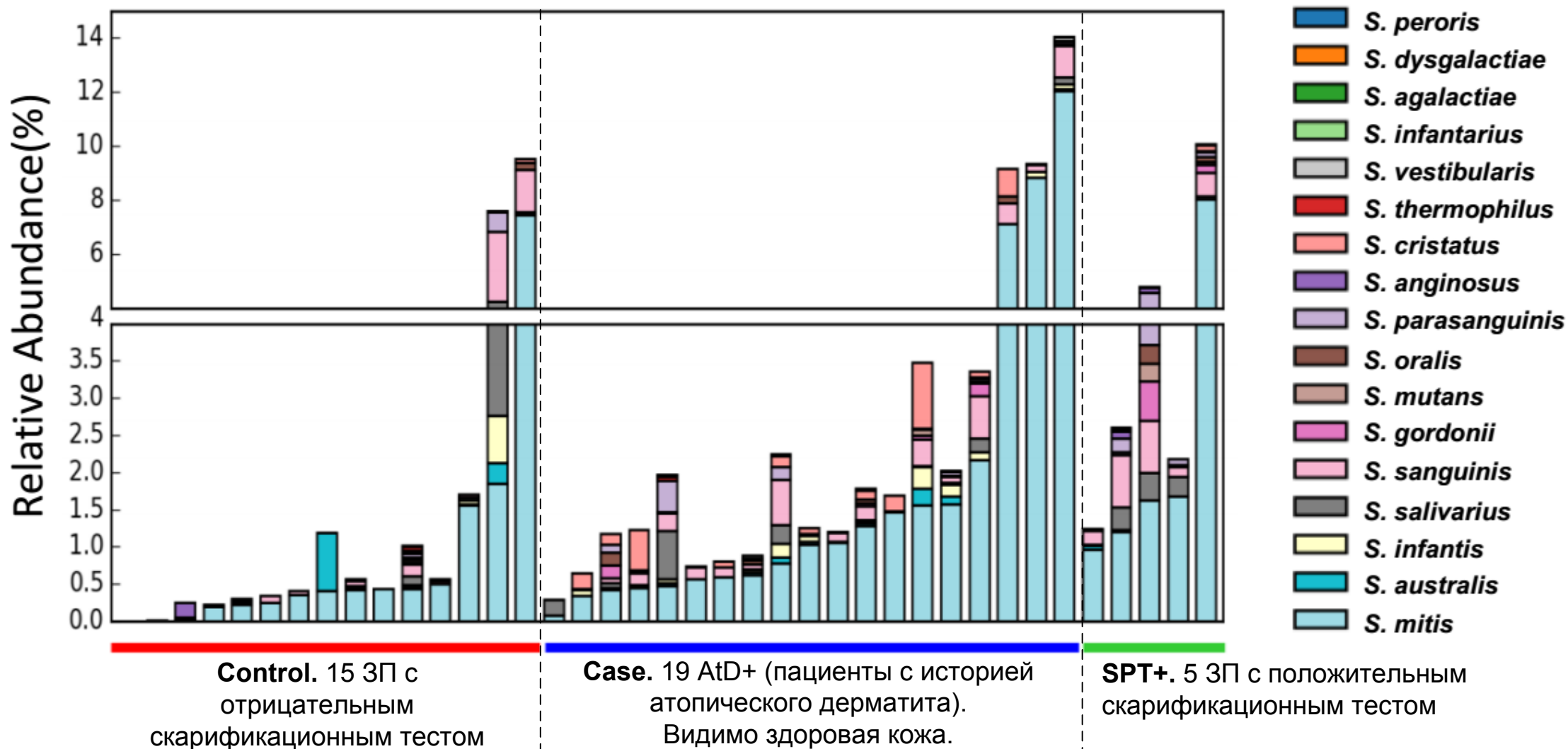
У каждого брались два мазка (с правой и левой локтевых складок - antecubital fossae) методом клейкой ленты (tape stripping). Результат двух WMS-тестов усреднялся.

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

Метагеном кожи

(15 ЗП SPT(-), 19 AtD+, 5 ЗП SPT+, WMS-тест, Chng 2016).

Относительное присутствие видов *Streptococcus* sp.

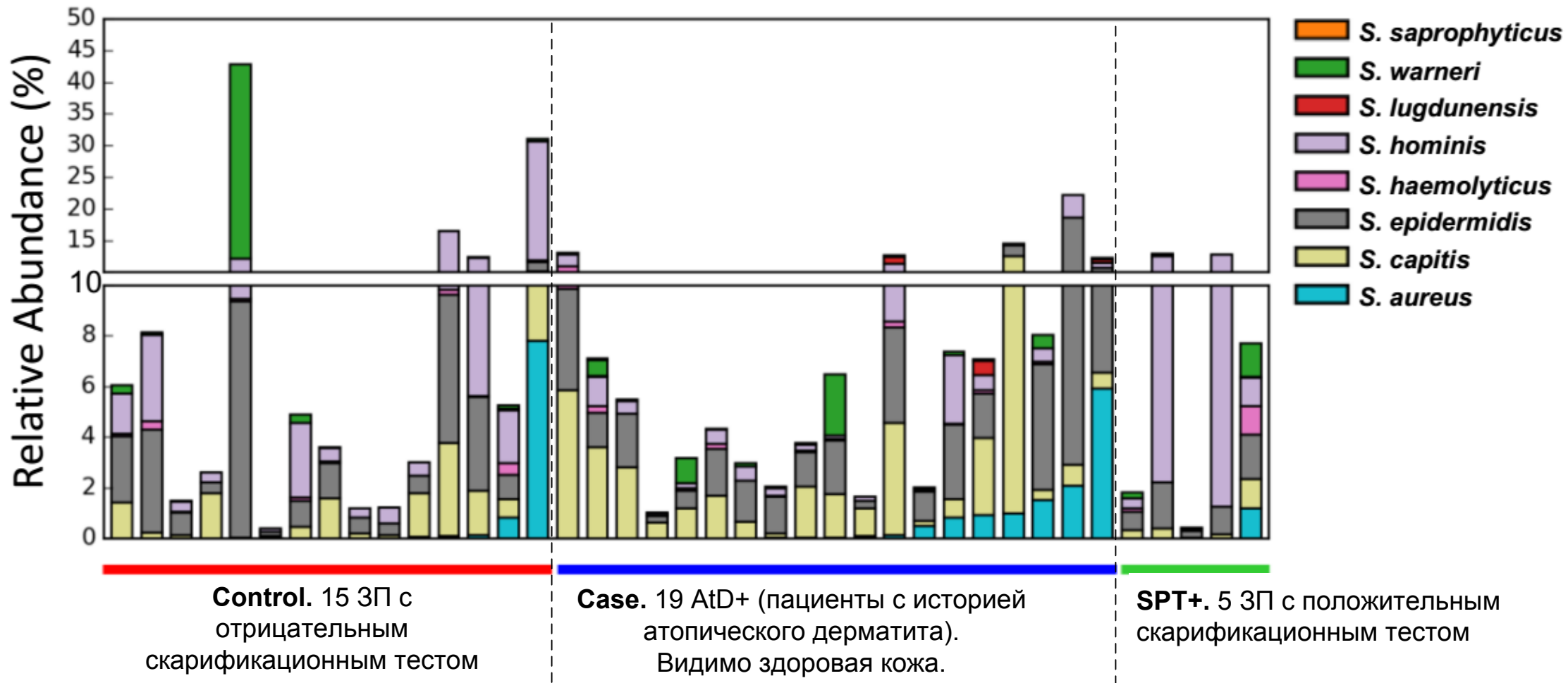


У каждого брались два мазка (с правой и левой локтевых складок - antecubital fossae) методом клейкой ленты (tape stripping). Результат двух WMS-тестов усреднялся.

Метагеном кожи

(19 AtD+, 15 ЗП SPT(-), 5 ЗП SPT+, WMS-тест, Chng 2016).

Относительное присутствие видов *Staphylococcus* sp.



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

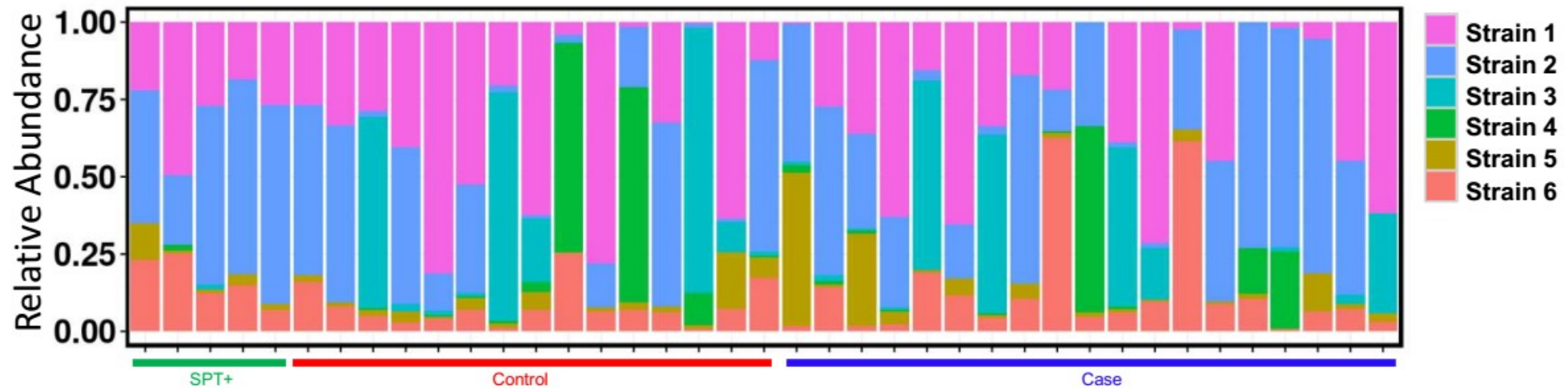
Chng KR, Tay AS, Li C. et al. Whole metagenome profiling reveals skin microbiome-dependent susceptibility to atopic dermatitis flare. Nat Microbiol. 2016 Jul 11;1(9):16106. 27562258.

Метагеном кожи

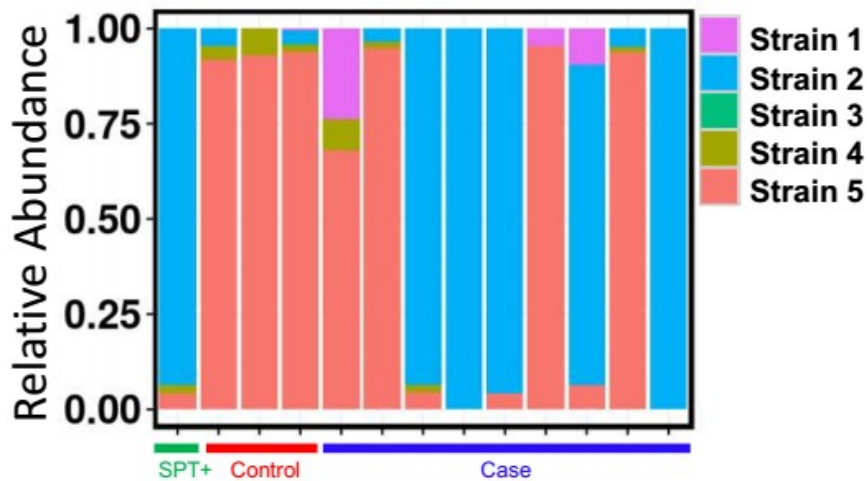
(19 AtD+, 15 ЗП SPT(-), 5 ЗП SPT+, WMS-тест, Chng 2016).

Относительное присутствие штаммов *Staphylococcus aureus*.

A



B



SPT+. 5 ЗП с положительным скарификационным тестом

Control. 15 ЗП с отрицательным скарификационным тестом

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

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.

Нетоз – формирование нейтрофильной внеклеточной сети NET (neutrophil extracellular trap)

Триггеры формирования NET из нейтрофилов

LPS, fMLP, PMA, тромбоциты, цитокины (IL1-beta и др.), IFN-alpha, бактерии, грибы, вирусы, аутоантитела, ROS

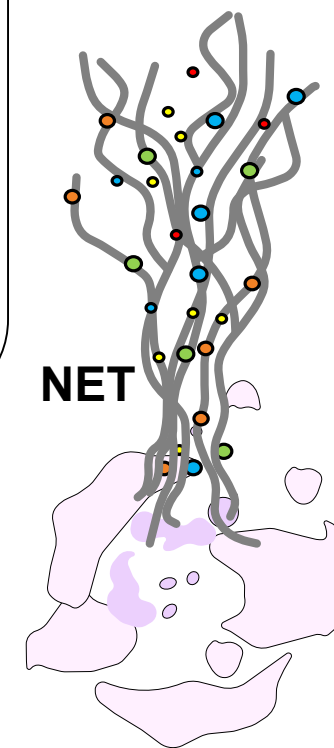
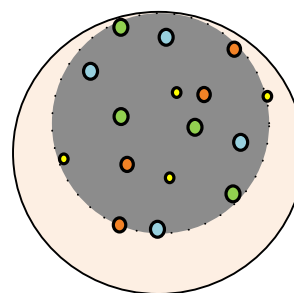
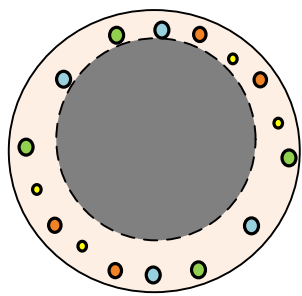
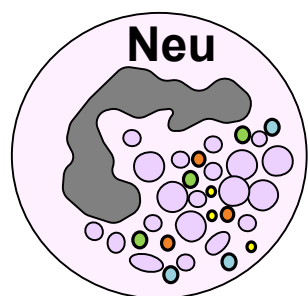
Внутренние преобразования нейтрофилов, предшествующие формированию NET

С участием PAD4 происходит цитруллинизация гистонов, что способствует деконденсации хроматина, NE и MPO дестабилизирует и разрезает нуклеосомы, происходит растворение мембран ядра и гранул и смешивание их содержимого. Происходят мобилизация Ca, активация NADPH оксидазы, секреция ROS (реактивных форм кислорода), транслокация PAD4, MPO и NE.

Взрывное формирование NET

Разрыв клеточной оболочки, и выброс DNA-сети, связанной с белками, антимикробными пептидами, цитокинами, миелопероксидазой и другими веществами, связывающими и разрушающими патогены.

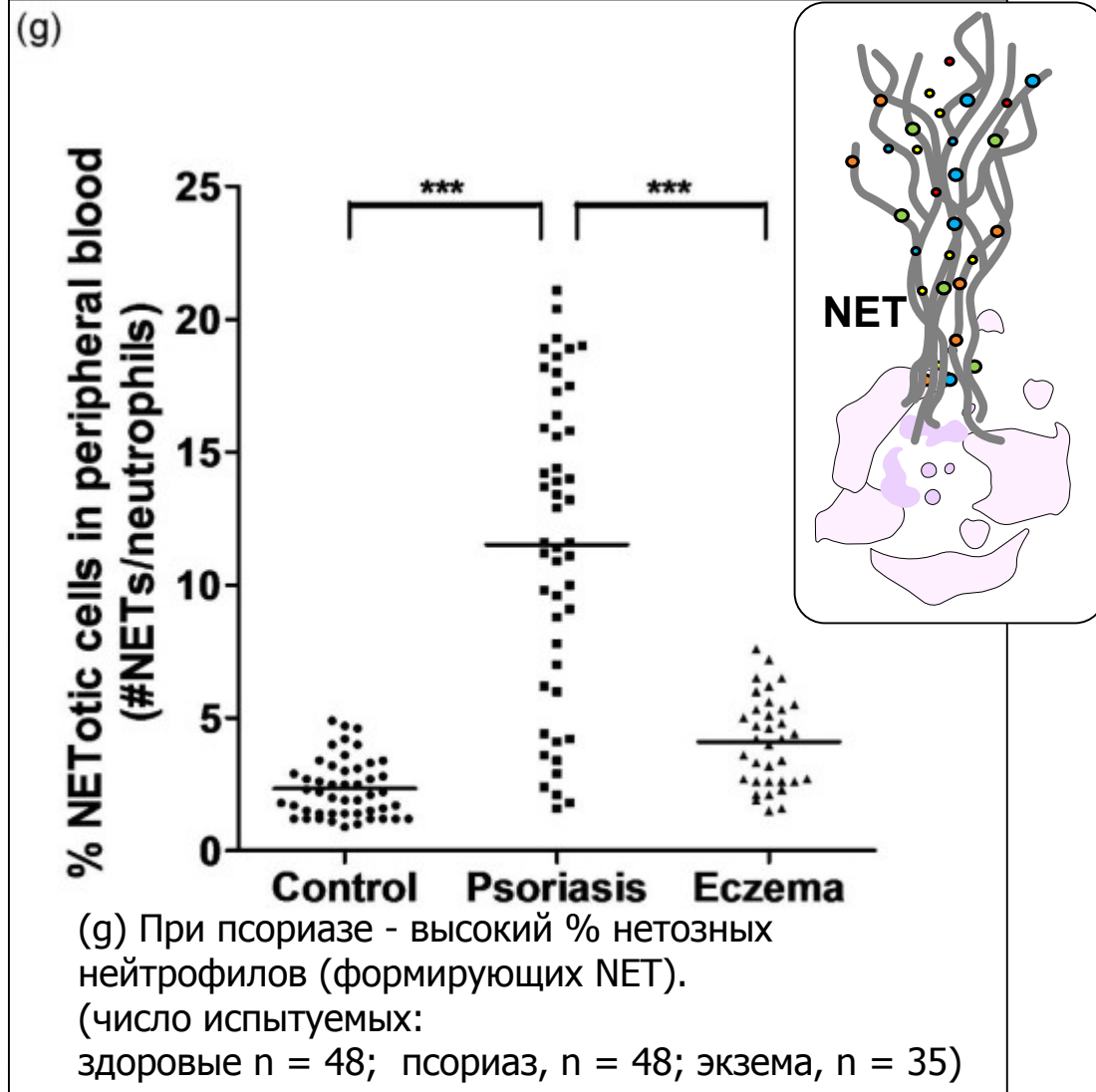
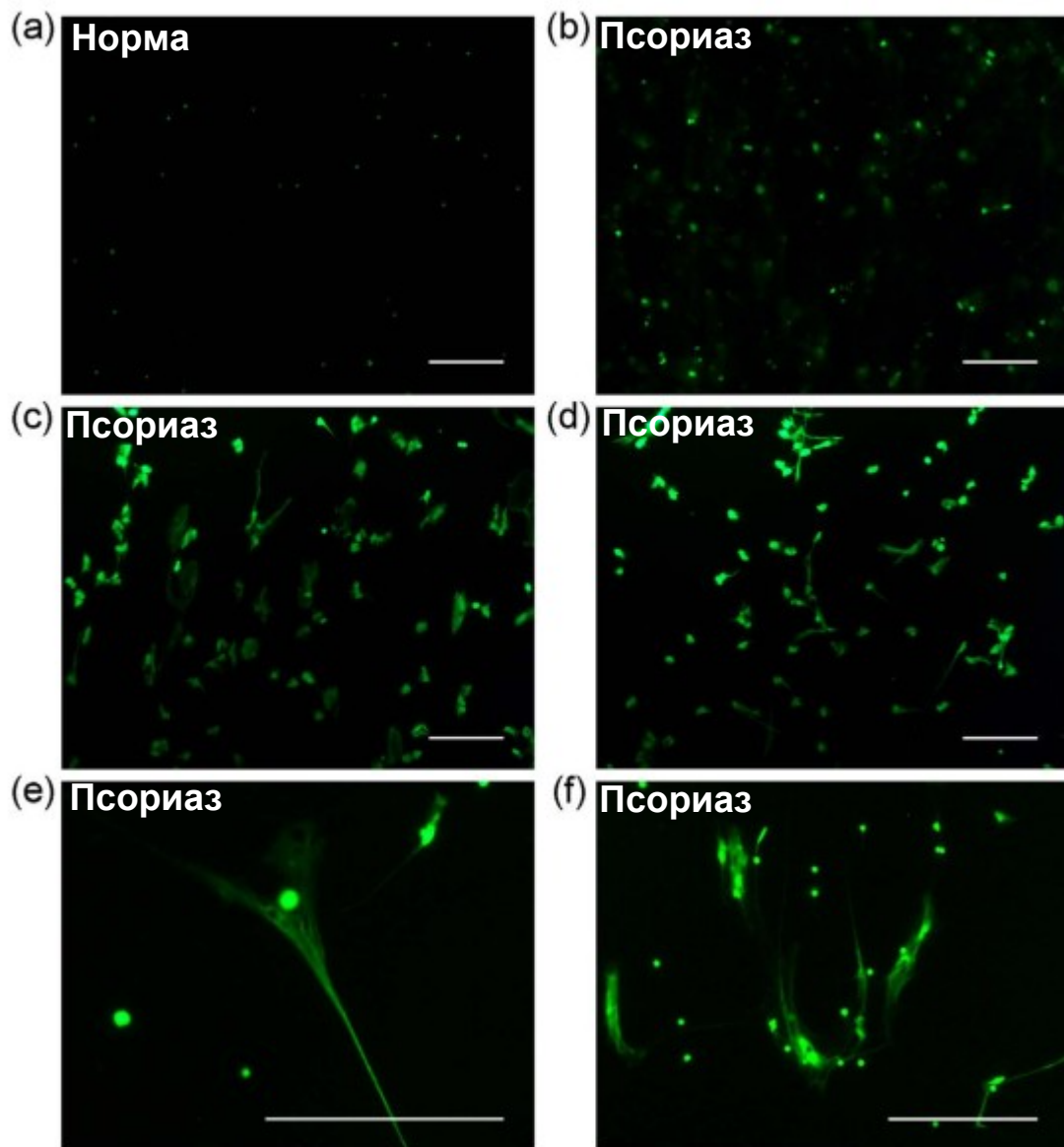
Размер NET может в 10-15 раз превышать размер нейтрофила.



В 2004 г. был открыт нетоз – новый механизм, посредством которого нейтрофилы осуществляют защитные функции путем формирования внеклеточной сети. Нетоз является типом клеточной смерти нейтрофилов наравне с апоптозом и некрозом.

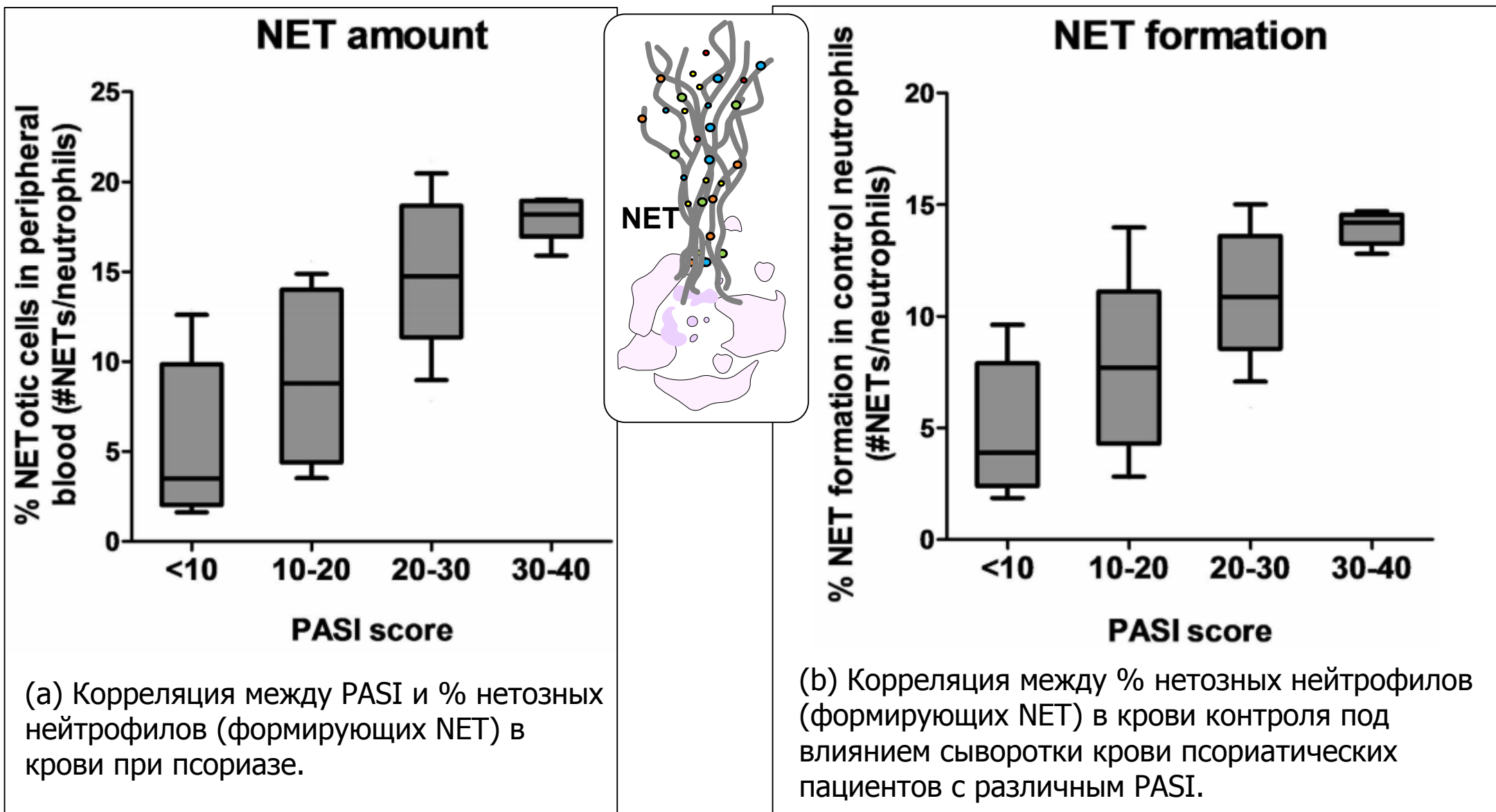
Состав NET

hDNA (хозяйская ДНК), MPO (миелопероксидаза), NE (нейтрофильная эластаза), цитруллинированные гистоны, антимикробные протеины, LL37, цитокины (IL-17 и др.). Всего более 30 различных белков.



Число нетозных нейтрофилов (формирующих NET) в крови низкое в норме (a) и высокое при псориазе (b-d). Во время нетоза происходит расширение ядра и образование внеклеточной сети DNA (e, f). Внеклеточная DNA окрашена флуоресцентной Sytox Green. Размер отрезка = 200 микрон.
 Рис.1 из 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, PMID 27493143.

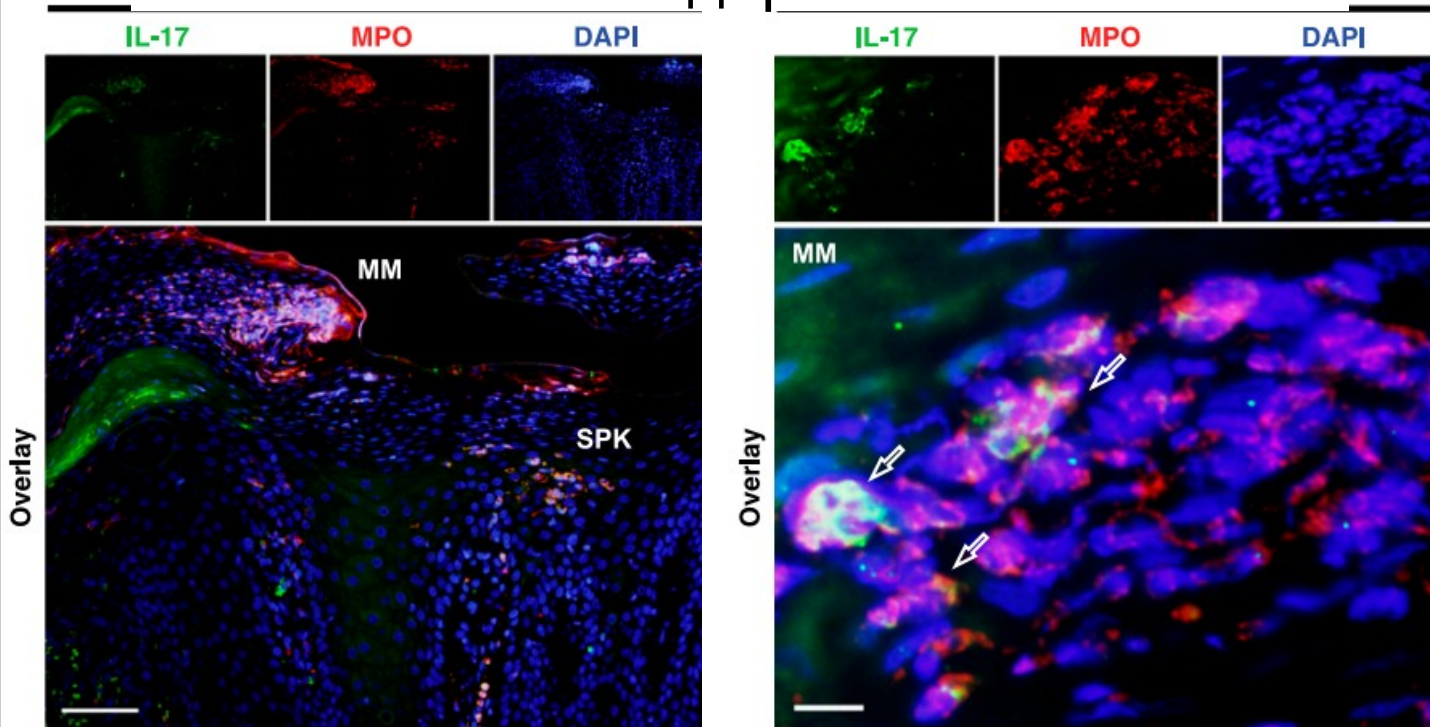
Корреляция между PASI и % нетозных нейтрофилов крови (Hu 2016)



PASI < 10, n=10; PASI 10-20, n=15; PASI 20-30, n=18; PASI 30-40, n=5.

Рис.3 из 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, PMID 27493143.

Эпидермис



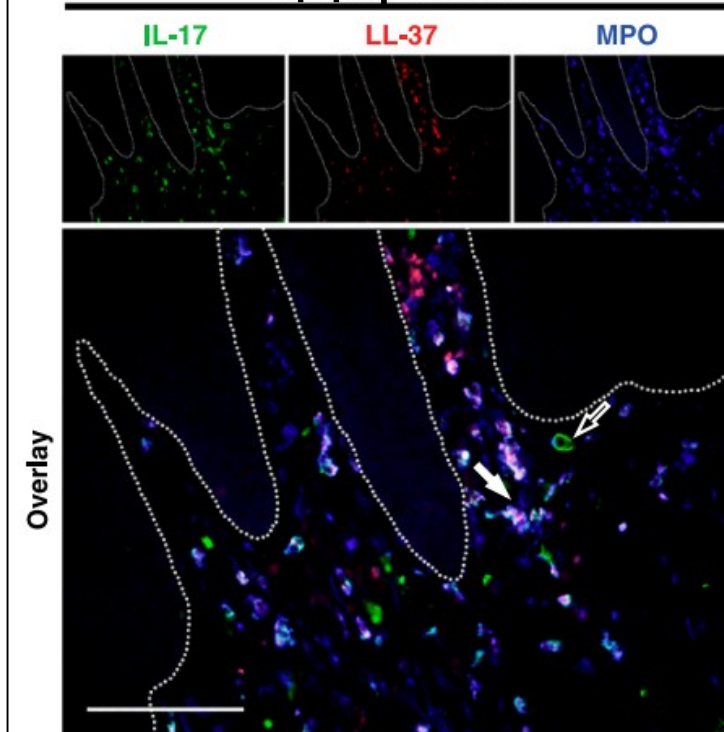
А. Псориатический эпидермис содержит IL-17+ нейтрофилы в микроабсцессах Мунро (ММ) и в пустулах Когоя (СПК). 200х кратное увеличение. Размер отрезка = 100 микрон.

В. Микроабсцесс Мунро (ММ). Формирование NET сопровождается выбросом ядерного материала (полые стрелки) и содержит МРО и IL-17. 1000х кратное увеличение. Размер отрезка = 10 микрон.

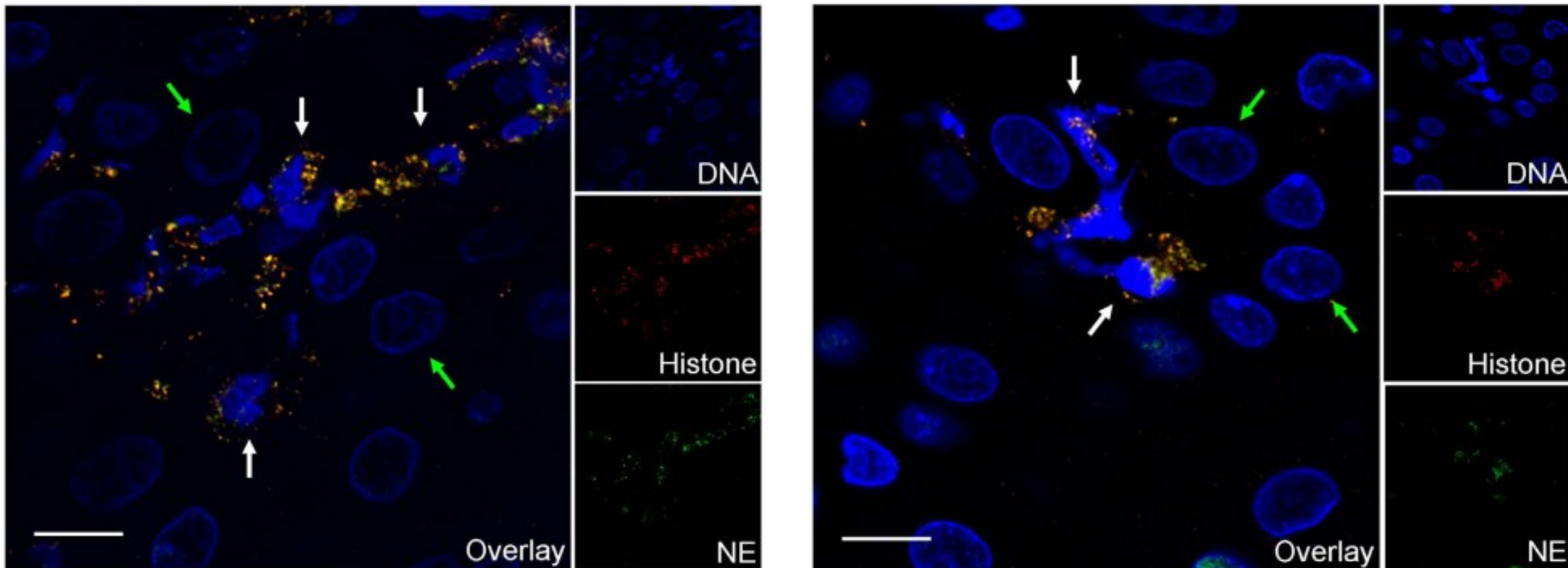
Биопсия псориатического эпидермиса (n = 12).

Иммунофлуоресценция для IL-17 (зеленый), МРО - миелопероксидаза (красный) и DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole - синий).

Дерма

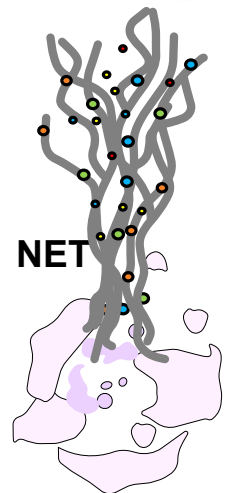


С. Биопсия псориатической кожи (n = 3). Иммунофлуоресценции для IL-17 (зеленый), LL-37 (красный), и МРО (синий). Обнаружилось много дермальных NET (белый цвет, сплошная стрелка), а также отличные от нейтрофилов IL-17+ клетки (зеленый цвет, полая стрелка). Размер отрезка = 100 микрон.



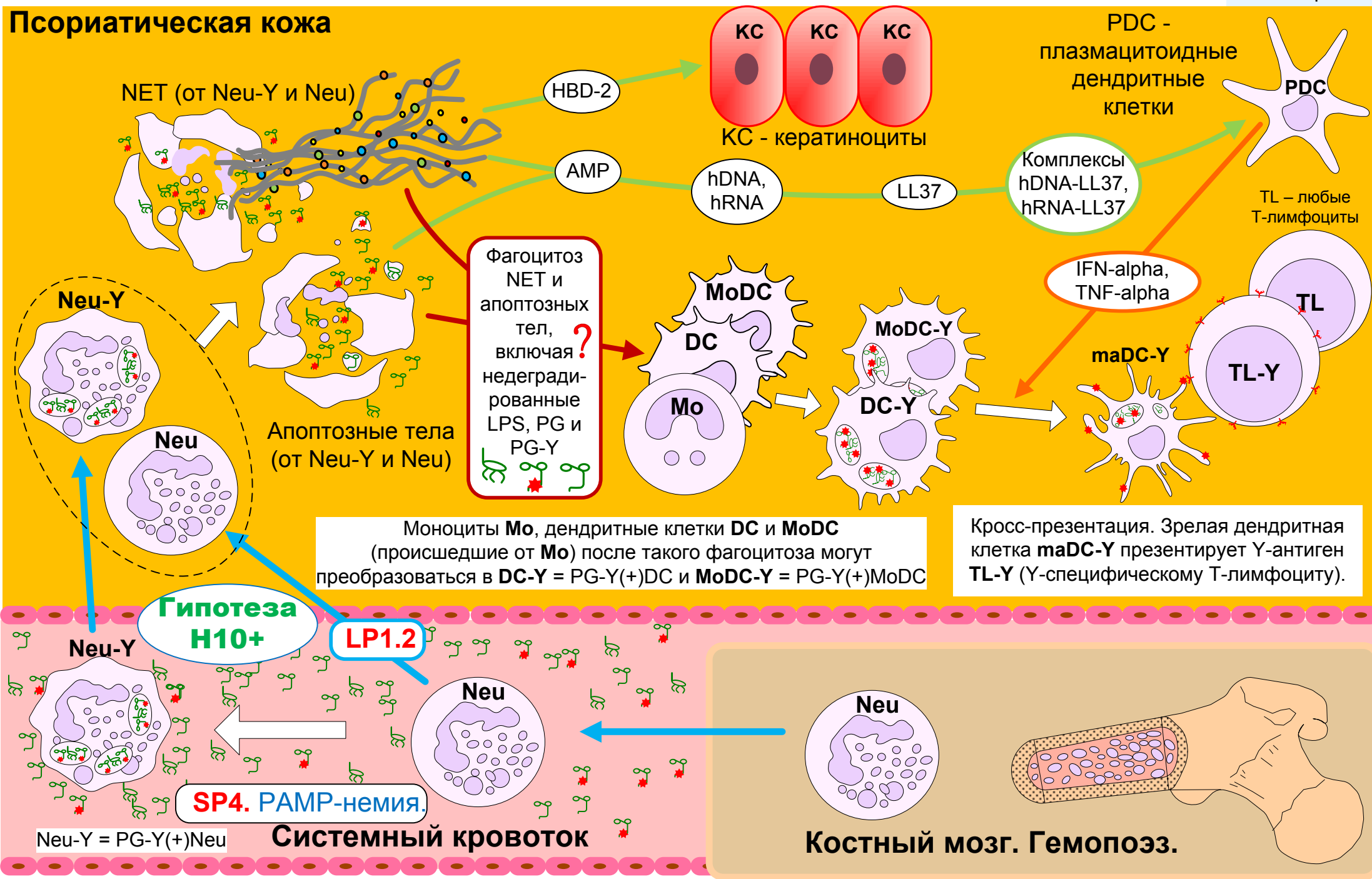
Софокусная микроскопия псориазического эпидермиса.
NET (белые стрелки) часто находятся рядом с кератиноцитам (зеленые стрелки).
NET определяются путем наложения изображений внеклеточных сетей DNA (DAPI, синий), гистонов (красный) и нейтрофильной эластазы (NE, зеленый).
Размер отрезка = 10 микрон.

Фрагмент Рис.4 из 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, PMID 27493143.



Привлечение из крови, нетоз и апоптоз нейтрофилов в псориатической коже. Кросс-презентация Y-антигена.

Псориатическая кожа



Привлечение фагоцитов крови в кожу при средне-тяжелом псориазе (факты).

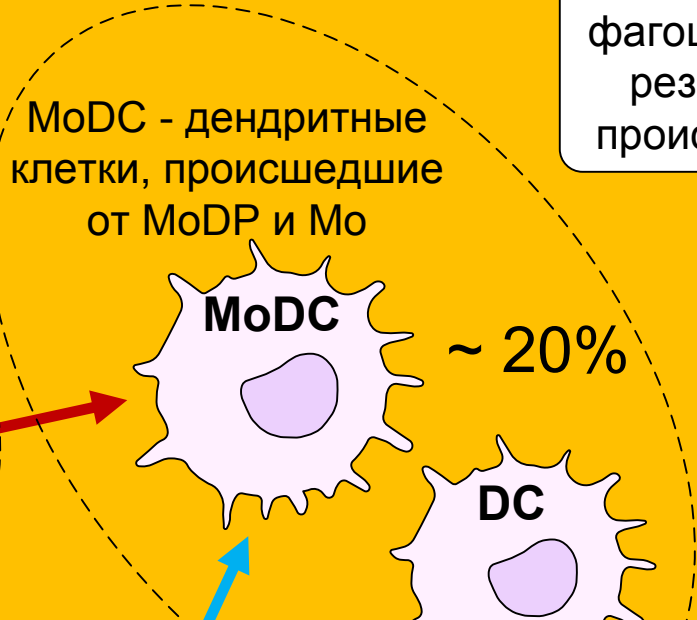
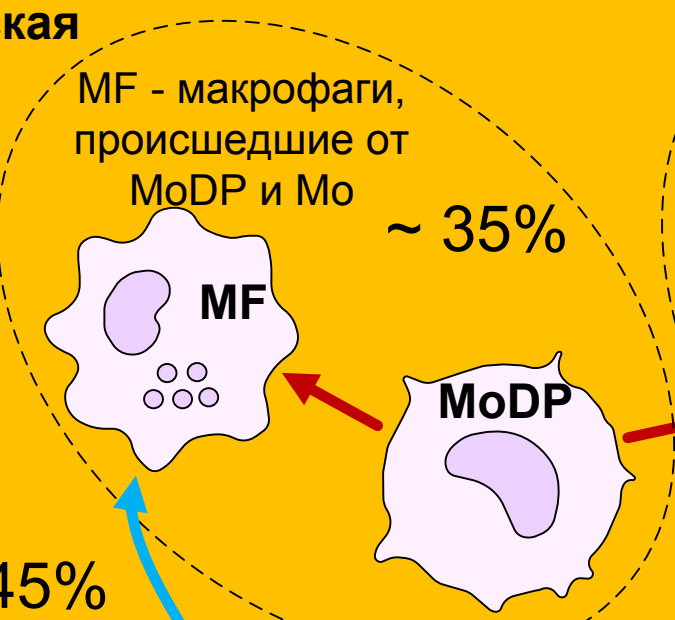
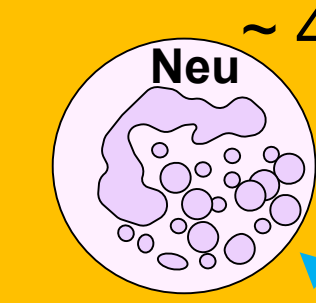
В здоровой коже почти все фагоциты имеют резидентное происхождение.

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

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

Псориатическая кожа

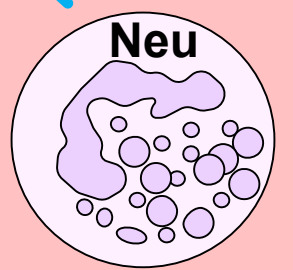
Концентрация фагоцитов ~ 41000 шт/мм3 (в верхнем слое толщиной 0,5 мм)



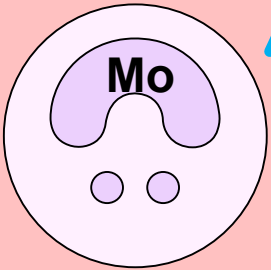
MoDP - предшественники моноцитов и дендритных клеток (дермальные стволовые клетки)

Системный кровоток

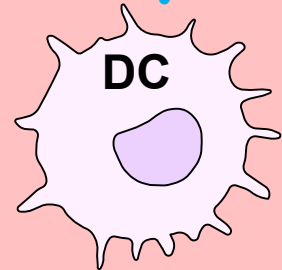
Концентрация фагоцитов ~ 6500 шт/мм3



Нейтрофилы крови ~ 85%



Моноциты крови ~ 15%

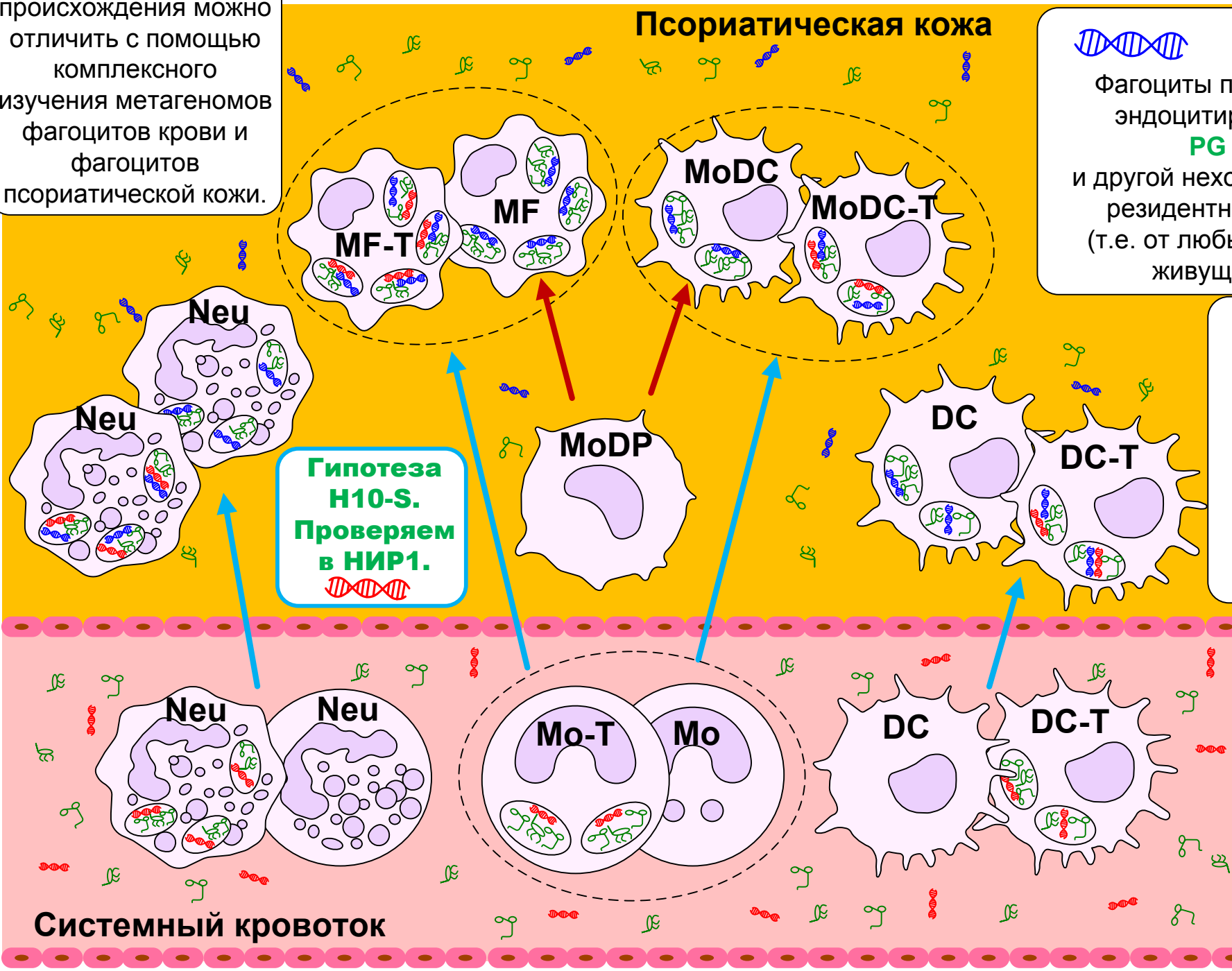


Дендритные клетки крови < 1%

Нехозяйский биоматериал поступает в псориатическую кожу внутри фагоцитов крови.



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



Фагоциты псориатической кожи эндоцитируют nhDNA, LPS, PG (в т.ч. PG-Y) и другой нехозяйский биоматериал резидентного происхождения (т.е. от любых микроорганизмов, живущих на и в коже).

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

Гипотеза H10-S.
Проверяем в НИР1.

nhDNA, LPS, PG (в т.ч. PG-Y) и другой нехозяйский биоматериал поступает в псориатическую кожу из кровотока внутри нейтрофилов Neu и и толеризованных моноцитов Mo-T и дендритных клеток DC-T

Системный кровоток

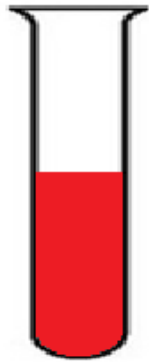
Псориатическая кожа

Отбор фагоцитов из крови и псориатической кожи иммуномагнитным методом

Отрицательная селекция

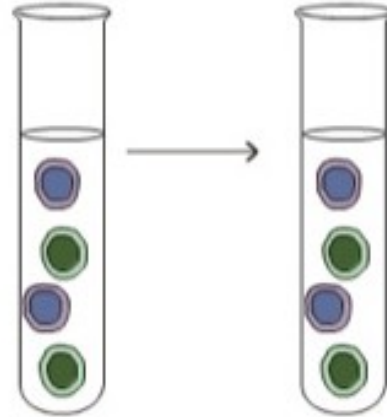
Phagocytes_selection

Получение крови в стерильных условиях из вены.

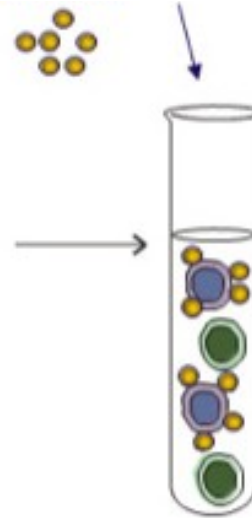


Добавление в клеточную суспензию специфических антител

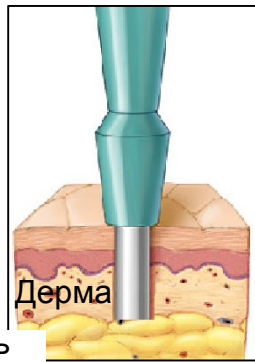
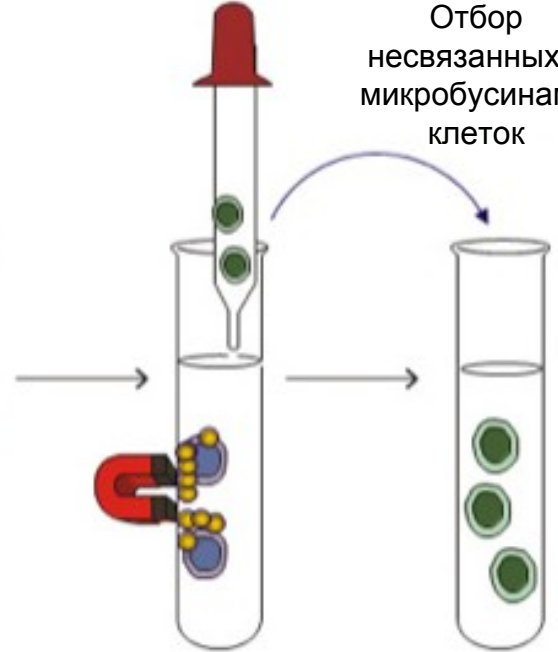
Инкубация и центрифугирование



Добавление магнитных микробусин, инкубация



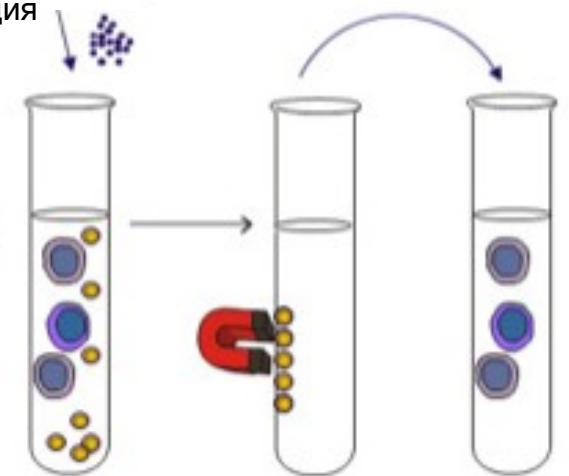
Отбор несвязанных с микробусинами клеток



Гомогенизация биоптата с целью полного разделения клеток.

Добавление реагента, освобождающего от микробусин, инкубация

Отбор клеток, освобожденных от микробусин



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

Положительная селекция

Предполагаемые фракции метагенома фагоцитов псориатической кожи MPPS

34

nhDNA-MPPS_{co}

Смешанная фракция RuN.
Возможные причины существования:

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

**MPB -
Метагеном
фагоцитов
крови**

**MPPS -
Метагеном
фагоцитов
псориатической
кожи**

R. Резидентная.

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

RuN. Смешанная. nhDNA резидентного и нерезидентного происхождения.

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

M. Общая.

(nhDNA есть и в MPB и в MPPS).

N. Нерезидентная. nhDNA нерезидентного происхождения.

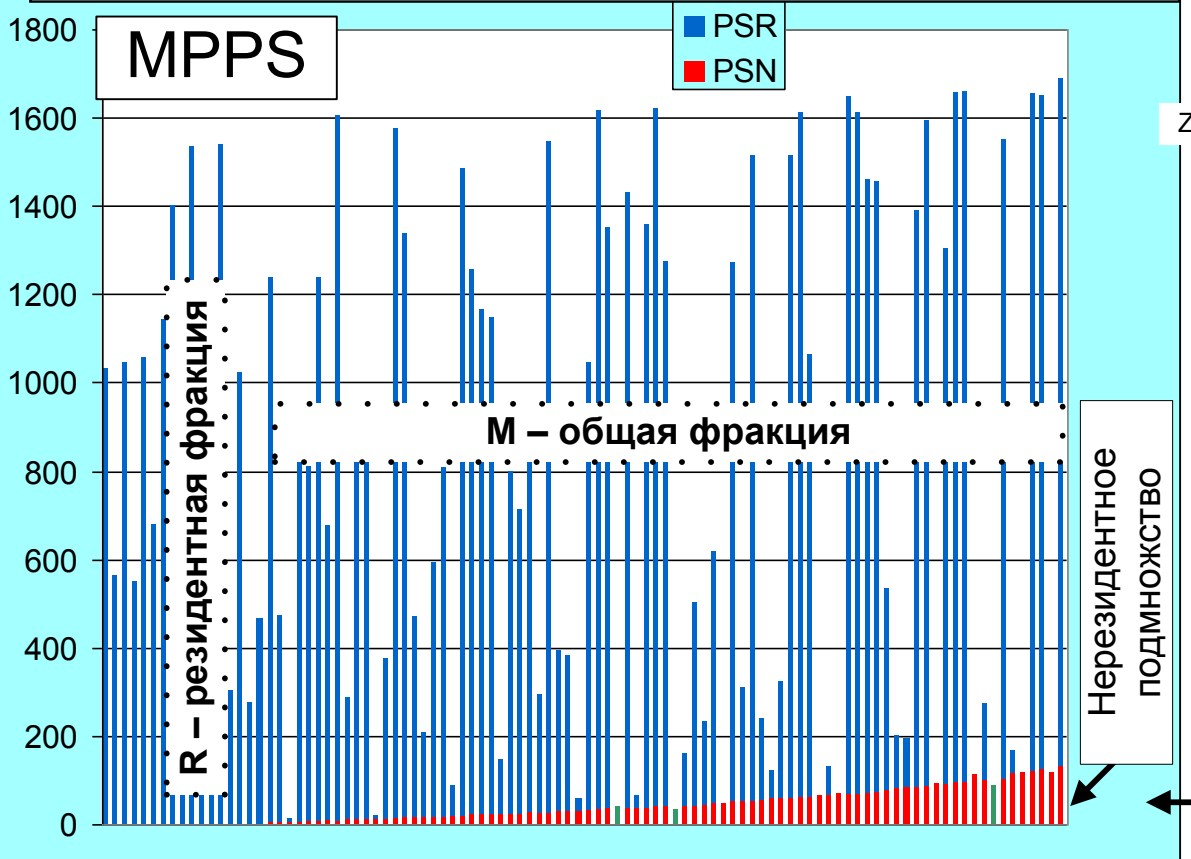
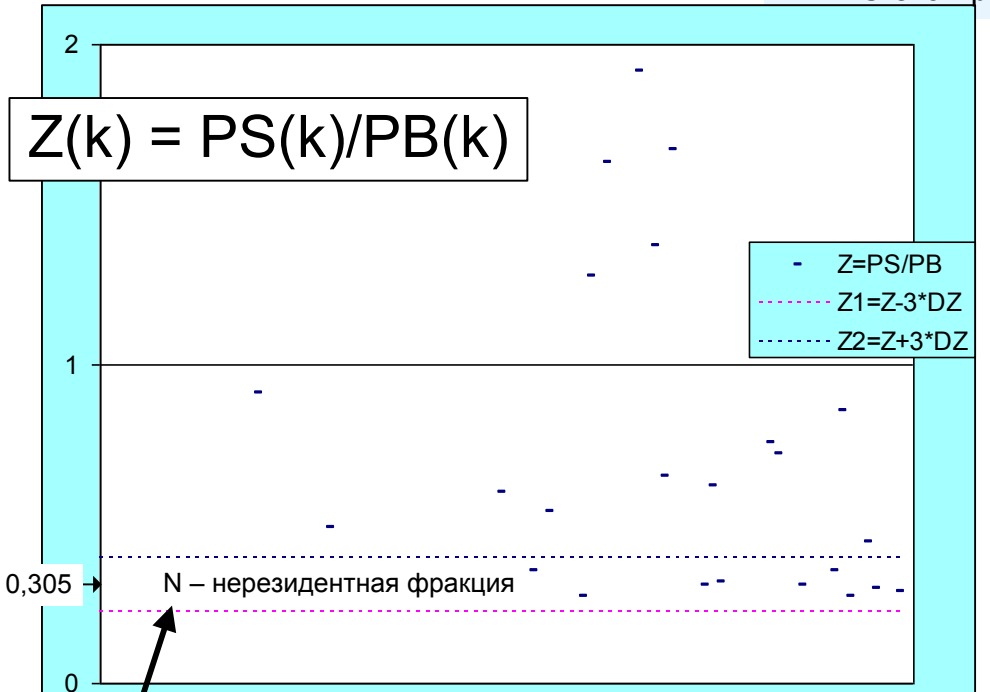
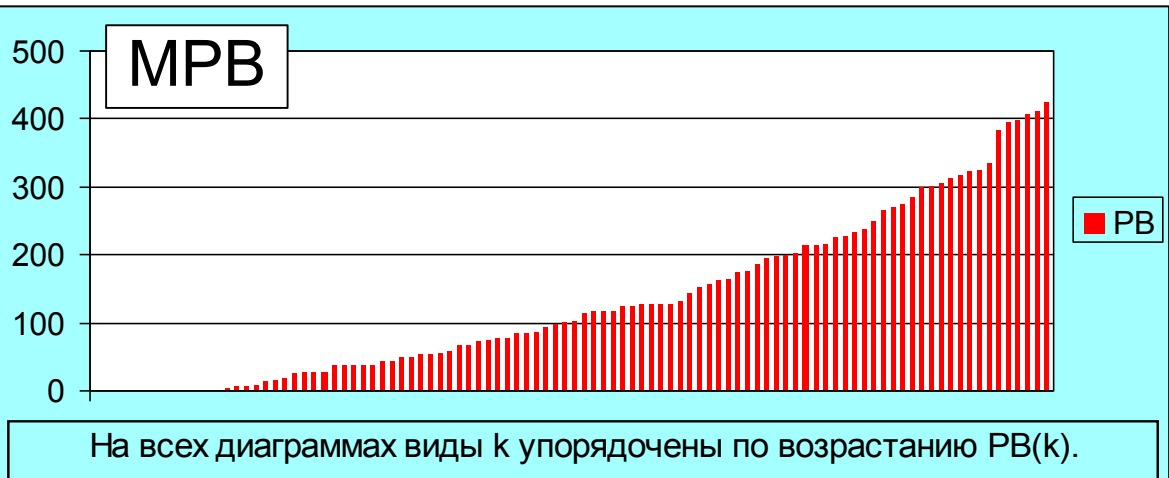
(nhDNA есть в MPPS только потому, что поступила в псориатическую кожу внутри фагоцитов крови. Определяется логически и алгоритмически. Первоначально в нее включаются nhDNA организмов, которые не могут существовать в коже).

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

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

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

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



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

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

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

	Вопросы	Возможные ответы и выводы	
1	<p>Коррелирует ли тяжесть псориатической болезни</p> <p>а) с концентрацией каких-либо phDNA в фагоцитах крови?</p> <p>б) с уровнем PAMP-немии?</p>	<p>Да.</p> <p>Прямое подтверждение гипотез H2 и H3.</p>	<p>Частично.</p> <p>Нужно смотреть что именно обнаружено и, вероятно, корректировать гипотезы H2 и/или H3.</p> <p>Нет.</p> <p>Это противоречит гипотезам H2 и H3.</p> <p>Критично для проведения НИР2.</p>
2	<p>Недеградированная phDNA поступает из крови в псориатическую кожу?</p> <p>Если да, то какая часть метагенома фагоцитов крови MPB обнаружена в метагеноме фагоцитов псориатической кожи MPPS и в какой концентрации?</p>	<p>> 80%.</p> <p>Факт доказывает гипотезу H10-S и поддерживает гипотезу H10+, поскольку доказывает поступление бактериальных продуктов из крови в псориатическую кожу внутри фагоцитов.</p>	<p>< 20%.</p> <p>Факт ставит под сомнение гипотезы H10-S и H10+, поскольку не подтверждает значимого поступления бактериальных продуктов из крови в псориатическую дерму.</p> <p>Критично для проведения НИР2.</p>

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

Главные цели НИР1

Изучение подпроцессов, лежащих в основе системного псориатического процесса.

Получение фактов в поддержку гипотез Н2 и Н3.

Получение фактов в поддержку гипотезы Н10+ (Н10-S).

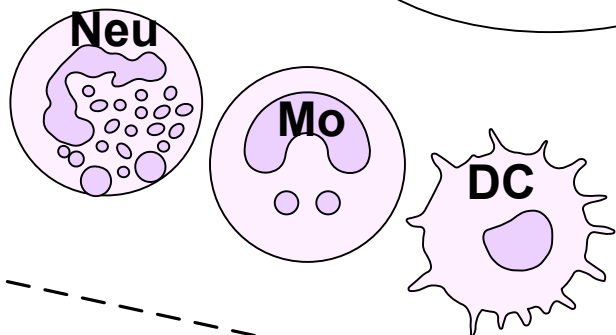
Н10+ лежит в основе Y-модели патогенеза ПБ и предполагает ключевую роль поступления специфических бактериальных продуктов из системного кровотока в псориатическую дерму внутри фагоцитов крови.

Обоснование целесообразности и подготовка к проведению НИР2

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

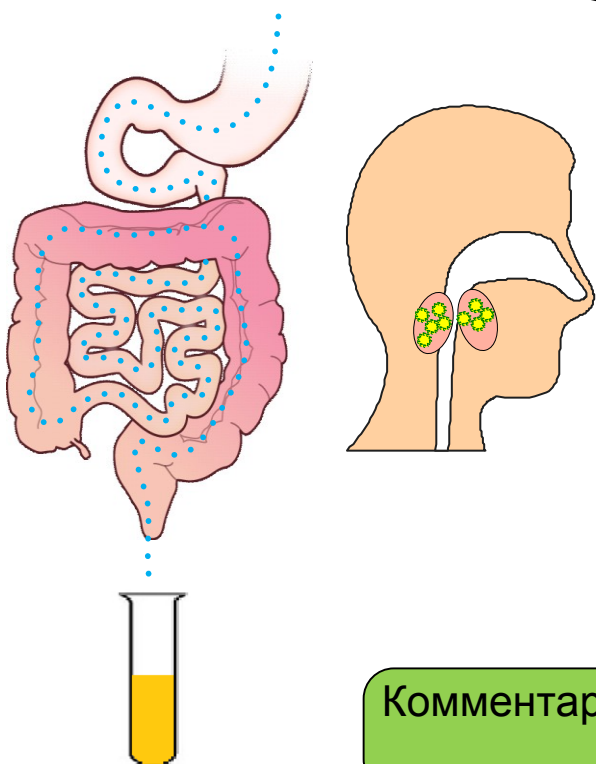
Пациенты, типы биоматериалов и число WMS-тестов

НИР1



Комплексное
изучение и поиск
влияния

НИР2



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

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

Комментарии к данной презентации
(формат *.doc)

Вся информация по проекту НИР1
"Метагеномы фагоцитов крови и фагоцитов
псориазной кожи" в онлайн-версии