

**ЧЕРНЫШ ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА**

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И  
ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
БОЛЕЗНИ ХЕЙЛИ-ХЕЙЛИ**

**14.01.10 - кожные и венерические болезни**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата медицинских наук**

**Москва – 2016**

Работа выполнена в отделении дерматовенерологии и дерматоонкологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области "Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского" и отделе клинической патологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук

**Махнева Наталия Викторовна**

**Научный консультант:**

Доктор медицинских наук, профессор

**Белецкая Людмила Вячеславовна**

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ

**Белоусова Ирена Эдуардовна**

Доктор медицинских наук, профессор кафедры кожных и венерических болезней ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

**Теплюк Наталия Павловна**

**Ведущая организация:** ГБОУ ВПО "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_» сентября 2016 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.115.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении "Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации. 107076, г. Москва, ул. Короленко, дом 3, стр. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук

**Карамова Арфеня Эдуардовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Болезнь Хейли-Хейли (семейная доброкачественная хроническая пузырчатка Гужеро-Хейли-Хейли) – редкий аутосомно-доминантный наследственный везикуло-буллезный дерматоз, характеризующийся супрабазальным нарушением связи между клетками эпидермиса [Burge S.M., 1992; Megahed M., 2004]. Последние научные исследования позволили идентифицировать мутации гена АТР2С1, кодирующего секреторные проводящие пути  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  АТРаза, которые могут быть причиной врожденного дефекта экспрессии молекул адгезии при болезни Хейли-Хейли [Hu Z. et al., 2000]. Однако отсутствие корреляции между типом мутации дефектного гена и семейного анамнеза с разнообразием клинической картины болезни Хейли-Хейли позволяет предположить существование дополнительных патогенетических факторов, включая иммунный ответ [Ikeda S. et al., 2001; Dobson-Stone C. et al., 2002]. Продемонстрировано, что в патогенезе болезни Хейли-Хейли могут участвовать растворимые иммунные комплексы (иммуноглобулины класса G), выявляемые в межклеточной связывающей субстанции многослойного плоского эпителия, т. е. в локализации характерной для аутоиммунной пузырчатки [Белецкая Л.В., Махнева Н.В., 1996; Makhneva N.V., Beletskaya L.V., 2007]. Однако природа выявленных комплексов пока не известна [Махнева Н.В., Белецкая Л.В., 2006].

Диагностика болезни Хейли-Хейли ввиду редкости заболевания, возможности развития патологического процесса в местах нетипичной локализации (на коже лица, внутренней поверхности бедер, слизистых оболочках полости рта, пищевода, гортани, гениталий и конъюнктивы), отсутствия семейного анамнеза, имитации на ранних этапах клинических проявлений других кожных заболеваний (аллергический дерматит, экзема, вульгарная пузырчатка, бактериальные, вирусные, грибковые инфекции кожи) затруднена. При патоморфологическом исследовании биоптатов кожи с очага поражения не всегда выявляется типичная картина, характерная для болезни Хейли-

Хейли, иногда гистологическая картина напоминает таковую при других дерматозах [Buteicǎ et al., 2007]. По данным литературы исследование клинически интактных участков кожи с помощью прямого метода иммунофлюоресценции дает в большинстве случаев отрицательные результаты, и лишь модифицированный прямой метод иммунофлюоресценции [Махнева Н.В., Белецкая Л.В., 2008] позволяет выявить фиксацию IgG в межклеточной связывающей субстанции. При исследовании сывороток крови пациентов были выявлены циркулирующие IgG к антигенам межклеточной связывающей субстанции волосяных фолликулов и ряда других тканей кожи (титр 1:20 - 1:40) [Махнева Н.В., Белецкая Л.В., 2006], что позволяет предположить существование слабоаффинных антител, для выявления которых требуются дополнительные условия при постановке непрямого метода иммунофлюоресценции.

Таким образом, изучение роли антител в патогенезе болезни Хейли-Хейли позволит не только прояснить сложные процессы развития и течения данного заболевания, но и усовершенствовать диагностику, получив дополнительные диагностические критерии с помощью прямого и непрямого методов иммунофлюоресценции.

#### **ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Целью исследования является усовершенствование диагностики болезни Хейли-Хейли на основании изучения клинических особенностей развития и течения данного заболевания, выявления циркулирующих и фиксированных антител к антигенам тканевых структур кожи с помощью прямого и непрямого методов иммунофлюоресценции и определения экспрессии ряда антигенов десмосомального аппарата и цитоскелета многослойного плоского эпителия.

#### **ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

1. Изучить клинические особенности развития и течения болезни Хейли-Хейли.

2. Определить роль циркулирующих и фиксированных антител в патогенезе болезни Хейли-Хейли с помощью непрямого и прямого методов иммунофлюоресценции.
3. Изучить экспрессию ряда антигенов десмосомального аппарата (кадгериновый комплекс, плакоглобин, десмосомальный протеин) и цитоскелета (цитокератина 5) многослойного плоского эпителия больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли, с помощью непрямого метода иммунофлюоресценции.
4. Установить дополнительные диагностические критерии в дифференциальной диагностике болезни Хейли-Хейли на основании выявленных антител и изменения экспрессии антигенов десмосомального аппарата и цитоскелета эпидермиса.

#### **ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ**

1. Среди пациентов, госпитализированных в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, болезнью Хейли-Хейли чаще страдают женщины (соотношение женщин к мужчинам 1,4:1). Манифестация у женщин начинается по большей части с поражения кожи в области туловища (57,1%), а у мужчин – естественных складок (60%). На момент госпитализации патологический процесс преимущественно (66,7%) носит распространенный характер с поражением нескольких анатомических областей.
2. Продемонстрирована роль циркулирующих (выявлены в 81,3% случаев,  $p < 0,0005$ ) и фиксированных (выявлены в 83,3% случаев,  $p < 0,0005$ ) антител класса G, и ранних компонентов комплемента (C3 компонент комплемента, выявлен в 50% случаев) в патогенезе болезни Хейли-Хейли. При этом антигенами-мишенями являются компоненты не только системы десмосомального аппарата, но и миокарда. Наличие широкого спектра антител к различным антигенам-мишеням объясняет разнообразие клинических проявлений и возможность возникновения экстракутанных поражений.
3. Выявленные антитела служат не только дополнительными диагностическими критериями при проведении дифференциальной диагностики слож-

но диагностируемых случаев болезни Хейли-Хейли, но и предикторами данного буллезного дерматоза у клинически здоровых родственников больных при наличии семейного анамнеза.

4. Изучена молекулярно-биологическая картина изменения экспрессии антигенов десмосомального аппарата (кадгериновый комплекс, плакоглобин, десмосомальный протеин) и цитоскелета (цитокератина 5) многослойного плоского эпителия больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли, что также служит дополнительным дифференциально-диагностическим признаком заболевания.

#### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА**

Диссертантом впервые установлены дополнительные диагностические критерии для дифференциальной диагностики болезни Хейли-Хейли: обнаружение циркулирующих и фиксированных антител класса G к антигенам системы десмосомального аппарата и к ряду антигенов многих структур органов и систем, а также выявление нарушений экспрессии ряда антигенов десмосомального аппарата и цитоскелета многослойного плоского эпителия больных.

Доказана роль циркулирующих и фиксированных антител в патогенезе болезни Хейли-Хейли, что позволяет говорить об аутоиммунном характере данного заболевания.

Диссертантом модифицирована методика проведения исследования непрямой иммунофлюоресценции с помощью подбора дополнительных условий (предварительная обработка криостатных срезов кожи лабораторного животного 100% охлажденным ацетоном с температурой 4,0-6,0°C в течение 3-5 минут; инкубация срезов с нанесенной на них типированной сывороткой больного при температуре 37,2°C во влажной камере в течение 45 минут) с целью выявления слабоаффинных циркулирующих антител к антигенам межклеточной связывающей субстанции эпидермиса, что позволяет обеспечить иммунофлюоресцентную диагностику болезни Хейли-Хейли.

## **ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ**

Проведение методов исследования, таких как прямой и непрямой методы иммунофлюоресценции (в том числе его модифицированный вариант), позволяет усовершенствовать диагностику болезни Хейли-Хейли и провести дифференциальную диагностику с другими кожными заболеваниями.

Выявление у пациента циркулирующих иммуноглобулинов G к антигенам миокарда и его компонентов в высоких титрах (от 1:80 до 1:1280) является обоснованием для проведения обследования сердечно-сосудистой системы с целью исключения возможной патологии.

Цркулирующие и фиксированные IgG к антигенам десмосомального аппарата многослойного плоского эпителия при отсутствии клинических проявлений болезни и наличии семейного отягощенного анамнеза по отношению к ней служат предикторами данного буллезного дерматоза.

Разработан «Способ подготовки пробы для проведения иммунофлюоресцентного исследования при диагностике болезни Хейли-Хейли» (заявка на патент № 2015144570/15(068612) от 16.10.2015) путем модификации методики проведения исследования непрямой иммунофлюоресценции.

## **ВНЕДРЕНИЕ РАБОТЫ**

Результаты работы внедрены в практику отделения дерматовенерологии и дерматоонкологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии ФУВ ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, кафедры кожных и венерических болезней ФППОВ ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, ГБУЗ МО МОККВД и ГАУЗ МО «Королёвский кожно-венерологический диспансер».

## **АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ**

Материалы диссертации доложены на Итоговой научно-практической конференции дерматовенерологов ЦФО РФ и МО «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии» (Москва, 2014 г.), Научно-практической конференции "Актуальные вопросы дерматовенероло-

гии, дерматоонкологии и косметологии" (Москва, 2015 г.), XV Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2015 г.), XXXIII Научно-практической конференции с международным участием, посвященной 170-летию со дня рождения А.И. Пospelова "Рахмановские чтения: от дерматологии А.И. Пospelова до наших дней – 170 лет" (Москва, 2016 г.), X Всемирном конгрессе по астме, хронической обструктивной болезни легких и иммунопатологии и XXII Всемирном конгрессе по клинической патологии и реабилитации в медицине (Дубай, 2016 г.), XXIII Российском Национальном Конгрессе «ЧЕЛОВЕК И ЛЕКАРСТВО» (Москва, 2016 г.), Межрегиональной научно-практической конференции дерматовенерологов и косметологов "Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии" (Москва, 2016 г.), XVI Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2016 г.).

#### **ПУБЛИКАЦИИ**

По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 7 – в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки Российской Федерации.

#### **СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ**

Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 3 таблицами и 120 рисунками, заключающими в себе 30 фотографий и 74 микрофотографии. Библиографический указатель включает в себя 36 отечественных и 221 иностранных источников.

#### **ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА**

Автором проведен анализ научной литературы по изучаемой проблематике отечественных и зарубежных авторов, разработан дизайн исследования, формулировка цели и задач. Проведено обследование и лечение 8 пациентов, страдающих болезнью Хейли-Хейли, госпитализированных в кожную клинику ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Автор принимал участие в постановке реакций прямой и непрямой иммунофлюоресценции,



интерпретировал результаты, анализировал полученные данные, формулировал выводы и положения.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Работа выполнена на основании ретроспективного анализа историй болезни 36 пациентов, проспективного клинического исследования и изучения биологического материала 24 больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли. Обследование пациентов проводилось в отделении дерматовенерологии и дерматоонкологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, ГБУЗ МО МОККВД, на базе ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России и МНПЦДК ДЗМ. В качестве контроля использовали биоптаты кожи и сыворотки крови 24 больных, страдающих другими дерматологическими заболеваниями, и практически здоровых лиц. Диагноз заболевания ставился на основании анамнестических сведений, клинико-морфологической картины, феномена Никольского, результатов цитологического и патоморфологического методов исследования. Цитологическое и патоморфологическое исследования проводились в лаборатории ГБУЗ МО МОККВД и в отделении патоморфологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского соответственно.

**Обработка биопсийного материала.** Взятие биопсии кожи проводилось под местной анестезией 2% раствором новокаина или лидокаина. Кусочки тканей кожи размером 0,3x0,5 см замораживали при -20°C. Срезы толщиной 5 мкм готовили в микротом-криостате (-20°C). Часть серийных срезов использовали в нефиксированном виде, а другую часть предварительно обрабатывали мягко денатурирующей 40% водной смесью этанола при комнатной температуре. Криостатные серийные срезы, фиксированные 96° этанолом, окрашивали гематоксилином и эозином для морфологического контроля.

**Выявление циркулирующих антител.** С целью выявления циркулирующих антител применяли непрямой метод иммунофлюоресценции [Белецкая Л.В., Данилова Т.А., 1977; Beutner E.H., Jordon R.E., 1964] в модифици-

рованном его варианте с использованием люминесцирующих сывороток против IgG. Срезы готовили из тканей кожи человека и ряда видов лабораторных животных (теленка, мыши, крысы, кролика). Подбор дополнительных условий заключался в предварительной обработке криостатных срезов кожи лабораторного животного 100% охлажденным ацетоном с температурой 4,0-6,0°C в течение 3-5 минут; инкубации срезов с нанесенной на них типированной сывороткой больного при температуре 37,2°C во влажной камере в течение 45 минут. Одновременно ставили положительный и отрицательный контроли. Для отрицательного контроля использовали нормальную сыворотку (человека или животного) в тех же разведениях и инкубировали на срезе столько же времени, как и испытываемую сыворотку, содержащую антитела. Для положительного контроля использовали сыворотку, заведомо известно содержащую антитела против изучаемого антигена. С целью выявления циркулирующих антител к антигенам миокарда и его компонентов проводили непрямой метод иммунофлюоресценции [Белецкая Л.В., Данилова Т.А., 1977]. Учитывали самое большое разведение сыворотки, которое давало четкую положительную реакцию.

**Выявление фиксированных антител.** Применяли классический [Белецкая Л.В., Данилова Т.А., 1977; Beutner E., Chorzelski T.P., 1973] и модифицированный [Белецкая Л.В., Махнева Н.В., 1995] прямой метод иммунофлюоресценции с использованием моноспецифических люминесцирующих сывороток против основных классов иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM), люминесцирующих сывороток против С3 компонента комплемента и фибриноген/фибрина. Для контроля исследовали срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, в световом микроскопе.

**Выявление экспрессии ряда антигенов десмосомального аппарата (кадгериновый комплекс, плакоглобин, десмосомальный протеин) и белка цитоскелета (цитокератин 5) многослойного плоского эпителия.** Использовали моноклональные антитела (МкАТ) к кадгериновому комплексу, десмосомальному протеину, плакоглобину и МкАТ серии А6/1 к цитоке-

ратину 5. В непрямом методе иммунофлюоресценции применяли люминесцирующие сыворотки против иммуноглобулинов мыши. Криостатные срезы толщиной 5 мкм готовили в микротом-криостате (-20°C). Для определения экспрессии антигенов десмосомального аппарата их использовали в фиксированном виде в 100% холодном (4°C) ацетоне в течение 10 мин, для определения экспрессии цитокератина 5 - в нефиксированном виде. Препараты в течение 18 ч находились во влажной камере при 4°C, затем их промывали 3-5 мин в PBS (pH 7,0-7,4), обрабатывали люминесцирующей сывороткой против иммуноглобулинов мыши в течение 30 мин при температуре 37,0-37,2°C (для определения экспрессии антигенов десмосомального аппарата) и комнатной температуре (для определения экспрессии цитокератина 5) во влажной камере, вновь промывали PBS (pH 7,0-7,4) 3-5 мин и заключали под покровное стекло в 60% нейтральный глицерин. Исследовали препараты с помощью люминесцентного микроскопа LEIKA DM4000B производства Leica Microsystems Nussloch GmbH, ФРГ.

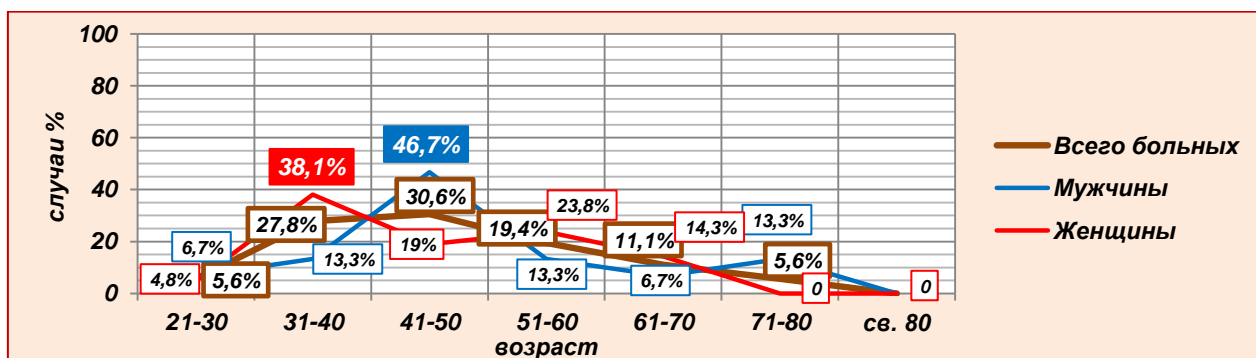
**Статистическая обработка.** При создании первичной базы данных использовался редактор электронных таблиц MS Excel 2010. Статистическая обработка данных выполнена с использованием пакетов прикладных программ Statistica 10. Сравнение бинарных и номинальных показателей между двумя группами проводилось с использованием критерия Хи-квадрат. Для сравнения связанных (парных) выборок применялся непараметрический критерий Вилкоксона. При описании данных, распределение которых отличалось от нормального закона, рассчитывались медиана и квартили. При нормальном распределении данные представлены как среднее значение и стандартное отклонение ( $M \pm \sigma$ ). Уровень статистической значимости был зафиксирован при значении 0,05.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### ***Клиническая характеристика больных***

В структуре пациентов, госпитализированных в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского за период с 1993 по 2016 гг., процент больных,

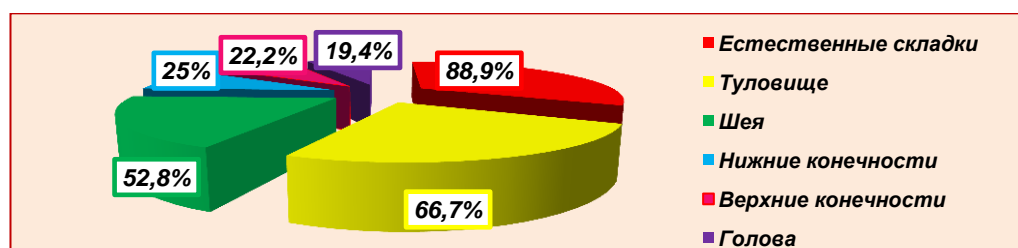
страдающих болезнью Хейли-Хейли, составил 0,29% от всех госпитализированных больных разными кожными болезнями. При этом 66,7% приходилось на лица женского пола, 33,3% – на лица мужского пола (соотношение женщин к мужчинам 1,4:1). По нашим данным возрастной диапазон пика заболеваемости пациентов приходился на возраст от 41 года до 50 лет и совпадал с пиком заболеваемости у мужчин (46,7% от общего числа больных мужского пола). Пик заболеваемости у женщин приходился на возраст от 31 года до 40 лет (38,1% от общего числа больных женского пола) (рис. 1).



**Рисунок 1.** Распределение больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли, по полу и возрасту на момент госпитализации.

Срок постановки диагноза с момента манифестации первых признаков болезни составлял от 1 месяца до 47 лет (в среднем  $13,57 \pm 12,3$  года). В большинстве (38,9%) случаев диагноз был выставлен в течение первых 5 лет.

Клинические проявления болезни Хейли-Хейли у обследованных пациентов были связаны с поражением как кожного покрова, так и видимых слизистых оболочек (2,8%). Патологический процесс преимущественно (66,7%) носил распространенный характер с вовлечением кожного покрова одновременно нескольких анатомических областей тела (рис. 2).



**Рисунок 2.** Локализация патологического кожного процесса у больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли, на момент госпитализации.

Наиболее излюбленной локализацией патологического процесса на момент госпитализации являлась кожа в области естественных складок (88,9%,  $p < 0,05$ ), туловища (66,7%) и заднебоковой поверхности шеи (52,8%).

При этом у женщин кожа в области естественных складок была вовлечена в 100% случаев ( $p=0,0121$ ), кожа в области шеи вовлекалась чаще у мужчин (60%), область туловища поражалась в равной степени (по 66,7% соответственно). При вовлечении в патологический процесс кожных покровов в области естественных складок (88,9%) у женщин преобладало поражение в области подмышечных впадин (81%,  $p=0,0117$ ), а у мужчин – паховых складок (72,7%).

Пик манифестации болезни приходился на возраст 31-40 лет, что совпадает с мнением многих авторов [Burge S.M., 1992; Gu H. et al., 1999]. У женщин заболевание начинается с поражения области туловища (57,1%) и естественных складок (47,6%), а у мужчин – естественных складок (60%) и шеи (53,8%,  $p=0,0314$ ). Наиболее характерными первичными морфологическими элементами при манифестации являются пузырьки (77,8%,  $p<0,05$ ) и эритематозные пятна (30,6%), сопровождающиеся зудом в 27,8% случаев. При первичном обращении к врачу ни в одном случае болезнь Хейли-Хейли не была заподозрена. Патологический процесс был расценен как экзема (19,4%), герпетиформный дерматит Дюринга (13,9%), пиодермия (11,1%), аутоиммунная пузырчатка, болезнь Дарье, нейродермит, дерматит (по 5,6%); буллезная форма красного плоского лишая, субкорнеальный пустулез, микоз гладкой кожи, опоясывающий лишай, фолликулярный кератоз Кирле (по 2,8%).

В процессе развития хронического процесса клиническая картина приобретает более выраженный полиморфизм с проявлением патогномоничного признака болезни Хейли-Хейли: инфильтрированные бляшки, на поверхности которых - глубокие извилистые трещины («извилины мозга»). Присутствие данного клинического признака позволяет диагностировать у больного болезнь Хейли-Хейли, но, как выше было указано, спустя годы (от 1-5 лет и более). Среди субъективных ощущений зуд и болезненность в местах высыпаний отмечены в 91,7% и 48,5%, соответственно. Феномен Никольского (краевой) выявлен в 11,1% случаев, феномен Кебнера - в 27,8% случаев. При

цитологическом исследовании мазков-отпечатков со дна эрозий акантолитические клетки были обнаружены в 55,6% случаев. В 69% случаев выявлена типичная патоморфологическая картина болезни Хейли-Хейли, в других случаях патоморфологическая картина напоминала таковую при вульгарной пузырчатке, и заключительный диагноз выставлялся с учетом анамнестических данных и клинической картины с последующим назначением терапии. В 55,6% случаев проводилось лечение системными глюкокортикостероидами (преднизолон). В остальных случаях лечение проводилось антигистаминными, десенсибилизирующими, антибактериальными и топическими препаратами.

Семейный анамнез среди 36-ти обследуемых пациентов прослеживался в 61,1% случаев ( $p < 0,05$ ). Среди родственников идентичная клиническая картина наблюдалась у матери или отца (по 36,4% случаев), у братьев и/или сестер (27,3% и 31,8% случаев соответственно), у дяди и/или тети (13,6% и 9,1% случаев соответственно). Подобные высыпания наблюдались у двоюродных родственников первого (4,5%) и третьего (13,6%) поколений, у старших (27,3%) и младших (13,6%) представителей семей по линии болеющего родителя. При этом данные высыпания рассматривались как аллергические дерматозы, гнойничковые или грибковые заболевания кожи, по поводу которых родственники пациентов получали соответствующую терапию, порой десятилетиями, не приносящую положительного эффекта.

Возникновение и обострение болезни Хейли-Хейли, по нашим данным, может быть спровоцировано как одним триггерным фактором, так и комбинацией (38,9%) двух или более факторов (рис. 3).

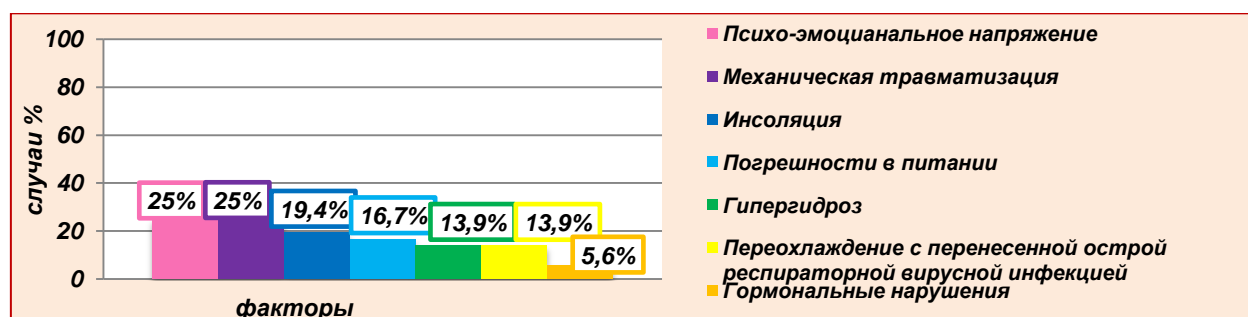


Рисунок 3. Факторы, способствующие началу и обострению болезни Хейли-Хейли.

При этом факторы, провоцирующие патологический процесс, на протяжении всего периода болезни у одного и того же пациента могут быть различными: психо-эмоциональное напряжение (25%), механическая травматизация (25%), инсоляция (19,4%), погрешности в питании (включая злоупотребление алкоголем) (16,7%) и другие. Кроме того, обращает на себя внимание наличие у ряда больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли (38,9%), отягощенного аллергоанамнеза, порой с тяжелыми клиническими проявлениями (отек Квинке, токсидермия, хроническая крапивница). Среди аллергенов пациенты указывали на средства парфюмерно-косметической продукции и бытовой химии, латекс; пыльцу растений и укусы насекомых; лекарственные препараты (антибиотики, сульфаниламиды, анальгетики, витамины группы В, спазмолитики, антидепрессанты).

Обследование больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли, продемонстрировало, что в большинстве (52,8%) случаев заболевание протекает на фоне патологии со стороны внутренних органов (рис. 4).

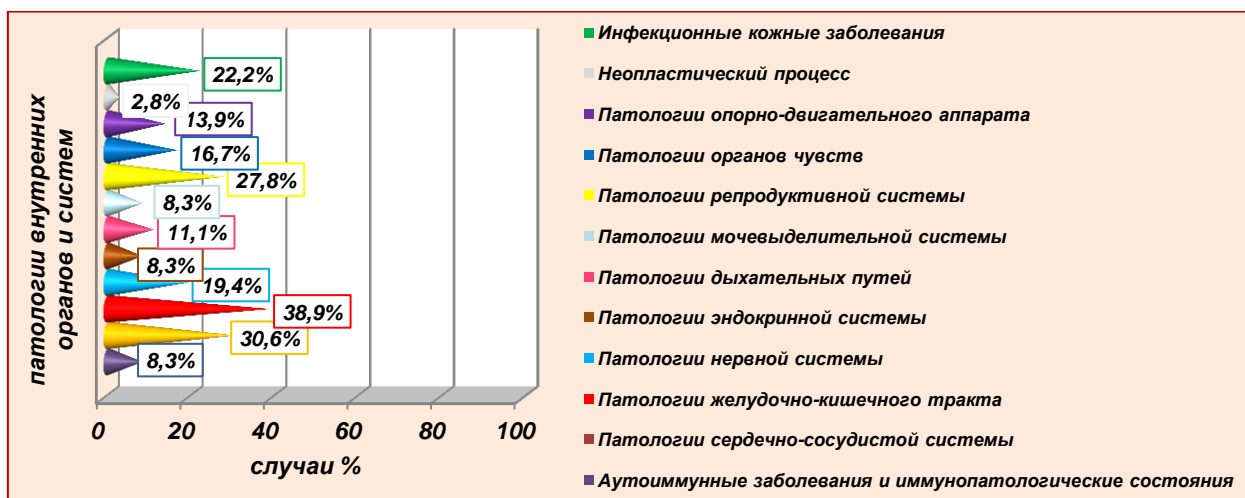


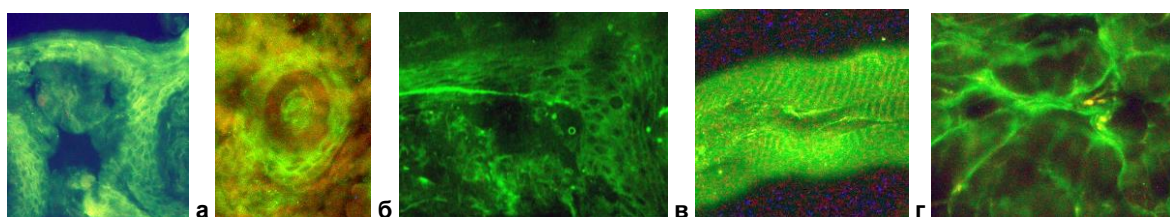
Рисунок 4. Патологии со стороны внутренних органов и систем, сопутствующие болезни Хейли-Хейли на момент госпитализации.

При этом в 36,8% случаев отмечена сочетанная патология со стороны желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистой системы. Среди заболеваний сердечно-сосудистой системы наиболее часто диагностируют гипертоническую болезнь (81,8%,  $p < 0,05$ ); со стороны желудочно-кишечного тракта – гастрит (28,6%), панкреатит (28,6%) и гепатиты, включая смешанного генеза (21,4%). В 8,3% случаев выявлена ассоциация этого наследственного

буллезного дерматоза с другими аутоиммунными заболеваниями и иммунопатологическими состояниями, такими как аутоиммунный тиреоидит, сахарный диабет I типа и бронхиальная астма. У одной (2,8%) пациентки клиническая картина болезни Хейли-Хейли развилась на фоне неопластического процесса (аденома-миелолипома с последующей эндоскопической ретроперитонеальной адреналэктомией с опухолью). Как ранее отмечалось, высказывается предположение о возможной роли мутации гена *ATP2C1*, кодирующего  $Ca^{2+}$ -транспортную АТФазу (*SPCA1*), синтезируемую клетками ткани всех органов, в формировании экстракутанного патологического фенотипа, которое наблюдается в тяжелых случаях болезни Хейли-Хейли [Махнева Н.В. с соавт., 2004; Amagai M. et al., 2001].

***Результаты изучения циркулирующих антител к антигенам различных структур эпидермиса, дермы и миокарда при болезни Хейли-Хейли.***

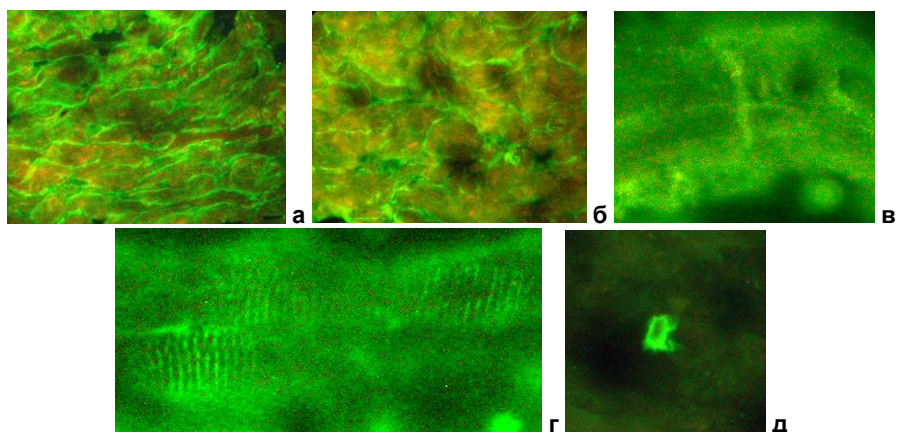
При изучении роли IgG в развитии болезни Хейли-Хейли с помощью непрямого (классического и модифицированного) метода иммунофлюоресценции в 81,3% ( $p < 0,0005$ ) случаев выявлены циркулирующие IgG к антигенам десмосомального аппарата многослойного плоского эпителия, а также к ряду тканевых компонентов эпидермиса и дермы (ядерные компоненты кератиноцитов, базальная мембрана эпидермиса и волосяных фолликулов, компоненты ретикулярного слоя дермы, изотропные диски гладкой мускулатуры и эндотелий капилляров кожи) (рис. 5).



**Рисунок 5.** Определение циркулирующих IgG в сыворотке крови больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли. Непрямой метод иммунофлюоресценции. х 400. **а-д** – обработка сывороткой больной, страдающей болезнью Хейли-Хейли: **а, б** – срез кожи мыши. Реакция в межклеточной субстанции всех слоев эпидермиса (**а**) и волосяных фолликулов (**б**); **в, г** – срез кожи кролика: Реакция в межклеточной субстанции всех слоев эпидермиса, в зоне базальной мембраны эпидермиса, ретикулярном слое (**в**) и изотропных дисках гладкой мускулатуры (**г**) дермы; **д** – срез кожи телянка. Реакция в эндотелии капилляров (**д**) дермы.

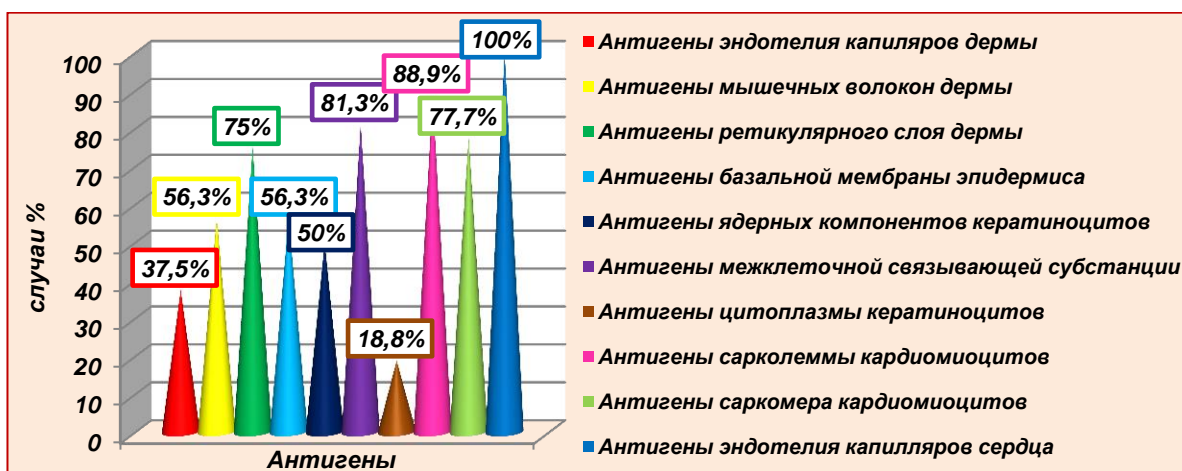
При этом титр антител составлял от 1:8 до 1:2560. Кроме основных патогенетических антител были обнаружены дополнительные антитела к антигенам некоторых структур сердца (сарколемма и саркомеры кардиомиоцитов, эндотелий капилляров миокарда) (рис. 6).





**Рисунок 6.** Криостатные срезы миокарда сердца теленка, обработанные сывороткой больного, страдающего болезнью Хейли-Хейли. Непрямой метод иммунофлуоресценции. х 400. а, б – реакция в зоне сарколеммы кардиомиоцитов в продольном (а) и поперечном (б) срезах; в, г – реакция в зоне саркомера кардиомиоцитов (водная иммерсия): в зонах вставочных пластинок (в) и изотропных дисков (г) кардиомиоцитов; д – реакция в зоне эндотелия капилляров (водная иммерсия) миокарда.

Титр выявленных антител составлял выше уровня естественных антител от 1:80 до 1:1280. На рисунке 7 представлена картина процентного соотношения выявленных антител к антигенам различных структур тканей кожи и миокарда у больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли.

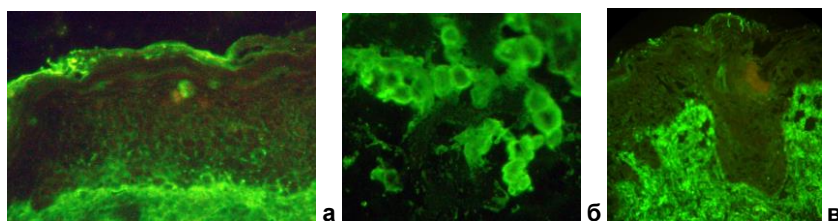


**Рисунок 7.** Циркулирующие IgG к антигенам различных структур тканей кожи и миокарда у больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли.

Такой широкий спектр антител ко многим структурам органов и тканей объясняет распространенность кожных высыпаний и возможное развитие экстракутантных поражений у больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли.

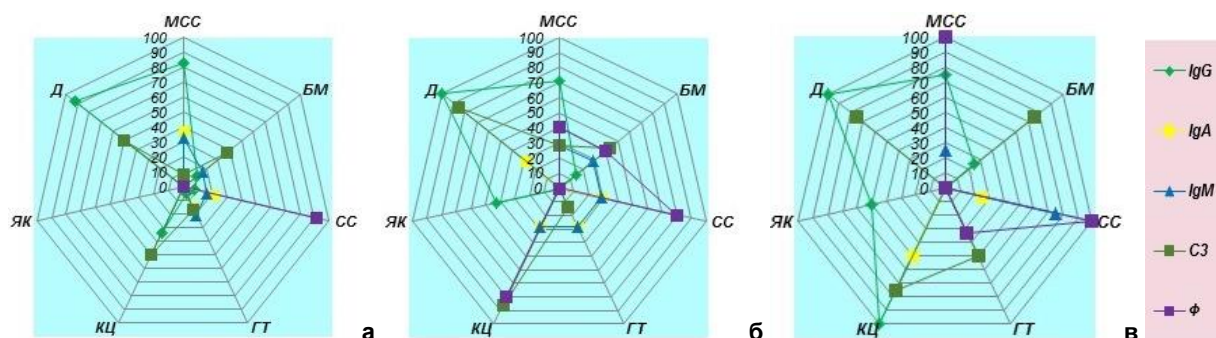
### ***Результаты изучения фиксированных антител при болезни Хейли-Хейли.***

При исследовании криостатных срезов различных участков кожи (пораженный, интактный и в месте бывших высыпаний) больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли, с помощью модифицированного прямого метода иммунофлуоресценции выявлена фиксация IgG в межклеточной связывающей субстанции эпидермиса в 83,3% случаев ( $p < 0,0005$ ) (рис. 8).



**Рисунок 8.** Криостатные срезы кожи больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли. Участки клинически непо-  
раженной кожи. Обработка меченой сывороткой против иммуноглобулина G человека. Прямой метод имму-  
нофлюоресценции. x 400. **а** – фиксация IgG в межклеточной субстанции эпидермиса и на поверхности кожи,  
выявляемая прямым и модифицированным методом иммунофлюоресценции; **б** – фиксация IgG в цитоплазме  
акантолитических клеток; **в** – фиксация IgG участками в зоне базальной мембраны эпидермиса.

При этом независимо от места проведения пункционной биопсии в ис-  
следуемых материалах отмечалась морфологическая картина, характерная  
для данного буллезного генодерматоза (акантолиз, внутриэпидермальные  
щели и/или пузыри). Наряду с основным классом иммуноглобулина G пря-  
мым методом иммунофлюоресценции в различных структурах эпидермиса и  
дермы у больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли, выявлены имму-  
ноглобулины других классов (А, М), ранний компонент комплемента (С3  
компонент комплемента) и фибриновый экссудат (рис. 9).



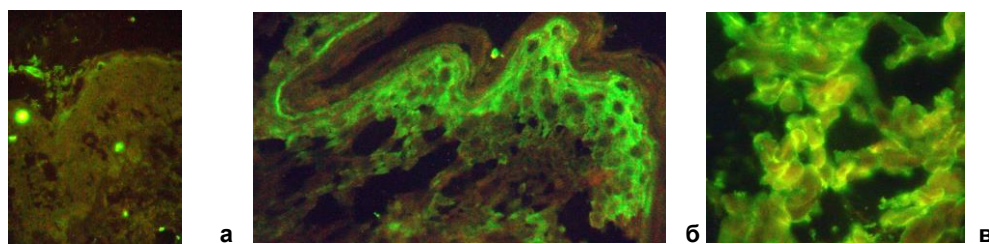
**Рисунок 9.** Процентное соотношение распределения фиксированных антител в различных тканевых структу-  
рах кожи больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли: **а** – в intactных участках кожи, **б** – в пораженных  
участках кожи, **в** – в ранее пораженных участках кожи. **Примечание:** МСС – межклеточная связывающая суб-  
станция эпидермиса; БМ – базальная мембрана эпидермиса; СС – стенки сосудов дермы; ГТ – гиалиновые  
тельца; КЦ – кератиноциты; ЯК – ядерные компоненты кератиноцитов; Д – дерма; IgA, IgM, IgG - основные  
классы иммуноглобулинов; С3 – ранний компонент комплемента, Ф - фибрин/фибриноген.

Это можно объяснить действием сопутствующих антител, которые отя-  
гощают основное заболевание, и являются причиной глубоких нарушений в  
системе гомеостаза.

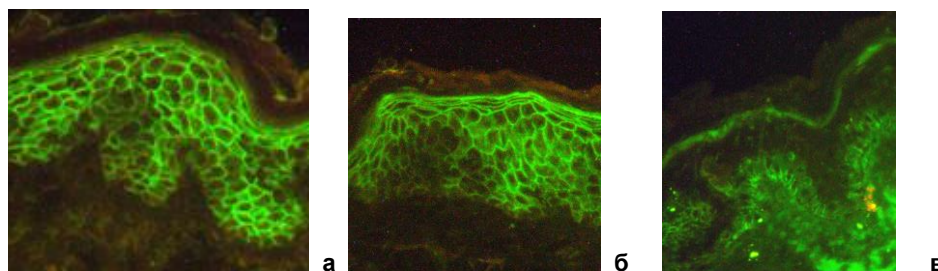
Так, в 50% случаев фиксация С3 компонента комплемента выявлена не  
только в местах локализации антител, но и вне зоны антигенов-мишеней, в  
зоне базальной мембраны эпидермиса. Это свидетельствует о сложных про-  
цессах развития данного наследственного буллезного дерматоза с активацией  
системы комплемента.

### ***Результаты изучения экспрессии антигенов десмосомального аппарата и цитоскелета многослойного плоского эпителия.***

При использовании моноклональных антител к антигенам ряда тканевых структур кожи (кадгериновый комплекс, плакоглобин, десмоплакин I, цитокератин 5) с целью изучения молекулярно-биологических сдвигов в тканях при болезни Хейли-Хейли отмечены ряд особенностей этой патологии (рис. 10, 11).



**Рисунок 10.** Экспрессия кадгеринового комплекса. Обработка моноклональными антителами к раp-cadherin. Непрямой метод иммунофлуоресценции. х 400. **а** – криостатный срез клинически интактного участка кожи больной. Формирование внутриэпидермальных надбазальных щелей на фоне отсутствия или “маскировки” экспрессии кадгеринов в межклеточных пространствах эпидермиса с появлением кадгерин+ материала на поверхности кожи; **б** - усиление экспрессии кадгеринов в супрабазальных слоях (покрышка пузыря) внутриэпидермального надбазального пузыря;



**Рисунок 11.** Экспрессия антигенов ряда тканевых структур кожи (плакоглобин, десмоплакин I, цитокератин 5). Криостатные срезы клинически интактных участков кожи больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли. Непрямой метод иммунофлуоресценции. х 400. **а** – экспрессия плакоглобина. Обработка моноклональными антителами к плакоглобину. Сохранение экспрессии плакоглобина с участками его подавления; **б** - экспрессия десмосомального протеина десмоплакина I. Обработка моноклональными антителами к десмосомальному протеину (десмоплакин I). На фоне нормальной экспрессии десмосомального протеина отмечаются участки его подавления; **в** - синтез цитокератина 5 клетками эпидермиса. Обработка моноклональными антителами к цитокератину 5. На фоне нормального синтеза цитокератина 5 отмечается местами выраженная иммунофлуоресцентная реакция на нижнем полюсе клеток базального слоя со скоплением цитокератин 5 положительного материала под роговым слоем;

При исследовании молекул адгезии (кадгериновый комплекс, плакоглобин, десмоплакин I) десмосомального аппарата эпидермиса в различных участках кожного покрова больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли, отмечено нарушение экспрессии изучаемых молекул клеточных адгезий вплоть до их исчезновения с парадоксально выраженным проявлением в местах формирования пузырей, эрозивных дефектов и не типичных для их локализации (цитоплазма, вокруг и/или внутри ядер кератиноцитов, скопление в роговом слое и на поверхности кожи). При этом наиболее глубокие моле-

кулярно-биологические изменения были отмечены с молекулами кадгеринового комплекса: полное подавление экспрессии в клинически интактных и ранее пораженных участках кожи больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли.

Подобные молекулярно-биологические явления продемонстрированы при исследовании кожи здоровых родственников больной Хейли-Хейли. Все это свидетельствует о вовлечении при данной патологии в общий иммунопатологический процесс широкого круга молекул адгезий, входящих в состав системы межклеточных соединений. Это подтверждается исследованиями и ряда других авторов [Bennani I., 2012; Ueo D., 2015]. В результате молекулярно-биологических нарушений протеинового комплекса «кадгерин-плакоглобин-десмоплакин», вероятно, происходит нарушение процессов пролиферации и дифференцировки кератиноцитов. Этому свидетельствуют изменения локализации цитокератина 5 в коже как больных, страдающих болезнью Хейли-Хейли, так и «здоровых» лиц, генетически предрасположенных к этому заболеванию. Выявлена картина от «истощения» синтеза данного цитокератина до его «возбуждения» с извращенной экспрессией кератина вокруг и/или внутри ядер кератиноцитов. Последнее явление - демонстрация серьезных метаболических нарушений в клетках эпидермиса при данном наследственном буллезном дерматозе.

Таким образом, циркулирующие и фиксированные IgG к антигенам десмосомального аппарата многослойного плоского эпителия служат не только диагностическими критериями при проведении дифференциальной диагностики сложно диагностируемых случаев болезни Хейли-Хейли, но и предикторами данного буллезного дерматоза у клинически здоровых родственников больных при наличии семейного анамнеза.

Наличие одновременно разных антигенов-мишеней приводит к разнообразию клинических проявлений болезни с возможным экстракутаным поражением ряда органов и систем. Последнее является обоснованием необходимости тщательного обследования пациентов с целью исключения латентно

протекающих воспалительных или аутоиммунных процессов в организме человека, в частности патологии сердечно-сосудистой системы.

## ВЫВОДЫ

1. В структуре пациентов, госпитализированных в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского за период с 1993 по 2016 гг., болезнью Хейли-Хейли страдают чаще женщины (соотношение женщин к мужчинам 1,4:1). Манифестация болезни у женщин начинается с поражения кожи области туловища (57,1%), а у мужчин – естественных складок (60%). Наиболее характерными первичными морфологическими элементами при манифестации являются пузырьки (77,8%) и эритематозные пятна (30,6%). В качестве триггерных факторов чаще выступают психо-эмоциональное перенапряжение и механическая травматизация (по 25%), инсоляция (19,4%) и погрешности в питании (16,7%). На момент госпитализации патологический процесс преимущественно (66,7%) носит распространенный характер с поражением нескольких анатомических областей. Отсутствие специфического клинического признака болезни Хейли-Хейли в момент ее манифестации в большинстве (38,9%) случаев удлиняет сроки поставки точного диагноза.
2. Установлено, что при болезни Хейли-Хейли патогенетически значимую роль играют циркулирующие (81,3%,  $p < 0,0005$ ) и фиксированные (83,3%,  $p < 0,0005$ ) IgG к антигенам не только системы десмосомального аппарата, но и к ряду антигенов многих структур органов и систем.
3. Выявлено нарушение экспрессии антигенов десмосомального аппарата (кадгериновый комплекс, плакоглобин, десмосомальный протеин) и цитоскелета (цитокератина 5) вплоть до их исчезновения с парадоксально выраженным проявлением в местах формирования пузырей, эрозивных дефектов и не типичных для их локализации (цитоплазма, вокруг и/или внутри ядер кератиноцитов, скопление в роговом слое и на поверхности кожи) ( $p < 0,05$ ). При этом наиболее глубокие молекулярно-биологические изменения отмечены с молекулами кадгеринового комплекса: полное подавление экспрессии в клинически интактных и ранее пораженных участках кожи больных. Подобные

явления продемонстрированы при исследовании кожи здоровых родственников больной ( $p < 0,05$ ).

4. Выявление циркулирующих и фиксированных IgG к антигенам десмосомального аппарата, циркулирующих IgG к антигенам миокарда и его компонентов, нарушения экспрессии десмосомального аппарата и цитоскелета могут быть использованы в качестве диагностических критериев при дифференциальной диагностике болезни Хейли-Хейли, а также служить предикторами данного буллезного дерматоза при отсутствии клинических проявлений болезни и наличии семейного отягощенного анамнеза по отношению к ней.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Рекомендуется проводить сбор анамнеза пациентов с учетом выявления возможных триггерных факторов и семейной предрасположенности.

В диагностике сложно дифференцируемых случаев болезни Хейли-Хейли и неоднозначной патогистологической картине рекомендуется использовать прямой и непрямой методы иммунофлюоресценции (а также их модификации) для выявления циркулирующих и фиксированных антител к антигенам десмосомального аппарата многослойного плоского эпителия кожи и миокарда, а также молекулярно-биологической картины с целью подтверждения диагноза.

Выявление у больного, страдающего болезнью Хейли-Хейли, циркулирующих иммуноглобулинов класса G к антигенам миокарда и его компонентов в высоких титрах (1:80 – 1:1280) является обоснованием для проведения обследования сердечно-сосудистой системы с целью исключения возможной патологии.

Для прогнозирования развития болезни Хейли-Хейли у клинически здоровых родственников пациентов, страдающих данным заболеванием, рекомендуется исследование их биологических материалов (сыворотки и биоптата кожи) методами меченых антител.

### **Перечень сокращений, используемых в работе**

АТФ – аденозинтрифосфат,

МкАТ – моноклональные антитела,

МСС – межклеточная связывающая субстанция,

С3 – ранний компонент комплемента,

Ig – иммуноглобулин,

PBS – фосфатно-солевой буферный раствор,

SPCA1 – секреторный проводящий путь  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  АТФase.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Махнева Н.В. Болезнь Хейли-Хейли и антитела к антигенам межклеточной связывающей субстанции эпидермиса / Махнева Н.В., Давиденко Е.Б., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Сборник тезисов VI Международного форума дерматовенерологов и косметологов, Москва, 2013 г. – С. 134.
2. Махнева Н.В. Клинические исследования и анализ результатов 19 пациентов семейной доброкачественной хронической пузырчаткой Гужеро-Хейли-Хейли Московской области / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Сборник статей Итоговой научно-практической конференции дерматовенерологов ЦФО РФ и МО «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии», Москва, 2014 г. – С. 48-51.
3. Черныш Е.С. Клинико-морфологические особенности болезни Хейли-Хейли в Московском регионе / Черныш Е.С., Махнева Н.В. - // Сборник статей молодых специалистов Департамента здравоохранения города Москвы, выпуск № 3 (под редакцией д.м.н. С.А. Федотова), 2014 г. – С. 10-14.
4. Махнева Н.В. Доброкачественная семейная хроническая пузырчатка Гужеро-Хейли-Хейли в аспекте иммунопатологии / Махнева Н.В., Давиденко Е.Б., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2014 г. – № 2. – С. 32-37.
5. Махнева Н.В. Клинико-эпидемиологическая особенность болезни Хейли-Хейли в московской области / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Доктор.Ру, Аллергология, Дерматология. – 2015 г. – № 7 (108). – С. 27-33.
6. Махнева Н.В. Вопросы эпидемиологии и манифестации болезни Хейли-Хейли / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Тезисы научных работ XV Всероссийского съезда дерматовенерологов и косметологов, Москва, 2015 г. – С. 20.
7. Махнева Н.В. Особенности манифестации и диагностики болезни Хейли-Хейли у больных Московской области / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015 г. – № 4. – С. 24-28.
8. Махнева Н.В. Болезнь Хейли-Хейли: эпидемиология и характер клинического течения / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015г. – № 5. – С. 16-21.
9. Махнева Н.В. Роль кальциевых насосов аппарата Гольджи и иммунной системы в патогенезе Семейной доброкачественной хронической пузырчатки Гужеро-Хейли-Хейли / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015 г. – № 6. – С. 18-25.
10. Махнева Н.В. Случаи клинических проявлений сегментарных форм болезни Хейли-Хейли / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Альманах клинической медицины. – 2016. – № 44 (1). – С. 58-63.
11. N.V. Makhneva. Antibodies to some antigens of heart structures in patients with Hailey-Hailey disease / N.V. Makhneva, E.S. Chernysh, V.A. Zaidenov, L.V. Beletskaya - // International Journal on Immunorehabilitation. Proceedings and abstracts X World Congress On Asthma, COPD & Immunopathology. XXII World Congress On Clinical Pathology And Rehabilitation In Medicine. Dubai, UAE. February 6-9, 2016. Edited by Professor Revaz I. Sepiashvili. – 2015. – Vol. 17. – № 2. – P. 89.
12. Махнева Н.В. Миокардиальные антитела и функциональное состояние сердечно-сосудистой системы у больных болезнью Хейли-Хейли / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Полякова Е.А., Белецкая Л.В. - // Сборник тезисов XXXIII Научно-практической конференции с международным участием, посвященной 170-летию со дня рождения А.И. Пospelова "Рахмановские чтения: от дерматологии А.И. Пospelова до наших дней - 170 лет", Москва, 2016 г. – С. 2 .
13. Махнева Н.В. Иммуноморфологическая картина при доброкачественной семейной пузырчатке Гужеро-Хейли-Хейли / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Сборник тезисов XXIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 2016 г., – С. 18.
14. Махнева Н.В. Иммунные комплексы в клинически интактных и пораженных участках кожи у больных, страдающих семейной доброкачественной пузырчаткой Гужеро-Хейли-Хейли / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Сборник статей Межрегиональной научно-практической конференции дерматовенерологов и косметологов "Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии", Москва, 2016 г. – С. 35-37.
15. Махнева Н.В. Молекулярно-биологическая характеристика ряда структур системы межклеточного соединения при болезни Хейли-Хейли / Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. - // Тезисы научных работ XVI Всероссийского съезда дерматовенерологов и косметологов, Москва, 2016 г. – С. 23.
16. Махнева Н.В. Способ подготовки пробы для проведения иммунофлюоресцентного исследования при диагностике болезни Хейли-Хейли / Махнева Н.В., Белецкая Л.В., Черныш Е.С. - // Заявка на патент №2015144570/15(068612) от 16.10.2015.