

Абрамова Татьяна Валерьевна

**«ПУЗЫРЧАТКА: ИММУНОПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ**

(клинико-экспериментальное исследование)»

14.01.10 – Кожные и венерические болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Кубанов Алексей Алексеевич - член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Махнева Наталия Викторовна - доктор медицинских наук, профессор, главный врач Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Московский областной клинический кожно-венерологический диспансер» Министерства здравоохранения Московской области

Теплюк Наталия Павловна - доктор медицинских наук, профессор кафедры кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Уфимцева Марина Анатольевна - доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой дерматовенерологии и безопасности жизнедеятельности Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____20__ года в 12:00 часов на заседании Диссертационного совета Д 208.115.01 при ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России по адресу: 107076, г. Москва, ул. Короленко, дом 3, стр. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России по адресу: 107076, г. Москва, ул. Короленко, дом 3, стр. 6. и на сайте: <http://www.cnikvi.ru/>

Автореферат разослан «__» _____20__ года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Карамова Арфеня Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Пузырчатка – тяжелый буллезный дерматоз, характеризующийся поражением кожи и/или слизистых оболочек. Распространенность пузырчатки в Российской Федерации, согласно данным Федерального статистического наблюдения, в 2014 году составила 4,9 случая на 100 000 взрослого населения.

Ведущая роль в патогенезе пузырчатки отводится аутоиммунным реакциям, приводящим к акантолизу (Кубанова А.А. и соавт., 2009, 2015; Самцов А.В. и соавт., 2012). В настоящее время считается, что у пациентов, генетически предрасположенных к развитию пузырчатки, антигенпредставляющие клетки, распознав компоненты десмосом как чужеродные, презентируют антиген Т-клеткам, инициируя их дифференцировку. В свою очередь, аутореактивные Т-клетки активируют синтез аутоантител В-клетками (Карачева Ю.В., 2015; Giordano C.N. et al., 2012; Grando S.A., 2012).

Процессы распознавания патогенов структурами врожденного иммунитета (паттерн-распознающими рецепторами) остаются малоизученными (Kawai T. et al., 2010). Одними из наиболее значимых представителей семейства сигнальных паттерн-распознающих рецепторов, присутствующих в коже, являются толл-подобные рецепторы (TLR), которые при активации поврежденными молекулярными структурами организма формируют молекулярный каскад передачи сигнала к ядру клетки, что приводит к транскрипции генов провоспалительных цитокинов, инициирующих развитие адаптивного иммунитета (Ковальчук J.B. и соавт., 2008, Хаитов Р.М., 2010; Катунина О.Р., 2011; Kawai T. et al., 2010; Gibson J. et al., 2010; Drexler S.K. et al., 2010). Исследований по изучению роли толл-подобных рецепторов в патогенезе пузырчатки ранее не проводилось.

Механизмы акантолиза при пузырчатке недостаточно изучены. Показано, что к развитию акантолиза может привести активация внутриклеточных, в том числе апоптотических сигнальных путей, вызывающая изменение свойств кератиновых фибрилл клетки, связанных с десмосомами (Скрипкин Ю.К. и

соавт., 2009, 2013; Карачева Ю.В. и соавт., 2014; Lotti R. et al., 2009; Cirillo N. et al., 2013; Ludwig R.J. et al., 2017) и приводящая к потере связи эпителиальных клеток друг с другом (Grando S.A., 2009; Bektas M. et al., 2010; Spindler V., Eming R. et al., 2017; Amber K.T., et al., 2018).

Одним из белков, обладающих проапоптотической функцией, является структурный белок десмосом PERP («p53 apoptosis effector related to PMP-22»), относящийся к семейству периферических миелиновых белков, обеспечивающий межклеточную адгезию и регулирующий пролиферацию кератиноцитов (Attardi L.D. et al., 2000; Ihrie R.A. et al., 2003, 2005; Johnson T.M. et al., 2008). В единичных работах, посвященных изучению роли белка PERP в развитии пузырчатки на экспериментальных моделях, показано, что дефект строения структурного белка десмосом PERP может сопровождаться нарушением функций десмосом и способствовать развитию акантолиза (Nguyen B. et al., 2009; Kalantari-Dehaghi M. et al., 2011).

Основными структурными компонентами десмосом, к которым вырабатываются антитела - иммуноглобулины класса G (IgG), являются десмоглеины 1 и 3 типов (Dsg1 и Dsg3) (Матушевская Е.В. и соавт, 1995; Махнева Н.В., 2010; 2013; Amagai M. et al., 1992; Delva E. et al., 2008; Nagel A. et al., 2010; Ludwig R.J., 2017). В ряде работ опубликованы данные по изучению уровня циркулирующих антител к Dsg1 и Dsg3 у больных пузырчаткой в зависимости от клинической формы заболевания (Матушевская Е.В. и соавт., 2005; Amagai M., 1991,1999; Abasq C. et al., 2009; Herrero-González J.E., 2010; Cozzani E., 2013; Öktem A. et al., 2018). Однако, имеющиеся результаты носят противоречивый характер. Исследований по изучению корреляции уровня антител к десмоглеинам у больных пузырчаткой и тяжестью клинических проявлений не проводилось.

При первичном обращении за медицинской помощью больных диагноз пузырчатки устанавливается лишь в 9-30% случаев. Частота диагностических ошибок особенно высока при изолированном поражении слизистой оболочки рта или ограниченных высыпаниях на коже (Хапилова В.И., 1981; Чеботарев В.В. и

соавт., 2015; Знаменская Л.Ф. и соавт., 2008, 2017; Baum S. et al., 2014; Rabinovich O.F. et al., 2019). Существующие методы диагностики пузырчатки имеют свои преимущества и недостатки, но ни один из них в отдельности не обладает 100% чувствительностью и специфичностью (Каламкарян А.А., 1974; Соколовский Е.В., 1999; Чистякова И.А., 2012; Махнева Н.В., 2016; Zhong S., 2011; Hertl M. et al., 2015). К тому же, общепринятые рутинные методы исследований имеют диагностическую значимость лишь у больных с выраженными клиническими проявлениями, тогда как при стертом, атипичном течении их ценность невысока. В связи с чем, проблема диагностики пузырчатки остается одной из важнейших в дерматовенерологии (Галлямова Ю.А., 2012; Махнева Н.В. и соавт., 2011; 2014; 2017; Хамаганова И.В. и соавт., 2016, 2017; Карачева Ю.В. и соавт., 2017; Знаменская Л.Ф. и соавт., 2017; Уфимцева М.А. и соавт., 2017; Eming R. et al., 2015; Surya V. et al., 2018; Van Beek N. et al., 2018).

Для оценки степени тяжести больных дерматозами, мониторинга за состоянием пациентов и определения эффективности терапии используются клинические индексы, позволяющие объективно оценивать состояние больных. Несмотря на большое количество предложенных индексов оценки тяжести пузырчатки, ни один из них не является общепризнанным. Наиболее известными и удобными к применению в клинической практике в настоящее время признаются: индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index) (Murrell D.F., 2008), индекс балльной оценки тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи (ABSIS, Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score) (Pfützte M. et al., 2003) и индекс активности вульгарной пузырчатки (PVAS, Pemphigus Vulgaris Activity Score) (Herbst A. et al., 2000), которые до настоящего времени в Российской Федерации не использовались.

Основу терапии пузырчатки составляют системные глюкокортикостероидные препараты. Однако длительная терапия иммуносупрессивными препаратами сопровождается развитием серьезных нежелательных реакций, что отягощает состояние больных (Матушевская Е.В., 1997; Теплюк Н.П. и соавт., 2013-2016; Перламутров Ю.Н. и соавт., 2015;

Куклин И.А., Кохан М.М., и соавт, 2015; Духанин А.С. и соавт, 2016; Уфимцева М.А. и соавт.. 2016; Олисова О.Ю. и соавт., 2016; Ahmed A.R. et al., 2011; Ruocco E. et al., 2013; Sajda T., Sinha A.A., 2018). Разработка патогенетически обоснованных способов терапии больных пузырчаткой позволит снизить курсовые дозы иммуносупрессивных препаратов и уменьшить частоту возникновения нежелательных явлений у больных.

В настоящее время имеется большой опыт отечественных и зарубежных исследователей по применению методов экстракорпоральной терапии (фотофереза, плазмафереза и иммуноадсорбции) у больных пузырчаткой (Грандо С.А., 1989; Гребенников В.А., 1990; Кильдюшевский А. В. и соавт., 2002; 2008; Махнева Н.В. и соавт., 2003; Marker M. et al., 2011, Langenhan J. et al., 2014; Hertl M. et al., 2015). Однако данные методы, являясь неселективными, наряду с патогенетически значимыми аутоантителами, удаляют также IgA, IgM, IgE и иммунные комплексы, необходимые для функционирования иммунной системы. В свою очередь, уменьшение содержания в крови иммуноглобулинов разных классов увеличивает риск развития инфекционных заболеваний (Luftl M.et al., 2003; Hofrichter M. et al., 2018).

Учитывая вышесказанное, представляется перспективным изучение патогенеза пузырчатки, что позволит получить новые знания о возможных терапевтических мишенях для перспективной разработки новых способов ранней диагностики и лечения больных; разработка методических подходов, направленных на повышение эффективности диагностики пузырчатки, определение критериев степени тяжести, совершенствование методов патогенетической терапии, что позволит улучшить медицинскую помощь больным пузырчаткой. Вышеизложенное послужило основой настоящей работы, определив ее цель и задачи.

Цель исследования: изучить молекулярно-биологические механизмы развития пузырчатки на основании исследования рецепторов врожденного иммунитета, структурных компонентов десмосом и разработать патогенетически обоснованный подход к терапии пузырчатки.

Задачи исследования

1. Изучить диагностическую значимость клинических индексов для оценки степени тяжести больных пузырчаткой.
2. Определить уровень циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных с разными клиническими формами пузырчатки и оценить взаимосвязь со степенью тяжести заболевания.
3. Изучить частоту встречаемости полиморфизмов гена *PERP* у больных пузырчаткой с количественным определением экспрессии структурного белка десмосом *PERP* в пузыре и в участках кожи, прилегающих к пузырьным элементам, у больных пузырчаткой.
4. Исследовать уровни экспрессии гена толл-подобного рецептора 7 типа (*TLR7*) в коже больных пузырчаткой.
5. Разработать экспериментальный подход к патогенетической терапии больных пузырчаткой на основе селективной сорбции антител к десмоглеину 3 типа и оценить его эффективность *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна

Впервые выявлена взаимосвязь между степенью тяжести пузырчатки, определяемой с использованием клинического индекса площади поражения при пузырчатке (PDAI) и уровнем циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов, определяемых методом иммуноферментного анализа.

Впервые на основании изучения уровня циркулирующих антител к десмоглеину 1 и 3 типов, структурных компонентов десмосом обоснованы дополнительные критерии диагностики степени тяжести у больных пузырчаткой.

Впервые на основании молекулярно-генетического анализа белок-кодирующей последовательности гена *PERP* методом секвенирования определены молекулярно-генетические предикторы развития пузырчатки: доказано увеличение частоты встречаемости гетерозиготных генотипов *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396) в 3-м экзоне гена *PERP* у больных пузырчаткой.

Впервые установлена взаимосвязь между однонуклеотидными полиморфизмами rs648802/rs648396 гена *PERP* и степенью тяжести пузырчатки: при легкой степени тяжести преобладают аллели C/G и гомозиготные генотипы CC/GG полиморфизмов rs648802/rs648396; при средней и тяжелой степени тяжести заболевания преобладают аллели T/C.

Впервые при иммунофлюоресцентном исследовании определено снижение экспрессии структурного белка десмосом *PERP* в коже больных пузырчаткой, приводящей к нарушению функций десмосом по обеспечению межклеточной адгезии в коже.

Впервые методом ПЦР в реальном времени с продуктами обратной транскрипции выявлена повышенная экспрессия гена, кодирующего толл-подобный рецептор 7 типа в коже больных пузырчаткой, что позволило расширить представления о патогенетических механизмах пузырчатки с участием структур врожденного иммунитета в инициации аутоиммунного процесса, доказать роль TLR7 в увеличении антител, играющих роль в развитии пузырчатки.

Созданная экспериментальная модель пузырчатки на лабораторных животных (новорожденных мышах линии BALB/c) может использоваться для изучения иммунных механизмов патогенеза пузырчатки, проведения тестирования новых методов терапии.

Практическая значимость работы

Для объективной клинической оценки степени тяжести больных пузырчаткой рекомендовано использовать клинический индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index), позволяющий дифференцировать больных с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести заболевания, что позволит персонализировать лечение больных пузырчаткой и оценивать эффективность проводимой терапии.

Выявлены и предложены критерии оценки степени тяжести пузырчатки на основании определения уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типа методом иммуноферментного анализа.

Предложено использовать количественное определение структурного белка десмосом PEPР в биоптатах видимо непораженной кожи больных пузырчаткой методом реакции иммунофлюоресценции для оценки степени тяжести.

Разработаны опытные образцы иммуносорбента для селективной сорбции антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой. Разработка метода селективной иммуносорбции пемфигусных антител явится основой для создания нового метода терапии больных пузырчаткой.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Ключевые структуры врожденного иммунитета - толл-подобные рецепторы 7 типа, являющиеся сигнальными паттерн-распознающими рецепторами, участвуют в активации выработки аутоантител при пузырчатке.
2. Однонуклеотидные полиморфизмы rs648802 и rs648396 в 3 экзоне гена *PEPР* являются молекулярно-генетическими предикторами развития пузырчатки. Гетерозиготные генотипы *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396) служат маркерами предрасположенности к развитию пузырчатки и степени тяжести заболевания. Нуклеотидная замена в однонуклеотидных полиморфизмах rs648802/rs648396 3-го экзона гена *PEPР* является значимой, приводит к снижению экспрессии структурного белка десмосом PEPР и к нарушению функций десмосом по обеспечению межклеточной адгезии в коже.
3. Селективное удаление антител к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови при помощи иммуносорбента на основе твердофазного носителя, ковалентно связанного с рекомбинантным человеческим десмоглеином 3 типа, является перспективным направлением экстракорпоральной терапии больных пузырчаткой.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертационная работа Абрамовой Т.В. соответствует паспорту специальности 14.01.10 Кожные и венерические болезни и областям исследований: п. 1 - Различные аспекты патогенеза кожных болезней (клинические, патоморфологические, генетические, иммунологические, серологические исследования); п. 3 - Современные клинические проявления

кожных болезней, их роль в комплексной диагностике. Клинико-лабораторные параллели при кожных болезнях. Совершенствование диагностики дерматозов с использованием клинических, лабораторных и других методов исследования. п. 4 - Совершенствование лечения кожных заболеваний на основе последних исследований по их этиологии и патогенезу.

Внедрение результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования внедрены и используются в практической работе ГБУ Рязанской области БУ «Областной клинический кожно-венерологический диспансер», ДЗ БУЗ Вологодской области «Вологодский областной кожно-венерологический диспансер», БУЗ «Воронежский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи», БУ «Республиканский кожно-венерологический диспансер» Минздрава Чувашии, ГБУЗ Астраханской области «Областной кожно-венерологический диспансер».

Результаты работы внедрены в учебный процесс по дополнительным профессиональным программам профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей по специальности «Дерматовенерология»; основным профессиональным образовательным программам высшего образования - программам подготовки кадров высшего образования в ординатуре по специальности «Дерматовенерология», научно-педагогических кадров в аспирантуре по специальности «Кожные и венерические болезни» на кафедре дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, ВПО ГБОУ ВПО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России. Результаты работы включены в учебно-методические пособия: "Дополнительная профессиональная программа повышения квалификации врачей по специальности «Дерматовенерология»", "Основная профессиональная образовательная программа высшего образования – программа подготовки кадров высшего образования в ординатуре по специальности 31.08.32 Дерматовенерология", сборник клинических задач для

ординаторов по специальности «Дерматовенерология»; учебные пособия: "Пузырчатка", "Дифференциальная диагностика буллезных дерматозов".

Апробация результатов работы

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на: объединенном иммунологическом форуме – 2013 (г.Нижний Новгород, Россия, 30 июня - 5 июля 2013г.); V Всероссийском конгрессе дерматовенерологов и косметологов (г. Казань, Россия, 17-20 сентября 2013г.); XII International Congress of Dermatology and 42 Annual National Congress of IADVL (New Delhi, India, 4-7 December, 2013), XI th European Academy of Dermatology and Venerology (EADV) Spring simposium (Belgrade, Serbia, 21-25 May, 2014); 1086 заседания Московского общества дерматовенерологов и косметологов имени А.И. Пospелова (г.Москва, Россия, 17 июня 2014г.); XIV Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (г.Москва, Россия, 24-27 июня 2014г.); 23rd EADV Congress (Amsterdam, Netherlands, 8-12 October, 2014); научно-практической конференции «Актуальные вопросы дерматовенерологии и косметологии» (г.Москва, Россия, 07 ноября 2014г.); 23rd World Congress of Dermatology (Vancouver, Canada, 8-13 June, 2015); XV Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (г.Москва, Россия, 23-26 июня 2015г.); 24 EADV Congress (Copenhagen, Denmark, 7-11 October, 2015г.); 13th EADV Spring Symposium (Athens, Greece, 19-22 May, 2016); XVI Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (г.Москва, Россия, 14-17 июня 2016г.); 25th EADV Congress (Vienna, Austria, 28 September–2 October, 2016); научно-практической конференции ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России (г.Москва, Россия, 02 декабря 2016г.); 14th EADV Symposium (Brussels, Belgium, 25–28 May, 2017); XVII Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (г.Москва, Россия, 20-23 июня 2017г.); 15th EADV Spring Symposium (Budva, Montenegro, 03–05 May, 2018); 24 World Congress of Dermatology (Milano, Italy, 10–15 June, 2019).

Получены патенты на изобретения: «Способ моделирования пузырчатки у мышей методом введения иммуноглобулинов класса G» (№ 2613718), «Способ

получения селективного иммуносорбента для удаления антител-IgG к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови больных пузырчаткой» (№ 2622005), «Применение селективного иммуносорбента для удаления антител к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови у больных пузырчаткой» (№2627652).

Апробация диссертационной работы состоялась на совместной научно-практической конференции ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России и кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России 27.03.2018, протокол № 1.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автором проанализирована научная литература, на основании чего сформулирована проблема, обоснована степень её разработанности, в соответствии с чем определены цели и задачи исследования, и методологический подход к решению поставленных задач. Автором лично обследовано 132 больных пузырчаткой и 100 здоровых лиц, сформирована база данных. Проведены оценка тяжести больных пузырчаткой с использованием клинических индексов тяжести пузырчатки (ABSIS, PDAI, PVAS, DIDS), сбор материалов для выполнения цитологических, патоморфологических, иммунологических, генетических исследований. Автором проведен детальный анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, на основании которых подготовлен обзор литературы, проведена систематизация, интерпретация и статистический анализ собственных клинико-лабораторных и экспериментальных данных, сформулированы выводы, научная новизна и практическая значимость проведенных исследований.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 50 научных работ, из них 21 - в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 2 учебных пособия, 3 патента на изобретения.

Объём и структура диссертации

Диссертация оформлена и изложена на 270 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 36 таблицами и 48 рисунками.

Работа состоит из введения, 5 глав, содержащих обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, приложение, список литературы, включающий 340 источников, из них 102 российских и 238 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Под наблюдением находилось 132 больных пузырчаткой. Диагноз пузырчатки устанавливался на основании клинического, цитологического, патоморфологического исследований, реакции иммунофлюоресценции. Контрольную группу составили 100 здоровых лиц.

Степень тяжести у больных пузырчаткой оценивали с использованием клинических индексов оценки степени тяжести пузырчатки: индекса площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index), оценки тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи (ABSIS, Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score), индекса активности вульгарной пузырчатки (PVAS, Pemphigus Vulgaris Activity Score), дерматологического индекса тяжести заболевания (DIDS, Dermatology Index of Disease Severity) у 132 больных пузырчаткой.

Лабораторные исследования:

Патоморфологическое исследование кожи для выявления акантолиза у 122 больных пузырчаткой (биоптаты пузырных элементов). Окраску гематоксилин-эозином проводили в автоматическом устройстве для окрашивания срезов тканей Leica Autostainer XLST5010 (Германия). Гистологические препараты изучали с помощью светового микроскопа Leica DM 4000B (Германия).

Иммуногистохимическое исследование - реакция непрямой иммунофлуоресценции (ИРИФ) с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus IX81S1F-S (Германия):

- с антителами к IgA, IgM, IgG (первичные антитела - rabbit polyclonal antibodies, ready-to-use, «Cell Marque antibody», USA; вторичные антитела - Goatanti-Rabbit IgG Light 488, «Epitomics» USA) для выявления фиксации иммуноглобулинов А, М, G в коже 111 больных пузырьчаткой (биоптаты из участка видимо неповрежденной кожи) и 30 здоровых лиц;

- с антителами к PERP («p53 apoptosis effector related to PMP-22») (United States Biological) для количественного определения экспрессии структурного белка десмосом PERP в различных участках кожи (пузырь - зона 1, участок кожи, прилегающий к пузырю - зона 2 и видимо неповрежденная кожа - зона 3) у 30 больных пузырьчаткой и 10 здоровых лиц (n=51). Постановку ИРИФ осуществляли согласно инструкции, прилагаемой к антителам. В каждом биоптате анализировали 5 полей зрения, определяли значение среднего показателя интенсивности свечения по заданному каналу в выделенной области (в условных единицах количества клеток, экспрессирующих белок PERP, на 100 кератиноцитов), рассчитывали средний показатель экспрессии PERP для каждого биоптата. Анализ результатов проводился с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus IX81S1F-S (Германия) (объективы x200 и x600), оснащенного фотомикрографической системой, и персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 с предустановленным программным обеспечением "Olympus Fluoview Ver. 1.7b".

Иммуноферментным анализом (ИФА) определяли антитела к десмоглеинам 1 и 3 типов (Dsg1, Dsg3) в крови 119 больных пузырьчаткой и 30 здоровых лиц (n=298). Постановку ИФА проводили с использованием диагностических наборов реагентов Anti-Desmoglein 3 ELISA и Anti-Desmoglein 1 ELISA (Euroimmun AG, Германия) согласно типовой стандартной методике.

Молекулярно-генетические методы: Метод секвенирования по Сенгеру использовали для определения нуклеотидной последовательности гена *PERP* в

крови у 49 больных пузырчаткой и 68 здоровых лиц. Исследование молекулярной структуры белок-кодирующей последовательности гена *PERP* человека проводилось в несколько этапов: выделение ДНК из образцов крови, полученных от пациентов с пузырчаткой и здоровых лиц, с помощью набора реагентов GeneJET (фирма Fermentas, Литва); амплификация белок-кодирующей последовательности ДНК трех экзонов гена *PERP*; визуализация продуктов амплификации; проведение сиквесной реакции с использованием набора реагентов для секвенирования ДНК Big Dye Terminator v3.1 Sequencing RR-100 (фирма Applied Biosystems, США); электрофоретическое разделение продуктов сиквесной реакции с использованием генетического анализатора 3130 Genetic Analyzer (фирма Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей экзонов гена *PERP*, полученных в результате секвенирования, проводили с использованием программы MEGA5 и пакета программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов в режиме реального времени для количественного определения экспрессии гена толл-подобного рецептора 7 типа (*TLR7*) в образцах кожи 38 больных пузырчаткой (биоптаты из участка видимо непораженной кожи) и 24 здоровых лиц. Для определения уровня экспрессии гена *TLR7* применяли оптимизированные для метода Real-Time PCR пары праймеров Quanti Tect Primer Assay (Qiagen, США), в качестве эндогенного контроля использовались гены β -актин и *PANK*, экспрессия которых считается стабильной для человека. Последовательности праймеров *TLR7* и генов "домашнего хозяйства" (β -актин и *PANK*) подбирались в программе "Oligo 6,0". Оценка эффективности амплификации проводилась при помощи программного обеспечения *Real-time PCR Miner*, доступного на сайте <http://www.miner.ewindup.info/>.

Выделение и очистка суммарных иммуноглобулинов G (IgG) из сывороток крови 78 больных пузырчаткой и 100 здоровых лиц проводились методом аффинной хроматографии на колонке с белком G - сефарозой (сефароза с

иммобилизованным белком G) (Биалекса, Россия) согласно стандартным технологиям (Anhalt G.J., 1981).

Экспериментальные исследования для создания модели пузырчатки на лабораторных животных - неонатальных мышах линии BALB/c (n=99) выполнялись в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт «Принципы надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434-2009, Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н г. Москва «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»). После введения препаратов IgG, полученных от больных пузырчаткой и здоровых лиц, проводились: клинический осмотр мышей (n=99); патоморфологическое (n=99) и нРИФ с использованием *ex vivo* КЛСМ для выявления фиксации IgG (n=99) аутопсийного материала (кожи) мышей.

Для получения селективного твердофазного иммуносорбента для удаления антител (IgG) к Dsg3 из сыворотки крови больных пузырчаткой рекомбинантный Dsg3, полученный методом генной инженерии, экспрессированный в клетках грибов Yeast («R&D Systems», США), иммобилизовали путем ковалентного связывания с твердофазным носителем - крупнозернистой агарозной матрицей Affi-Gel-15 (Bio-Rad, США). Для оценки эффективности сорбции антител в эксперименте *in vitro* получение препаратов суммарных IgG проводилось методом иммунохроматографической очистки при прохождении растворов через иммуносорбент. Определение эффективности селективного иммуносорбента *in vivo* проводилось с использованием 43 неонатальных мышей линии BALB/c. При проведении экспериментов для оценки эффективности разработанного иммуносорбента после введения препаратов IgG, выделенных из пула сывороток крови 1. больных пузырчаткой, содержащих антитела к десмоглеину 3 типа; 2. больных пузырчаткой после прохождения через иммуносорбент; 3. здоровых лиц), у мышей проводился клинический осмотр (n=43), получен аутопсийный материал (кожа) для патоморфологического исследования (n=43) и нРИФ с использованием *ex vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (n=43).

Настоящее исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России.

Инструмент статистического анализа формировался дифференцированно, в зависимости от данных, подлежащих обработке: данные рутинного клинико-лабораторного исследования обрабатывались с использованием программных пакетов Statistica 10.0 (StatSoft, Inc) и Excel 2010 (Microsoft). При статистической обработке материала использовали стандартные методы с расчетом средней величины, среднего квадратического отклонения и ошибки средней с расчетом достоверности отличий по t-критерию Стьюдента (с проверкой равенства средних значений в двух выборках) при нормальном распределении, а также непараметрические методы математической статистики. Для сравнительной оценки количественных признаков в несвязанных группах применяли U-критерий Манна-Уитни, тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов. Оценка корреляционных связей осуществлялась с помощью метода ранговой корреляции Спирмена (при отклонении от нормального распределения). Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p \leq 0,05$. Корреляцию оценивали значимой при уровне $p < 0,05$, тесноту связи между признаками считали слабой при $r < 0,3$, умеренной - при $0,3 \leq r < 0,7$, сильной - при $r \geq 0,7$. Результаты исследования представлены в формате $M \pm SEM$, где M - среднее значение, SEM - стандартная ошибка среднего.

Расчет частоты встречаемости полиморфных аллелей и генотипов гена *PERP* между больными пузырчаткой и здоровыми лицами проводилось путем прямого подсчета. Достоверность отличий между частотами генотипов в двух сравниваемых группах обследованных (больных пузырчаткой и здоровых лиц) оценивалась с применением четырехпольной таблицы, двустороннего критерия χ^2 и показателя отношения шансов (Odds Ratio – OR), который рассчитывался стандартным способом (Szumilas M., 2010) при помощи калькулятора, находящегося в открытом доступе на сайте библиотеки Meta Numerics (<http://www.meta-numerics.net/Samples/ContingencyCalculator.aspx>).

Расчет относительной экспрессии гена *TLR7* проводили по методу $\Delta\Delta C_t$ (2-Delta Delta C(T) (2- $\Delta\Delta C_t$)), используя β -актин и *PANK* в качестве эндогенного контроля. Для статистической обработки результатов использовали критерий Стьюдента. Межгрупповые различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клиническая характеристика больных пузырчаткой

Под наблюдением находилось 132 больных пузырчаткой в возрасте от 18 до 70 лет (средний возраст 46,25 лет), из них 82 (62,2%) женщины и 50 (37,8%) мужчин. Вульгарная пузырчатка диагностирована у 98 (74,2%) больных (в том числе вегетирующая - у 1 (0,8%), герпетиформная – у 2 (1,5%)); листовидная – у 31 (23,5%) больных (в том числе себорейная – у 28 (21,2%)); паранеопластическая - у 3 (2,3%). У 29 (21,9%) больных пузырчаткой наблюдалось изолированное поражение слизистых оболочек, в том числе у 26 (89,7%) пациентов на слизистых оболочках рта и у 3 (10,3%) - на слизистых оболочках рта и половых органов. У 48 (36,4%) больных патологический процесс локализовался только на коже, у 55 (41,7%) больных отмечалось поражение кожных покровов и слизистых оболочек. Площадь поражения кожных покровов у больных пузырчаткой составляла от 1 до 18% (в среднем $4,3 \pm 0,3\%$).

Провоцирующими факторами у больных пузырчаткой могли быть: вирусные и/или бактериальные заболевания (52; 39,4% больных), психоземональные стрессы (43, 32,6% больных), прием лекарственных препаратов (15; 11,4% больных), оперативные вмешательства (10; 7,6% больных), инсоляция (4; 3,0%). У 8 (6,1%) больных провоцирующие факторы развития заболевания установить не удалось.

Дебют появления высыпаний у 64 (66,7%) больных вульгарной пузырчаткой отмечался на слизистых оболочках, на кожных покровах туловища и конечностей у 27(28,1%), реже - на волосистой части головы (5; 5,2%). У 12 (38,7%) больных с листовидной пузырчаткой первые очаги поражения появились на лице, у 9 (29,0)

- на коже волосистой части головы, реже - на коже туловища (7; 22,6%) и конечностей (3; 9,7%). Диагноз пузырчатки у пациентов после появления первых симптомов заболевания устанавливался в сроки от 1 месяца до 4,5 лет, в среднем через $6,6 \pm 3,2$ месяцев (Таблица 1).

Таблица 1 - Сроки установления диагноза пузырчатка

Сроки установления диагноза пузырчатки	Количество больных(n=132)	
	Абс	%
до 6 мес	67	50,7
от 7 до 12 мес	47	35,6
от 13 до 18 мес	7	5,3
от 19 до 24 мес	3	2,3
от 25 до 30 мес	3	2,3
более 31 мес	5	3,8

Длительность заболевания у больных пузырчаткой была от 0,5 месяцев до 15 лет (в среднем $52,4 \pm 10,2$ месяцев). У 82 (62,1%) больных длительность заболевания была до 1 года, у 17 (12,9%) - от 1 года до 2 лет, у 11 (8,3%) - от 2 до 3 лет; у 22 (16,7%) - более 3 лет.

Сопутствующие заболевания желудочно-кишечного тракта выявлены у 90 (68,2%) больных, сердечно-сосудистой системы - у 88 (66,7%) больных, эндокринной системы - у 29 (22,0%) больных, мочеполовой системы - у 23 (17,4%), органов дыхания - у 18 (13,6%). У 9 больных пузырчаткой выявлены аутоиммунные заболевания: у 6 (4,5%) больных - аутоиммунный тиреоидит, у 3 (2,3%) - ревматоидный артрит. Аллергологический анамнез был отягощен у 37 (28,0%) больных.

Системную терапию до поступления в стационар получали 65 (49,2%) больных, из них 54 (83,1%) больных принимали системные глюкокортикостероидные препараты, 11 (16,9%) - системные глюкокортикостероидные препараты в сочетании с цитостатиками метотрексатом, азатиоприном), длительность терапии составляла от 1 месяца до 10 лет (в среднем $10,1 \pm 6,9$ месяцев). 67 (50,8%) больных пузырчаткой ранее не получали иммуносупрессивные препараты.

У 56 (86,2%) больных пузырчаткой выявлены побочные эффекты вследствие терапии системными иммуносупрессивными препаратами: нарушения толерантности к глюкозе (n=23; 41,1%), сахарный диабет (n=18; 32,1%), надпочечниковая недостаточность (n=28; 50,0%), ятрогенное поражение печени (n=8; 14,3%), синдром Иценко-Кушинга (n=11; 19,6%), артериальная гипертензия (n=9; 16,1%), остеопороз (n=8; 14,3%). Сроки развития нежелательных реакций составляли от 1 до 11 месяцев от начала системной терапии глюкокортикостероидными препаратами (в среднем $3,95 \pm 1,33$ мес).

Изучение диагностической значимости клинических индексов в оценке тяжести пузырчатки

У 132 больных пузырчаткой оценка степени тяжести заболевания проводилась с использованием 4-х индексов: индекса площади поражения при пузырчатке - PDAI, балльной оценки тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи - ABSIS, индекса активности вульгарной пузырчатки - PVAS, дерматологического индекса тяжести заболевания - DIDS в соответствии с методикой подсчета каждого из индексов. Между индексами не установлено четкого параллелизма, в связи с чем больные при подсчете индексов могли попасть в разные группы, что было обусловлено различными подходами к оценке распространенности, активности и тяжести патологического процесса у больных пузырчаткой и различными методами подсчета баллов (Таблица 2).

**Таблица 2 - Индексы PDAI, ABSIS, PVAS и DIDS у больных
пузырчаткой**

Степень тяжести	Клинические индексы оценки тяжести пузырчатки			
	PDAI	ABSIS	PVAS	DIDS
Легкая степень (1)	78,8% (n=104)	48,5% (n=64)	59,8% (n=79)	40,2% (n=53)
Средняя степень (2)	13,6% (n=18)	41,7% (n=55)	19,7% (n=26)	48,5% (n=64)
Тяжелая степень (3)	7,6% (n=10)	9,8% (n=13)	20,5% (n=27)	11,3% (n=15)

Применение индекса PDAI позволило установить легкую степень тяжести (PDAI до 30 баллов) у 104 больных пузырьчаткой, у 18 больных - среднюю степень тяжести (PDAI до 60 баллов) и у 10 больных – тяжелую степень тяжести (PDAI выше 60 баллов).

Сравнение между собой групп пациентов по средним значениям общего индекса PDAI и его подиндексов показало, что индекс PDAI позволяет дифференцировать степень тяжести у больных пузырьчаткой; при этом, как при подсчете общего показателя, так и подиндексов, между пациентами всех групп (легкая, средняя и тяжелая степень тяжести) выявлены статистически значимые различия (Таблица 3).

Таблица 3 - Индекс PDAI больных пузырьчаткой (в баллах)

Группы пациентов по степени тяжести (n=132)	Кожа	Волосистая часть головы	Слизистые оболочки	Активность поражения	Вторичные изменения	Общий (суммарный) показатель
	1	2	3	4	5	6
Легкая степень (1) (n=104)	5,97±0,73	0,84±0,15	4,77±0,68	11,57±0,85	2,51±0,32	14,04±1,09
Средняя степень (2) (n=18)	20,09±2,56	2,72±0,85	11,09±0,65	33,91±2,85	6,27±0,76	40,19±2,62
Тяжелая степень (3) (n=10)	44,33±8,85	7,67±2,33	32,00±2,34	82,76±5,68	9,33±1,20	91,33±5,17
p₁₋₂	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
p₁₋₃	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
P₂₋₃	P<0,05	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,05	p<0,001

При оценке степени тяжести пузырьчатки в соответствии с индексом ABSIS в группу пациентов с легкой степенью тяжести включено 64 человека (ABSI до 30 баллов), со средней степенью – 55 человек (ABSI до 60 баллов), с тяжелой степенью – 13 человек (ABSI выше 60 баллов). Сравнение между собой групп пациентов по средним значениям общего показателя индекса ABSIS и его «подиндексов» показало, что подсчет общего индекса позволяет дифференцировать больных пузырьчаткой по степени тяжести заболевания.

Вместе с тем, показатель не позволяет различать степень поражения кожи у больных с легкой и средней степенью тяжести заболевания и степень поражения слизистых оболочек у больных со средней и тяжелой степенью тяжести пузырчатки (Таблица 4).

Таблица 4 - Индекс ABSIS у больных пузырчаткой (в баллах)

Группы пациентов по степени тяжести (n=132)	Кожа	Слизистые оболочки (распространенность)	Слизистые оболочки (тяжесть поражения)	Общий показатель
	1	2	3	4
Легкая степень (1) (n=64)	6,94±1,37	0,95±0,24	5,64±1,56	13,25±1,70
Средняя степень (2) (n=55)	9,51±2,01	4,62±0,40	30,04±1,78	44,18±1,18
Тяжелая степень (3) (n=13)	35,44±9,70	4,13±0,69	30,63±4,59	72,94±7,92
p₁₋₂	p>0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001
p₁₋₃	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001
P₂₋₃	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,001

Использование индекса PVAS позволило выделить группы пациентов: с легкой степенью тяжести (PVAS до 4 баллов), состоящую из 79 человек, со средней степенью (PVAS до 8 баллов) – из 26 человек, с тяжелой степенью (PVAS выше 8 баллов) – из 27 человек (Таблица 5).

Таблица 5 - Индекс PVAS у больных пузырчаткой (в баллах)

Группы пациентов по степени тяжести	Кожа	Слизистые оболочки	Общий показатель
Легкая степень (1) (n=79)	1,28±0,20	0,99±0,11	2,22±0,19
Средняя степень (2) (n=26)	4,92±0,36	1,13±0,30	6,05±0,25
Тяжелая степень (3) (n=27)	9,26±0,34	1,21±0,22	10,44±0,36
p₁₋₂	p<0,001	p>0,05	p<0,001
p₁₋₃	p<0,001	p>0,05	p<0,001
P₂₋₃	p<0,001	p>0,05	p<0,001

Результаты исследования показали, что подсчет суммарного индекса PVAS позволяет дифференцировать больных пузырчаткой по степени тяжести заболевания. Вместе с тем, показатель не позволяет различить степень поражения слизистых оболочек у больных с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести заболевания, что может ограничить его применение у больных с поражением слизистых оболочек

Для оценки клинической значимости индексов проведено сравнение результатов подсчета индексов PDAI, ABSIS и PVAS с распределением больных по тяжести заболевания с учетом дерматологического индекса тяжести заболевания (DIDS). При определении степени тяжести пузырчатки по данному параметру (с учетом степени тяжести заболевания 1-3) установлено, что группа пациентов с легкой степенью тяжести включала 53 человека (40,2%), со средней степенью – 64 человека (48,5%), с тяжелой степенью тяжести – 15 человек (11,3%).

Подсчет коэффициента корреляции Спирмена показал, что между значениями суммарного показателя индексов PDAI, ABSIS и PVAS существует умеренная прямая связь. Так, коэффициент корреляции PDAI-PVAS составил +0,5783, коэффициент корреляции ABSIS-PVAS составил +0,5301, коэффициент корреляции ABSIS-PDAI составил +0,6405. Данные, полученные с помощью дерматологического индекса тяжести заболевания (DIDS), были наиболее близки данным индекса PDAI ($r_{\text{PDAI}}=+0,56$). Применение индекса ABSIS способствовало увеличению процента больных с легкой степенью тяжести заболевания, индекса PVAS, напротив, повышению процента больных тяжелой степенью тяжести заболевания.

Таким образом, в результате выполнения исследований у больных пузырчаткой показано, что наиболее удобным и достоверным среди изученных клинических индексов (PDAI, ABSIS, PVAS) для использования является индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index), отражающий тяжесть пузырчатки и позволяющий дифференцировать больных по степени (легкая, средняя и тяжелая) тяжести заболевания, что позволяет

рекомендовать его для применения в клинической практике специалистами медицинских организаций дерматовенерологического профиля для объективной оценки тяжести состояния больных пузырчаткой, персонализации терапии пациентов и определения эффективности проводимой терапии.

Определение уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных пузырчаткой

Антитела к десмоглеинам 1 и 3 типов в сыворотках крови больных пузырчаткой определены у 119 больных пузырчаткой, в том числе у 96 больных вульгарной пузырчаткой и 23 больных листовидной пузырчаткой методом иммуноферментного анализа.

Сравнительное изучение уровня циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных с разными клиническими формами пузырчатки показало, что у больных вульгарной пузырчаткой средний уровень антител к десмоглеину 3 типа ($146,20 \pm 16,20$ RU/ml) был статистически значимо выше, чем у больных листовидной пузырчаткой ($35,54 \pm 10,90$ RU/ml) ($p_{1-2} < 0,001$).

Уровень антител к десмоглеину 1 типа был статистически значимо выше у больных листовидной пузырчаткой ($147,43 \pm 17,57$ RU/ml) в сравнении с уровнем антител, определявшимся у больных вульгарной пузырчаткой ($88,36 \pm 16,60$ RU/ml) ($p_{1-2} < 0,001$) (Таблица 6).

Таблица 6 - Уровень антител к десмоглеинам у больных пузырчаткой в зависимости от клинической формы заболевания, RU/ml (M±m)

Показатель/ Клиническая форма заболевания	Вульгарная пузырчатка	Листовидная пузырчатка	Достоверность различий между группами(1-2)
Группы больных	1	2	
Антитела к десмоглеину 3 типа	$146,20 \pm 16,20$ (n=96)	$35,54 \pm 10,90$ (n=23)	$p_{1-2} < 0,001$
Антитела к десмоглеину 1 типа	$88,36 \pm 16,60$ (n=96)	$147,43 \pm 17,57$ (n=23)	$p_{1-2} < 0,001$

Полученные нами данные соответствуют данным современных авторов (Махнева Н.В. и соавт., 2010, Mysorekar V.V., 2015; Oliveira L.A. et al., 2017), указывающих на то, что обнаружение и повышенный уровень антител к

десмоглеину 3 типа более характерны для больных вульгарной пузырчаткой и, напротив, обнаружение и высокий уровень антител к десмоглеину 1 типа характерны для больных листовидной пузырчаткой, что связано с экспрессией соответствующих антигенов плоском эпителии.

Для оценки прогностической роли определения антител к десмоглеинам в развитии вариантов степени тяжести пузырчатки, проанализирован уровень антител у больных с легкой (1), средней (2) и тяжелой (3) степенью тяжести заболевания, определявшихся с использованием индекса площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index) (Таблица 7).

Таблица 7 - Уровень антител к десмоглеинам у больных пузырчаткой в зависимости от степени тяжести заболевания, определявшейся с использованием индекса PDAI (RU/ml) (M±m)

Показатель	Легкая степень	Средняя степень	Тяжелая степень	Достоверность различий между группами (1-2, 1-3, 2-3)
Группы больных по степени тяжести	1	2	3	
Антитела к десмоглеину 3 типа	86,29±15,41 (n=70)	159,49±46,08 (n=39)	262,0±17,00 (n=10)	p ₁₋₂ <0,001 p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001
Антитела к десмоглеину 1 типа	71,68 ±17,03 (n=70)	149,98±13,81 (n=39)	262,0±40,00 (n=10)	p ₁₋₂ <0,001 p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,05

Выявлено нарастание (статистически значимое: от p<0,05 до p<0,001) уровня антител как к Dsg 3, так и Dsg1 у больных пузырчаткой с увеличением степени тяжести заболевания.

Для оценки взаимосвязи клинических особенностей пузырчатки с уровнем антител к десмоглеинам был проведен корреляционный анализ между степенью тяжести, определяемой с использованием клинического индекса PDAI и его составляющих (подиндексов) и уровнем антител к десмоглеинам 1 и 3 типа.

По данным корреляционного анализа выявлена статистически значимая прямая связь между уровнем антител к Dsg1 и тяжестью, определяемой

подиндексами, отражающими поражение кожи у больных пузырчаткой (PDAI «кожа» (+ 0,60 - умеренная), PDAI «вторичные изменения» (0,57 – умеренная)). Данное обстоятельство свидетельствует о том, что уровень антител к Dsg1 в большей степени отражает степень поражения кожи при пузырчатке и в меньшей степени – степень поражения слизистых оболочек.

Также установлена достоверная прямая связь между уровнем антител к Dsg3 и тяжестью, определяемой величиной 2-х подиндексов PDAI, отражающих поражение слизистых оболочек у больных пузырчаткой (PDAI «слизистые» (+0,46 умеренная), PDAI «активность» (+0,47 умеренная). Полученные данные позволяют заключить, что уровень антител к Dsg3 в большей степени отражает степень поражения слизистых оболочек при пузырчатке.

Таким образом, уровень антител к десмоглеинам 1 и 3 типов коррелирует со степенью тяжести и обуславливает клиническую форму заболевания и может использоваться при диагностике пузырчатки, для установления степени тяжести. Легкая степень тяжести заболевания определяется у больных пузырчаткой при уровне антител к Dsg3 до 100 RU/ml (86,29+15,41) и уровне антител к Dsg1 до 80 RU/ml (71,68+17,03), средняя степень тяжести – при уровне антител к Dsg3 от 101 RU/ml до 200 RU/ml (159,49+46,08) и уровне антител к Dsg1 от 81 RU/ml до 160 (149,98+13,81), тяжелая степень тяжести – при уровне антител к Dsg3 более 201 RU/ml и уровне антител к Dsg1 более 161 RU/ml.

Изучение полиморфизмов гена *PERP* и экспрессии белка PERP у больных пузырчаткой

С целью поиска мутаций/полиморфизмов гена *PERP* у больных пузырчаткой проведено исследование белок-кодирующей последовательности ДНК гена *PERP* в крови у 49 больных пузырчаткой и 68 здоровых лиц методом секвенирования. Количественное определение экспрессии структурного белка десмосом - PERP проводилось у 30 больных пузырчаткой в различных участках кожи (пузырь - зона 1, участок кожи, прилегающий к пузырю - зона 2 и видимо здоровая кожа - зона 3) и 10 здоровых лиц методом нРИФ с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа.

В результате анализа белок кодирующей нуклеотидной последовательности гена *PERP* у больных пузырчаткой в 1-м и 2-м экзонах мутаций/полиморфизмов не обнаружено, в третьем экзоне гена *PERP* обнаружены два однонуклеотидных полиморфизма (SNP, Single nucleotide polymorphism): rs648802 (C611G) (несинонимичный) и rs648396 (T675C) (синонимичный). В случае полиморфизма rs648802 происходит замена нуклеотида С (цитозина) на G (гуанин) в положении 611 нуклеотидной цепи, что приводит к замене пролина на аргинин в положении 143 белковой цепи *PERP*. В случае полиморфизма rs648396 происходит синонимичная замена нуклеотида, не приводящая к замене аминокислоты в белковой цепи. Изучаемые полиморфизмы rs648802 и rs648396 наследуются сцеплено: G (rs648802) с C (rs648396), а C (rs648802) с T (rs648396). Показатель сцепления между локусами равен 100%.

На основании сравнительного анализа частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфизмов rs648802 и rs648396 3-го экзона гена *PERP* между больными пузырчаткой и здоровыми лицами установлено, что группы больных и здоровых статистически значимо отличались по частоте встречаемости генотипов (Таблица 8).

Таблица 8 - Частота аллелей и генотипов полиморфизма rs648802(rs648396) 3-го экзона гена *PERP*

Аллели и генотипы	Больные (n=49) абс. значение/ частота	Здоровые (n=68) абс. значение/ частота	P	OR [CI 95%]
Аллель С (Т)	52/0,53	59/0,43	> 0,05 ($\chi^2=2,14$)	1,48 [0,88-2,49]
Аллель G (C)	46/0,47	77/0,57		0,68 [0,4-1,14]
Генотип C/C (T/T)	10/0,20	16/0,24	> 0,05 ($\chi^2=0,16$)	0,83 [0,089-1,58]
Генотип C/G (T/C)	32/0,65	27/0,40	< 0,01 ($\chi^2=7,47$)	2,86 [0,68-5,04]
Генотип G/G (C/C)	7/0,14	25/0,37	< 0,05 ($\chi^2=1,57$)	1,29 [0,11-0,73]

Гетерозиготные генотипы *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396) статистически значимо чаще встречались в группе больных пузырчаткой по сравнению со здоровыми лицами (65,3% против 39,7%, $p < 0,01$), что позволяет рассматривать их как предикторы развития заболевания. Соответственно, у здоровых лиц достоверно чаще встречаются гомозиготные генотипы *G/G* (полиморфизм rs648802) и *C/C* (полиморфизм rs648396) по сравнению с больными пузырчаткой (36,8% против 14,3%, $p < 0,05$)

Нуклеотидная замена в rs6488023-го экзона гена *PERP* является значимой, так как приводит к изменению аминокислотной последовательности белка *PERP* (в случае полиморфизма rs648802 происходит замена нуклеотида С (цитозина) на G (гуанин) в положении 611 нуклеотидной цепи, что приводит к замене пролина на аргинин в 143 положении белковой цепи *PERP*), что ведет к изменению его структуры и, возможно, функции. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в *PERP*, участвующем в апоптотическом сигнальном пути, изменяют способность клеток к апоптозу (Reed J.C., 2010) и играют важную роль в развитии акантолиза у больных пузырчаткой.

Для выяснения возможной взаимосвязи между генетической предрасположенностью и тяжестью заболевания проведен анализ частоты встречаемости генотипов в полиморфизмах rs648396/rs648802 3-го экзона гена *PERP* у больных пузырчаткой с различной степенью тяжести заболевания. Тяжесть заболевания оценивалась в соответствии с клиническим индексом PDAI ($n=45$). По степени тяжести заболевания пациенты были разделены на 2 подгруппы: легкая степень (1-я группа, $n=12$), средняя и тяжелая степень тяжести (2-я группа, $n=33$). Установлено, что группа пациентов со средней и тяжелой степенью тяжести патологического процесса статистически значимо отличалась от группы пациентов с легкой степенью тяжести заболевания как по частоте аллелей, так и по частоте генотипов полиморфизмов rs648396/rs648802 3-го экзона гена *PERP*.

Частота аллельных вариантов *C/G* (полиморфизм rs648802 и rs648396) статистически значимо повышена у больных с легкой степенью тяжести в

сравнении с больными со средней и тяжелой степенью тяжести пузырчатки (81,8% против 42,0%, $p < 0,01$), в то время как частота аллельных вариантов *T/C* полиморфизмов rs648802 и rs648396, напротив, выше у больных со средней и тяжелой степенью тяжести заболевания (58,0% против 18,2%; $p = 0,041$) (Таблица 9).

Таблица 9. Сравнение частот распределения генотипов полиморфизмов rs648802/rs648396 гена *PERP* в группах пациентов с различной степенью тяжести патологического процесса

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов полиморфизма rs648396/ rs648802 гена <i>PERP</i>		P	OR [CI 95%]
	Легкая степень (n=12) абс. значение/ частота	Средняя, тяжелая степень (n=33) абс. значение/ частота		
Аллель <i>T/C</i>	8/0,18	38/0,58	p<0,05 $\chi^2=4,14$	0,37 [0,08-0,73]
Аллель <i>C/G</i>	16/0,82	28/0,42	p<0,01 $\chi^2=7,54$	2,71 [0,056-5,37]
Генотип <i>TT/CC</i>	1/0,08	7/0,21	$p > 0,05$ $\chi^2=0,99$	0,34 [0,41-1,08]
Генотип <i>TC/CG</i>	6/0,5	24/0,73	$p > 0,05$ $\chi^2=2,0$	0,38 [0,14-0,89]
Генотип <i>CC/GG</i>	5/0,42	2/0,06	p<0,05 $\chi^2=8,5$	11,07 [0,22-31,37]

Примечание: для аллельных вариантов – тест хи-квадрат, $df=1$; для генотипов – непараметрический тест Манна-Уитни

Частота гомозиготных генотипов *CC/GG* полиморфизмов rs648802/rs648396 3-го экзона гена *PERP* так же статистически значимо повышена у пациентов с легкой степенью тяжести заболевания (41,7%) в сравнении с пациентами со средней и тяжелой степенью тяжести заболевания (41,7% против 6,0%, $p < 0,05$).

Отмечена взаимосвязь между частотами встречаемости аллельных вариантов и генотипов полиморфизмов rs648802/rs648396 3-го экзона гена *PERP* и степенью тяжести пузырчатки: при легкой степени тяжести патологического процесса выявлено преобладание аллелей *C/G* и гомозиготных генотипов *CC/GG*

полиморфизмов rs648802/rs648396, более характерных для здоровых лиц; при средней и тяжелой степени тяжести заболевания установлено преобладание аллелей T/C полиморфизмов rs648802/rs648396. Полученные данные позволяют сделать предположение о существовании различных генетических механизмов эскалации патологического процесса, что приводит к различиям в тяжести клинического течения пузырчатки у пациентов.

При сравнении частот встречаемости генотипов гена *PERP* у больных пузырчаткой в зависимости от возраста, в котором возникли первые клинические проявления, между группами пациентов разного возраста были выявлены отличия: с увеличением возраста, в котором началось заболевание, частота выявления гетерозиготных полиморфизмов CG/TC rs648802/rs648396 гена *PERP* у пациентов с пузырчаткой постепенно нарастала (в 20-40 лет - у 44%; в 41-60 лет – у 52%; в возрасте старше 60 лет – у 89,5%); в то время как гомозиготных, напротив, падала (Рисунок 1).

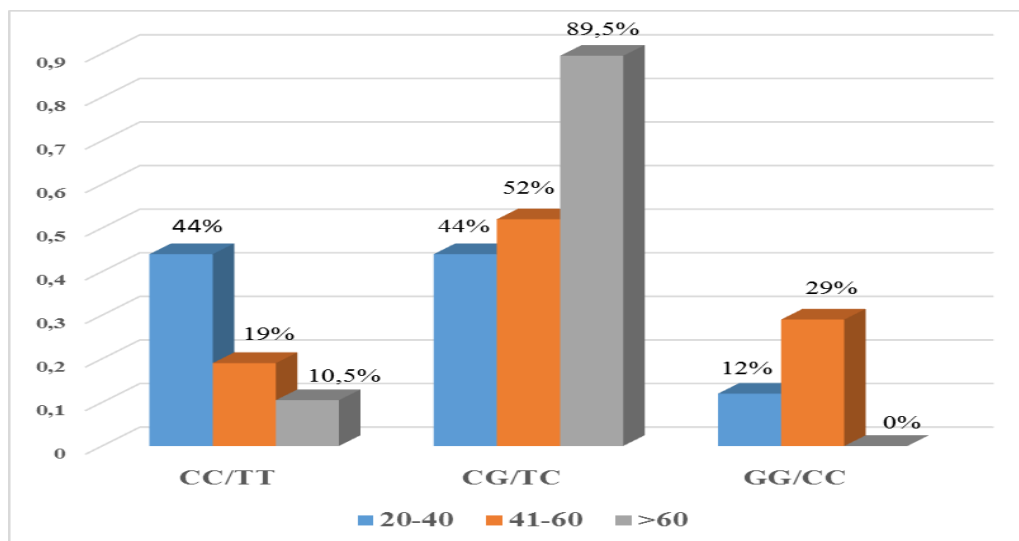


Рисунок 1. Распределение частот генотипов полиморфизмов rs648802/rs648396 гена *PERP* в группах пациентов с различным возрастом манифестации заболевания

Сопоставление частот встречаемости гетерозиготных («маркерных») генотипов в группах больных (классификация по возрастным периодам Г. Крайг, 2000) с более ранней (1 группа, 20-60 лет) и более поздней (2 группа, после 60 лет) манифестацией заболевания показало, что у лиц 2 группы гетерозиготные генотипы C/G (полиморфизм rs648802) и T/C (полиморфизм rs648396)

встречались в 89,5% случаев, в то время как у лиц с манифестацией заболевания в возрасте до 60 лет только в 50% случаев (разница статистически значима; $p < 0,05$, $p = 0,012$) (Таблица 10).

Таблица 10. Сравнение частот распределения генотипов полиморфизмов rs648802/rs648396 гена *PERP* в группах пациентов с различным возрастом манифестации заболевания

Группы пациентов	Возраст манифестации заболевания	Гомозиготные и гетерозиготные генотипы полиморфизмов rs648802/rs648396 гена <i>PERP</i>		
		CC/TT	CG/TC	GG/CC
1	20-60 (n=30)	8/0,27	15/0,5	7/0,23
2	>60 (n=19)	2/0,105	17/0,895	0/0,0
Статистические показатели	P	>0,05	<0,05	>0,05
	OR	3,09	8,5	2,9
	CI	[2,08-,26]	[5,36-2,36]	[3,44-9,35]
	χ^2	1,87	8,0	1,05

Примечание: Тест Харди-Вайнберга (тест хи-квадрат, $df = 1$).

Если учесть, что генотип человека на протяжении жизни остается неизменным, то полученные данные могут свидетельствовать о том, что с увеличением возраста человека (очевидно, под влиянием неблагоприятного воздействия внешней среды и/или дестабилизации внутренней среды организма) «генотип предрасположенности» к развитию пузырьчатки может проявиться фенотипически – в виде проявлений заболевания; при этом определение «маркерного» генотипа имеет значительно более высокую диагностическую значимость у пациентов, у которых заболевание развилось в возрасте старше 60 лет.

В целях определения возможной взаимосвязи между генетической предрасположенностью и клинической формой пузырьчатки был проведен анализ достоверности отличий в распределении аллелей и генотипов в полиморфизмах rs648802/rs648396 гена *PERP* у больных с вульгарной (1-я группа, ВП, 32 человека) и листовидной (2-я группа, ЛП, 15 человек) пузырьчками.

Согласно результатам теста Кохрана-Армитаджа, в распределении генотипов rs648802/rs648396 гена *PERP* у больных вульгарной и листовидной пузырчаткой были отмечены статистически значимые различия ($p=0,0384$) (Таблица 11).

Таблица 11. Сравнение частот распределения аллельных вариантов и генотипов полиморфизмов rs648802/rs648396 3 экзона гена *PERP* в группах пациентов с вульгарной (ВП) и листовидной пузырчаткой (ЛП)

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов полиморфизма rs648396/ rs648802		P	OR [CI 95%]
	ВП (n=32) абс. значение /частота	ЛП (n=15) абс. значение /частота		
Аллель T/C	38/0,59	12/0,4	0,0793	2,19 [0,91-5,31]
Аллель C/G	26/0,41	18/0,6		0,46 [0,19-1,1]
Генотип TT/CC	9/0,28	1/0,07	0,0384 (χ^2 for trend)	5,48 [0,63 – 47,99]
Генотип TC/CG	20/0,63	10/0,67		0,83 [0,23-3,03]
Генотип CC/GG	3/0,09	4/0,26		0,28 [0,05-1,48]

Примечание: для аллельных вариантов - тест хи-квадрат, $df = 1$; для генотипов - тест хи-квадрат, $df = 2$ и тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов, $\chi_1 = [0,1,2]$, $df = 1$.

Данные отличия касались в большей степени гомозиготных (*TT/CC* и *CC/GG*) генотипов. Так, частота встречаемости *TT/CC* – генотипа у больных вульгарной пузырчаткой составила 28,1%, в то время как у больных листовидной пузырчаткой – 6,7%; частота встречаемости *CC/GG* - генотипов у больных вульгарной пузырчаткой составила 9,4%, в то время как у больных листовидной пузырчаткой – 26,3%, что свидетельствует о существовании различий в механизмах развития вульгарной и листовидной пузырчатки, обусловленной генетическими особенностями пациентов.

Таким образом, при изучении частоты встречаемости генотипов полиморфизмов rs648802 и rs648396 3-го экзона гена *PERP* у больных пузырчаткой были получены данные, свидетельствующие о роли гена *PERP* при данном заболевании.

При иммунофлюоресцентном исследовании экспрессии белка PERP в коже больных пузырчаткой установлено наличие отложений структурного белка десмосом PERP в межклеточных промежутках покрывки пузырей, в участках, прилегающих к пузырьным элементам, а также в участках видимо непораженной кожи у больных пузырчаткой и коже здоровых лиц.

Количественный анализ экспрессии белка PERP (количество клеток на 100 базальных кератиноцитов) ($M \pm m$) показал значительно более низкий уровень экспрессии данного белка у больных пузырчаткой в сравнении со здоровыми лицами ($824,60 \pm 35,24$ ед.), как в области покрывки пузыря (зона 1; $309,67 \pm 34,56$ ед.), так и в участках, прилегающих к пузырьному элементу (зона 2; $384,81 \pm 37,10$ ед.) и в видимо непораженной коже больных пузырчаткой (зона 3; $429,20 \pm 49,48$ ед.) ($p < 0,05$). Статистически значимой разницы между количественными показателями экспрессии структурного белка десмосом PERP у больных пузырчаткой в покрывке пузыря ($409,67 \pm 34,56$ ед.), в участках, прилегавших к пузырьному элементу ($484,81 \pm 37,10$ ед.), и в видимо непораженной коже ($529,20 \pm 49,48$ ед.) обнаружено не было ($p > 0,05$).

У больных пузырчаткой выявлена зависимость экспрессии белка PERP от тяжести и длительности течения заболевания (Таблица 12).

Таблица 12. Количественные показатели экспрессии структурного белка десмосом PERP в коже больных пузырчаткой в зависимости от тяжести течения заболевания

Показатель/ Группа пациентов по степени тяжести	Средние количественные показатели экспрессии белка PERP в коже больных пузырчаткой, ед. ($M \pm m$)		
	в покрывке пузыря	в видимо здоровой коже рядом с пузырем	в видимо непораженной коже
Легкая степень (1) (n=11)	$387,45 \pm 14,78$	$511,68 \pm 42,39$	$702,58 \pm 78,44$
Средняя степень (2) (n= 10)	$467,33 \pm 94,05$	$470,81 \pm 33,83$	$363,46 \pm 82,72$
Тяжелая степень (3) (n=9)	$481,90 \pm 56,38$	$506,33 \pm 24,72$	$113,66 \pm 74,42$
p_{1-2}	$p > 0,05$	$p >,05$	$p < 0,05$
p_{1-3}	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
p_{2-3}	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$

При исследовании биоптатов кожи, полученных из участков видимо непораженной кожи больных пузырчаткой, выявлено статистически значимое снижение экспрессии белка PERP при увеличении тяжести заболевания (у больных легкой степенью - $702,58 \pm 78,44$ ед., средней степенью - $363,46 \pm 82,72$ ед., тяжелой степенью - $113,66 \pm 74,42$ ед. ($p < 0,05$)).

Установлена обратная корреляционная связь между количественными показателями экспрессии белка PERP в участке видимо здоровой кожи и длительностью заболевания у больных пузырчаткой ($r = -0,5$; $p < 0,05$).

Полученные данные позволяют сделать заключение об участии структурного белка десмосом PERP в патогенезе пузырчатки. Выявленный у больных пузырчаткой дефицит структурного компонента десмосом – белка PERP может обуславливать процесс акантолиза, способствуя снижению адгезии и потере связей между клетками, нарушению межклеточных контактов в эпидермисе.

Определение экспрессии толл-подобного рецептора 7 типа у больных пузырчаткой

Для изучения роли толл-подобного рецептора 7 типа у больных пузырчаткой определялась экспрессия гена *TLR7* в участках видимо непораженной кожи 38 больных пузырчаткой и 24 здоровых лиц методом ПЦР в реальном времени. В качестве эндогенного контроля использовались «нормировочные» гены, относительно которых производился расчет экспрессии *TLR7* (гены «домашнего хозяйства», *housekeeping genes* (β -актин и *PANK*)), экспрессия которых считается стабильной для человека.

Как следует из представленных данных, при расчете экспрессии гена *TLR7* по отношению к нормировочному гену β -актин у больных пузырчаткой был выявлен статистически значимо более высокий уровень экспрессии *TLR7* ($249,95 \pm 21,89$ OE) по сравнению со здоровыми лицами ($186,13 \pm 17,76$ OE; $p < 0,05$). Экспрессия *TLR7* по отношению к гену *PANK* была также статистически значимо выше у больных пузырчаткой ($2,96 \pm 0,34$ OE) по сравнению со здоровыми лицами ($1,61 \pm 0,23$ OE) ($p < 0,05$).

В результате выполнения исследований методом ПЦР-РТ показано, что уровень экспрессии гена *TLR7* в коже больных пузырчаткой, выраженный в условных относительных единицах (по отношению к нормировочному гену β -актин - $249,95 \pm 21,89$ OE; по отношению к нормировочному гену *PANK* - $2,96 \pm 0,34$ OE), статистически значимо превышал экспрессию данного гена по сравнению с контрольной группой (показатели, соответственно, $186,13 \pm 17,76$ OE и $1,61 \pm 0,23$ OE; $p < 0,05$), что может свидетельствовать о повышении транскрипционной активности генома больных пузырчаткой и активации сигнальных путей в клетках (Таблица 13).

Таблица 13 - Уровень экспрессии гена *TLR7* в коже больных пузырчаткой и здоровых лиц, OE (M \pm m)

Группы	Уровень экспрессии <i>TLR7</i> (M \pm m)	Уровень экспрессии <i>Actin</i> (M \pm m)	Нормализованная <i>TLR 7/ Actin</i>	Уровень экспрессии <i>TLR7</i> (M \pm m)	Уровень экспрессии <i>PANK</i> (M \pm m)	Нормализованная <i>TLR 7/ PANK</i>
Больные пузырчаткой (n= 38)	$33,25 \pm 8,42$	$23,18 \pm 5,54$	$249,95 \pm 21,89$	$31,34 \pm 2,78$	$27,99 \pm 3,03$	$2,96 \pm 0,34$
Здоровые лица (n=24)	$32,34 \pm 7,19$	$20,38 \pm 6,68$	$186,13 \pm 17,76$	$33,25 \pm 3,35$	$30,51 \pm 2,98$	$1,61 \pm 0,23$
p ₁₋₂			<0,05			<0,05

Примечание.*- уровень экспрессии выражен в условных относительных единицах экспрессии - относительных единицах (OE); M- среднее значение; m - ошибка среднего значения

Согласно результатам корреляционного анализа Спирмена в изучаемых выборках, с помощью W-теста Шапиро-Уилка, коэффициент корреляции (rs) для показателей уровня антител к десмоглеину 1 типа и уровня экспрессии гена *TLR7/PANK* равен 0,819 ($p=0,046$), что соответствует сильной выраженности силы связи. Коэффициент корреляции (rs) для показателей уровня антител к десмоглеину 3 типа и уровня экспрессии гена *TLR7/PANK* равен 0,225 ($p>0,05$), что соответствует слабой выраженности связи.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено статистически значимое повышение экспрессии гена *TLR7* в коже больных

пузырчаткой. Сильная прямая корреляционная связь между уровнем антител к десмоглеину 1 типа, определяемым в крови (увеличивающимся при поражении кожи больных пузырчаткой), и повышением экспрессии *TLR7* в коже больных свидетельствует о наличии связи между структурами врожденного иммунитета и компонентов адаптивного иммунитета при пузырчатке. Высокие концентрации *TLR7* в эпителиоцитах кожи могут приводить к нарушению функционирования иммунной системы, что приводит к увеличению выработки пемфигусных аутоантител и активации процессов акантолиза.

Разработка подходов к патогенетической терапии больных пузырчаткой

На первом этапе проведения экспериментальных работ получены препараты суммарных IgG из пула сывороток крови 78 больных пузырчаткой, содержащие антитела к Dsg3 (часть пропущена через образцы иммуносорбента) и 100 здоровых лиц методом аффинной хроматографии.

Работы в системах *in vivo* для создания экспериментальной модели пузырчатки проводились на 99 лабораторных животных; для оценки эффективности разработанного иммуносорбента по степени сорбции антител к Dsg3 - на 43 лабораторных животных (неонатальных мышах инбредной линии BALB/) с клиническим осмотром (n=142); патоморфологическим (n=142) и нРИФ (n=142) исследованием аутопсийного материала мышей.

В соответствии с разработанной технологической последовательностью методом аффинной хроматографии созданы образцы иммуносорбентов для селективного связывания IgG к десмоглеину 3 типа, циркулирующих в крови больных пузырчаткой, в виде крупнозернистой агарозной матрицы Affi-Gel-15 (Bio-Rad, США) с ковалентно связанным человеческим рекомбинантом Dsg3, полученным методом генной инженерии, («R&D Systems», США). Образцы использованы для проведения экспериментов по оценке эффективности сорбции аутоантител к Dsg3 из суммарных IgG, выделенных из пула сывороток крови больных пузырчаткой; образцов крови больных пузырчаткой (*in vitro*) и на экспериментальной модели пузырчатки (*in vivo*).

Проведена серия экспериментов по созданию модели пузырчатки на лабораторных животных (новорожденных мышах инбредной линии белых мышей BALB/c), в ходе проведения которых определяли дозу препарата суммарных IgG и время, необходимое для развития признаков пузырчатки. Клинические симптомы пузырчатки в виде единичных пузырьков и эрозий в абдоминальной области были выявлены у животных основной группы, которым вводили препараты IgG, полученные из пула сывороток больных пузырчаткой, в дозе 30 мг/мышь со временем экспозиции 24, 36 и 48 часов соответственно. При патоморфологическом исследовании аутопсийного материала кожи мышей патогномичный признак пузырчатки - акантолиз с формированием пузыря - выявлялся во всех гистологических препаратах животных основной группы, которым были введены антитела в количестве 30 мг/мышь, как однократно, так и двукратно, со временем экспозиции 18, 24, 48 часов. При исследовании криосрезов кожи мышей из основной группы, которым были введены препараты IgG от больных пузырчаткой, методом нРИФ обнаружена фиксация человеческих IgG в межклеточных промежутках эпидермиса у всех мышей, которым был введен препарат суммарных IgG от больных пузырчаткой в дозе 30 мг/мышь, вводимых как одно-, так и двукратно, при времени экспозиции 48 часов. При исследовании мышей контрольной группы, которым вводили препараты суммарных IgG, выделенные из сывороток крови здоровых лиц, клинические признаки пузырчатки не выявлены; в аутопсийном материале мышей патоморфологические признаки, характерные для пузырчатки, не зарегистрированы; фиксация человеческих IgG в эпидермисе кожи мышей не наблюдалось.

Таким образом, создание экспериментальной модели пузырчатки на неонатальных мышах инбредной линии BALB/c путем введения препаратов IgG от больных пузырчаткой, подтверждено развитием у лабораторных животных признаков пузырчатки, определяемых клиническими, патоморфологическими и иммуногистохимическими методами исследования. Учитывая, что наибольшее количество признаков пузырчатки было зарегистрировано при введении

препаратов IgG в дозе 30 мг/мышь, для экспериментального воспроизведения пузырчатки на неонатальных мышах инбредной линии BALB/c рекомендуется проведение экспериментов с данной дозой препарата IgG.

Для оценки степени сорбции антител селективным иммуносорбентом *in vivo* при пассивном переносе лабораторным животным препаратов IgG, очищенных от антител к десмоглеину 3 типа на селективном иммуносорбенте, клинические, патоморфологические и иммуногистохимические признаки пузырчатки не выявлены. Такие же результаты были получены при введении лабораторным животным препаратов IgG, полученных от здоровых лиц.

При оценке эффективности иммуносорбента по степени сорбции антител к Dsg3 из суммарных IgG, полученных из пула сывороток крови больных пузырчаткой, *in vitro* установлено, что оптическая плотность препарата, содержащего IgG к Dsg3, полученного от больных пузырчаткой (0,892) была в 6,8 раз больше, чем в препаратах, полученных от здоровых лиц (0,132) (минимальная оптическая плотность, при которой результат определения антител к Dsg3 считается положительным, 0,174). После прохождения через селективный иммуносорбент оптическая плотность антител - IgG к десмоглеину 3 типа, полученных от больных пузырчаткой, уменьшилась до 0,339. Изменение активности IgG в препаратах, выделенных из пула сывороток крови больных пузырчаткой, до и после прохождения иммуносорбента, составляло 62,0%, что свидетельствовало о значительном снижении активности IgG в препаратах антител после прохождения сывороток через разработанный иммуносорбент.

При однократной сорбции антител к Dsg3 из крови больных пузырчаткой с разной активностью на Affi-gel-Dsg3 во всех случаях отмечено уменьшение титра антидесмоглеиновых антител. Установлено, что эффективность удаления антител к Dsg3 из крови больных пузырчаткой зависит от исходной концентрации антител. Наиболее высокая эффективность сорбции (88%) зафиксирована при исследовании сывороток с низким уровнем антител (40 RU/ml). В то время как из крови больных пузырчаткой с высоким содержанием специфических антител (1100 RU/ml) возможно удаление до 42% антител. Таким

образом, в результате проведенных исследований разработаны экспериментальные подходы к патогенетической терапии больных пузырчаткой, основанные на применении иммуносорбента для селективного связывания антител к Dsg3 из крови больных пузырчаткой.

Выводы

1. Сравнительный анализ диагностической значимости клинических индексов для оценки степени тяжести больных пузырчаткой PDAI, ABSIS, PVAS с высокой степенью достоверности ($0,001 < p < 0,05$) выявил, что наиболее информативным показателем является индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI) ($p < 0,05$).

2. При определении уровня циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных вульгарной и листовидной пузырчаткой установлены статистически значимые различия. У больных вульгарной пузырчаткой уровень антител к десмоглеину 3 типа ($146,20 \pm 16,20$ RU/ml) выше, чем у больных листовидной пузырчаткой ($35,54 \pm 10,90$ RU/ml) ($p < 0,001$). У больных листовидной пузырчаткой уровень антител к десмоглеину 1 типа ($147,43 \pm 17,57$ RU/ml) выше по сравнению с больными вульгарной пузырчаткой ($88,36 \pm 16,60$ RU/ml) ($p < 0,001$), что свидетельствует о различиях в механизмах развития клинических форм заболевания.

Доказана прямая связь между уровнем антител к Dsg3 и Dsg1 и степенью тяжести при пузырчатке, определяемой индексом PDAI ($0,001 < p < 0,05$). Установлена связь между уровнем антител к Dsg1 и степенью тяжести, определяемой с использованием подиндексов поражения кожи, уровнем антител к Dsg3 и степенью тяжести, определяемой с помощью подиндексов поражения слизистых оболочек клинического индекса площади поражения при пузырчатке (PDAI).

3. При изучении частоты встречаемости полиморфизма гена *PERP* у больных пузырчаткой установлено, что гетерозиготные генотипы *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396) в 3-м экзоне гена *PERP* встречаются в 2,86 раза чаще, чем у здоровых лиц ($p < 0,05$). При легкой степени тяжести

пузырчатки выявлено преобладание аллелей C/G и гомозиготных генотипов CC/GG полиморфизмов rs648802/rs648396; при среднетяжелой и тяжелой степенях заболевания установлено преобладание аллелей T/C полиморфизмов rs648802/rs648396.

Экспрессия структурного белка десмосом PERP в области покрывки пузыря (309,67±34,56 ед.), в участках кожи, прилегающих к пузырьным элементам (384,81±37,10 ед.) и видимо непораженной коже (429,20±49,48 ед.) у больных пузырчаткой значительно снижена в сравнении со здоровыми лицами (824,60±35,24 ед.) ($p<0,05$) и зависит от тяжести и длительности заболевания ($p<0,05$). Полученные данные позволяют считать ген *PERP* молекулярно-генетическим предиктором развития пузырчатки и подтвердить участие структурного белка десмосом PERP в патогенезе пузырчатки.

4. Исследование уровня экспрессии гена *TLR7* в коже больных пузырчаткой показало, что данный показатель по отношению к нормировочным генам β -актин (249,95±21,89 ОЕ) и *PANK* (2,96±0,34 ОЕ) статистически значимо превышал экспрессию гена по сравнению со здоровыми лицами (показатели соответственно 186,13±17,76 ОЕ и 1,61±0,23 ОЕ; $p<0,05$). Выявлена сильная корреляционная связь между показателями уровня антител к десмоглеину 1 типа и уровнем экспрессии гена *TLR7/PANK* ($rs=0,819$, $p=0,0462$), указывающая на роль *TLR7* в увеличении выработки пемфигусных аутоантител.

5. Разработанный подход к терапии больных пузырчаткой, основанный на селективной сорбции антител к десмоглеину 3 типа, показал высокую эффективность в эксперименте. Селективный иммуносорбент, полученный путем ковалентного связывания крупнозернистой агарозной матрицы с человеческим рекомбинантным десмоглеином 3 типа, продемонстрировал высокие сорбционные характеристики: снижение уровня антител к Dsg3 из суммарных IgG, выделенных из пула сывороток крови больных пузырчаткой на 62,0% (*in vitro*); предотвращал развитие клинических, патоморфологических и иммуногистохимических признаков пузырчатки на лабораторных животных (*in*

vivo); значимое уменьшение уровня антител класса G из крови больных пузырчаткой.

Практические рекомендации

1. Для клинической оценки тяжести пузырчатки рекомендуется использовать индекс определения площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index). При суммарном показателе PDAI от 0 до 30 баллов состояние больного оценивается как легкой степени тяжести, от 31 до 60 - средней степени тяжести, более 61 - тяжелая степень тяжести заболевания.

2. Для оценки степени тяжести пузырчатки рекомендуется определение уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типов методом иммуноферментного анализа. Легкая степень тяжести заболевания определяется у больных пузырчаткой при уровне антител к Dsg3 до 100 RU/ml и уровне антител к Dsg1 до 80 RU/ml, средняя степень тяжести – при уровне антител к Dsg3 от 101 RU/ml до 200 RU/ml и уровне антител к Dsg1 от 81 RU/ml до 160, тяжелая степень – при уровне антител к Dsg3 более 201 RU/ml и уровне антител к Dsg1 более 161 RU/ml.

3. Для дифференциальной диагностики пузырчатки в качестве дополнительного критерия рекомендуется определение антител к десмоглеинам 1 и 3 типов методом иммуноферментного анализа: при поражении слизистых оболочек рта - определение антител к десмоглеину 3 типа, при поражении кожи - антител к десмоглеину 1 типа, при поражении кожи и слизистых оболочек - антител к десмоглеинам 1 и 3 типов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кубанов А.А. Анализ факторов, провоцирующих развитие истинной акантолитической пузырчатки / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Научные материалы V Всероссийского конгресса дерматовенерологов, 17–20 сентября 2013. – Казань, 2013. – С. 26.

2. **Кубанов А.А. Диагностика истинной акантолитической пузырчатки методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии / А.А. Кубанов, О.Р. Катунина, Т.В. Абрамова и др. // Российский иммунологический журнал / Russian Journal of Immunology. – 2013. – Т.7(16), № 2–3. – С. 232–233.**

3. **Кубанов А.А. Роль полиморфизмов гена PERP в развитии акантолиза у больных истинной акантолитической пузырчаткой / А.А. Кубанов, А.В. Миченко, Т.В. Абрамова и др. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2013. – № 5. – С. 69–77.**
4. **Кубанов А.А. Исследование экспрессии белка PERP в коже больных истинной акантолитической пузырчаткой / А.А. Кубанов, О.Р. Катунина, Т.В. Абрамова и др. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2013. – № 6. – С. 59–65.**
5. Kubanov A.A. Gene PERP polymorphisms rs648802 and rs648396 in patients with autoimmune acantholytic pemphigus / A.A. Kubanov, A.V. Michenko, T.V. Abramova et al. // XI International Congress of Dermatology and 42–nd Annual Conference of IADV, December 4–7, 2013 – India. – P. 127.
6. Кубанов А.А. Ошибки в диагностике истинной акантолитической пузырчатки / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Научные материалы V Всероссийского конгресса дерматовенерологов, 17–20 сентября 2013. – Казань, 2013. – С. 26–27.
7. **Кубанов А.А. Возможная роль толл–подобного рецептора 7 типа в развитии истинной акантолитической пузырчатки / А.А. Кубанов, А.В. Миченко, Т.В. Абрамова и др. // Цитокины и воспаление. – 2013. – Том 12, № 4. – С. 11–17.**
8. Кубанов А.А. Изучение полиморфизмов в белок–кодирующей последовательности гена PERP у больных истинной акантолитической пузырчаткой / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова, А.В. Миченко и др. // Научные материалы V Всероссийского конгресса дерматовенерологов, 17–20 сентября 2013. – Казань, 2013. – С. 27.
9. **Кубанов А.А. Участие структур врожденного иммунитета в патогенезе акантолитической пузырчатки / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова, О.Р. Катунина и др. // Российский иммунологический журнал / Russian Journal of Immunology. – 2013. – Т.7(16), №2–3. – С. 233.**
10. Кубанов А.А. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в дифференциальной диагностике истинной акантолитической пузырчатки и буллезного пемфигоида / А.А. Кубанов, О.Р. Катунина, Т.В. Абрамова и др. // Научные материалы XXXI научно–практической конференции Рахмановские чтения, 24 января 2014. Дерматология в России. 2014; 3. 2014. – Москва. – С. 38.
11. Кубанов А.А. Экспрессия белка PERP в коже больных истинной акантолитической пузырчаткой / А.А. Кубанов, О.Р. Катунина, Т.В. Абрамова и др. // Научные материалы XXXI научно–практической конференции Рахмановские чтения, 24 января 2014. Дерматология в России. 2014; 3.– 2014. – Москва. – С. 39.

12. **Кубанов А.А. Роль аутоантител в развитии истинной акантолитической пузырчатки / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Цитокины и воспаление. – 2014. – Том 13, № 1. – С. 102–103.**
13. Кубанов А.А. Оценка экспрессии апоптотического эффектора белка p53 (PERP) в коже больных истинной акантолитической пузырчаткой / А.А. Кубанов, О.Р. Катунина, Т.В. Абрамова и др. // Научные материалы XXI Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 7–14 апреля 2014. – Москва. – 132 с.
14. Kubanov A.A. Confocal laser scanning microscopy in diagnostic procedure of bullous dermatoses / A.A.Kubanov, O.R. Katunina, T.V. Abramova et al. // 11th EADV Spring Symposium "Tradition and Innovation", 22 – 25 May, 2014. – Belgrade, Serbia. – P. 223.
15. **Кубанов А.А. Селективная иммуносорбция в терапии истинной акантолитической пузырчатки / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Цитокины и воспаление. – 2014. – Том 13, № 1. – С. 103.**
16. Kubanov A.A. Polymorphisms in protein coding sequence of gene PERP in patients with autoimmune pemphigus / A.A. Kubanov, A.V. Michenko, T.V. Abramova et al. // 11th EADV Spring Symposium "Tradition and Innovation", 22 – 25 May, 2014. – Belgrade, Serbia. – P. 224.
17. **Кубанов А.А. Современные методы терапии истинной акантолитической пузырчатки / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. – № 4. – С. 19–27.**
18. Кубанов А.А. Морфометрические параметры экспрессии белка PERP в биоптате больных пемфигусом / А.А. Кубанов, О.Р. Катунина, Т.В. Абрамова // Научные материалы XIV Всероссийского конгресса дерматовенерологов, 24–27 июля 2014. – Москва, 2014. – С. 25.
19. Kubanov A.A. Problems in the diagnosis of pemphigus vulgaris / A.A. Kubanov, T.V. Abramova, N.V. Griбанov // 23rd EADV Congress, 8–12 october, 2014. – Amsterdam, the Netherlands. – P. 232.
20. **Кубанов А.А. Исследование фиксации аутоантител в коже больных вульгарной пузырчаткой при изолированном поражении слизистой оболочки полости рта / А.А. Кубанов, О.Р. Катунина, Т.В. Абрамова // Цитокины и воспаление. – 2014. – Том 13, № 3.–С. 109–110.**
21. **Кубанов А.А. К вопросам диагностики истинной акантолитической пузырчатки / А.А. Кубанов, Л.Ф. Знаменская, Т.В. Абрамова и др. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. – № 6. – С. 121–130.**
22. Рог К.В. Разработка экспериментальной модели истинной пузырчатки на лабораторных животных и перспективы ее применения в создании новых методов диагностики и терапии / К.В. Рог, Т.В. Абрамова // Научные материалы

XV Всероссийского конгресса дерматовенерологов, 23–26 июня 2015. – Москва, 2015. – С. 26–27.

23. Кубанов А.А. Пузырчатка: учеб. пособие / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования». – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015. – 54 с.

24. Кубанов А.А. Экспрессия проапоптотического белка у больных пузырчаткой / А.А. Кубанов, О.Р. Катунина, Т.В. Абрамова // Цитокины и воспаление. – 2014. – Том 13, № 4. – С. 31–36.

25. Kubanov A. Immunomorphological analysis of desmosomal protein PERP in pemphigus patients' skin / A. Kubanov, O. Katunina, T. Abramova // 23th World Congress of Dermatology, 8.06.2015–13.06.2015. – Vancouver, Canada. – 2015. – P. 2946650.

26. Кубанов А.А. Современные подходы к диагностике пузырчатки методом реакции непрямой иммунофлюоресценции с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова, В.А. Смольяникова // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17, №3s. – С. 90.

27. Кубанов А.А. Дифференциальная диагностика буллезных дерматозов: учеб. пособие / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова, Л.Ф. Знаменская и др. // ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования». – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015. – 56 с.

28. Кубанов А.А. Распознающие рецепторы врожденного иммунитета (толл-подобные рецепторы) в патогенезе заболеваний кожи / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Цитокины и воспаление. – 2015. – Том 14, № 1. – С. 11–18.

29. Кубанов А.А. Диагностика буллезных дерматозов с поражением слизистой оболочки рта / А.А. Кубанов, Е.Г. Сабанцева, Т.В. Абрамова и др. // Стоматология. – 2015. – Т. 94, №4. – С. 49–52.

30. Кубанов А.А. Экспериментальное моделирование пузырчатки на животных / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова, П.А. Калинина // Биомедицина. – 2015. – № 3. – С. 78–87.

31. Kubanov A.A. Epidemiology of pemphigus in 2011–2014 in Russian Federation / A.A. Kubanov, E.V. Bogdanova, T.V. Abramova et al. // 24th EADV Congress, 7–11 october, 2015. – Copenhagen, Denmark. – P. 0248.

32. Кубанов А.А. Разработка экспериментальной модели вульгарной пузырчатки на лабораторных животных / А.А. Кубанов, А.Э. Карамова, Т.В. Абрамова и др. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2015. – № 4. – С.76–83.

33. Kubanov A.A. Selective immunoadsorption of antibodies to desmoglein 3 of patients with pemphigus vulgaris / A.A. Kubanov, S.V. Rotanov, T.V. Abramova // 13th EADV Spring Symposium, 19–22 may, 2016. – Athens, Greece. – P. 0110.
34. Кубанов А.А. Модель твердофазного сорбента для селективного удаления аутоантител к десмоглеину 3 типа из крови больных вульгарной пузырчаткой / А.А. Кубанов, А.Э. Карамова, Т.В. Абрамова и др. // Научные материалы XVI Всероссийского съезда дерматовенерологов, 14–17 июня 2016. – Москва, 2016. – С. 17–18.
35. **Кубанов А.А. Применение клинико-диагностических индексов в оценке тяжести пузырчатки (сравнительный анализ) / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2016. – №3. – С. 36–46.**
36. Kubanov A.A. Experimental models of autoimmune pemphigus in mice / A.A. Kubanov, T.V. Abramova, A.E. Karamova et al. // 25th EADV Congress, 28 september – 2 october, 2016. – Vienna, Austria. – P. 0335.
37. **Кубанов А.А. Дифференциальная диагностика пузырных дерматозов / А.А. Кубанов, Л.Ф. Знаменская, Т.В. Абрамова // Вестник дерматологии и венерологии. - 2016. - №6. – С. 43–56.**
38. Пат. на изобретение 2613718 от 21.03.2017 Российская Федерация, МПК G09B 23/28 (2006.01). Способ моделирования пузырчатки у мышей методом введения иммуноглобулинов класса G / А.А. Кубанова, А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова и др.; заявитель и патентообладатель ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России / заявл. 2015150125 от 24.11.2015; опубл. 21.03.2017. Бюл. №9; приоритет 24.11.2015. – 11 с.; ил.
39. Пат. на изобретение 2622005 от 08.06.2017 Российская Федерация, МПК G01N 33/53 (2006.01). Способ получения селективного иммуносорбента для удаления антител-IgG к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови больных пузырчаткой / А.А. Кубанова, А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова и др.; заявитель и патентообладатель ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России; заявл. 2015150126 от 24.11.2015; опубл. 29.05.2017, Бюл. № 16; приоритет 24.11.2015. – 16 с.; ил.
40. Пат. на изобретение 2627652 от 09.08.2017. МПК G01N 33/53 (2006.01), G01N 33/548 (2006.01). Российская Федерация Применение селективного иммуносорбента для удаления антител к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови у больных пузырчаткой / А.А. Кубанова, А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова и др. // заявитель и патентообладатель ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России; заявл. 2016129257 от 18.07.2016; опубл. 09.08.2017, Бюл. № 22; приоритет 18.07.2016. – 21с.; ил.
41. **Кубанов А.А., Абрамова Т.В. Экспрессия гена toll-подобного рецептора 7-го типа в коже больных пузырчаткой / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова //**

Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2017. – № 20(2). – С. 98.

42. Kubanov A.A. Diagnostic value of clinical and laboratory methods in pemphigus patients / A.A. Kubanov, T.V. Abramova // 14th European Academy of Dermatology and Venereology Spring Symposium. – Brussels, Belgium 25.05.2017– 28.05.2017. – P. 277.

43. **Кубанов А.А., Абрамова Т.В. Диагностическая значимость методов исследования при обследовании больных акантолитической пузырчаткой / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Медицинская иммунология. - 2017. - Т. 19. – С. 256-257.**

44. **Кубанов А.А. Экстракорпоральные методы терапии пузырчатки / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова, Е.К. Мураховская и др. // Лечащий врач. - 2017. - №5. – С. 38–41.**

45. **Смольянникова В.А. Опыт использования конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в диагностике буллезных дерматозов / В.А. Смольянникова, М.А. Нефедова, Т.В. Абрамова и др. // Клиническая и экспериментальная морфология - 2017. - № 2(22). – С. 35–40.**

46. Kubanov A.A. Diagnostic relevance of different pemphigus vulgaris activity indices / A.A. Kubanov, T.V. Abramova, A.V. Asoskova // 15th European Academy of Dermatology and Venereology Spring Symposium. – Budva, Montenegro, 03.05.2018–06.05.2018. – P. 491.

47. Abramova T.V. Selective immunosorbent: developing a new tool for pemphigus vulgaris treatment / T.V. Abramova, A.A. Kubanov, D.G. Deryabin et al. // 15th European Academy of Dermatology and Venereology Spring Symposium. – Budva, Montenegro, 03.05.2018–06.05.2018. – P. 315.

48. **Кубанов А.А. Диагностическая значимость клинических индексов для оценки тяжести больных пузырчаткой / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Научные материалы XVIII Всероссийского съезда дерматовенерологов, 15-18 мая 2018. – Москва, 2018. – С. 15.**

49. Kubanov A.A. Selective immunoabsorption of anti-Desmoglein-3 autoantibodies in pemphigus vulgaris / A.A. Kubanov, T.V. Abramova, M.V. Shpilevaya // 24 World Congress of Dermatology (WCD 2019). – Milano, Italy, 10.06.2019–15.06.2019. – P. 322.

50. Kubanov A.A. Toll-like receptor 7 (*TLR7*) gene expression in pemphigus vulgaris patients / A.A. Kubanov, T.V. Abramova // 24 World Congress of Dermatology (WCD 2019). – Milano, Italy, 10.06.2019–15.06.2019. – P. 491.

Список сокращений и обозначений

- ИФА иммуноферментный анализ
- КГ контрольная группа
- КЛСМ конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
- нРИФ реакция непрямой иммуофлюоресценции
- ОГ основная группа
- ОТ–ПЦР (reverse transcription polymerase chain reaction – RT–PCR) полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ПЦР–РВ (Real–Time PCR) ПЦР в режиме «реального времени»
- ФИПС Федеральный институт промышленной собственности
- ABSI (Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score) оценка тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи
- Affi-gel - аффигель, гель для аффинной хроматографии
- Dsg десмоглеин
- EADV (European Academy of Dermatology and Venerology) Европейская академия дерматологии и венерологии
- IgG иммуноглобулин G класса
- OR (Odds Ratio) отношение шансов
- PDAI (Pemphigus Disease Area Index) индекс площади поражения при пузырчатке
- PERP (англ. «p 53 apoptosis effector related to PMP–22») мембранный белок, необходимый для реализации функций десмосом в коже и слизистых оболочках; апоптотический эффектор белка p53, относящийся к периферическим миелиновым белкам–22
- PERP* ген, кодирующий белок PERP
- PVAS (Pemphigus Vulgaris Activity Score) индекс активности вульгарной пузырчатки
- Real–Time RCR ПЦР в реальном времени
- SNP (single nucleotide polymorphism) однонуклеотидный полиморфизм — отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности)
- TLR (toll–like receptor) толл–подобный рецептор
- BALB/c (Bagg albino C) инбредная линия белых мышей

Автореферат напечатан по решению Диссертационного совета Д 208.115.01
ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России _____20__г.

Подписано в печать20__г.. Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1,0. Т

Тираж 100 экз.