

ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4⁺ КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ CD39 И CD73 У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ

Купцова Д.Г.¹, Радыгина Т.В.¹, Петричук С.В.¹, Мурашкин Н.Н.^{1,2,3},
Хотко А.А.², Иванов Р.А.¹

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства
здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ,
Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Пуринергическая передача сигналов модулирует системные и местные воспалительные реакции при иммуноопосредованных и аутоиммунных заболеваниях, включая псориаз. Внеклеточный АТФ является важной частью пуринергической регуляции, уровень которого регулируется каталитическими эффектами эктонуклеотидаз CD39 и CD73. Целью исследования была оценка количества регуляторных Т-клеток (Tregs), активированных Т-хелперов (Thact), Т-хелперов 17-го типа (Th17), экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, у детей с вульгарным псориазом в зависимости от возраста, длительности заболевания и тяжести патологического процесса. Обследовано 114 детей с вульгарным псориазом (70 девочек и 44 мальчиков) и 41 здоровый ребенок в качестве группы сравнения (25 девочек и 16 мальчиков). Возраст детей с псориазом составил — 12,5 (10,1-15,8) года, для группы сравнения — 12,4 (7,4-16,1) года. Тяжесть псориаза оценивали по индексам PASI и BSA. Оценку количества клеток с экспрессией CD39 и CD73 на Tregs, Thact и Th17 выполняли методом проточной цитофлуориметрии. Наибольшее количество клеток с экспрессией CD39 выявлено в популяции Tregs, а с экспрессией CD73 — в Thact, как у детей с псориазом, так и в группе сравнения. У детей с псориазом содержание CD39⁺Th17 было ниже, а CD39⁺CD73⁺Thact и CD39⁺CD73⁺Th17 выше относительно группы сравнения ($p < 0,05$). Получено достоверное снижение CD73⁺Tregs, CD39⁺Thact, CD39⁺Th17, CD39⁺CD73⁺Thact и CD39⁺CD73⁺Th17 с возрастом у здоровых детей ($p < 0,05$). У пациентов с псориазом CD73⁺Th17 увеличивалось с возрастом. Выявлено снижение CD73⁺Th17 и увеличение CD39⁺CD73⁺Tregs при возрастании индексов PASI и BSA. При увеличении PASI (> 10) выделялись пациенты как с высоким содержанием CD39⁺Tregs, так и с низким, при этом количество CD39⁺Tregs в 48% случаев было ниже, в 35% было выше и только в 17% соответствовало значениям показателя здоровых детей. Учитывая роль эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в формировании иммунного ответа

Адрес для переписки:

Купцова Дарья Геннадьевна
ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.
Тел.: 8 (499) 134-13-98.
Факс: 8 (499) 134-70-01.
E-mail: dg.kuptsova@gmail.com

Address for correspondence:

Kuptsova Darya G.
National Medical Research Center for Children's Health
119296, Russian Federation, Moscow,
Lomonosovsky ave., 2, bldg 1.
Phone: 7 (499) 134-13-98.
Fax: 7 (499) 134-70-01.
E-mail: dg.kuptsova@gmail.com

Образец цитирования:

Д.Г. Купцова, Т.В. Радыгина, С.В. Петричук,
Н.Н. Мурашкин, А.А. Хотко, Р.А. Иванов «Оценка
количества субпопуляций CD4⁺ клеток с экспрессией
эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у детей с псориазом» // *Медицинская иммунология*, 2022,
Т. 24, № 3. С. 587-596.
doi: 10.15789/1563-0625-AOC-2487
© Купцова Д.Г. и соавт., 2022

For citation:

D.G. Kuptsova, T.V. Radigina, S.V. Petrichuk,
N.N. Murashkin, A.A. Khotko, R.A. Ivanov "Assessment
of CD4⁺ cells subpopulations with the expressing CD39 and
CD73 ectonucleotidases in children with psoriasis", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 3, pp. 587-596.
doi: 10.15789/1563-0625-AOC-2487
DOI: 10.15789/1563-0625-AOC-2487

при иммуноопосредованных заболеваниях, мониторинг количества Tregs, Thact и Th17-клеток с экспрессией CD39 и CD73 у детей с псориазом может быть использован для контроля хронического воспаления.

Ключевые слова: дети, вульгарный псориаз, Т-хелперы, эктонуклеотидазы, CD39, CD73

ASSESSMENT OF CD4⁺ CELLS SUBPOPULATIONS WITH THE EXPRESSING CD39 AND CD73 ECTONUCLEOTIDASES IN CHILDREN WITH PSORIASIS

Kuptsova D.G.^a, Radigina T.V.^a, Petrichuk S.V.^a, Murashkin N.N.^{a, b, c}, Khotko A.A.^b, Ivanov R.A.^a

^a National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

^b Central State Medical Academy, Department of Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Purinergic signaling modulates systemic and local inflammatory responses in immune-mediated and autoimmune diseases, including psoriasis. Extracellular ATP is an important factor of purinergic regulation, and its levels are regulated by catalytic effects of CD39 and CD73 ectonucleotidases. The aim of the present study was to estimate the number of regulatory T cells (Tregs), activated T-helper cells (Thact), T-helper type 17 (Th17) expressing CD39 and CD73 ectonucleotidases in children with psoriasis vulgaris, depending on age, disease duration and severity of the pathological process. We have examined a total of 114 children with psoriasis vulgaris (70 girls and 44 boys) and 41 healthy children serving as a comparison group (25 girls and 16 boys). The age of children with psoriasis was 12.5 (10.1–15.8) years, and 12.4 (7.4–16.1) years for the comparison group. The severity of psoriasis was assessed by the PASI and BSA indices. The number of cells with CD39 and CD73 expression on Tregs, Thact and Th17 was estimated by flow cytometry. The highest number of CD39-expressing cells was found in the Tregs and CD73-expressing cells in Thact, both in children with psoriasis and in the comparison group. The number of CD39⁺Th17 was lower in children with psoriasis, but CD39⁺CD73⁺Thact and CD39⁺CD73⁺Th17 were higher than in comparison group ($p < 0.05$). There was a decreased number of CD73⁺Tregs, CD39⁺Thact, CD39⁺Th17, CD39⁺CD73⁺Thact and CD39⁺CD73⁺Th17 with age in healthy children ($p < 0.05$). In patients with psoriasis, the number of CD73⁺Th17 increased with age. A decrease in CD73⁺Th17, and an increase in CD39⁺CD73⁺Tregs with higher PASI and BSA indices were detected. An increased PASI (> 10) showed patients with both high and low CD39⁺Tregs, with CD39⁺Tregs being reduced in 48% of cases, increased in 35% and normal values in only 17% of cases. Monitoring the numbers of Tregs, Thact and Th17 cells expressing CD39 and CD73 in children with psoriasis may be used to evaluate chronic inflammation, given the role of CD39 and CD73 ectonucleotidases in shaping the immune response in immune-mediated diseases,

Keywords: children, psoriasis vulgaris, T helper, ectonucleotidases, CD39, CD73

Введение

Псориаз — хроническое рецидивирующее иммуноопосредованное воспалительное заболевание кожи [3, 35]. В настоящее время увеличивается распространенность данной патологии среди детей и подростков во всем мире [4, 26]. Псориаз, характеризующийся утолщением эпидермиса из-за повышенной пролиферации кератиноцитов, может проявляться в виде различных фенотипов [24]. Наиболее распространенной формой

является псориаз обыкновенный или вульгарный, составляющий до 90% случаев заболевания [16].

В последнее время патогенетическая модель псориаза была пересмотрена в соответствии с более широким и глубоким пониманием иммунных механизмов, ведущих к образованию характерных клинических проявлений заболевания [23]. Выделяют две общепризнанные фазы патогенеза псориаза: инициация/запуск заболевания и поддержание патологического воспаления [9, 13]. На

сегодняшний день большое внимание уделяется изучению молекулярных механизмов запуска псориаза [23, 32].

В патогенезе ранней стадии псориаза Ferrari D. и соавт. описали роль внеклеточного АТФ (еАТФ), который высвобождается в результате повреждения клеток кожи [12]. Внеклеточный АТФ является сильным провоспалительным сигналом и важной частью пуринергической регуляции [19, 38]. еАТФ включает активацию пуринергических рецепторов в клетке и/или в близлежащих клетках, тем самым регулируя клеточные функции [27]. Антагонистом еАТФ является внеклеточный аденозин, обладающий иммуносупрессивными свойствами [6]. Уровень еАТФ регулируется каталитическими эффектами эктонуклеотидтрифосфатдифосфогидролазы-1 (CD39) и экто-5'-нуклеотидазы (CD73), которые ответственны за превращение еАТФ в аденозин [25]. После выхода во внеклеточное пространство еАТФ гидролизуются до аденозиндифосфата и аденозинмонофосфата (АМФ) с помощью CD39, тогда как CD73 отвечает за превращение АМФ в аденозин [6, 25]. Показано, что ферменты CD39 и CD73 экспрессируются на плазматической мембране многих иммунных клеток [19, 31]. За счет продукции аденозина, эктонуклеотидазы CD39 и CD73 считаются ответственными за создание иммуносупрессивной среды [5]. Наиболее изучена экспрессия этих ферментов в популяции регуляторных Т-клеток (Tregs) [7, 29].

Показано, что пуринергическая передача сигналов модулирует системные и местные воспалительные реакции при иммуноопосредованных и аутоиммунных заболеваниях [1, 15, 33]. Изменение экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 может регулировать продукцию аденозина и приводить к активации функций Т-хелперов 17-го типа (Th17) и активированных Т-хелперов (Thact) при хроническом воспалении [21, 34]. Показано снижение экспрессии CD39 на Tregs при обострении аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, воспалительные заболевания кишечника и др. [10, 14, 33]. Ранее проведенные исследования по изучению пуринергической регуляции у взрослых пациентов с псориазом выявили снижение экспрессии CD73 в популяции Tregs по сравнению со здоровыми людьми [18, 37]. Однако исследования пуринергической регуляции в поддержании хронического воспаления при псориазе у детей не проводились.

Целью нашего исследования была оценка количества популяций Tregs, Thact, Th17, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, у детей с вульгарным псориазом в зависимости от

возраста, длительности заболевания и тяжести патологического процесса.

Материалы и методы

В исследование включены 114 пациентов с вульгарным псориазом, в группу сравнения вошли здоровые дети ($n = 41$). Возраст детей с псориазом составил — Ме 12,54 (10,1-15,8) лет, для группы сравнения — Ме 12,4 (7,4-16,1). Критериями включения в исследование были: возраст обследованных детей — 4-18 лет, установленный диагноз «вульгарный псориаз». Критериями исключения являлись иные формы псориаза у детей, возраст участников старше 18 лет, невозможность получения образца крови. Всем детям проводили оценку тяжести псориаза по индексам PASI (Psoriasis Area and Severity Index) и BSA (Body Surface Area, %). В стадии регресса заболевания псориазом ($PASI \leq 10$) находилось 36 пациентов, а в прогрессирующей стадии ($PASI > 10$) — 78 детей. Пациенты с псориазом проходили обследование и лечение в отделении дерматологии с группой лазерной хирургии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в период с марта 2020 по август 2021 года. Проведенное исследование соответствовало этическим принципам Хельсинкской декларации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и было одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 2 от 14.02.2020). Для участников исследования было получено информированное согласие родителей.

Всем детям было проведено иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови с определением популяций $CD4^+$ клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73. Для проведения исследований использовали периферическую кровь, взятую натощак в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА. Пробоподготовка образцов включала в себя инкубирование в течение 20 минут в темном месте 100 мкл цельной крови с 10 мкл моноклональных антител, меченных флуорохромами. Для лизирования эритроцитов был использован лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences, США), длительность инкубации с которым в темноте при комнатной температуре не превышала 10-12 минут. Запись полученных образцов проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences, США).

Панель моноклональных антител для оценки относительного количества клеточных популяций и экспрессии маркеров CD39 и CD73 включала антитела, конъюгированные с флуорохромами: CD3 — PerCP (Sony Biotechnology, США); CD4 — FITC (Beckman Coulter, США);

CD127 — PE (Beckman Coulter, США); CD161 — PE (Beckman Coulter, США); CD25 — PE-Cy7 (Beckman Coulter, США); CD39 — APC (Sony Biotechnology, США); CD73 — APC-Cy7 (Sony Biotechnology, США). Методом пошагового гей-тирования проводили выделение следующих популяций клеток: CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} — Tregs, CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} — Thact, CD3⁺CD4⁺CD161⁺ — Th17, с последующей оценкой количества клеток, экспрессирующих CD39 и CD73.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Описательная статистика количества клеток с экспрессией эктонуклеотидаз представлена в виде медианы (нижний — верхний квартили) — Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Уровень статистической значимости различий между независимыми группами оценивали непараметрическим критерием Манна-Уитни, для оценки зависимых групп применяли критерий Вилкоксона. Для выявления корреляционных зависимостей использовали множественный пошаговый корреляционный анализ с исключением. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Частотные гистограммы по-

строены в программе Excel, распределения сравнивались между собой по критерию χ^2 .

Результаты

Проведенный анализ показал, что для детей с псориазом характерно достоверное увеличение относительного количества Th17 и Thact по сравнению со здоровыми детьми, по содержанию Tregs группы не отличались (табл. 1). Оценка относительного количества клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, в исследуемых популяциях выявила достоверное снижение CD39⁺Th17 ($p = 0,006$) у детей с псориазом, при этом относительное количество CD39⁺CD73⁺Thact ($p = 0,011$) и CD39⁺CD73⁺Th17 ($p = 0,000$) было выше чем в группе сравнения (табл. 1).

Оценка содержания клеток с экспрессией эктонуклеотидазы CD39 в изученных популяциях показала, что наибольшее количество клеток с экспрессией CD39 характерно для популяции Tregs. Количество CD39⁺Tregs достоверно превышало CD39⁺Thact ($p = 0,000$) и CD39⁺Th17 ($p = 0,000$), при этом количество CD39⁺Th17 было

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4⁺ КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ CD39 И CD73 У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ И В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ, Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})

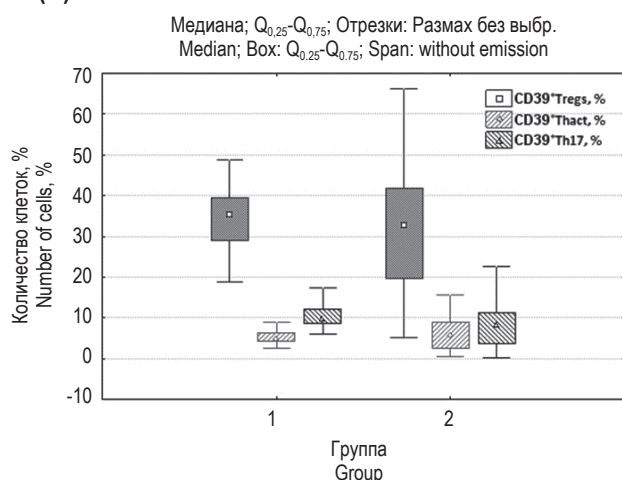
TABLE 1. NUMBER OF CD4⁺ CELLS SUBSETS EXPRESSING CD39 AND CD73 IN CHILDREN WITH PSORIASIS AND IN THE COMPARISON GROUP, Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})

Показатели Parameters	Пациенты с псориазом Patients with psoriasis (n = 114)	Здоровые дети Healthy children (n = 41)	p
Tregs, % CD4	6,9 (6,1-8,4)	7,3 (6,4-9,6)	0,194
CD39 ⁺ Tregs, %	32,8 (19,6-42,2)	35,2 (29,1-39,4)	0,112
CD73 ⁺ Tregs, %	7,5 (5,7-11,3)	8,9 (7,3-11,1)	0,429
Thact, % CD4	19,1 (14,2-24,2)	18,8 (10,6-20,0)	0,011
CD39 ⁺ Thact, %	6,1 (2,8-8,9)	4,6 (4,2-6,2)	0,741
CD73 ⁺ Thact, %	18,2 (14,0-23,2)	17,6 (11,9-21,5)	0,157
Th17, % CD4	20,0 (15,6-24,8)	12,8 (10,9-19,5)	0,000
CD39 ⁺ Th17, %	8,3 (3,3-11,8)	9,6 (8,6-12,1)	0,006
CD73 ⁺ Th17, %	10,9 (8,2-16,3)	10,2 (7,3-14,4)	0,056
CD39 ⁺ CD73 ⁺ Tregs, %	3,6 (2,1-6,2)	4,0 (2,5-7,1)	0,340
CD39 ⁺ CD73 ⁺ Thact, %	1,3 (0,8-1,9)	0,7 (0,6-1,3)	0,011
CD39 ⁺ CD73 ⁺ Th17, %	1,4 (0,4-2,4)	0,8 (0,7-1,3)	0,000

Примечание. p — достоверность различий между группами, критерий Манна-Уитни.

Note. p, significance of differences between groups, Mann–Whitney U test.

А (A)



Б (B)

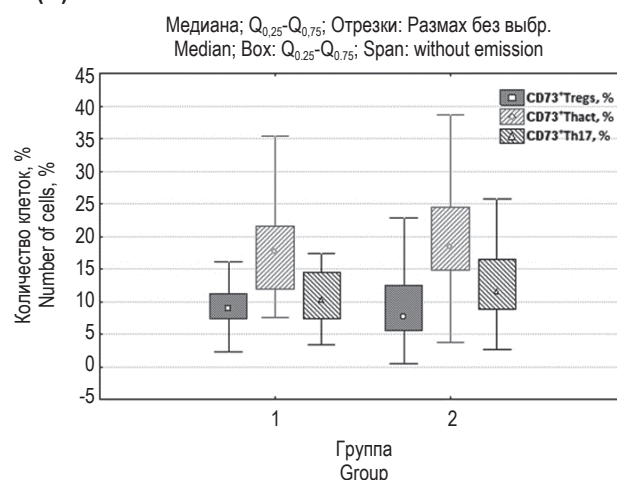


Рисунок 1. Относительное количество Tregs, Thact, Th17 с экспрессией CD39 (A) и CD73 (Б) у детей с псориазом и в группе сравнения

Примечание. Группа 1 – здоровые дети, группа 2 – дети с псориазом.

Figure 1. Relative numbers of Tregs, Thact, Th17 expressing CD39 (A) and CD73 (B) in children with psoriasis and in the comparison group.

Note. Group 1, healthy children; group 2, children with psoriasis.

достоверно выше, чем CD39⁺Thact ($p = 0,000$), как у здоровых детей, так и у пациентов с псориазом (рис. 1A).

Сравнение количества популяций Tregs, Thact, Th17 с экспрессией CD73 выявило достоверно более высокое количество CD73⁺Thact ($p = 0,000$) в обеих группах (рис. 1Б). У детей с псориазом относительное количество CD73⁺Th17 было достоверно выше CD73⁺Tregs ($p = 0,000$), в то время как в группе здоровых детей не отличалось ($p = 0,197$; рис. 1Б).

Анализ количества клеток с коэкспрессией CD39 и CD73 показал более высокие значения в популяции Tregs по сравнению с Thact ($p = 0,000$) и Th17 ($p = 0,000$), как у здоровых детей, так и у пациентов с псориазом. Относительное количество CD39⁺CD73⁺Thact и CD39⁺CD73⁺Th17 не отличались в обеих группах.

На следующем этапе был проведен анализ количества клеток с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в зависимости от возраста детей и длительности заболевания псориазом. Группы обследованных детей были сопоставимы по возрасту ($p = 0,295$). Для детей с псориазом медиана возраста составила 12,5 (10,1-15,8), для группы сравнения – Ме 12,4 (7,4-16,1).

Корреляционный анализ показал достоверное увеличение относительного количества Thact и Th17 с возрастом как у детей с псориазом ($p = 0,000$), так и у здоровых детей ($p = 0,006$). У здоровых детей получено достоверное уве-

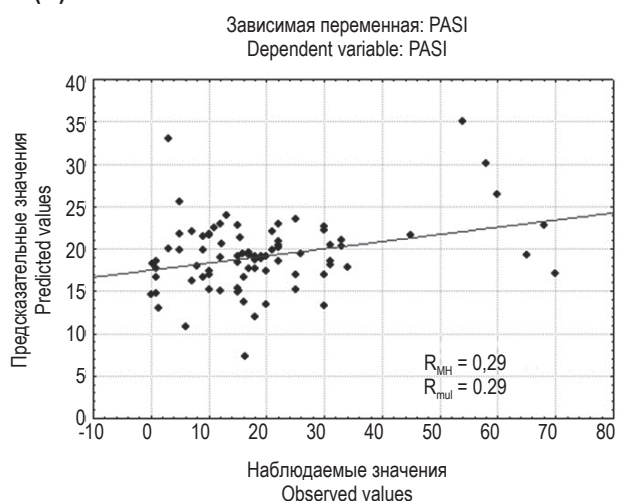
личение CD73⁺Th17 и снижение CD73⁺Tregs, CD39⁺Thact, CD39⁺Th17, CD39⁺CD73⁺Thact и CD39⁺CD73⁺Th17 с возрастом ($p < 0,05$). Для детей с псориазом показано только увеличение относительного количества CD73⁺Th17 с возрастом ($p = 0,000$). Зависимости количества клеток с экспрессией CD39 и CD73 в популяциях Tregs, Thact и Th17 от длительности заболевания псориазом у детей не выявлено.

Оценку тяжести заболевания псориазом у детей проводили по индексам PASI и BSA, которые изменялись: PASI – от 0 до 70 (Ме 13,3 (5-22)), BSA – от 0 до 100% (Ме 20 (4-40)). В стадии регресса заболевания псориазом ($PASI \leq 10$) находилось 36 пациентов, а в прогрессирующей стадии ($PASI > 10$) – 78 детей.

Множественный корреляционный анализ зависимости тяжести псориаза от содержания клеток с экспрессией CD39 и CD73 показал увеличение индекса PASI при снижении количества CD73⁺Th17 и увеличении количества CD39⁺CD73⁺Tregs (рис. 2А, табл. 2). Увеличение BSA наблюдается при снижении количества клеток CD73⁺Th17 и увеличении количества CD39⁺CD73⁺Tregs (рис. 2Б, табл. 2).

Учитывая большой интерес к изучению эктонуклеотидазы CD39 в популяции Tregs при аутоиммунных заболеваниях, мы детально проанализировали количество CD39⁺Tregs у детей с псориазом в зависимости от индекса PASI. Статистически значимых различий по количеству

А (А)



Б (В)

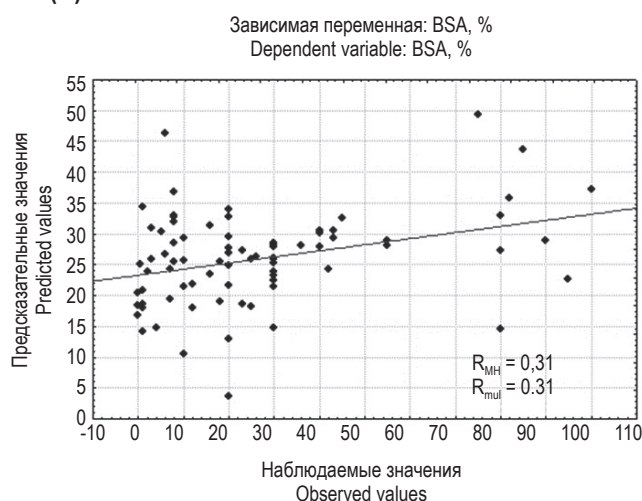


Рисунок 2. Зависимости предсказанных и наблюдаемых значений для PASI (А) и BSA (Б) в зависимости от количества клеток с экспрессией CD39 и CD73 у детей с псориазом

Примечание. $R_{\text{мн}}$ – множественный коэффициент корреляции R.

Figure 2. Dependencies of predicted and observed values for PASI (A) and BSA (B) as a function of the number of cells expressing CD39 and CD73 in children with psoriasis

Note. $R_{\text{мнл}}$, coefficient of multiple correlation R.

ТАБЛИЦА 2. УРАВНЕНИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ PASI И BSA В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ CD39 И CD73 У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ

TABLE 2. MULTIPLE REGRESSION EQUATIONS FOR PASI AND BSA AS A FUNCTION OF THE NUMBER OF CELLS EXPRESSING CD39 AND CD73 IN CHILDREN WITH PSORIASIS

Уравнение множественной регрессии Multiple regression equation				
Зависимая переменная: PASI Dependent variable: PASI				
Переменная Variable	Коэффициент регрессии Regression coefficient	Ошибка коэффициента Error of coefficient	t-критерий t test	p
Свободный член Free term	23,06	3,9	5,87	0,000
CD73*Th17	-0,67	0,3	-2,19	0,03
CD39*CD73*Tregs	0,87	0,4	2,42	0,017
Зависимая переменная: BSA Dependent variable: BSA				
Свободный член Free term	35,9	6,55	5,48	0,000
CD73*Th17	-1,33	0,5	-2,65	0,009
CD39*CD73*Tregs	1,34	0,58	2,28	0,025

Примечание. Для построения уравнений регрессии использовали метод множественный пошаговой регрессией с исключениями. p – достоверность отличия коэффициентов регрессии от 0.

Note. Regression equations were constructed using the stepwise multiple regression method with exceptions. p, reliability of difference of regression coefficients from 0.

CD39⁺Tregs у детей с псориазом в стадии прогресса заболевания (Me 33,2 (14,3-46,2)) и регресса заболевания (Me 28,6 (24,8-36,5)) не выявлено ($p = 0,507$). При этом отмечался большой разброс показателя в обеих группах. В стадии регресса заболевания относительное количество CD39⁺Tregs в 44% случаев было ниже, в 14% было выше и в 42% случаев соответствовало значениям квартильного интервала у здоровых детей (29,1-39,4). У пациентов с псориазом в стадии прогресса заболевания относительное количество CD39⁺Tregs в 48% случаев было ниже, в 35% было выше и только в 17% случаев соответствовало значениям показателя здоровых детей.

Проведенный частотный анализ показал, что в стадии регресса заболевания распределение пациентов по CD39⁺Tregs не отличается от здоровых детей (критерий χ^2 ; $p > 0,01$) и достоверно отличается от стадии прогресса заболевания ($p < 0,01$; рис. 3). Распределение пациентов по CD39⁺Tregs в стадии прогресса заболевания псориазом представляет собой кривую с несколькими пиками, четко выделяются пациенты с низким и высоким процентом CD39⁺Tregs (рис. 3).

Обсуждение

Эктонуклеотидазы CD39 и CD73 играют фундаментальную роль в поддержании концентрации eATF, тем самым контролируя биохимический состав воспалительной среды [5, 38]. В проведенном исследовании был применен протокол определения количества клеток с экспрессией эктонуклеотидов CD39 и CD73 в популяциях Tregs, Thact, Th17 клеток у детей с псориазом и в группе сравнения. Результаты исследования показали, что количество клеток с экспрессией CD39 и CD73 определяется популяцией клеток, что согласуется с данными полученные у взрослых пациентов [2, 5]. Содержание CD39⁺Tregs достоверно превышало количество клеток с экспрессией CD39 в популяциях Thact и Th17, при этом количество CD39⁺Th17 было выше, чем CD39⁺Thact и в группе сравнения и у детей с псориазом. Оценка количества клеток с экспрессией CD73 выявила наибольшее содержание в популяции Thact в обеих группах. Анализ количества клеток с коэкспрессией CD39 и CD73 выявил более высокие значения в популяции Tregs.

Выявлено, что у детей с псориазом относительное содержание Th17 клеток и Thact выше по сравнению со здоровыми детьми, а по количеству Tregs группы не отличались, что ранее также было показано у взрослых пациентов с псориазом [30].

Особый интерес представляет популяция Th17 клеток с экспрессией CD39 (supTh17), обладающая регуляторными и иммуносупрессивными свойствами [20, 22]. При ювенильном

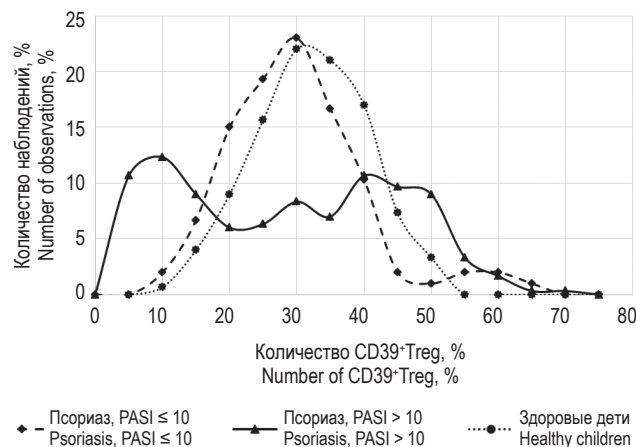


Рисунок 3. Распределение детей по количеству CD39⁺Tregs в стадиях регресса (PASI ≤ 10), прогресса (PASI > 10) заболевания и у здоровых детей

Figure 3. Distribution of children according to the number of CD39⁺Tregs in stages of disease regression (PASI ≤ 10), progression (PASI > 10) and in healthy children

аутоиммунном заболевании печени и воспалительных заболеваниях кишечника показано снижение содержания популяции supTh17 [20, 22]. В нашем исследовании также получено снижение supTh17 у детей с псориазом относительно группы сравнения, что может свидетельствовать о сохранении эффекторных свойств Th17 клеток. Известно, что количество supTh17-клеток регулируется концентрацией TGF- β и IL-6, которые могут запускать дифференцировку Th17 клеток, тем самым поддерживая хроническое воспаление [6, 36]. Количество клеток с коэкспрессией CD39⁺CD73⁺ в популяции Thact было выше, чем в группе сравнения, что согласуется с результатами полученные Han L. и соавт. у взрослых пациентов с псориазом [18]. По нашим данным, у детей с псориазом количество клеток с коэкспрессией CD39 и CD73 в популяции Th17 также было выше, чем у здоровых детей.

Известно, что при анализе содержания популяций лимфоцитов у детей необходимо учитывать возрастную динамику показателей. В нашем исследовании получено увеличение относительного количества Thact и Th17 с возрастом, при этом количество Tregs не зависело от возраста для всех обследованных детей. Оценка относительного количества клеток с экспрессией CD39 и CD73 у здоровых детей показала снижение CD73⁺Tregs, CD39⁺Thact, CD39⁺Th17, CD39⁺CD73⁺Tregs, CD39⁺CD73⁺Thact и увеличение CD73⁺Th17 с возрастом, при этом относительное количество CD39⁺Tregs от возраста не зависело. Ранее показано увеличение количества CD39⁺CD4⁺-клеток с возрастом у взрослых [1, 11, 17]. У детей с псориазом, в отличие от показателей здоровых детей, с возрастом увеличивается лишь относитель-

ное количество CD73⁺Th17, которые повторяют динамику общей популяции Th17 с возрастом.

Зависимости количества клеток в популяциях Tregs, Thact и Th17 с экспрессией CD39 и CD73 от длительности заболевания псориазом у детей не выявлено. Можно предположить, что экспрессия эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях CD4⁺ Т-клеток в большей степени определяется тяжестью псориаза у детей, чем их возрастом и длительностью заболевания.

Корреляционный анализ показал снижение количества CD73⁺Th17 и увеличение количества CD39⁺CD73⁺Tregs при увеличении индексов PASI и BSA у детей с псориазом, что согласуется с данными Gordon-Smith S.B. и соавт. об обратной корреляции экспрессии CD73 и продукции аденозина с тяжестью ювенильного идиопатического артрита [8].

Полученные нами данные согласуются с другими результатами авторов о том, что эктонуклеотидаза CD39 наиболее часто экспрессируется в популяции Tregs [14, 29]. Результаты исследования Han L. и соавт. по оценке количества CD39⁺Tregs, полученные от 10 взрослых пациентов с вульгарным псориазом, не показали

достоверных отличий относительно здоровых доноров, но показали снижение CD39⁺Tregs при пустулезном псориазе [18]. В нашем исследовании мы также не получили достоверных отличий, однако получили большой разброс показателя CD39⁺Tregs.

У детей с псориазом при увеличении PASI (> 10) наблюдается большой разброс показателя CD39⁺Tregs, выделяются пациенты как с высоким содержанием CD39⁺Tregs, так и с низким. С чем связано такое распределение CD39⁺Tregs предстоит выяснить. Можно предположить, что данный факт связан с разной активностью эктонуклеотидазы CD39.

Заключение

Учитывая роль эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в формировании иммунного ответа при иммуноопосредованных заболеваниях, мониторинг количества Tregs, Thact и Th17 клеток с экспрессией CD39 и CD73 у детей с псориазом, может быть использован для контроля хронического воспаления и разработки таргетных методов лечения псориаза.

Список литературы / References

1. Головкин А.С., Асадуллина И.А., Кудрявцев И.В. Пуринергическая регуляция основных физиологических и патологических процессов // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 463-476. [Golovkin A.S., Asadullina I.A., Kudryavtsev I.V. Purinergic regulation of basic physiological and pathological processes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 463-476. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-463-476.
2. Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Баранова О.П., Головкин А.С., Исаков Д.В., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян А.А. Экспрессия CD39 регуляторными Т-лимфоцитами при хроническом и остром саркоидозе // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 467-478. [Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Golovkin A.S., Isakov D.V., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. CD39⁺ Expression by regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis and Lofgren's syndrome. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 467-478. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-467-478.
3. Мурашкин Н.Н., Круглова Л.С., Коваленко Ю.А., Амбарчян Э.Т., Епишев Р.В., Материкин А.И., Опрятин Л.А., Иванов Р.А., Куколева Д.С., Купцова Д.Г., Помазанова М.Ю., Козырь Я.В. Коморбидности псориаза в детском возрасте // Вопросы современной педиатрии, 2020. Т. 19, № 6. С. 460-467. [Murashkin N.N., Kruglova L.S., Kovalenko I.A., Ambarchian E.T., Epishev R.V., Materikin A.I., Opryatin L.A., Ivanov R.A., Kukoleva D.S., Kuptsova D.G., Pomazanova M.Yu., Kozyr Y.V. Psoriasis comorbidities in childhood. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2020, Vol. 19, no. 6, pp. 460-467. (In Russ.)]
4. Мурашкин Н.Н., Материкин А.И., Амбарчян Э.Т., Епишев Р.В., Опрятин Л.А., Иванов Р.А., Куколева Д.С., Купцова Д.Г., Помазанова М.Ю. Псориаз и псориатический артрит в детском возрасте // Вопросы современной педиатрии, 2020. Т. 19, № 6. С. 444-451. [Murashkin N.N., Materikin A.I., Ambarchian E.T., Epishev R.V., Opryatin L.A., Ivanov R.A., Kukoleva D.S., Kuptsova D.G., Pomazanova M.U. Psoriasis and psoriatic arthritis in childhood psoriasis and psoriatic arthritis in childhood. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2020, Vol. 19, no. 6, pp. 444-451. (In Russ.)]
5. Allard B., Longhi M.S., Robson S.C., Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 276, no. 1, pp. 121-144.
6. Bono M.R., Fernandez D., Flores-Santibanez F., Roseblatt M., Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.*, 2015, Vol. 589, no. 22, pp. 3454-3460.
7. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua M.L., Rossini P.M., Battistini L., Röttschke O., Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 4, pp. 1225-1232.

8. Botta Gordon-Smith S., Ursu S., Eaton S., Moncrieffe H., Wedderburn L.R. Correlation of low CD73 expression on synovial lymphocytes with reduced adenosine generation and higher disease severity in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2015, Vol. 67, no. 2, pp. 545-554.
9. Chiricozzi A., Romanelli P., Volpe E., Borsellino G., Romanelli M. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 179. doi: 10.3390/ijms19010179.
10. Dong K., Gao Z.W., Zhang H.Z. The role of adenosinergic pathway in human autoimmune diseases. *Immunol. Res.*, 2016, Vol. 64, no. 5, pp. 1133-1141.
11. Fang F., Yu M., Cavanagh M.M., Hutter Saunders J., Qi Q., Ye Z., Le Saux S., Sultan W., Turgano E., Dekker C.L., Tian L., Weyand C.M., Goronzy J.J. Expression of CD39 on Activated T Cells Impairs their Survival in Older Individuals. *Cell Rep.*, 2016, Vol. 14, no. 5, pp. 1218-1231.
12. Ferrari D., Casciano F., Secchiero P., Reali E. Purinergic Signaling and Inflammasome Activation in Psoriasis Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 17, 9449. doi: 10.3390/ijms22179449.
13. Georgescu S.R., Tampa M., Caruntu C., Sarbu M.I., Mitran C.I., Mitran M.I., Matei C., Constantin C., Neagu M. Advances in understanding the immunological pathways in psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 3, 739. doi: 10.3390/ijms20030739.
14. Gibson D.J., Elliott L., McDermott E., Tosetto M., Keegan D., Byrne K., Martin S.T., Rispens T., Cullen G., Mulcahy H.E., Cheifetz A.S., Moss A.C., Robson S.C., Doherty G.A., Ryan E.J. Heightened Expression of CD39 by Regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2015, Vol. 21, no. 12, pp. 2806-2814.
15. Giuliani A.L., Sarti A.C., Di Virgilio F. Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation. *Front. Pharmacol.*, 2021, Vol. 11, 619458. doi: 10.3389/fphar.2020.619458.
16. Griffiths C.E.M., Armstrong A.W., Gudjonsson J.E., Barker J.N.W.N. Psoriasis. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10281, pp. 1301-1315.
17. Guzman-Flores J.M., Cortez-Espinosa N., Cortés-García J.D., Vargas-Morales J.M., Cataño-Cañizalez Y.G., Rodríguez-Rivera J.G., Portales-Perez D.P. Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology*, 2015, Vol. 220, no. 8, pp. 976-984.
18. Han L., Sugiyama H., Zhang Q., Yan K., Fang X., McCormick T.S., Cooper K.D., Huang Q. Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ regulatory T-cells in psoriasis. *Australas. J. Dermatol.*, 2018, Vol. 59, no. 1, pp. 31-38.
19. Junger W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 3, pp. 201-12.
20. Liberal R., Grant C.R., Ma Y., Csizmadia E., Jiang Z.G., Heneghan M.A., Yee E.U., Mieli-Vergani G., Vergani D., Robson S.C., Longhi M.S. CD39 mediated regulation of Th17-cell effector function is impaired in juvenile autoimmune liver disease. *J. Autoimmun.*, 2016, Vol. 72, pp. 102-112.
21. Longhi M.S., Vuerich M., Kalbasi A., Kenison J.E., Yeste A., Csizmadia E., Vaughn B., Feldbrugge L., Mitsuhashi S., Wegiel B., Otterbein L., Moss A., Quintana F.J., Robson S.C. Bilirubin suppresses Th17 immunity in colitis by upregulating CD39. *J.C.I. Insight.*, 2017, Vol. 2, no. 9, e92791. doi: 10.1172/jci.insight.92791.
22. Longhi M.S., Moss A., Bai A., Wu Y., Huang H., Cheifetz A., Quintana F.J., Robson S.C. Characterization of human CD39⁺ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, e87956. doi: 10.1371/journal.pone.0087956.
23. Ogawa E., Sato Y., Minagawa A., Okuyama R. Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. *J. Dermatol.*, 2018, Vol. 45, no. 3, pp. 264-272.
24. Raharja A., Mahil S.K., Barker J.N. Psoriasis: a brief overview. *Clin. Med. (Lond)*, 2021, Vol. 21, no. 3, pp. 170-173.
25. Regateiro F.S., Cobbald S.P., Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin. Exp. Immunol.*, 2013, Vol. 171, no. 1, pp. 1-7.
26. Relvas M., Torres T. Pediatric Psoriasis. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2017, Vol. 18, no. 6, pp. 797-811.
27. Robson S.C., Sévigny J., Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.*, 2006, Vol. 2, no. 2, pp. 409-430.
28. Savio L.E.B., Robson S.C., Longhi M.S. Ectonucleotidase modulation of lymphocyte function in gut and liver. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2021, Vol. 8, 621760. doi: 10.3389/fcell.2020.621760.
29. Schuler P.J., Saze Z., Hong C.S., Muller L., Gillespie D.G., Cheng D., Harasymczuk M., Mandapathil M., Lang S., Jackson E.K., Whiteside T.L. Human CD4⁺CD39⁺ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73⁺ exosomes or CD73⁺ cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, Vol. 177, no. 2, pp. 531-543.
30. Shi Y., Chen Z., Zhao Z., Yu Y., Fan H., Xu X., Bu X., Gu J. IL-21 Induces an imbalance of Th17/Treg cells in moderate-to-severe plaque psoriasis patients. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1865. doi: 10.3389/fimmu.2019.01865
31. Takenaka M.C., Robson S., Quintana F.J. Regulation of the T cell response by CD39. *Trends Immunol.*, 2016, Vol. 37, no. 7, pp. 427-439.
32. Tseng J.C., Chang Y.C., Huang C.M., Hsu L.C., Chuang T.H. Therapeutic development based on the immunopathogenic mechanisms of psoriasis. *Pharmaceutics*, 2021, Vol. 13, no. 7, 1064. doi: 10.3390/pharmaceutics13071064.

33. Vuerich M., Robson S.C., Longhi M.S. Ectonucleotidases in intestinal and hepatic inflammation. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, no. 507. doi: 10.3389/fimmu.2019.00507.
34. Vuerich M., Harshe R.P., Robson S.C., Longhi M.S. Dysregulation of adenosinergic signaling in systemic and organ-specific autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 528, pp. 1-15.
35. Yamanaka K., Yamamoto O., Honda T. Pathophysiology of psoriasis: A review. *J. Dermatol.*, 2021, Vol. 48, no. 6, pp. 722-731.
36. Zeng J., Ning Z., Wang Y., Xiong H. Implications of CD39 in immune-related diseases. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 89, 107055. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107055.
37. Zhang H.Y., Yan K.X., Huang Q., Ma Y., Fang X., Han L. Target tissue ectoenzyme CD39/CD73-expressing Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with psoriasis. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2015, Vol. 40, no. 2, pp. 182-191.
38. Zimmermann H. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. *Purinergic Signal.*, 2021, Vol. 17, no. 1, pp. 117-125.

Авторы:

Купцова Д.Г. — младший научный сотрудник, врач-клинической лабораторной диагностики лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Радыгина Т.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Петричук С.В. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Мурашкин Н.Н. — д.м.н., профессор, руководитель НИИ детской дерматологии, заведующий отделением дерматологии с группой лазерной хирургии, заведующий лабораторией патологии кожи у детей отдела научных исследований в педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Хотко А.А. — к.м.н., доцент кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

Иванов Р.А. — врач-дерматовенеролог отделения дерматологии с группой лазерной хирургии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Kuptsova D.G., Junior Research Associate, Clinical Laboratory Physician, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Radygina T.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Petrichuk S.V., PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Murashkin N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Research Institute of Pediatric Dermatology, Dermatology Department with Laser Surgery Unit, Pediatric Laboratory of Skin Pathology, National Medical Research Center for Children's Health; Professor, Department of Dermatology and Cosmetology, Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Khotko A.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Dermatology and Cosmetology, Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

Ivanov R.A., Dermato-venerologist, Dermatology Department with Laser Surgery Unit, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation