

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИИ И
КОСМЕТОЛОГИИ" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

АБРАМОВА ТАТЬЯНА ВАЛЕРЬЕВНА

**«Пузырчатка: иммунопатогенез, диагностика и патогенетическая терапия
(клинико-экспериментальное исследование)»**

14.01.10 – кожные и венерические болезни

**Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

**Научный консультант:
член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор
А.А. Кубанов**

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ВЗГЛЯДЫ НА ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ, ДИАГНОСТКУ И МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ ПУЗЫРЧАТКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	19
1.1 Эпидемиология пузырчатки.....	19
1.2 Роль генетической предрасположенности в развитии пузырчатки.....	20
1.3 Роль толл-подобных рецепторов в развитии пузырчатки.....	24
1.4 Современная концепция патогенеза пузырчатки.....	28
1.4.1 Аутоантитела при пузырчатке.....	28
1.4.1.1 Антитела и клинический фенотип пузырчатки.....	32
1.4.2. Антигены при пузырчатке.....	35
1.4.2.1 Структурный компонент десмосом белок PERP и ген <i>PERP</i>	36
1.4.3 Патофизиология акантолиза при пузырчатке.....	38
1.5 Клиническая картина пузырчатки.....	41
1.5.1 Клинические индексы в оценке тяжести пузырчатки.....	44
1.6 Методы диагностики пузырчатки.....	52
1.7 Современные методы терапии пузырчатки.....	56
1.8 Экспериментальное моделирование пузырчатки.....	70
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	75
2.1 Материалы исследования.....	75
2.2 Методы исследования.....	76
2.2.1 Клиническое обследование больных пузырчаткой.....	79
2.2.1.1 Оценка степени тяжести пузырчатки с использованием клинических индексов.....	80
2.2.2 Цитологическое исследование мазков-отпечатков для определения акантолитических клеток Тцанка.....	85
2.2.3 Первичная обработка биопсийного материала.....	85
2.2.4 Морфологическое исследование.....	86
2.2.5 Реакция непрямой иммунофлюоресценции с использованием <i>ex vivo</i>	

конфокального лазерного сканирующего микроскопа для выявления фиксированных антител (IgA, IgM, IgG).....	87
2.2.6 Реакция иммунофлюоресценции с использованием <i>ex vivo</i> конфокального лазерного сканирующего микроскопа для изучения экспрессии структурного белка десмосом белка PERP.....	89
2.2.7 Метод обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов в режиме реального времени для количественного определения экспрессии гена толл-подобного рецептора 7 типа (<i>TLR7</i>).....	91
2.2.8 Иммуноферментный анализ для определения антител к десмоглеинам 1 и 3 типов.....	94
2.2.9 Метод секвенирования по Сенгеру для определения нуклеотидной последовательности гена <i>PERP</i>	97
2.2.10 Методологии, использованные при получении экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных.....	100
2.3.10.1 Выделение и очистка антител класса G из сывороток крови больных пузырчаткой и здоровых лиц методом аффинной хроматографии.	100
2.2.10.2 Проведение экспериментальных работ с введением лабораторным животным (новорожденным мышам линии BALB/c) препаратов суммарных IgG человека.....	104
2.2.11 Технологии, использованные при создании иммуносорбента для селективного удаления аутоантител к Dsg3 из крови больных пузырчаткой.....	108
2.2.11.1 Иммуносорбция антител к десмоглеину 3 типа из препаратов суммарных IgG, полученных из пула сывороток крови больных пузырчаткой.....	111
2.2.11.2 Применение иммуносорбента для удаления антител к Dsg3 из крови больных пузырчаткой.....	112
2.2. Статистическая обработка данных.....	114

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БОЛЬНЫХ ПУЗЫРЧАТКОЙ.....	116
3.1 Клиническая характеристика больных пузырчаткой.....	116
3.2 Клинические индексы в оценке тяжести пузырчатки.....	128
3.2.1 Индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index) в оценке тяжести больных пузырчаткой.....	129
3.2.2 Балльная оценка тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи (ABSIS, Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score) в оценке тяжести больных пузырчаткой.....	132
3.2.3 Индекс активности вульгарной пузырчатки (PVAS, Pemphigus Vulgaris Activity Score) в оценке тяжести больных пузырчаткой.....	135
3.2.4 Корреляция индексов PDAI, ABSIS, PVAS и DIDS у больных пузырчаткой.....	137
Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ БОЛЬНЫХ ПУЗЫРЧАТКОЙ.....	141
4.1 Результаты цитологического, морфологического, иммунофлюоресцентного методов исследования при обследовании больных пузырчаткой.....	141
4.2 Результаты изучения уровня циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных пузырчаткой	145
4.3 Результаты изучения патогенетической роли гена <i>PERP</i> и кодируемого им структурного белка десмосом <i>PERP</i> в развитии пузырчатки.....	153
4.3.1 Характеристика белок-кодирующей последовательности экзонов гена <i>PERP</i> у больных пузырчаткой и оценка возможной взаимосвязи полиморфизмов с клиническими особенностями заболевания.....	153
4.3.2 Результаты определения экспрессии белка <i>PERP</i> в коже больных пузырчаткой	166
4.4 Оценка роли толл-подобного рецептора 7 типа в патогенезе пузырчатки на основании изучения его экспрессии в коже больных	172

методом ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени.....

Глава 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	178
5.1 Создание экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных (неонатальных мышах инбредной линии BALB/c).....	178
5.2 Разработка и оценка <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> эффективности экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой.....	187
5.2.1 Создание иммуносорбента для селективного связывания и удаления аутоантител - IgG к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой.....	187
5.2.2 Оценка <i>in vitro</i> эффективности экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из суммарных IgG, выделенных из сывороток крови больных пузырчаткой.....	191
5.2.3 Оценка <i>in vivo</i> эффективности экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой.....	193
5.2.4. Оценка <i>in vitro</i> эффективности экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой.....	197
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	205
ВЫВОДЫ.....	223
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	225
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	226
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	228
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	257

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Пузырчатка - буллезный дерматоз, характеризующийся поражением кожи и/или слизистых оболочек. Распространенность пузырчатки в Российской Федерации, согласно данным официальной государственной статистики, в 2012 году составляла 2,3, в 2013 году - 2,1, в 2014 году – 4,9 случая на 100 000 взрослого населения. Распространенность пузырчатки в Российской Федерации, согласно данным Федерального статистического наблюдения, в 2012 году составляла 2,3, в 2013 году - 2,1, в 2014 году -4,9 случая на 100 000 взрослого населения. В странах Европы распространенность варьирует от 0,08 до 1,6 случаев на 100 000 населения в год (Ljubojević S. et al., 2002; Wolff K. et al., 2012).

Ведущая роль в патогенезе пузырчатки отводится аутоиммунным реакциям, приводящим к акантолизу (Торсуев Н.А. и соавт., 1979; Кубанова А.А. и соавт., 2009; Самцов А.В. и соавт., 2012). В настоящее время считается, что у пациентов, генетически предрасположенных к развитию пузырчатки, антигенпредставляющие (например, дендритные) 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.В. и соавт., 2008, Хайтов Р.М., 2010; Катунина О.Р., 2011; Kawai T. et al, 2010; Gibson J. et al. 2010; Drexler S.K. et al., 2010). В

единичных работах указывается на возможное участие толл-подобного рецептора 7 типа в развитии акантолиза (Schiavo A. L. et al., 2008; Bauza A. et al., 2009; Sebaratnam D.F. et al., 2011). Исследований по изучению роли толл-подобных рецепторов в патогенезе пузырчатки раннее 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, 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; R.J. Ludwig, 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., 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) (Pfütze 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; Молочков В.А. и соавт., 2002; Махнева Н.В. и соавт., 2003; Eming R. et al., 2006; 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).

Таким образом, результаты изучения патогенеза пузырчатки на иммунологическом и молекулярно-генетическом уровне позволят 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 улучшит 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 на моделях *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) 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 PERP 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 сыворотки крови больных пузырчаткой. Разработка метода селективной иммуносорбции пемфигусных антител станет основой для создания нового метода терапии больных пузырчаткой.

Внедрение результатов исследования

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 г.Москвы, ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, ВПО ГБОУ ВПО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России. Результаты работы включены в учебно-методические пособия: "Дополнительная профессиональная программа профессиональной переподготовки врачей по специальности «Дерматовенерология»", "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"; учебные пособия: "Пузырчатка", "Дифференциальная диагностика буллезных дерматозов".

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 *PERP* 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 *PERP* является значимой, приводит к снижению экспрессии структурного белка десмосом *PERP* и к нарушению функций десмосом по обеспечению межклеточной адгезии в коже.

3. Селективное удаление антител к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови больных пузырчаткой с использованием иммуносорбента на основе твердофазного носителя, ковалентно связанного с рекомбинантным человеческим десмоглеином 3 типа, является перспективным направлением экстракорпоральной терапии больных тяжелым аутоиммунным дерматозом.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Степень достоверности результатов работы определяется дизайном исследования, адекватным поставленной цели и решаемым задачам, наличием репрезентативной выборки больных пузырчаткой и экспериментальных животных (новорожденных мышей линии BALB/c), использованием современных методов исследования (клинические, цитологическое, патоморфологическое, иммуногистохимические, молекулярно-генетические) и корректными методами статистической обработки данных, соответствующим критериям доказательной медицины.

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на: объединенном иммунологическом форуме – 2013 (VI Съезд иммунологов России, VI Конференция Российского цитокинового общества, VI Конференция по иммунологии репродукции, VI Конференция по нейроиммунологии) (г.Нижний Новгород, Россия, 30 июня - 5 июля 2013г.); V Всероссийском конгрессе дерматовенерологов и косметологов (г.Казань, Россия, 17-20 сентября 2013г.); XI 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 заседании Московского общества дерматовенерологов и косметологов имени А.И. Пospelова (г.Москва, Россия, 17 июня 2014г.); XIV Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (г.Москва, Россия, 24-27 июня 2014г.); 23rd EADV Congress (Amsterdam, the Netherlands, 8-12 October, 2014); научно-практической конференции «Актуальные вопросы дерматовенерологии и косметологии» (г.Москва, Россия, 07 ноября 2014г.); XV Всероссийском научном форуме с международным

участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г.Санкт-Петербург, Россия, 1-4 июня 2015г.); 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.); XII научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование» (Московская область-Светлые горы, 18-19 мая 2016г.); научно-практической конференции ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России (г.Москва, Россия, 20 мая 2016г.); 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 в ФГБУ «Федеральный институт промышленной собственности» РФ: «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» (№ 2613718 2622005), «Применение селективного иммуносорбента для удаления антител к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови у больных пузырчаткой» (№ 2613718 2622005).

Материалы диссертационной работы использовались при выполнении научно-исследовательских работ (НИР): по фундаментальной теме НИР «Изучение молекулярно-биологических механизмов развития пузырчатки», Государственный контракт 114/БУ-2012-051 от 16.01.2012 г. в рамках Государственного задания ФГБУ ГНЦДК Минздрава России на 2012-2014 годы; по прикладной теме НИР «Разработка метода патогенетической терапии больных

пузырчаткой», заказчик работ - Министерство здравоохранения Российской Федерации, регистрационный номер НИОКТР АААА-А15-115120850099-7, дата регистрации 08.12.2015.

Диссертация апробирована и рекомендована к защите на совместной научно-практической конференции ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России и кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава РФ 27.03.2018г., протокол № 1.

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.

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 обследовано 152 больных с буллезными дерматозами, в том числе 132 больных пузырчаткой, и 100 здоровых лиц, сформирована база данных. Автором 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 описание собственных клинико-лабораторных и экспериментальных данных, проведен статистический анализ данных, научно обоснованы результаты, сформулированы выводы, научная новизна и практическая значимость проведенных исследований.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

В соответствии с формулой специальности 14.01.10 - Кожные и венерические болезни, изучающей кожные покровы и видимые слизистые оболочки в норме и патологии, охватывающей проблемы изучения этиологии, патогенеза, диагностики, лечения и профилактики дерматозов, в работе проведено сравнительное изучение диагностической значимости клинических индексов оценки тяжести пузырчатки, сделано заключение о целесообразности использования индекса PDAI; оценен уровень циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных с разными клиническими формами пузырчатки и степенями тяжести заболевания; установлены молекулярно-генетические предикторы развития пузырчатки: гетерозиготные генотипы *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396) в 3-м экзоне гена *PERP*; определена роль структурного белка десмосом *PERP* в развитии акантолиза и клинических проявлений заболевания у больных пузырчаткой; доказана активация сигнальных путей, в которых принимает участие кодируемый геном *TLR7* белок, и участие *TLR7* в патогенезе пузырчатки; разработан подход к патогенетической терапии больных пузырчаткой с использованием селективного иммуносорбента для элиминации антител к десмоглеину 3 типа.

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.

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 338 источников, из них 102 российских и 238 зарубежных авторов.

Глава 1

СОВРЕМЕННЫЕ ВЗГЛЯДЫ НА ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, КЛИНИКУ, ДИАГНОСТИКУ И МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ ПУЗЫРЧАТКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Эпидемиология пузырчатки

Распространенность пузырчатки в странах Европы варьирует от 0,08 до 1,6 случаев на 100 000 населения в год (Ljubojević S. et al., 2002; Wolff K. et al., 2012). В некоторых популяциях распространенность пузырчатки составляет 0,1-0,5 на 100 000 человек в год и выше (Venugopal S.S., 2011). Так, распространенность пузырчатки в Финляндии составляет 0,076, во Франции - 0,155-0,17 (в районе центральных Пиренеев - 2,7), в Италии - 0,3, в Швейцарии - 0,6 случаев на 100 000 населения (Marazza G. et al., 2010; Thomas M. et al., 2010).

Отмечается, что высокий уровень распространенности аутоиммунных буллезных дерматозов в некоторых этнических группах (например, высокий уровень заболеваемости вульгарной пузырчаткой среди евреев-ашкенази, у лиц, проживающих в районах Средиземноморья; высокий уровень заболеваемости листовидной пузырчаткой в Бразилии) может быть обусловлен генетическими факторами или влиянием окружающей среды (Alpsoy E., 2015).

В Российской Федерации, согласно данным Федерального статистического наблюдения, в 2014 году распространенность пузырчатки составила 4,9 случая на 100 000 взрослого населения, заболеваемость 2,0 на 10 тысяч населения (Ресурсы и деятельность медицинских организаций дермато-венерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными заболеваниями и болезнями кожи. Статистические материалы, 2013; 2014, 2015; Кубанова А.А. и соавт., 2014; 2015).

Пузырчаткой болеют люди всех возрастов, но, преимущественно в возрасте 40-60 лет, описаны случаи заболевания у детей (Кубанова А.А., 2010; Музыченко А.П. и соавт., 2017; Daneshpazhooch M., 2012; Ghiasi M. et al., 2017; Surya V. et al., 2018). В последние годы увеличилась заболеваемость пожилых людей (Hofmann

S.C. et al., 2018). В большинстве исследований отмечается преобладание пузырчатки среди лиц женского пола (Соколовский Е.В., 1999; Alpsoy E. et al., 2015; Ghiasi M. et al., 2017). При анализе гендерного распределения больных пузырчаткой в Японии M. Amagai et al. (2014) определили, что соотношение мужчин и женщин составляло 1:1,5. Исследователи из Великобритании отметили, что число женщин среди больных вульгарной пузырчаткой составило 66%. Эти же авторы отметили ежегодный рост заболеваемости данным буллезным дерматозом на 11% (Langan S.M. et al., 2008).

Факторами, провоцирующими возникновение пузырчатки, могут служить разнообразные физические, химические и биологические воздействия, в частности, избыточная инсоляция, жаркий климат, психогенные расстройства, вирусные и бактериальные инфекции, хирургические и косметические процедуры, лечение препаратами, содержащими сульфгидрильную группу, а также некоторыми другими медикаментами (пенициллином, D-пеницилламином, каптоприлом, ампициллином и др.) (Чистякова И.А. и соавт., 2008; Гайнулин Ш.М. и соавт., 2011; Давиденко Е.Б., Махнева Н.В. и соавт., 2012; 2013; Теплюк Н.П. и соавт., 2017; Kalantari M. et al., 2010; Brenner S., Goldberg I., 2011; Spoljar S. et al., 2012; Ruocco V. et al., 2013; Alpsoy E. et al., 2015; Akarsu S. et al., 2017; Tavakolpour S., 2018; Min M.S. et al., 2018). Отмечено, что пузырчатка чаще встречается у лиц, занимающихся сельским хозяйством и контактирующих с пестицидами (Tsankov N., Kazandjieva J., 1998; Gaido K., Safe S., 1998). Повышенный риск развития пузырчатки также имеют лица, постоянно контактирующие с металлами (работники типографий, металлоиндустрии) (Tavakolpour S., 2018). Установлено, что в распространении эндемичной формы листовидной пузырчатки (Fogo seivagem) в Южной Америке определенную роль играют насекомые-переносчики (Waschke J., 2008).

1.2 Роль генетической предрасположенности в развитии пузырчатки

В настоящее время доказано, что развитие пузырчатки наблюдается у генетически предрасположенных пациентов. Генетическую предрасположенность

организма к этому заболеванию подтверждает обнаружение на популяционном уровне сочетания пузырчатки с особым HLA (HLA-DQ и HLA-DR4) гаплотипом (Давиденко Е.Б., Махнева Н.В., 2012). Многочисленными исследованиями показано, что корреляция развития пузырчатки с различными аллелями генов, кодирующих HLA, обнаруживается в разных странах и регионах мира (Таблица 1).

Таблица 1 - Аллели HLA, ассоциированные с развитием пузырчатки в различных странах

Страна/ регион мира	Аллели HLA	Ссылки
Европа	HLA - DR4 (DRB1*0402, *0406; DQB1*0302), HLA - DR14 (DRB1*1401, *1405; DQB1*0503)	Lombardi M.L. et al., 1999
Турция	HLA-B35, B44, CW4, DR4, DR14, DQ4 и DQ8	Birol A. et al., 2002; Tunca M. et al., 2012
Япония	HLA-B1*1507 HLA-DRB1*04, DRB1*14	Yamamoto T. et al., 2011; Miyagava S. et al., 1997
Тунис	HLA-DR3 DRB1*03, DQB1*0302 и DRB1*04	Abida O. et al., 2009
Северная Америка	DRB1*0402 и DQB1*0503	Lee E., Lendas K.A., 2005

К.W. Wucherpfennig et al. (1995) установлено, что склонность к развитию пузырчатки ассоциирована с DR4 подтипом (DRB 1*0402), при котором кислотные остатки присутствуют в локусах p70 и p71 в «кармане» P4, обеспечивая отрицательный заряд на поверхности молекулы. P. Loiseau et al. (1999) получены данные о том, что ассоциированные с вульгарной пузырчаткой молекулы DRB 1*14/0406 способны презентировать пептиды Dsg1 и Dsg3, что может объяснять развитие вульгарной пузырчатки с формированием аутоантител к Dsg3 и Dsg1 и поражением кожи и слизистых оболочек.

Ассоциация HLA-DRB1*04 и DRB1*1401 аллелей с предрасположенностью к развитию вульгарной пузырчатки показана S. Shams et al. (2009).

Статистически значимая ассоциация генотипов DRB1*04, DRB1*08 и

DRB1*14 с развитием пузырчатки продемонстрирована в метаанализе, проведенном L. Yan et al. (2012). D. Svecova et al. (2015) показано, что аллели HLA DRB1* and DQB1* влияют на восприимчивость к пузырчатке и могут обуславливать тяжесть течения и тип пузырчатки. Авторы считают, что генетический фон может способствовать исходу заболевания, влияя на характер течения заболевания и эффективность лечения, потому что некоторые из аллелей значительно чаще обнаруживаются у пациентов с тяжелой формой заболевания.

Однако наблюдения за родственниками больных пузырчаткой с одинаковым генотипом указывают на то, что за формирование аутоантител и клинической картины заболевания при пузырчатке ответственны не только аллели главного комплекса гистосовместимости, но и однонуклеотидные полиморфизмы генов, кодирующих различные молекулы, участвующие в развитии патологического процесса (Yamamoto T. et al. 2011). Так, F. Caron et al. (2005) показано, что дополнительным фактором риска, предрасполагающим к развитию вульгарной пузырчатки, может быть генетическая вариабельность гена, кодирующего десмоглеин 3 типа (Dsg3) по полиморфным локусам rs8085532, rs3911655, rs3848485, rs3794925 и rs1466379.

Группой французских исследователей выявлена ассоциация развития листовидной пузырчатки с полиморфным вариантом гена, кодирующего десмоглеин 1, содержащим замену Т на С в положении 809 у больных европеоидной расы (Martel P., Gilbert D. et al., 2001). Это в дальнейшем было подтверждено при эндемической листовидной пузырчатке в Тунисе (Ayed M.B., Martel P. et al., 2002), но не было установлено в бразильской популяции (Petzl-Erlar M.L., Malheiros D., 2005).

Ряд публикаций показал возможность влияния однонуклеотидных полиморфизмов генов, кодирующих молекулы сигнальных путей и костимулирующие молекулы на восприимчивость к развитию пузырчатки. Так, R. Dalla-Costa et al. (2010) при сравнительном анализе 18 полиморфизмов, находящихся в хромосомном регионе 2q33 и 3q21 (регион, ответственный за активацию и взаимодействие корцептора Т-клеток CD86 с лигандами семейства

В7 (CD80 и CD86) на антигенпрезентирующих клетках) 269 пациентов с листовидной пузырчаткой и 395 лиц группы контроля евро-бразильской и афро-бразильской популяции установлен ряд ассоциаций однонуклеотидных генетических полиморфизмов (CD86 1057G>A, CTLA4-1722T>C, CTLA4-318C>T, CTLA4 (AT)п, CD28 (CAA)п, и D2S72 (CA) п) с развитием листовидной пузырчатки (Dalla-Costa R., Pincerati M.R. et al., 2010). J. Narbutt et al. (2010) установлена ассоциация генетических полиморфизмов генов, кодирующих костимулирующие молекулы CTLA4 (+49A/G) и ICOS (IVS1+173), с развитием вульгарной и листовидной пузырчатки среди лиц польской популяции.

Противоречивый характер носят данные о влиянии на предрасположенность к развитию пузырчатки генетического полиморфизма цитокинов. Так, изучение полиморфизмов генов, кодирующих ряд цитокинов, проведенное J. D. Torzecka et al. (2003), Y. Eberhard et al. (2005), J. Javor et al. (2009) не выявило значимой ассоциации генетического полиморфизма цитокинов с развитием пузырчатки, либо связь была слабой. В то же время, в исследовании N.F. Pereira et al. (2004) выявлена ассоциация с развитием вульгарной пузырчатки Т/Т-генотипа гена *IL4* в позиции -590 и G аллеля гена *IL6* в позиции -174. Y. Eberhard et al. (2005) выдвинуто предположение о цитокиновом полиморфизме, который может явиться фактором предрасположенности к развитию пузырчатки. Авторами установлена ассоциация с развитием заболевания аллеля Т в позиции - 819 гена *IL-10*. Y.M. Mosaad et al. (2012) выявлена более высокая частота С аллеля и СС/ГС генотипа *IL-6* в позиции -174 у больных вульгарной и листовидной пузырчаткой в египетской популяции (Mosaad Y.M. et al., 2012).

O. Sarig et al. (2012) при проведении исследований с использованием полногеномного скрининга ассоциаций (GWAS - genome-wide association studies) выявлена ассоциация с развитием пузырчатки полиморфного варианта гена *ST18*, кодирующего транскрипционный фактор, регулирующий воспаление и апоптоз; данная ассоциация наблюдалась в популяции евреев и египтян, но отсутствовала у обследованных немцев. Позже I. Etesami et al. (2018) установили, что однонуклеотидный полиморфизм в *ST18* повышает экспрессию *ST18*, индуцирует

секрецию цитокинов, увеличивает восприимчивость креатиноцитов к антидесмоглеиновым антителам.

D. Malheiros et al. (2014) при изучении экспрессионного профиля 135 генов, кодирующих CD4+ Т лимфоциты, показана возможная роль дифференцированной экспрессии генов, расположенных в хромосомных регионах 19q13 and 12p13, в развитии эндемичной листовидной пузырчатки. Предполагается, что некоторые из этих генов могут явиться терапевтическими мишенями и позволят раскрыть неизвестные аспекты патогенеза пузырчатки (Malheiros D. et al., 2014).

В немногочисленных исследованиях продемонстрирована ассоциация между генетическими вариантами толл-подобных рецепторов и аутоиммунными заболеваниями (системная красная волчанка, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, офтальмопатия Грейвса) (Netea M.G. et al., 2012). J. Tian et al. (2012) обнаружена ассоциация генотипа rs1634323 AG гена толл-подобного рецептора 7 типа с развитием аутоиммунного заболевания - системной красной волчанки у женщин.

Таким образом, роль генетической предрасположенности в развитии пузырчатки, отдельных ее типов и вариантов клинического течения на настоящий момент можно считать доказанной. Полученные данные указывают на возможное влияние не только молекул главного комплекса гистосовместимости, но и однонуклеотидных полиморфизмов генов, кодирующих белки структурных компонентов десмосом, толл-подобные рецепторы, цитокины, молекулы сигнальных путей, и другие регуляторные молекулы, что, ввиду недостатка зарубежных и российских исследований, обуславливает особую актуальность.

1.3 Роль толл-подобных рецепторов в развитии пузырчатки

В настоящее время исследователи уделяют большое внимание изучению естественных защитных реакций организма в патогенезе различных заболеваний. Первой линией защиты организма от патогенов является врожденный иммунитет, компоненты которого не изменяются в течение жизни (Ковальчук Л.В. и соавт., 2008, Катунина О.Р., 2011; Cario E., 2010; Kawai T., Akira S., 2010; Vandana D.P.,

Swaptagni D. et al., 2012). Важнейшие функции врожденного иммунитета реализуются посредством паттерн-распознающих рецепторов, способных узнавать консервативные молекулярные структуры микроорганизмов, так называемые патоген-ассоциированные молекулярные образы (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) (Kawai T., Akira S., 2010). Секретируемые паттерн-распознающие рецепторы, действуя как опсонины, облегчают фагоцитоз микробных клеток. Сигнальные паттерн-распознающие рецепторы распознают консервативные молекулярные структуры микроорганизмов и активируют пути передачи сигнала для экспрессии разнообразных генов иммунного ответа, включая выработку провоспалительных цитокинов (Ковальчук Л.В. и соавт., 2008, Kawai T., Akira S., 2010; Drexler S.K., Foxwell B.M., 2010).

Одним из наиболее значимых представителей семейства сигнальных паттерн-распознающих рецепторов считают толл-подобные рецепторы (TLR), относящиеся к трансмембранным белкам. В настоящее время идентифицированы 13 представителей семейства TLR, среди которых TLR1- TLR9 выявляют у мышей и человека; TLR10 – только у человека; TLR11- TLR13 – только у мышей (O’Neil L.A., Brint E., 2005; Miller L.S., 2008; Vandana D.P. et al., 2012).

Часть TLR (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) экспрессируется на клеточной мембране; они распознают в основном бактериальные антигены (Miller L.S., 2008; Netea M.G. et al., 2012). Другие рецепторы (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) локализуются во внутриклеточных мембранных компартментах (интрацитоплазматических эндосомах), благодаря чему предотвращается контакт этих рецепторов с эндогенными нуклеиновыми кислотами (Sandor F., Buc M., 2005; Kawai T., Akira S., 2011; O’Neil L.A., Brint E., 2011). Группа рецепторов, расположенных в эндосомах, осуществляет распознавание бактериальных и вирусных ДНК и РНК. Лигандами толл-подобных рецепторов могут выступать как экзогенные, так и эндогенные вещества. Экзогенными лигандами TLR являются PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) инфекционных агентов, эндогенными – молекулярные структуры собственного организма, образующиеся

при повреждении клеток (DAMPs - damage associated molecular patterns) или алармины (Xiang M., Fan J., 2010; Cario E., 2010).

Каскад клеточных событий, инициируемых при стимуляции толл-подобных рецепторов, реализуется при участии компонентов, составляющих единую систему: лиганды и распознающие их TLR; гены, кодирующие TLR; мРНК; адаптерные белки, осуществляющие трансдукцию сигнала; эффекторные молекулы, вырабатываемые в результате активации TLR (O'Neil L.A. et al., 2005).

На клеточном уровне эффект стимуляции толл-подобных рецепторов реализуется в трех направлениях. Во-первых, происходит активация фагоцитов и значительное усиление их эффекторного потенциала (фагоцитоза, переваривающей активности, продукции активных форм кислорода). Во-вторых, антиген-специфические клетки адаптивного иммунитета переходят в активированное состояние с усилением эффекторных функций. В частности, зрелые В-лимфоциты увеличивают продукцию иммуноглобулинов и становятся более чувствительными к антигенной стимуляции, а Т-эффекторы наращивают киллерные функции. И, в-третьих, происходит активация (прайминг) наивных лимфоцитов и подготовка их к началу адаптивного иммунного ответа (Akira S., Takeda K., 2005). Указанные эффекты могут вносить существенный вклад в развитие ряда заболеваний, что обуславливает повышенный интерес к фундаментальным исследованиям в данной области.

Таким образом, TLR играют решающую роль в ранней защите организма от патогенов, являются сигнальными паттерн-распознающими рецепторами и считаются ключевыми структурами врожденного иммунитета (Катунина О.Р., 2011; Avalos A. M. et al., 2010), поэтому дефекты в системе TLR (изменение способности распознавать лиганды, нарушение экспрессии TLR, передачи сигнала, выработки эффекторных молекул, а также полиморфизм генов TLR) могут приводить к развитию тяжелых инфекционных, аллергических, онкологических, аутоиммунных и других заболеваний (O'Neil L.A., Brint E., 2005; Huiming Y. et al., 2011; Netea M.G., Wijmenga C. et al., 2012).

В последние годы большое количество научных исследований посвящено изучению структур врожденного иммунитета при различных дерматозах и злокачественных новообразованиях кожи с целью выявления новых механизмов патогенеза заболеваний, патогенетически обоснованных мишеней и создания лекарственных препаратов. Так, О.Р. Катуниной и соавт. (2010) установлено участие TLR2 и TLR4 в патогенезе псориаза. Также имеются работы, посвященные аутоиммунным заболеваниям, связанным с формированием аутоантител, и оценке вклада TLR в патогенез таких заболеваний, как аутоиммунный тиреоидит, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, тромбоцитопеническая пурпура, дерматомиозит (Ruocco E. et al., 2004; Carrasco S. et al, 2011; Tian J. et al., 2012).

Результатом научных работ стал синтез экспериментальных молекул, селективно стимулирующих или блокирующих TLR. Одним из таких препаратов является имиквимод – селективный стимулятор TLR7, используемый при терапии злокачественных опухолей кожи (базалиома, плоскоклеточный рак, некоторые поверхностные меланомы), предраковых новообразований кожи (болезнь Бовена, актинический кератоз) а также остроконечных кондилом (Bilu D., Sauder D.N., 2003) (Рисунок 1).

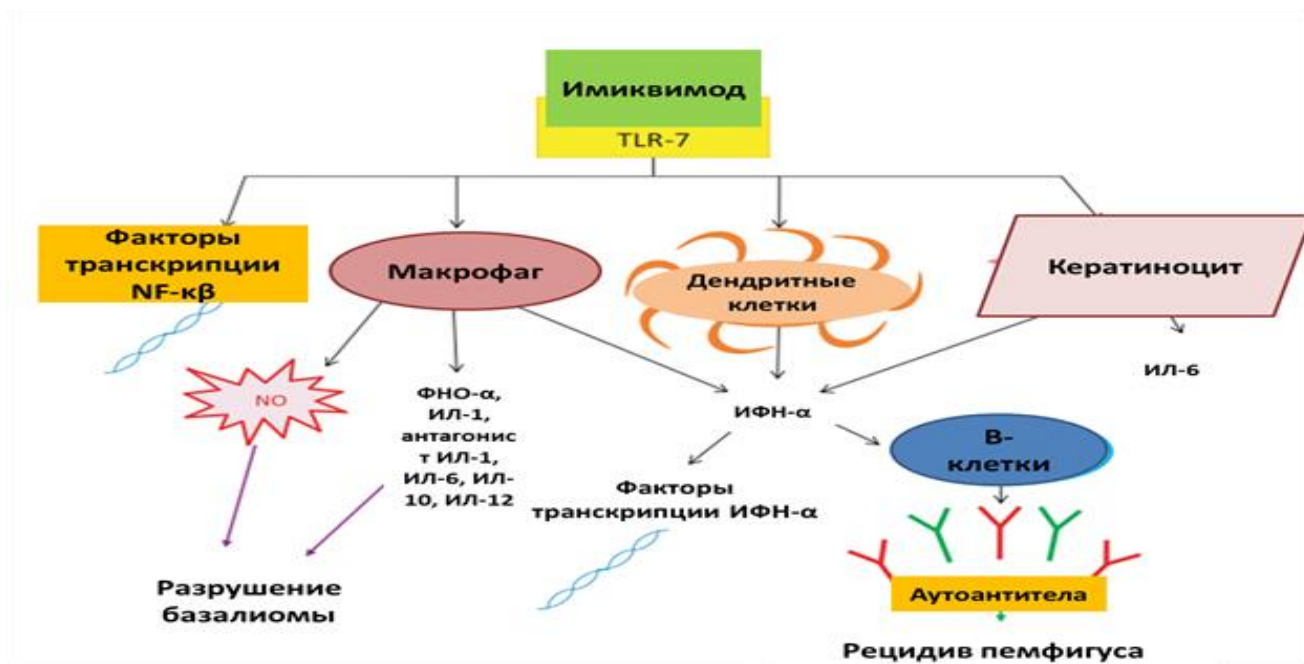


Рисунок 1. Эффекты имиквимода, развивающиеся в результате стимуляции TLR7 (Sebaratnam D.F., Martin L.K., Rubin A.I., 2011)

Механизм действия препарата окончательно не изучен, однако известно, что его эффекты опосредуются активацией иммунных клеток в результате стимуляции TLR7.

Так как имиквимод является в настоящее время единственным лекарственным препаратом, селективно стимулирующим TLR7, анализ данных об эффективности, безопасности и переносимости, получаемых после начала применения имиквимода в практике, может служить источником новых фундаментальных гипотез об участии TLR в патогенезе заболеваний (Schiavo A. L. et al., 2008).

Имеются единичные сообщения о возникновении пузырчатки после применения имиквимода, который назначался пациенткам по поводу злокачественных новообразований кожи, флоридного папилломатоза наружных половых органов и интраэпителиальной неоплазии слизистых оболочек, что может свидетельствовать о возможной роли структур врожденного иммунитета - TLR7 в патогенезе пузырчатки (Lin R. et al., 2004; Mashiah J., Brenner S., 2005; Bauza A. et al, 2009; Sebaratnam D.F. et al. 2011; Shiraishi K. et al., 2018).

Таким образом, имеющиеся в настоящее время научные данные позволяют предполагать участие TLR7 в патогенезе пузырчатки, что обуславливает необходимость проведения исследований, которые будут способствовать расширению сведений о патогенезе пузырчатки и выборе мишеней для терапии.

1.4 Современная концепция патогенеза пузырчатки

1.4.1 Аутоантитела при пузырчатке

Пузырчатка трактуется как аутоиммунное буллезное заболевание, характеризующееся нарушением межклеточных контактов кератиноцитов в супрабазальных слоях эпидермиса вследствие выработки IgG к белкам десмосом (Grando S.A., 1990, 2012; Herrero–González J.E. et al., 2010).

Первые доказательства аутоиммунной природы пузырчатки были получены в начале 60-х годов XX века, когда E. Beutner и R. Jordan впервые обнаружили в сыворотке крови больных пузырчаткой циркулирующие IgG к компонентам

склеивающей субстанции эпидермиса, а также определили присутствие связанных аутоантител на клеточной поверхности кератиноцитов эпидермиса (Beutner E., Jordon R., 1964). Благодаря иммуногистохимическим исследованиям были открыты гликопротеины массой 130 кДа и 160 кДа, названные десмоглеинами 1 и 3 типов соответственно (Dsg1 и Dsg3) (Harman K.E., Gratian M.J. et al., 2000). Десмоглеины являются молекулами клеточной адгезии и вырабатываются клетками кожи и слизистых оболочек.

В последующем исследовании доказали патогенетическую роль при пузырчатке антител к десмоглеинам, что подтверждено следующими фактами: 1) наличием транзиторных пузырных высыпаний на коже новорожденных, рожденных от матерей, больных пузырчаткой; 2) индукцией появления пузырных высыпаний на коже новорожденных мышей, которым вводились иммуноглобулины больных пузырчаткой; 3) регрессом клинической картины после применения экстракорпоральных методов терапии, в частности, иммуноадсорбции, направленных на удаление аутоантител из сыворотки крови (Anhalt G.J., 1982; Roscoe J.T., 1985; Hofmann S.C. et al., 2018).

В настоящее время считается, что у пациентов, генетически предрасположенных к развитию пузырчатки, антиген-представляющие (например, дендритные) клетки, распознав компоненты десмосом как чужеродные, презентируют антиген Т-клеткам (Th0), инициируя их дифференцировку в Т-хелперные (Th) клетки 1-го и 2-го типа. В свою очередь, аутореактивные Т-клетки активируют синтез аутоантител В-клетками (Самцов А.В., 2012; Карачева Ю.В и соавт. 2015; Grando S.A., 2012). Несмотря на противоречивость данных, в большинстве работ при пузырчатке подчеркивается преобладание Th1-опосредованного иммунного ответа (Giordano C.N., Sinha A.A., 2012; Timoteo R.P. et al., 2017).

В аутоиммунных реакциях при пузырчатке обсуждается участие цитокинов, при этом основная роль принадлежит интерлейкинам (IL) -4, -5, -6, -9, -10, -12. В ряде публикаций сообщается об обнаружении повышенного уровня IL-2 и IL-12 при вульгарной и листовидной пузырчатках (Timoteo R.P. et al., 2017). Большой

интерес вызвало обнаружение повышенного уровня фактора некроза опухоли- α в пузырьной жидкости, что послужило основанием для последующих исследований и применения при лечении пузырчатки препаратов антител к фактору некроза опухоли-альфа (Jacobi A. et al., 2005).

Основную патогенетическую роль в формировании пузырей играют циркулирующие аутоантитела, относящиеся к классу иммуноглобулинов G (IgG), обладающие высокой тканевой специфичностью и вызывающие разрушение десмосом вследствие выделения протеолитических ферментов, что приводит к акантолизу (Матушевская Е.В., Кубанова А.А. и др., 1995; Joly P. et al., 2011; Spindler V. et al., 2018). IgG не реагируют ни с одним из антигенов тканей других органов, кроме антигенов межклеточной субстанции многослойного плоского эпителия и телец Гассалья тимуса человека и животных (Махнева Н.В., 2010).

Таким образом, влияние IgG на развитие аутоиммунной пузырчатки не вызывает сомнений. Однако роль субклассов IgG в патогенезе аутоиммунной пузырчатки все еще до конца не ясна. Поскольку субклассы IgG ассоциируются с различными функциональными и антигенными свойствами, то и вопрос изучения их роли в развитии и течении пузырчатки остается до сих пор актуальным. У большинства больных пузырчаткой обнаруживаются IgG всех четырех субклассов (IgG1-4) (Kricheli D. et al., 2000). По данным J.D. Torzecka (2007), в сыворотке больных с активной формой пузырчатки доминируют IgG4 и IgG1 (96% и 76% соответственно), в то время как в стадию ремиссии главная роль принадлежит IgG2 (75%) и IgG4 (37,5%). Однако циркулирующие антитела подклассов IgG2 и IgG4 выявляются и у здоровых родственников больных пузырчаткой (60% и 23,3% соответственно).

Н.В. Махневой и соавт. (2013) выявлено решающее значение в развитии и течении пузырчатки IgG4 и/или IgG1 с доминированием IgG4 на всем протяжении развития иммунопатологического процесса, что совпадает с мнением ряда других авторов. Авторы делают вывод о том, что преобладание IgG1/IgG4 свидетельствует о хронической антигенной стимуляции преимущественно гликопротеиновой природы. По данным A. Nagel et al. (2010), у некоторых

больных вульгарной пузырчаткой обнаруживаются также антитела к Dsg3 классов IgA и IgE.

Несмотря на определенные успехи, достигнутые учеными для доказательства аутоиммунной природы пузырчатки, механизм образования пузырей при этом заболевании изучен недостаточно (Карачева Ю.В. и соавт., 2015; Spindler V., Eming R. et al., 2018). В настоящее время выделяют четыре основные гипотезы воздействия аутоантител на десмоглеины, что приводит к появлению пузырей: 1) связывание IgG с десмосомальным Dsg вызывает разрушение гомофильных связей в последних, приводит к продольному разъединению десмосом и потере межклеточной адгезии (*steric hindrance hypothesis*) (Amagai M. et al., 1992); 2) взаимодействие IgG с Dsg вне десмосом нарушает межклеточные сигнальные пути, что приводит к разрушению цитоскелета или дезорганизации десмосом (*cell signalling hypothesis*) (Delva E. et al., 2008; Müller E.J. et al., 2008); 3) действие IgG приводит к повышению фосфорилирования этого типа кадгеринов и уменьшению количества Dsg3; в результате происходит постепенное «истощение» десмосом и их разрушение (*disassembly depletion hypothesis*); 4) взаимодействие с IgG вызывает эндоцитоз пула Dsg3, расположенного вне десмосом, приводя к дезорганизации десмосом (*nonassembly depletion hypothesis*) (Aoyama Y., 2010).

При исследовании культур кератиноцитов выявлено, что при вульгарной пузырчатке после взаимодействия IgG с Dsg3 количество Dsg3-содержащих десмосом снижается приблизительно на 80%, что приводит к уменьшению клеточной адгезии на 40% (Yamamoto Y. et al., 2007, Kitajima Y., 2013).

Таким образом, в развитии акантолиза при пузырчатке основная патогенетическая роль принадлежит циркулирующим IgG, обладающим высокой тканевой специфичностью. Однако, в современной литературе имеются данные, свидетельствующие в пользу разных гипотез о воздействии аутоантител со структурными компонентами десмосом, что показывает актуальность, масштабность и сложность необходимых дальнейших исследований по изучению действия аутоантител при пузырчатке.

1.4.1.1 Антитела и клинический фенотип пузырчатки

Во многих исследованиях показана вариабельность уровня иммуноглобулинов при пузырчатке в зависимости от тяжести и активности процесса. Однако, единого мнения исследований по данному вопросу нет.

Е.Б. Давиденко (2013) проведен анализ частоты выявления циркулирующих IgG к антигенам межклеточной связывающей субстанции многослойного плоского эпителия, который установил их вариабельность в зависимости от активности дерматоза. Так, циркулирующие IgG чаще обнаруживались в начале заболевания (у 83,3% больных) и в стадии обострения (у 87,5%), реже (у 70 %) они обнаруживались у больных пузырчаткой в стадии клинической ремиссии. Анализ частоты выявления фиксированного IgG показал идентичную картину вариабельности антител в зависимости от периодов развития болезни. Так, в стадии обострения (впервые диагностируемая пузырчатка и стадии обострения) фиксированный IgG выявлялся в 100% случаев, в период клинической ремиссии - в 66,7% случаях (Давиденко Е.Б., 2013; Махнева Н.В. и др., 2013).

В исследовании М. Dhandha et al. (2012) показано, что в острой фазе заболевания уровень антител подклассов IgG1 и IgG4 к Dsg3 в сыворотке крови больных вульгарной пузырчаткой существенно выше, чем у больных в стадии ремиссии и, соответственно выше, чем у здоровых лиц. У пациентов с изолированным поражением слизистых оболочек, а также с поражением слизистых оболочек и кожи, уровень IgG4 к Dsg3 существенно выше по сравнению с пациентами, у которых наблюдалось только поражение кожи.

М. Amagai (1999); J.E. Herrero-González (2010); E. Cozzani (2013) установлена связь между уровнем антител к Dsg1 и Dsg3 и тяжестью поражения при вульгарной пузырчатке, в то время при листовидной пузырчатке, согласно исследованиям В.Е. Cozzani et al. (2013), данная корреляция отсутствовала. Авторы склонны рассматривать патогенность антител к Dsg3 в качестве ключевого фактора, способствующего развитию клинического фенотипа у больных пузырчаткой.

По данным К. Tsunida (2003), М. Ohyama (2003), Свирщевской Е.В., Лысенко А.А., Матушевской Е.В. и соавт. (2009), Р. Joly (2011) антитела к Dsg1 выявляются у 50-60% пациентов с пузырчаткой и значительно реже обнаруживаются антитела к другим белкам. Исследователи также выявили отсутствие антител к Dsg 3 и Dsg1 у ряда больных, что свидетельствует о роли других антигенов в патогенезе заболевания.

В исследованиях Е.В. Матушевской и соавт. (2005), И.Р. Дзущевой (2005) методом ИФА выявлен повышенный уровень циркулирующих антител к Dsg3 человека в сыворотках 80—85% больных пузырчаткой, связь между уровнем антител к Dsg3 и длительностью заболевания не выявлена. Лечение системными глюкокортикостероидами приводило к снижению уровня антител к Dsg3 в сыворотках 80% больных с повышенным титром, однако, встречались случаи клинического улучшения у больных без снижения титра антител к Dsg3 (Матушевская Е.В. и др., 2005; Дзущева И.Р., 2005).

Н. Mortazavi et al. (2008) изучали взаимосвязь титра антител к Dsg3, выявленных методом непрямой иммунофлуоресценции у 91,8% больных, и степени тяжести пузырчатки. Исследователи установили выраженную взаимосвязь титра антител и общего клинического индекса распространенности и активности пузырчатки (РАAS) ($p < 0,001$), а также индексов РАAS для кожи ($p = 0,04$) и слизистых оболочек ($p = 0,04$) (Mortazavi Н., 2008). В. Kumar et al. (2006), De D. Khullar G. et al. (2017) выявили связь титра антител к Dsg3 с тяжестью поражения слизистой оболочки рта, а также взаимосвязь титра антител к Dsg1 с тяжестью поражения кожных покровов.

Согласно результатам А. Belloni-Fortina et al. (2009), тяжесть поражения слизистой оболочки рта у больных пузырчаткой коррелирует с уровнем антител к Dsg1 и Dsg3, а кожи - с уровнем антител к Dsg3.

Существование клинических фенотипов пузырчатки может быть объяснено десмоглеиновой компенсаторной теорией. Тем не менее, некоторые атипичные случаи вульгарной пузырчатки, протекающей с поражением только кожных покровов, в крови которых определяются антитела к Dsg3, не соответствуют этой

теории. Для объяснения расхождения между клиническими фенотипами и профилями антител M.A. Saleh et al. (2015) предполагают гипотезу «патогенной стабильности» IgG против Dsg3. Если активность антител к Dsg3 не достаточна для ингибирования экспрессии Dsg3 на слизистой оболочке рта, но может ингибировать экспрессию Dsg3 в коже, то возможно образование пузырей только на коже.

Хотелось бы отметить, что, по мнению ряда авторов, наличие определенных антител у больных различными видами пузырчатки не является абсолютным диагностическим критерием. Так, по данным S. Khandpur (2010), P.R. Cunha et al. (2014), антитела к Dsg1, и к Dsg3 обнаруживаются лишь у 58% больных листовидной пузырчаткой и у 12% больных эндемической бразильской пузырчаткой. В исследовании A. Belloni-Fortina (2009) антитела к обоим десмоглеинам были выявлены только у 15% больных вульгарной пузырчаткой с изолированным поражением слизистых оболочек.

Ряд авторов утверждает, что уровень IgG к десмоглеинам не всегда коррелирует с тяжестью клинической картины и не может быть использован для прогнозирования обострения или ремиссии заболевания (Abasq C. et al., 2009; De D. et al., 2017). У части пациентов не выявлено корреляции титра антител к Dsg1 и Dsg3 и выраженности клинических проявлений на коже и слизистых оболочках (Belloni-Fortina A. et al., 2009; Öktem A. et al. 2018).

Таким образом, как следует из приведенных данных, на сегодняшний день главенствующей доказанной теорией патогенеза пузырчатки является аутоиммунная теория. Исследователями отмечается важная роль в развитии заболевания антител (IgG) и направленных, прежде всего, к основным структурным компонентам десмосом – десмоглеинам 1 и 3 типа. Показана роль различных типов антител в развитии клинического фенотипа заболевания. В многочисленных исследованиях сделаны попытки установить взаимосвязь частоты выявления антител с тяжестью и активностью заболевания. Однако, полученные результаты носят противоречивый характер, что обуславливает необходимость продолжения исследований в данном направлении.

1.4.2 Антигены при пузырчатке

Основными молекулярными структурами, к которой вырабатываются аутоантитела при пузырчатке, являются кадгериновые белки десмосомального аппарата - десмоглеины 1 и 3 типов (Dsg1 и Dsg3) (молекулярная масса 130kD и 160kD), а так же к десмоколлинам 1-3 типов (Dscs1-3), соединительные (адаптерные) белки (десмоплакин, плакофиллин и плакоглобин) и другие.

Рядом авторов определена зависимость клинической формы пузырчатки от специфических антигенов, к которым образуются антитела (Kitajima Y., 2003; Capon F. U. et al., 2009, Hofmann S.C. et al., 2018; и др.) (Таблица 2).

Таблица 2 - Антигены при пузырчатке

(Gratian M.J., Bhogal B.S. et al., 2002; Kitajima Y., 2003; Capon F. et al., 2009)

Клиническая форма	Специфический антиген	Гистологическая характеристика
Вульгарная пузырчатка	Dsg3, Dsg1	Супрабазальный пузырь
Вегетирующая пузырчатка	Dsg3	Супрабазальный пузырь, акантоз, нейтрофильная эозинофильная инфильтрация
Листовидная пузырчатка	Dsg1	Интраэпидермальный пузырь на уровне зернистого слоя
Эритематозная пузырчатка	Dsg3, Dsg1	Интраэпидермальный пузырь на уровне зернистого слоя
Бразильская эндемическая пузырчатка	Dsg1	Дефект на уровне гранулярного слоя
Герпетиформная пузырчатка	Dsg3, Dsg1	Эозинофильный спонгиоз
Паранеопластическая пузырчатка	Dsg3, плектин, десмоплакин 1, энвоплакин, периплакин	Эпидермальный пузырь, некроз кератиноцитов

Dsg1 и Dsg3 являются основными, но не единственными антигенами при пузырчатке (Öktem A. et al. 2018; Amber K.T., 2018). В работе S.A. Grando (2012) показано, что к настоящему времени выявлено более 40 антигенов-белков десмосомального аппарата с молекулярной массой от 12 до 260 кДа.

Протеомные исследования, проведенные в последние годы, выявили новые антигены, участвующие в нарушении межклеточных контактов при пузырчатке, в том числе из группы холинергических рецепторов ($\alpha 9$ -ацетилхолиновые рецепторы клеточных мембран и пемфаксин), митохондриальные белки, запускающие множество внутриклеточных сигнальных каскадов (Kalantari-Dehaghi M. et al., 2013; Kowalczyk A.P., Green K.J., 2013; Ahmed A.R. et al., 2016; Amber K.T. et al., 2018). Однако антитела к ацетилхолиновым рецепторам не были обнаружены (Таций О.А., Мельникова В.И., 2010).

Таким образом, основными компонентами десмосом, с которыми связываются аутоантитела при пузырчатке, являются $Ca(2+)$ -связывающие белки клеточной адгезии, относящиеся к семейству кадгеринов (десмоглеины 1-4 типов (Dsg1-4), а так же десмоколлины 1-3 типов (Dscs1-3), соединительные (адаптерные) белки (десмоплакин, плакофиллин и плакоглобин). Дефекты в любом из компонентов десмосом могут приводить к нарушению межклеточной адгезии и к образованию пузырей (Дзуцева И.Р. и соавт., 2005; Amagai M. et al., 1999; Arredondo J. et al, 2005; Kitajima Y., 2013; Ahmed A.R. et al., 2016).

1.4.2.1 Структурный компонент десмосом белок PERP и ген *PERP*

Среди многочисленных белков десмосом особый интерес вызывает белок PERP (Kalantari-Dehaghi M. et al., 2011) - трансмембранный полипептид, являющийся членом семейства трансмембранных белков PMP-22/gas3, которые играют двойную роль: являются структурными компонентами миелина и регуляторами клеточного роста (Attardi L.D., Reczek E.E. et al., 2000).

Установлено, что белок PERP является апоптотическим эффектором белка p53 («p53 apoptosis effector related to PMP-22») и обладает проапоптотической функцией (Attardi L., 2000; Davies L. et al., 2009). В последующем M. Bektas et al. (2009) и A.H. Jheon et al. (2011) показали, что этот белок необходим для реализации функций десмосом по обеспечению межклеточной адгезии в коже и слизистых оболочках, регуляции пролиферации кератиноцитов, а также для реализации процессов апоптоза (Bektas M., 2009, Jheon A.H. 2011). Возможно,

существует два механизма PERP-зависимого апоптоза. Во-первых, его сходство с γ -субъединицей кальциевых каналов предполагает наличие порообразующей или канал-образующей активности, способствующей выходу из цитоплазматических хранилищ молекул, критичных для индукции апоптоза. Во-вторых, не исключено, что PERP аналогично белкам KILLER/DR5 и FAS/APO-1/CD95 является "рецептором смерти", принимающим аутокринные или паракринные сигналы (Attardi L.D. et al., 2000; Ihrie R.A. et al., 2005).

Белок PERP локализуется в клетке на митохондриях, цитоплазматической мембране и мембранах аппарата Гольджи. В коже человека белок PERP экспрессируется на поверхности кератиноцитов. Коллективу L. Attardi (2000) удалось продемонстрировать локализацию PERP в десмосомах и подтвердить участие этого белка в адгезии клеток, поскольку созданные ими *PERP*^{-/-} мыши погибали вскоре после рождения в результате формирования внутриэпидермальных пузырей на коже и слизистых оболочках. Число десмосом у *PERP*^{-/-} мышей было снижено, также обнаруживалось нарушение их связи с цитоскелетом клетки.

Кроме обеспечения межклеточной адгезии, PERP регулирует пролиферацию кератиноцитов. Таким образом, было установлено, что у мышей в отсутствие PERP наблюдались нарушения в межклеточной адгезии и дефекты взаимодействия клеток (Ihrie R.A. et al., 2005; Marques M.R. et al., 2006; Johnson, T.M. et al., 2008).

Изучению роли белка PERP в развитии пузырчатки посвящены лишь единичные зарубежные работы, которые проводились на экспериментальных моделях пузырчатки (Nguyen B. et al., 2009, Reaz S., 2013). Иммуногистохимическим методом установлено, что после нанесения иммуноглобулина G белки Dsg3 и PERP отделялись от цитоплазматической мембраны кератиноцитов и вместе со структурным белком десмосом плакоглобином погружались в цитоплазму, где подвергались разрушению в лизосомах.

Таким образом, функции белка PERP многогранны: наряду с участием в реализации апоптоза он регулирует пролиферацию кератиноцитов и обеспечивает межклеточную адгезию. Ген *PERP*, кодирующий белок PERP, был также впервые открыт в 2000 г., когда L.Attardi et al. обнаружили его активацию в процессе апоптоза, индуцируемую непосредственно p53. Ген находится на шестой хромосоме, содержит 19032 пар оснований (п.о.) и включает 3 экзона, кодирующих белковую цепь PERP, длиной в 193 аминокислоты. Первый экзон содержит 397 п.о., второй-140 п.о. и третий-3764 п.о.; длина кодирующей белок последовательности составляет 579 п.о. Кодирует *PERP* четырехтяжевый мембранный белок, необходимый для реализации функций десмосом в коже и слизистых оболочках (Attardi L.D. et al., 2000).

Как упоминалось выше, нарушение функции и дефект структурного белка десмосом PERP может сопровождаться нарушением строения десмосом и способствовать развитию акантолиза под действием аутоагрессивных антител при пузырчатке, что обуславливает необходимость проведения исследований, направленных на изучение экспрессии белка PERP в коже больных пузырчаткой и определение наличия мутаций/полиморфизмов в кодирующем данный белок гене. Подобных исследований по изучению белка PERP, кодирующего его гена у больных пузырчаткой до настоящего времени не проводилось. Принимая во внимание реактивацию гена *PERP* белком p53 в процессе апоптоза, подтверждение активации сигнальных путей апоптоза в процессе акантолиза при пузырчатке (Attardi L.D. et al., 2000; Ihrie R.A. et al., 2005; Arredondo J. et al., 2005; Deb-Basu D. et al., 2006; Lanza A. et al., 2008; Grando S.A. et al., 2009; Dusek, R.L. et al., 2012; Reaz S. et al., 2013), изучение гена *PERP* при пузырчатке представляет особый интерес.

1.4.3 Патопфизиология акантолиза при пузырчатке

Ведущая роль в патогенезе пузырчатки отводится аутоиммунным реакциям, приводящим к акантолизу (Grando S.A., 2012; Giordano C.N., Sinha A.A., 2012). Однако, механизмы акантолиза при пузырчатке окончательно не установлены

(Миченко А.В., Знаменская Л.Ф. и соавт., 2012; Sajda T., Sinha A.A.; 2018).

Существует несколько гипотез развития акантолиза при пузырчатке. Согласно десмоглеиновой гипотезе, аутоантитела против десмоглеинов 3 и/или 1 типов блокируют их адгезивную функцию, что приводит к потере связи между кератиноцитами и влечет за собой развитие акантолиза. Согласно данной гипотезе клинический фенотип заболевания определяется уровнем антител к десмоглеинам (Stanley J, 1982, 1993).

В 1999 году была предложена компенсационная гипотеза развития акантолиза, основанная на особенностях экспрессии десмоглеинов. Известно, что Dsg1 экспрессируется преимущественно в коже, в основном в поверхностных слоях эпидермиса, а Dsg3 - в базальном и супрабазальном слоях эпителия слизистых оболочек и кожи. Согласно данной гипотезе, для обеспечения полноценного межклеточного взаимодействия достаточно одного из десмоглеинов - Dsg1 или Dsg3. При формировании аутоантител к Dsg1 формируются субкорнеальные пузыри на коже, одновременно в эпителии слизистых оболочек, вследствие разрушения Dsg1, наблюдается компенсаторное увеличение Dsg3. И наоборот, при формировании аутоантител к Dsg3 на слизистых оболочках образуются супрабазальные пузыри, а разрушение Dsg3 компенсируется повышением экспрессии Dsg1. Согласно наблюдениям D.A.Oktarina et al. (2011), антитела против Dsg3 при вульгарной пузырчатке вызывают супрабазальный акантолиз, антитела против Dsg1 у больных листовидной пузырчаткой - субкорнеальный акантолиз. Поражение и кожи, и слизистых оболочек наблюдается при одновременном формировании аутоантител к Dsg1 и Dsg3 (Amagai M., 1999; Oktarina D.A.et al., 2011; De D., Khullar G. et al., 2017).

Предполагается, что адгезивную функцию десмоглеинов блокирует присоединение к ним антител, что приводит к разъединению кератиноцитов (Tsunoda K.. et al., 2003). Гипотеза о нарушении прочности контактов из-за снижения экспрессии Dsg3 под действием аутоантител была подтверждена. Показано, что связывание аутоантител с участками Dsg3 вблизи сайта адгезии

«якорь-карман», располагающегося в первом дистальном домене, может приводить к постепенному истощению Dsg3 и десмоколлина 3 типа из десмосом (Свищевская Е.В. и соавт., 2009). Однако компенсационная теория не может полностью объяснить появления внутриэпидермальных пузырей при пузырчатке, так как она не учитывает сложных взаимодействий всех компонентов десмосом. Исключительно Dsg3 не может обеспечить прочность межклеточных контактов десмосом. Это подтверждается экспериментальными исследованиями T.N. Vu, в которых было выявлено отсутствие спонтанного развития пузырей у Dsg3-нокаутных мышей. Это позволило предположить участие в формировании внутриэпидермальных пузырей не только Dsg3, но и других структурных компонентов десмосом, обеспечивающих связь между кератиноцитами (Vu T.N., 1998; Ahmed A.R. et al., 2016).

В 2004 году X. Wang предположил, что ведущую роль в индукции акантолиза при пузырчатке может играть апоптоз кератиноцитов, вызванный нарушением их функционирования из-за потери контакта с соседними клетками (так называемый анойкис). Появляются новые данные (Карачева Ю.В., 2014; Vektas M., 2009; Grando S.A., 2009), подтверждающие участие апоптоза в формировании пузырей при пузырчатке, что позволило S.A.Grando сформулировать новый термин - "аптолиз". Согласно новой гипотезе, аутоантитела активируют сигнальные пути, вызывающие апоптоз и акантолиз. Аутоантитела связываются с антигенами на плазматической мембране кератиноцитов по типу связывания рецептора с лигандом, что приводит к активации рецепторов, сигнальных элементов и инициации молекулярных каскадов запрограммированной гибели кератиноцитов (Grando S.A., 2012). Доказано, что, откладываясь в межклеточных пространствах эпидермиса, антитела иницируют передачу сигналов от мембранных рецепторов в цитоплазму и ядро кератиноцитов. Это приводит к изменениям цитоскелета, погружению десмосом в цитоплазму с их последующим разрушением в лизосомах, активации каскада ферментов апоптоза, деградации и массивному коллапсу структурных белков, что завершается уменьшением объема клеток и, вследствие, разрывом оставшихся десмосом (Карачева Ю.В. и соавт.,

2014; Green K. J., Simpson C.L., 2007; Kalantari-Dehaghi M., 2011; Grando S.A., 2009, 2012). Именно активацией апоптотических сигнальных путей можно было бы отчасти объяснить морфологические изменения клеток эпидермиса при пузырчатке, а именно деградацию и массивный коллапс структурных белков с последующим уменьшением объема клеток. Однако программа апоптоза реализуется не полностью, и клетки не гибнут, а лишь претерпевают морфологические изменения, приводящие к формированию клеток Тцанка и клеток базального слоя, напоминающих надгробные плиты (Grando S.A., 2009, 2012).

Таким образом, механизм акантолиза при пузырчатке до сих пор окончательно не ясен и служит предметом отдельного направления исследований. Для понимания патогенеза пузырчатки актуальной является идентификация механизма действия аутоантител на белки межклеточной адгезии кератиноцитов и эпителия слизистых оболочек. Особый интерес представляет исследование роли апоптоза и проапоптотических белков в потере связи кератиноцитов друг с другом, поскольку выявление механизмов этого явления может способствовать созданию новых лекарственных препаратов, блокирующих акантолиз.

1.5 Клиническая картина пузырчатки

В дерматологической российской и зарубежной литературе пузырчатка представлена следующими формами: вульгарная (малый вариант – вегетирующая) и листовидная (малые варианты - эритематозный пемфигус и герпетиформный пемфигус), паранеоплатическая пузырчатка (Самцов А.В., Белоусова И.Э., 2012; Joly P., Bernard P., 2011; Grando S.A., 2012; Ruocco E. et al.; 2013; Hertl M., Jedlickova H. et al., 2015; Schmidt E., Goebeler M., 2015; Harman K.E., Brown D. et al., 2017; Feliciani C., Cozzani E. et al., 2018).

Японская ассоциация дерматовенерологов в 2014 году предложила классификацию пузырчатки, в которые выделены 3 основные формы: вульгарная, листовидная пузырчатки и другие формы. Другие формы включают паранеопластическую и вегетирующую формы, являющиеся субтипами

вульгарной пузырчатки, эритематозную пузырчатку (или синдром Сенир-Ашера), которые являются подвидами листовидной пузырчатки, а также герпетиформную и лекарственно-индуцированную пузырчатки (Amagai M. et al., 2014). Наиболее распространенной формой заболевания, по их данным, является вульгарная пузырчатка (65%), затем листовидная пузырчатка (23%) и неизвестный тип заболевания (4%) (Amagai M., 2014).

На VI Всемирном рабочем совещании по медицине заболеваний полости рта (World Workshop on Oral Medicine VI) в 2015 году принята классификация пузырчатки, согласно которой определяют следующие ее четыре разновидности: вульгарная, листовидная, IgA-пузырчатка и паранеопластическая пузырчатка (паранеопластический аутоиммунный полиорганный синдром (paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome (PAMS) (McMillan R., 2015). Иммунопатологические механизмы развития PAMS значительно отличаются от иммунопатогенеза при вульгарной пузырчатке (Czernik A., 2011). Некоторые исследователи описывают также герпетиформную пузырчатку, лекарственно-индуцированный пемфигус (развивается чаще всего при назначении D-пенициллина и каптоприла), эндемичную форму листовидной пузырчатки – бразильскую пузырчатку (Махнева Н.В., Молочков В.А., Белецкая Л.В., 2004; Mimouni D., Bar H. et al., 2010; Brenner S., Goldberg I., 2011; Silva J.A., Mesquita Kde C. et al., 2013; Aoi J., Makino K. et al., 2013).

Различными ассоциацией дерматовенерологов (European Academy of Dermatology and Venereology, British Association of Dermatologists) предложено использовать классификацию пузырчатки, в которой выделяют вульгарную (подвид вегетирующая), листовидную (подвид себорейная), паранеопластическую пузырчатки (Ruocco E. et al.; 2013; Hertl M. et al., 2015; Feliciani C. et al., 2018).

Согласно Федеральным клиническим рекомендациям Российского общества дерматовенерологов и косметологов по ведению больных пузырчаткой (2015), различают: пузырчатку обыкновенную, вегетирующую, герпетиформную, листовидную, бразильскую, эритематозную; пузырчатку, вызванную лекарственными средствами, и другие виды пузырчатки. Однако это деление

достаточно условно, так как клиническая картина разных форм пузырчатки может иметь сходство, кроме того, возможен переход одной формы в другую (Ткаченко С.Б., Теплюк Н.П., 2015).

Показана более низкая смертность у больных вульгарной пузырчаткой с изолированным поражением слизистой оболочки (1-17%) по сравнению с больными, у которых наблюдалось поражение кожи и слизистых оболочек (34-42%) (Martin L.K., 2009; Mimouni D., 2010).

Каждая форма пузырчатки отличается клинической картиной, морфологическими и иммуноморфологическими признаками. При вульгарной пузырчатке в 67-85% случаев первые признаки заболевания отмечаются на слизистых оболочках. Поражения слизистой оболочки рта длительное время (до нескольких лет от начала заболевания) остаются основным симптомом (Рабинович О.Ф. и соавт., 2006; Кубанова А.А., 2009; Теплюк Н.П., Махнева Н.В. и соавт., 2015, 2018; Дрождина М.Б., Кошкин С.В. 2017; Baum S., 2014).

При листовидной пузырчатке на коже лица, волосистой части головы, туловища появляются вялые поверхностные пузыри с тонкой покрывкой, при вскрытии которых обнажаются розово-красные эрозии, покрытые пластинчатыми корками, иногда довольно массивными за счет постоянного ссыхания отделяющегося экссудата (Соколовский Е.В., 1999; Прохоренков В.И. и соавт., 2008; Самцов А.В., Белоусова И.Э., 2012; Walker A., Favreau T., 2017). В отличие от вульгарной пузырчатки, при листовидной пузырчатке поражение слизистых оболочек наблюдается крайне редко, даже при распространенном поражении кожи.

Паранеопластическая пузырчатка - заболевание, ассоциированное с опухолями (чаще всего с лимфопролиферативными заболеваниями: лимфоцитарная лейкемия, лимфомы, макроглобулинемия). Клиническая картина паранеопластической пузырчатки достаточно вариабельна, в большинстве случаев наблюдаются поражения слизистых оболочек полости рта и глаз (Самцов А.В., Белоусова И.Э., 2004; Теплюк Н.П., 2006; Махнева и соавт., 2015; 2018; Уфимцева М.А., Бочкарев Ю.М. и соавт., 2017; Silva J.A., 2013, Aoi J., 2013).

Лекарственная пузырчатка развивается после приема лекарственных препаратов. По мнению К.Yoshimura (2014), самой распространенной причиной лекарственной пузырчатки являются препараты, содержащие сульфгидрильную группу (SH-группу) (пеницилламин, буцилламин, тиопронин, пироксикам, пиритинол и препараты золота). До появления пузырей у больных развиваются неспецифические эритематозные или папуло-везикулезные высыпания (Самцов А.В., Белоусова И.Э., 2012; Feng S., Zhou W. et al., 2009).

Герпетиформная пузырчатка - атипичная форма пузырчатки, которая в ряде случаев напоминает герпетиформный дерматит Дюринга. Высыпания могут быть в виде поверхностных пузырьков и эритематозных бляшек и разрешаются после применения глюкокортикостероидных препаратов. Заболевание может прогрессировать, приобретая признаки вульгарной или листовидной пузырчатки (Самцов А.В., Белоусова И.Э., 2012; Hofmann S.C. et al., 2018).

Таким образом, клиническое течение пузырчатки, ее прогноз, продолжительность жизни больного зависят от ряда факторов: своевременной диагностики и назначения адекватной терапии, проводимой под диспансерным наблюдением дерматовенеролога. Многолетние клинические наблюдения продемонстрировали, что течение пузырчатки носит индивидуальный характер. В связи с чем возникает вопрос о возможности и необходимости прогнозирования течения болезни на ранних стадиях, при проведении диагностики и планировании терапевтических мероприятий.

1.5.1 Клинические индексы в оценке тяжести пузырчатки

В последние десятилетия представления о патогенезе пузырчатки значительно расширились, увеличился арсенал терапевтических возможностей. Для объективной оценки состояния больного, эффективности лечебных мероприятий, а так же сравнения результатов научных исследований при оценке и сравнении эффективности различных методов терапии применяются индексы, основанные на комплексной оценке состояния больного. Например, для оценки тяжести течения распространенных дерматозов применяются общепризнанные

клинико-диагностические индексы (PASI при псориазе, SCORAD при атопическом дерматите). Однако, универсальный инструмент для оценки тяжести клинического течения пузырчатки отсутствует (Martin L.K., 2009). В качестве такого инструмента могут быть использованы клинические индексы, отражающие тяжесть клинического течения пузырчатки (Chams-Davatchi С., 2013; Tjokrowidjaja A., 2013; Zhao С.Y., 2015). Однако следует отметить, что создание универсальных систем оценки тяжести пузырчатки затруднительно, что объясняется разнообразием клинической картины и редкостью дерматоза (Murrell D.F. et al., 2008). В течение последних 20 лет учеными разных стран предложен ряд индексов, позволяющих оценивать степень тяжести пузырчатки, динамику течения патологического кожного процесса, эффективность терапии, в том числе при использовании новых методов терапии (Таблица 3). Однако, ни один из них не является общепризнанным мировым сообществом.

Правило девяток Уоллеса (правило девяток) впервые опубликовано А.В. Wallace 1951 году в качестве инструмента для использования в неотложной медицинской помощи для определения площади поверхности тела (BSA), пострадавшего от ожога. Правило девяток отличается простотой в использовании и доступностью применения в любых условиях (Wallace A.B., 1951). Однако, по мнению S. Kalra (2006), правило девяток целесообразно использовать при оценке только ожогового поражения кожи, к тому же исследователь отмечает его субъективность.

Шкала «общей оценки врача» (PGA) применяется для рутинной оценки воспалительных заболеваний кожи и при проведении клинических исследований. Значения, полученные при оценке состояния больного пузырчаткой по шкале PGA, могут варьировать от 0 (отсутствие изменений) до 10 баллов (наиболее тяжелое поражение кожи и слизистых оболочек). Шкала PGA может применяться при обследовании больных псориазом, лимфомой, экземой, дерматомиозитом. Она удобна в использовании, однако, вследствие субъективности, также широкого распространения не получила (Guzzo C.A. et al., 1991; Langley R.G. et al., 2004; Rosenbach M. et al., 2009; Daniel B.S. et al., 2012).

Таблица 3 - Клинические индексы для оценки степени тяжести пузырчатки

№	Индекс	Сокращенное Название	Английское Название	Год	Авторы
1.	Правило девяток Уоллеса	Правило девяток	Wallace's rule of nines	1951	Wallace A.B., 1951
2.	Шкала «общей оценки врача»	PGA	Physician's Global Assessment	1991	Guzzo C.A., 1991; Langley R.G., 2004
3.	Дерматологический индекс тяжести заболевания	DIDS	Dermatology Index of Disease Severity	1997	Faust H.B. et al., 1997
4.	Индекс тяжести пораже ния при пузырчатке по Икеда	Индекс Икеда	Severity Index for Pemphigus Ikeda	1993, поправки в 1997, 2000	Ikeda S. et al., 2003
5.	Оценка площади поражения и активности пузырчатки	PAAS	Pemphigus Area and Activity Score	1998	Agarwal M., 1998;
6.	Система оценки по Харману	Harman's scoring system	Harman's scoring system	2001	Harman K.E., 2001
7.	Система градации для пузырчатки слизистой оболочки рта	Индекс Saraswat	Sops-Saraswat's oral pemphigus scoring	2003	Saraswat A., 2003
8.	Система оценки Махаджана	MSS	Mahajan's scoring system	2005	Mahajan V.K., 2005
9.	Индекс площади поражения при пузырчатке	PDAI	Pemphigus Disease Area Index	2008	Murrell D.F., 2008
10.	Индекс Кумара	KSS	Kumar's scoring system	2006	Kumar, 2006
11.	Балльная оценка тяжести аутоиммунных буллезных заболеваний кожи	ABSIS	Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score	2007	Pfütze M., 2007
12.	Оценка активности вульгарной пузырчатки	PVAS	Pemphigus Vulgaris Activity Score	2013	Chams-Davatchi C., 2013

Дерматологический индекс тяжести заболевания (DIDS) предложен для оценки степени тяжести заболеваний кожи с учетом площади поражения и степени функциональных ограничений кожи. Первым компонентом индекса является оценка степени поражения поверхности тела, вторым - функциональные ограничения при выполнении повседневных действий в быту и на работе. Индекс предлагается для оценки тяжести псориаза, атопического дерматита и ряда других дерматозов (Faust H.V. et al., 1997). Однако, дерматологический индекс тяжести заболевания так же имеет субъективный характер.

Индекс тяжести поражения при пузырчатке по Икеда (индекс Икеда) включает следующие параметры оценки степени тяжести патологического процесса при пузырчатке: доля пораженных участков кожи от площади всей поверхности тела (в %); наличие или отсутствие симптома Никольского; количество вновь появившихся пузырей за день; наличие или отсутствие поражения слизистых оболочек; титр антител. Каждому параметру присваивается значение от 0 до 3, максимальное значение индекса Ikeda составляет 15 баллов (Ikeda S., Imamura S. et al., 2003). Однако, в последующем, группами ученых B.S. Daniel и соавт. (2012) и H. Benchikhi и соавт. (2013) он признан недостаточно объективным (Daniel B.S. et al., 2012; Benchikhi H. et al., 2013).

Оценка площади поражения и активности пузырчатки (РААС) была разработана на основе индекса PASI. При подсчете индекса РААС (кожа) оценивается количество очагов и площадь поражения поверхности тела. Для подсчета индекса все тело человека делится на 4 сегмента (голова, туловище, верхние и нижние конечности). Критерии, по которым оценивается активность заболевания в сегментах: а) количество новых пузырей, появившихся за 1 день; б) периферический рост существующих элементов; с) наличие прямого и/или краевого симптома Никольского. Общий балл РААС (кожа) представляет собой сумму баллов всех сегментов (Agarwal M. et al., 1998).

Отдельно рассчитывается индекс РААС для слизистых оболочек с учетом: а) количества пораженных участков на слизистых оболочках; б) степени их поражения. Итоговый индекс РААС определяется в виде суммы балльных оценок

поражения кожи и слизистых оболочек (Agarwal M. et al., 1998; Адаскевич В.П., 2014).

По мнению M.Pfütze et al. (2006), S.Grover (2011), B.S. Daniel et al. (2012), индекс RAAS имеет ряд недостатков: необходимым условием оценки изменения площади поражения являются существенные отличия в распространенности патологического процесса; количественная оценка степени поражения слизистой оболочки рта не является достаточно точной; количество новых пузырей, появляющихся за 1 день, не всегда отражает активность патологического процесса.

Оценка активности пузырчатки по Харману (индекс Хармана) основывается на подсчете количества эрозий на слизистых оболочках и коже у больных пузырчаткой; титров антител к Dsg 1 и Dsg 3, определяемых методом иммуноферментного анализа (Harman K.E. et al., 2001).

Однако, наряду с имеющимися в литературе данными о корреляции тяжести течения пузырчатки с титрами антител к Dsg1 и Dsg3 (Свирцевская Е.В., Матушевская Е.В. и соавт., 2005; Herrero-González J.E. et al., 2010; Schmidt E., Zillikens D., 2010), в ряде исследований показано несоответствие титра антител с клинической картиной заболевания (Daniel B.S. et al., 2012).

Система градации для пузырчатки слизистой оболочки рта по Сарасвату (Индекс Сарасвата) включает оценку поражения слизистой оболочки рта и дискомфорт при приеме пищи. Слизистая оболочка рта делится на 11 анатомических участков. При наличии пузырей/эрозий пораженному участку присваивается 1 балл. Второй исследуемый признак – наличие боли и/или кровотечения при глотании больным 9-и видов пищи различной консистенции (от жидких до твердых продуктов) (Saraswat A. et al., 2003).

A. Saraswat и соавт. (2003), B.S. Daniel и соавт. (2012) предложили использовать индекс Saraswat для оценки степени поражения слизистой оболочки рта при других дерматозах: буллезном пемфигоиде, герпетическом гингивостоматите, синдроме Стивенса-Джонсона.

В системе оценки Махаджана (MSS) оценивается площадь пораженных участков кожи и слизистых оболочек, степень дискомфорта пациента в быту и тяжесть дисфагии при глотании пищи различной консистенции. В соответствии с этим, тяжесть заболевания классифицируется как легкая, умеренная, тяжелая и очень тяжелая (Mahajan V.K. et al., 2005). Данная система оценок легко применима. Однако, она не позволяет учитывать незначительные изменения клинического состояния больных (Zhao C.Y., Murrell D.F., 2015).

Система оценок Кумара (KSS, Kumar's scoring system) была предложена В. Kumar и соавт. в 2006 г. Индекс относительно легкий для подсчета, однако система оценок Кумара так же не позволяет учитывать незначительные изменения клинического состояния больных.

Индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI) складывается из суммы баллов активности поражения кожи, волосистой части головы, слизистых оболочек и вторичных изменений (Murrell D.F., 2008).

Активность патологического процесса кожи рассчитывается путем определения числа и диаметра пузырей и/или эрозий для каждого участка кожи (от 0 до 10 баллов). Далее подсчитывается сумма баллов по всем анатомическим областям. Активность патологического процесса на волосистой части головы оценивается по числу пораженных квадрантов в баллах в зависимости от наличия эрозий и/или пузырей (от 0 до 10 баллов). Для оценки активности поражения слизистых оболочек, разделенных на 12 анатомических областей, каждой из областей начисляются баллы по количеству и размеру эрозий и/или пузырей (от 0 до 10 баллов). PDAI (слизистые оболочки) подсчитывается путем сложения суммы баллов, полученных на всех слизистых оболочках. Вторичные изменения определяются по наличию гиперпигментации или эритемы на местах разрешившихся высыпаний (от 0 до 13 баллов) (Murrell D.F., 2008).

Максимальное значение PDAI составляет 263 балла. При этом 250 баллов приходится на активность патологического процесса (120 баллов – на поражение кожи, 10 баллов – волосистой части головы, 120 баллов – слизистых оболочек) и

13 баллов - на оценку поствоспалительных изменений (Murrell D.F., 2008; Rosenbach M., 2009; Daniel B.S., Hertl M. et al., 2012).

Основное преимущество PDAI заключается в четком определении границ различных анатомических участков и разделении их на зоны, а также в строгом учете числа и размеров морфологических элементов, что является показательным при небольшом количестве поражений (Grover S., 2011). Недостатком PDAI является отсутствие возможности разделения высыпаний на морфологические элементы (эритему, эрозии или корки), что снижает чувствительность данного индекса (Chams-Davatchi C. et al., 2013).

Оценка тяжести аутоиммунных буллезных заболеваний кожи (ABSIS) была разработана в 2007 году М. Pfützе и соавт. на основе усовершенствованной системы градации для пузырчатки слизистой оболочки рта по Сарасвату. ABSIS позволяет оценивать динамику течения заболевания у больного пузырчаткой (Pfützе M., Niedermeier A. et al., 2007).

Максимально при поражении слизистой оболочки рта начисляется 11 баллов при оценке распространенности и 45 баллов при оценке тяжести дерматоза. Максимальное количество баллов по ABSIS составляет 206 (Pfützе M., Niedermeier A. et al., 2007; Daniel B.S. et al., 2012).

При оценке поражения слизистой оболочки рта предусмотрен учет как объективных, так и субъективных данных. Субъективные характеристики (например, уменьшение боли при приеме пищи) оцениваются самим пациентом и могут не выявляться клиницистом, оценивающим только число поражений полости рта. В то же время, полностью субъективная оценка, при которой пациенты все внимание уделяют симптомам (например, болезненные ощущения в полости рта), не включает поражение кожи, важную для клинициста. Таким образом, сочетание как субъективной, так и объективной клинической диагностики дает ABSIS преимущество по сравнению с другими системами оценок. Кроме того, ABSIS может быть использован для оценки тяжести других аутоиммунных буллезных дерматозов, например, буллезного пемфигоида и буллезного эпидермолиза (Kautz O. et al., 2009).

Оценка активности вульгарной пузырчатки (PVAS, Pemphigus Vulgaris Activity Score) была представлена группой исследователей из Ирана под руководством С. Chams-Davatchi в 2013 году. Значение PVAS зависит от типа поражения кожных покровов, количества, распространенности элементов поражения на коже и слизистых оболочках, а также от наличия симптома Никольского. Общий индекс PVAS оценивается: $PVAS (\text{общий}) = PVAS (\text{кожа}) + PVAS (\text{слизистые оболочки})$. Максимальные значения PVAS: общий - 18 баллов, кожа - 11, слизистые оболочки - 7 (Chams-Davatchi С., 2013).

На протяжении нескольких лет проводятся исследования достоверности, применимости и воспроизводимости различных индексов оценки тяжести пузырчатки. Продемонстрировано, что наиболее достоверными индексами оценки тяжести течения пузырчатки являются индексы ABSIS, PDAI, PVAS (Колос Ю.В., 2013; Rosenbach M. 2009; Chams-Davatchi С., 2013; Kamiya K, 2013; Murrell D.F., 2014; Patsatsi A., 2014; Rahbar Z., 2014; Zhao C.Y., 2015).

Ряд исследований показал корреляцию клинических индексов пузырчатки ABSIS, PDAI, PVAS между собой. Однако контингент обследованных пациентов в основном включал больных пузырчаткой с легкой и средней тяжестью заболевания, что затрудняет интерпретацию результатов сравнительных исследований (Колос Ю.В., 2013; Chams-Davatchi С., Rahbar Z. et al., 2013).

Таким образом, несмотря на успехи в изучении патогенетических механизмов развития пузырчатки, разработку диагностических критериев и схем лечения, не существует единой системы оценки тяжести заболевания. Вследствие значительной вариабельности клинических проявлений пузырчатки, возникает необходимость разработки системы оценок поражения кожи и/или слизистых оболочек, в которой учитывается ряд параметров, способных отразить многообразие симптомов заболевания. Представляется целесообразным проведение клинических исследований больных с различной тяжестью заболевания в целях разработки единого инструмента оценки тяжести пузырчатки в Российской Федерации.

1.6 Методы диагностики пузырчатки

Диагностика пузырчатки является одним из наиболее сложных вопросов современной дерматологии. 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; Самцов В.А., 1988; Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., 2006; Баткаев Э.А., Галлямова Ю.А., 2006; Знаменская Л.Ф., 2008; Кубанова А.А., 2009; Чистякова И.А., Лапина Е.Ю., 2012; Завадский В.Н., 2013; Махнева Н.В. и соавт., 2014; Сердюкова Е.А., Родин А.Ю. и соавт., 2015; Чеботарев В.В. и соавт., 2015; Хамаганова И.В. и соавт., 2017; Baum S. et al., 2014; Magliocca K.R., Fitzpatrick S.G., 2017). К тому же, существующие методы диагностики пузырчатки имеют свои преимущества и недостатки, но ни один из них в отдельности не обладает 100% чувствительностью и специфичностью (Махнева Н.В., 2008; Знаменская Л.Ф., Бугарева М.М. и соавт., 2017; Zhong S., 2011; Eming R. et al., 2015). К тому же, общепринятые рутинные методы исследований имеют диагностическую ценность лишь у больных с выраженными клиническими проявлениями, тогда как в начале заболевания или при стертом, атипичном течении их значимость невысока. В связи с чем проблема диагностики пузырчатки остается одной из важнейших в дерматовенерологии (Галлямова Ю.А. и соавт., 2006; Махнева Н.В. и соавт., 2014; Хамаганова И.В. и соавт., 2016; Hertl M. et al., 2015).

Для дифференциальной диагностики пузырчатки проводится сбор анамнеза, анализ особенностей клинической картины заболевания, в том числе наличие субъективных ощущений, результаты цитологического, патоморфологического исследований, реакции непрямой иммунофлюоресценции (РИФ), метод иммуноферментного анализа (ИФА) (Глухенький Б.Т., 1990; Галлямова Ю.А., 2006; Махнева Н.В., Давиденко Е.Б. и соавт., 2014; Дрождина М.Б., Кошкин С.В., 2017; Уфимцева М.А., Гурковская Е.П. и соавт., 2017; Hertl M., 2011, 2015, Но J., Bhawan J., 2017).

Клиническим признаком пузырьчатки является наличие вялых пузырей с серозным содержимым на видимо неизменной коже и/или слизистых оболочках, которые быстро вскрываются с образованием болезненных эрозий (Прохоренков В.И. и соавт., 2008; Вольф К. и соавт., 2012).

Первоначально патогномичным для пузырьчатки и важным дифференциально-диагностическим признаком считали положительный симптом Никольского (Шеклаков Н.Д., 1965). Однако позднее было замечено, что механическую отслойку эпидермиса можно вызвать и при других заболеваниях, например, при буллезном и рубцующем пемфигоиде, токсическом эпидермальном некролизе, буллезном эпидермолизе, герпетиформном дерматите Дюринга и ряде других дерматозов, что поставило под сомнение патогномичность симптома Никольского для пузырьчатки (Махнева Н.В., 2008; Grunwald, 1984; Doubleday C.W., 1987). Следует также отметить, что отрицательный симптом Никольского не означает отсутствия пузырьчатки (Ganapati S., 2014).

Общепринятым диагностическим методом для подтверждения наличия акантолиза при пузырьчатке является обнаружение акантолитических клеток в мазках-отпечатках со дна эрозий, предложенный Тцанком в 1947 году. Следует отметить, что клетки Тцанка могут быть обнаружены и при других дерматозах: транзиторном акантолитическом дерматозе Гровера, фолликулярном дискератозе Дарье, синдроме Лайелла, хронической семейной пузырьчатке Гужеро-Хейли-Хейли, пиодермиях, герпесе (Соколовский Е.В., 1999; Галлямова Ю.А., 2006). В настоящее время, в связи с появлением более совершенных методов, цитологический метод исследования для диагностики пузырьчатки во многих странах не применяется (Карачева Ю.В., 2007; Самцов А.В., 2012; Baum S., 2014).

Для определения акантолиза и локализации пузырей в коже больных используется морфологический метод исследования. Однако из-за сходства морфологических изменений при пузырьчатке и некоторых других дерматозах (многоформная экссудативная эритема, болезнь Дарье, пиодермия) патоморфологический метод не всегда бывает информативным (Цветкова Г.М., 1993; Карачева Ю.В., 2010, 2012; Ho J., Bhawan J., 2017).

При диагностике пузырчатки применяется метод иммунофлюоресцентного исследования, направленный на выявление фиксированных иммуноглобулинов в различных слоях кожи в реакции иммунофлюоресценции (РИФ) (Махнева Н.В. и соавт., 2011, 2018; Давиденко Е.Б., 2013; Довганич А.А. и соавт., 2016; Hertl M., 2011; Mysorekar V.V., 2015; Hertl M. et al., 2015; Giurdanella F., Diercks G.F. et al., 2016; Hrabovska Z. et al., 2017; Van Beek N. et al., 2018). IgG у больных пузырчаткой можно обнаружить в коже даже при изолированном поражении слизистых оболочек, а также в период ремиссии кожного процесса (Wu H., 2005). Однако данный метод исследования имеет ряд недостатков. В отдельных случаях отложение иммуноглобулинов и компонентов комплемента наблюдается не только в межклеточном пространстве эпидермиса, что характерно для пузырчатки, но и в зоне дермо-эпидермального соединения, что осложняет дифференциальную диагностику пемфигуса и пемфигоида (Махнева Н.В., 2011; Ткаченко С.Б., Теплюк Н.П., 2015). При использовании метода можно получить как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты (в 5% и 23% соответственно) (Махнева Н.В., 2004). Ложноположительные результаты могут наблюдаться при токсидермии, обусловленной приемом лекарственных препаратов, болезни Гровера, афтозном стоматите. Ложноотрицательные и слабopоложительные реакции могут наблюдаться при первых признаках заболевания или в период ремиссии, а также на фоне проведения иммуносупрессивной терапии, что может быть связано с небольшим количеством аутоантител, их слабой афинностью (степенью связывания с антигеном) или наличием в тканях растворимой формы иммунных комплексов (Махнева Н.В. и соавт., 2002; Wu H., 2005, Eming R., 2006). Особые сложности представляет диагностика буллезных дерматозов при изолированном поражении слизистой оболочки полости рта: биопсия неповрежденного пузыря в этой области крайне затруднительна вследствие высокой ранимости покрывок пузырей, а обнаружение иммунного комплекса в межклеточной субстанции не всегда оказывается информативным, так как при постановке РИФ отмечается свечение и в нормальном эпителии десен (Цветкова Г.М., 2003; Magliocca K.R., Fitzpatrick

S.G., 2017). Перспективным методом получения достоверных результатов при оценке клеточных структур кожи является *ex vivo* конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) (Oliver C., 2010).

К серологическим тестам, применяемым для диагностики пузырчатки, относятся иммуноферментный анализ и иммуноблоттинг. Для выявления IgG к десмоглеинам 1 и 3 типа методом ИФА применяют иммуносорбенты с иммобилизованными на них рекомбинантными десмоглеинами 1 и 3 типа человека. Имеются указания литературы о том, что уровень аутоантител к десмоглеинам коррелирует со степенью тяжести заболевания и может использоваться в качестве прогностического метода, а также для мониторинга активности заболевания (Колос Ю.В., Лукьянов А.М., 2014; Schmidt E., Zillikens D., 2010; Zhong S., 2011; Van Beek N. et al., 2018). В то же время встречаются исследования, в которых не обнаруживается прямой корреляционной зависимости между тяжестью кожного процесса и титром антител (Матушевская Е.В. и соавт., 2005; Harman K.E. et al., 2001; Daniel B.S., et al., 2012). Методом ИФА обнаруживают антитела к Dsg1 и Dsg3 типа в зависимости от клинической формы заболевания (Матушевская Е.В., Кубанова А.А. и соавт., 1995; Stanley J.R., 1982, 1993; Hertl M., Jedlickova H. et al., 2015). Однако в ряде случаев отмечаются несовпадения клинического фенотипа с профилем антител (Daneshpazhooh M., 2011; Махнева Н.В. и соавт., 2018).

Иммуноблоттинг – метод, определяющий присутствие антител в сыворотке крови к специфическим белкам, предварительно иммобилизованным на нитроцеллюлозной мембране (Hertl M., 2011; Van Beek N. et al., 2018). В настоящее время метод используется в основном при проведении научно-исследовательских работ.

Таким образом, наиболее типичными клинико-морфологическими признаками пузырчатки являются: появление пузырей на коже и/или слизистых оболочках; положительный симптом Никольского, наличие акантолитических клеток в мазках-отпечатках со дна эрозий. К современным методам лабораторного исследования относятся: фиксация IgG в межклеточных

промежутках эпидермиса, определяемых методом РИФ; наличие антител к десмоглеинам 1 и 3 типов, выявленных методами ИФА и иммуноблоттинга. Однако ни один из современных клинических и лабораторных методов диагностики не позволяет с абсолютной достоверностью поставить диагноз пузырчатки. В повседневной практической деятельности врачи зачастую устанавливают диагноз пузырчатки только на основании клинических и цитологических исследований, что приводит к диагностическим ошибкам. Таким образом, проблема совершенствования ранней диагностики пузырчатки и прогнозирования ее течения остается актуальной.

1.7 Современные методы терапии пузырчатки

При лечении больных пузырчаткой необходимо добиться прекращения появления новых высыпаний и эпителизации эрозий, повышения качества жизни больных, длительной клинической ремиссии. Адекватная терапия пациентов должна проводиться с момента появления пузырей и/или эрозий даже при ограниченном характере высыпаний. Незаменимой составляющей фармакотерапии аутоиммунных дерматозов являются иммуносупрессивные препараты, основные среди которых - системные глюкокортикостероидные препараты (ГКС) (Соколовский Е.В., 1999; Hertl M., Jedlickova H. et al., 2015; Kasperkiewicz M, Ellebrecht C.T. et al., 2017).

1. Базовая терапия. Системные ГКС препараты. Впервые применение ГКС в терапии больных пузырчаткой было предложено G. Thorn et al. в 1951г. (Thorn G. et al., 1951). Одним из важных аспектов терапевтического действия ГКС препаратов при пузырчатке, по данным J. Hirata (1985), является стимулирующее влияние ГКС, приводящее к повышению содержания α_2 -макроглобулина (поливалентного ингибитора протеиназ, участвующего в процессе акантолиза) в сыворотке крови. Возможно, ГКС препараты усиливают синтез десмоглеинов или изменяют их посттранскрипционную модификацию (Udey M.C., Stanley J.R., 1999).

На фоне "пульс"-терапии метилпреднизолоном терапевтический эффект начинается через несколько дней от начала терапии, в то время как титр аутоантител снижается в течение 3-4 недель (Nguyen V.T. et al., 2005). V.T. Nguyen et al. (2005) предполагают, что такой быстрый терапевтический эффект связан с прямым антиакантолитическим действием ГКС, которое защищает кератиноциты от повреждения аутоантителами. При терапии метилпреднизолоном снижается уровень IgG, увеличивается экспрессия генов, кодирующих молекулы адгезии кератиноцитов, клеточный цикл, апоптоз, протеинкиназы, фосфатазы и т.д.

Несмотря на многочисленные и разнообразные осложнения, возникающие вследствие ГКС-терапии, не существует абсолютных противопоказаний к лечению ими пузырчатки, так как только ГКС предотвращают смерть больных (Торсуев Н.А., 1979; Михеев Г.Н. и соавт., 2014; Herbst A., Bystrin J., 2000; Eming R., Sticherling M. et al, 2015).

Лечение ГКС больных пузырчаткой проводится в несколько этапов.

1 этап. В начале терапии назначаются высокие дозы ГКС - не менее 1мг/кг/сут в преднизолоновом эквиваленте. При тяжелом состоянии больного рекомендуются более высокие дозы ГКС – до 200 мг/сут (Соколовский Е.В., 1999; Федер. клин. рек., 2010, 2015). Продолжительность приема максимальной дозы ГКС обычно составляет от 2 до 6 недель (до прекращения появления новых пузырей и эпителизации эрозий). 2 этап. Суточная доза постепенно снижается до поддерживающей дозы (продолжительность до 4 месяцев). Первоначальное снижение дозы ГКС возможно на 1/4-1/3 от максимальной дозы. 3 этап. Длительный (пожизненный) прием поддерживающих доз ГКС при диспансерном наблюдении (Машкиллейсон А.Л., 1977; Соколовский Е.В., 1999). Предельно допустимая минимальная поддерживающая доза индивидуальна и может варьировать от 2,5 до 30 мг в сутки. В некоторых случаях, при тяжелом течении пузырчатки, поддерживающую дозу не удается снизить ниже 40-50 мг в сутки (Schmidt E. et al., 2010).

На фоне снижения доз ГКС часто происходят обострения заболевания. В этих случаях, по мнению А.В. Самцова и соавт. (2012) следует наблюдать

больного. Если очаги поражения самопроизвольно не разрешаются, рекомендуется прежде всего сменить препарат на другой ГКС в тех же дозировках. При отсутствии эффекта в течение в среднем 5 дней следует дополнительно назначить средства, обладающие иммуносупрессивным действием или увеличить дозу гормона, с последующим повторным снижением.

В 2003г. предложена схема снижения доз ГКС при пузырчатке, позволяющая полностью отменить препарат у больных: доза ГКС снижается на 1/4 таблетки один раз в неделю, т.е. в течение недели всего один день больной получает дозу, уменьшенную на 1/4 таблетки, в течение второй недели доза снижается на 1/4 таблетки 2 раза и т.д. (Теплюк Н.П., 2011).

В отечественной литературе имеются сообщения о применении ГКС препарата пролонгированного действия – дипроспана, в 1 мл которого содержится 2 мг бетаметазона динатрия фосфата и 5 мг бетаметазона дипропионата (Матушевская Е.В. и соавт., 1995). Дипроспан назначается внутримышечно в дозе от 1 до 2 мл (доза подбирается индивидуально в зависимости от тяжести заболевания, клинической картины и распространенности патологического процесса) 1 раз в 10 дней, на курс от 3 до 5 инъекций (Цурова З.С. и соавт., 1997). Дипроспан имеет более высокий индекс безопасности в сравнении с преднизолоном, что позволяет добиться положительного терапевтического эффекта при меньших рисках развития осложнений (Матушевская Е.В., 1995).

Лечение больных пузырчаткой сопряжено с трудностями, обусловленными развитием тяжелых осложнений вследствие длительного приема ГКС препаратов. Побочные действия ГКС многообразны: синдром Иценко-Кушинга, осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта (эзофагит, гастрит, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки), тромбоэмболия, острая сердечная или сосудистая недостаточность, сахарный диабет, нарушение водно-солевого баланса, остеопороз, гипопропротеинемия. На фоне высоких доз системных глюкокортикостероидов у больных аберрантной ипохондрией наблюдалась ятрогенная (лекарственная) гипомания (Решетникова Т.Б. и соавт., 2005; Карачева Ю.В. и соавт., 2014; Уфимцева М.А., Бочкарев Ю.М. и соавт., 2016; Теплюк Н.П.

и соавт., 2017; Ahmed A.R., Gurcan H.M., 2011; Leventhal J.S. et al., 2012; Ruocco E. et al., 2013; Amber K.T. et al., 2018). Наиболее частым проявлением побочного влияния системных глюкокортикостероидных препаратов является синдром Иценко-Кушинга (“кушингоидный синдром”): ожирение с преимущественным отложением жира в области лица (лунообразное, круглое лицо), груди, живота; появление багрово-фиолетовых стрий в области бедер, внизу живота, в подмышечных впадинах; гипертрихоз у женщин (Галлямова Ю.А., 2012; Mimouni D. et al., 2010; Amber K.T. et al., 2018).

Г.А. Пантелеева и И.В. Суздальцева (2008) у 62% больных пузырчаткой наблюдали осложнения, развившиеся в процессе терапии ГКС. По данным D. Mimouni et al. (2010), в группе больных из 155 человек с пузырчаткой, получавших длительную кортикостероидную терапию, встречались следующие осложнения: клинически значимый остеопороз (34%); инфекции кожи (19%); слабость (16%); катаракта (9%); гипертензия (7%); миопатия (7%); желудочно-кишечные кровотечения (2%); инфекции (5%); акне (2%); тучность (1%); изменения настроения (4%); тремор (2%).

Тяжелым осложнением ГКС терапии является иммуносупрессивное состояние, присоединение инфекции, обусловленной ассоциацией различных микроорганизмов, ДВС-синдром, септицемия (Решетникова Т.Б., 2004; Галлямова Ю.А., 2012; Уфимцева М.А. и соавт., 2016; Теплюк Н.П. и соавт., 2017; Хамаганова И.В. и соавт., 2018; Mimouni D. et al., 2010; Uçmak D., 2013).

2. Адьювантная терапия. С целью снижения высоких доз ГКС, при стероидорезистентных формах заболевания, в комбинации с системными ГКС назначают адьювантные препараты, обладающие иммуносупрессивным эффектом. Данные препараты не дают такого быстрого эффекта, как ГКС, поэтому их редко применяют в виде монотерапии. Эффект комбинированной терапии является сопоставимым с назначением высоких доз преднизолона (Куклин И.А., Кохан М.М., 2013; Теплюк Н. и соавт., 2013, 2014; Карачева Ю.В. и соавт., 2014; Olszewska M., 2007; Atzmony L., Hodak E., 2015; M. Kasperkiewicz, С.Т. Ellebrecht, 2017; Hofmann S.C. et al., 2018). Полагают, что цитостатические

препараты (метотрексат, азатиоприн, циклофосфамид) обладают стероид-сберегающим действием, уменьшают частоту развития побочных эффектов ГКС и способны увеличить длительность ремиссии (Schmidt E., Zillikens D., 2011; Meggitt S.J. et al., 2011; Hertl M., Jedlickova H. et al., 2015; Eming R., Sticherling M., 2017).

Метотрексат - цитостатический препарат из группы антиметаболитов, антагонистов фолиевой кислоты. Метотрексат оказывает выраженное иммуносупрессивное действие, тормозит действие энзима редуктазы, необходимого для восстановления фолиевой кислоты в процессе синтеза ДНК, и препятствует воспроизводству тканевых клеток (Торсуев Н.А. и соавт., 1979; Cronstein В.Ю., 2010). А.Л. Машкиллейсон и соавт. (1977) предложили следующую схему комбинированной терапии пузырчатки: метотрексат по 25-50 мг один раз в неделю и преднизолон по 30-60 мг в день. Эффективность и переносимость такой терапии была лучше по сравнению с ежедневным приемом малых доз цитостатиков. И.А. Куклин и соавт. (2015) предлагают назначать одновременно среднетерапевтические дозы системных глюкокортикостероидов и метотрексат в дозе 7,5-15,0 мг подкожно 1 раз в неделю.

В руководстве "Guideline for diagnosis and treatment—guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV)" (2015), предлагается начинать лечение больных пузырчаткой с комбинации системных ГКС (в суточной дозе 1-1,5мг/кг массы тела) и азатиоприна (в суточной дозе 100 мг). Азатиоприн (Имуран®) - имидазольное производное 6-меркаптопурина, конкурентный антагонист гипоксантина. По химическому строению близок к пуриновым основаниям. Оказывает иммуносупрессивное и цитостатическое действие, ингибируя пролиферацию лимфоцитов (Meggitt S.J., 2011). В результате сочетанной терапии системными глюкокортикостероидами и азатиоприном у стероидрезистентных больных О.Ю. Олисова и соавт. (2016) установили снижение внутриклеточного уровня экспрессии гена NF-κB, что лежит в основе стероидсберегающего эффекта азатиоприна.

При тяжелом течении пузырчатки назначается циклофосфамид - цитостатический препарат алкилирующего типа, производное бис-β-хлорэтиламина, обладает также выраженным иммуносупрессивным действием с преимущественным угнетением активности В-субпопуляций лимфоцитов (в отличие от метотрексата, азатиоприна). Medved et al. в 1974 году впервые назначили циклофосфамид двум больным пузырчаткой и буллезным пемфигоидом, резистентным к терапии ГКС, и получили положительные результаты (Medved A., 1974). Препарат назначается в дозе 2-3 мг/кг/сут (более токсичный по сравнению с азатиоприном) (Chams-Davatchi C. et al., 2007; Hertl M., Jedlickova H. et al., 2015).

Однако J. Bystryn et al. (2005), проведя сравнительный анализ методов терапии пузырчатки по данным литературы, не обнаружил значительного уменьшения летальности или частоты обострений при сочетанной терапии больных ГКС и азатиоприна или ГКС и циклофосфамида по сравнению с аналогичными показателями при лечении только ГКС препаратами. Позже V.K. Sharma et al. (2013) на 60 пациентах с пузырчаткой показали эффективность комбинированной терапии циклофосфамида, который вводился внутривенно по 15 мг/кг 1 раз в месяц в течение одного года, с преднизолоном по сравнению с терапией только преднизолоном.

При недостаточной эффективности ГКС и наличии противопоказаний к применению цитостатиков возможно использование селективного иммунодепрессанта циклоспорина А (Сандиммун® Неорал®) - циклического полипептида, состоящего из 11 аминокислот. Циклоспорин А ингибирует активацию кальцийневрина лимфоцитов, таким образом предотвращая активацию Т-лимфоцитов, что тормозит экспрессию ряда цитокинов, включая IL-2, а также экспрессию белков, подавляющих апоптоз (Кубанова А.А., 1994; Матушевская Е.В. и соавт., 1995; Олисова О.Ю., 2008). По данным А.А. Кубановой и соавт. (1994), суточная доза циклоспорина А в комплексной терапии больных пузырчаткой в стадии обострения назначается индивидуально из расчета 5-8 мг на 1 кг массы тела больного. Для оценки индивидуальной переносимости

рекомендуется в первые два дня назначать препарат в половинной дозе, затем суточную дозу (5мг/кг) делят на 2 приема (утром и вечером с интервалом в 12 ч). По достижении ремиссии рекомендуется проведение поддерживающей терапии по 2-2,5мг/кг массы тела больного длительностью до 2-4 месяцев (Матушевская Е.В., 1996).

С целью снижения курсовых доз ГКС, частоты развития их побочных эффектов разрабатываются новые патогенетически обоснованные методы и средства лечения больных пузырчаткой, которые являются дополнением к базисной иммуносупрессивной терапии (Leventhal J.S. et al., 2012; Eming R., Sticherling M. et al., 2015; Hertl M., Jedlickova H. et al. 2015).

Внутривенное введение иммуноглобулина. При неэффективности и резистентности больных пузырчаткой к ГКС используется внутривенное введение высоких доз иммуноглобулина (Gürcan H.M. et al., 2010; Eming R. et al., 2015; Hofmann S.C. et al., 2018). Препарат иммуноглобулина содержат высокую концентрацию IgG и включает широкий спектр антител, направленных против патогенных микроорганизмов и аутоантигенов. Считается, что внутривенное введение иммуноглобулина усиливает катаболизм циркулирующих аутоантител, подавляет агрессию аутоантител к антигенам-мишеням, косвенно замедляя их синтез. Иммуноглобулин вводится внутривенно в дозе 400 мг/кг массы тела в сутки, ежедневно, в течение 5 дней (Shimanovich I. et al., 2008; Gürcan H.M. et al., 2010).

Н.М. Gürcan и соавт. проанализировали двадцать три исследования, которые были опубликованы в период с мая 1999 по апрель 2010 года. При анализе данных о 260 больных (191 пациент с вульгарной пузырчаткой и 69 пациентов с пемфигоидом), получавших иммуноглобулин внутривенно, у 245 пациентов было отмечено улучшение клинического состояния. Частота побочных эффектов была минимальной. Авторы сделали вывод об эффективности и хорошем профиле безопасности иммуноглобулина, вводимого внутривенно (Gürcan H.M., Jeph S. et al., 2010; Leventhal J.S., Sanchez M.R., 2012).

Биологическая терапия. Первым и пока единственным биологическим препаратом, рекомендованным к применению в клинической практике при пузырчатке, является ритуксимаб¹. Ритуксимаб представляет собой химерные моноклональные антитела к антигену CD20. Предполагаемые механизмы действия ритуксимаба при аутоиммунных заболеваниях обусловлены ослаблением антиген-презентирующей функции В-клеток в отношении индукции пролиферации и синтеза цитокинов CD4+ Т- клетками, деструкцией aberrantных ростковых центров; снижением образования аутоантиген-специфичных В-клеток памяти, плазматических клеток, подавлением синтеза антител и образования иммунных комплексов, модуляцией активности других аутореактивных клеток за счет нарушения функции Т-клеток, активацией Т-регуляторных клеток (CD4+ CD25+) (Craythorne E. et al. 2011; Kanwar A.J. et al., 2012; Kubanova A.A. et al., 2015; De Ansari A. et al., 2017; Anandan V. et al., 2017; Hofmann S.C. et al., 2018).

М. Heizmann et al. (2001) впервые использовали ритуксимаб в лечении паранеопластической пузырчатки. Впоследствии другие авторы применяли ритуксимаб у пациентов с тяжелым течением пузырчатки, резистентным к иммуносупрессивной терапии, нередко по жизненным показаниям и показали его эффективность и относительную безопасность (Shimanovich I., Nitschke M. et al., 2008; Kasperkiewicz M., Shimanovich I. et al., 2011, 2012; Kanwar A.J., Vinay K., 2012; Ventura F. et al., 2013; Gregoriou S. et al., 2015; Eming R., 2015; Ansari A. et al., 2017; Anandan V. et al., 2017; Hofmann S.C. et al., 2018; Amber K.T. et al., 2018). E. Craythorne (2011), A.J. Kanwar (2012) вводили ритуксимаб капельно в дозе 375 мг/м² 1 раз в неделю на протяжении 4 недель, при этом пациенты продолжали получать иммуносупрессивную терапию. Через 6 месяцев курс лечения повторялся. G. Cianchini et al. (2012) рекомендуют при вульгарной пузырчатке использовать ритуксимаб в дозе 1000 мг в день (Cianchini G. et al., 2012). Другими исследователями показана эффективность вливаний ритуксимаба по 500 мг с интервалом 2 недели (Horváth B. et al., 2012).

¹ Ритуксимаб в качестве препарата для лечения пузырчатки в Российской Федерации не зарегистрирован

Улучшение состояния больных при лечении ритуксимабом наблюдалось через два-три месяца после начала терапии, вследствие чего было возможно более быстрое снижение доз ГКС (Cianchini G. et al., 2012). 50-60% пациентов достигали ремиссии после одного курса терапии, приблизительно 40-50% пациентов могли находиться на поддерживающих малых дозах ГКС или им проводили повторные введения ритуксимаба (Kasperkiewicz M., Shimanovich I. et al., 2011; Kanwar A.J., Vinay K., 2012). Имеются единичные работы, в которых авторы использовали ритуксимаб в качестве препарата первой линии в виде монотерапии у пациентов с тяжелым течением пузырчатки (Craythorne E.E. et al., 2011; Kanwar A.J., Vinay K., 2012). Ряд авторов предполагает, что прекращение приема других иммуносупрессивных препаратов (ГКС, цитостатиков) может повысить уровень безопасности ритуксимаба (Cianchini G. et al., 2012; Horváth V. et al., 2012; Joly P., Maho-Vaillant M. et al., 2017; Amber K.T. et al., 2018).

Экстракорпоральные методы терапии. В отечественной и зарубежной практике имеется большой опыт применения методов экстракорпоральной терапии (экстракорпоральной фотохимиотерапии, плазмафереза и иммуноадсорбции) больных пузырчаткой (Грандо С.А. и соавт., 1988; Кильдюшевский А.В., 2008; Yamada H., 1997; Eming R., 2006; Saraceno R. et al., 2008; Meyersburg D., 2012; Hertl M., Jedlickova H. et al., 2015). Внедрение методов экстракорпоральной детоксикации в терапию больных пузырчаткой в качестве дополнения к ГКС препаратам дает возможность уменьшить развитие побочных эффектов вследствие массивной ГКС терапии, позволяет более быстро снижать высокие дозы ГКС (Грандо и соавт., 1988).

При проведении *экстракорпоральной фотохимиотерапии* клетки крови облучаются вне организма человека ультрафиолетовыми лучами спектра А в присутствии фотосенсибилизатора (8-метоксипсоралена, псоралена). Эффект экстракорпоральной фотохимиотерапии основан на подавлении продукции аутоантител В-лимфоцитами, которые играют ключевую роль в патогенезе пузырчатки (Кильдюшевский А. В. и соавт., 2002; 2008; Gollnick H.P. et al., 2003; Saraceno R. et al., 2008). К настоящему времени имеются единичные работы по

использованию данного метода лечения у больных вульгарной пузырчаткой. Так, L. Vakos et al. (2009) отметили положительный клинический эффект фотохимиотерапии у пациентов с пузырчаткой, побочные эффекты после проведенной экстракорпоральной фотохимиотерапии не были отмечены. Авторы рекомендуют фотохимиотерапию в качестве адъювантной терапии при неэффективности ГКС терапии у больных пузырчаткой.

Плазмаферез. С целью удаления циркулирующих аутоантител применяется плазмаферез с замещением плазмы больного свежей донорской плазмой. Терапевтический эффект плазмафереза при пузырчатке связан с элиминацией циркулирующих IgG и циркулирующих иммунных комплексов, обладающих способностью к адгезии на поверхности клеток шиповатого слоя эпидермиса, а также с уменьшением синтеза антител В-лимфоцитами (Самцов А.В., Белоусова И.Э., 2012; Hawayek L., 2004; Nagasaka T. et al., 2008; Saraceno R. et al., 2008). Больным пузырчаткой применяют центробежный плазмаферез (Nagasaka T. et al., 2008), плазмаферез двойной (каскадной) фильтрации (Yamada H. et al., 1997; Higashihara T., 2017). Курс плазмафереза состоит из 6-12 процедур, 3 раза в неделю, за сеанс обрабатывается 800-2000 мл плазмы (Yamada H. et al., 1997). Повторные процедуры плазмафереза приводят к временному снижению титра аутоантител и даже к их исчезновению, что позволяет в значительной степени уменьшить дозы иммуносупрессивных препаратов. Применение плазмафереза рекомендуется при стероидорезистентных формах пузырчатки или при развитии побочных явлений вследствие иммуносупрессивной терапии (Hawayek L, Mutasim D., 2004; Higashihara T., 2017).

Сочетание плазмафереза с приемом ГКС позволяет в значительной степени удлинить срок ремиссии, т.к. он потенцирует эффект ГКС препаратов, является эффективным и относительно безопасным методом лечения (наблюдались лишь единичные случаи тромбоцитопении, гипокальциемии, крапивницы, лихорадки, гипотонии, тошноты и головокружения) (Гребенников В.А., 1990). После достижения ремиссии, с целью профилактики рецидивов заболевания, процедуры плазмафереза рекомендуется проводить 1 раз в неделю (Roujeau J.C.,

1988). Однако, по мнению J.C. Guillaume et al. (1998) эффективность плазмафереза спорна. Авторы не могли продемонстрировать терапевтический эффект плазмафереза в сочетании с преднизолоном по сравнению с монотерапией преднизолоном. Кроме того, при проведении плазмафереза, наряду с патогенетически значимыми антителами, удаляются необходимые для организма компоненты крови: факторы свёртывания, медиаторы воспаления, гормоны и альбумины (Nagasaka T. et al., 2008).

Иммуноадсорбция. При проведении иммуноадсорбции плазма пациента пропускается через адсорбер (сорбент) для удаления циркулирующих иммунных комплексов и иммуноглобулинов, а затем возвращается к фильтрованной плазме пациента (Eming R. et al., 2006; 2015). Сорбенты, используемые для иммуносорбции, разделяют на три категории: неселективные, с низкой селективностью и с высокой степенью селективности. Неселективные сорбенты (декстрансульфат, триптофан, фенилаланин содержащие и другие) способны сорбировать такие компоненты плазмы крови, как фибриноген, альбумин, липиды, иммуноглобулины. Сорбенты с низкой селективностью (с иммобилизованным стафилококковым протеином А) имеют сродство к определенной фракции протеинов плазмы. Сорбенты с высокой степенью селективности извлекают только определенные протеины без изменения концентрации других компонентов плазмы пациента (Schmidt E. et al. 2003, Lüftl M., 2003; Eming R., Hertl M., 2006, Marker M., 2011).

Примером иммуносорбции с невысокой селективностью является способ применения углеродных гемосорбционных колонок у больных пузырчаткой, предложенный С.А. Грандо и соавт. (1988). Авторы проводили гемоперфузию по вено-венозному контуру через углеродный гемосорбент в сорбционных колонках, предназначенных для очистки и фильтрации крови вне организма со скоростью кровотока 80-120 мл/мин в объеме 1,5 объема циркулирующей плазмы. Однако, после быстрого наступления клинического эффекта, наблюдался феномен рикошета (экзацербация патологического кожного процесса, обусловленная

последующим резким повышением в крови титра антител) (Гребенников В.А., 1990).

Одним из методов иммуносорбции, использованных при пузырчатке, является иммуносорбция с использованием триптофансодержащих сорбентов, предложенная М. Lüftl и соавт. (2003). Триптофановые сорбенты представляют собой поливиниловые шарики, сшитые алкоголь-гелем, которые иммобилизируют гидрофобной аминокислотой и триптофаном в качестве лиганда. В исследованиях Lüftl и соавт. (2003) *in vitro* было продемонстрировано, что триптофановые сорбенты более эффективно удаляли аутоантитела при пузырчатке, чем декстрановые, преимущество которых заключалось в избирательном удалении аффинных белков, к тому же триптофановые сорбенты были более дешевыми. Недостаток метода заключался в том, что триптофановые сорбенты сорбировали необходимые для жизнедеятельности компоненты плазмы крови (фибриноген, альбумин, липиды, иммуноглобулины), а их синтез являлся довольно сложным процессом.

Для иммуносорбции использовался также стафилококковый протеин А (protein A affinity resin), представляющий собой рекомбинантный белок А *Staphylococcus aureus*, иммобилизованный на CNBr-активированной сефарозе FF (GEHealthcare). В исследованиях E.Schmidt et al. (2003) колонки с протеином А показали более высокую эффективность при элиминации IgG, чем триптофановые сорбенты. Однако позже было показано, что при проведении иммуноадсорбции с использованием стафилококкового протеина А, наряду с патогенетически значимыми аутоантителами, выводились также иммуноглобулины других подклассов, иммунные комплексы, антитела к ДНК, человеческому лейкоцитарному антигену. В свою очередь, уменьшение содержания в крови иммуноглобулинов разных классов увеличивало риск развития инфекционных заболеваний (Samuelsson G., 2003; Marker M., 2011).

Эффективность иммуноадсорбции показана в случаях, когда пузырчатка не поддается терапии иммуносупрессивными препаратами и сопровождается побочными явлениями. Рядом авторов отмечен феномен постсорбционного

резкого повышения чувствительности организма к лекарственной терапии, что позволяет быстрее достигнуть ремиссии и снизить дозы ГКС и цитостатиков (Shimanovich I. et al., 2006; Eming R. et al., 2006; Marker M., 2011; Behzad M., 2012).

Таким образом, несмотря на очевидные преимущества, метод иммуноадсорбции имеет ряд недостатков. Показано, что при иммуносорбции, наряду с патогенетически значимыми аутоантителами, удаляются жизненно необходимые компоненты крови (IgG других классов, а также IgA, IgM и IgE, комплементы, интерлейкины, простагландины, иммунных комплексы (Meyersburg D. et al., 2012).), что способствует увеличению риска развития инфекционных заболеваний. Отмечено также, что у некоторых пациентов, вследствие элиминации из сыворотки аутоантител и циркулирующих иммунных комплексов наблюдается феномен рикошета - экзацербация патологического кожного процесса, сопровождающаяся резким повышением титра иммуноглобулинов в сыворотке крови больных (Гребенников В.А., Белявский А.Д., Каминский М.Ю., 1990).

Экспериментальные методы терапии. В настоящее время проводятся исследования по изучению ряда методов терапии пузырчатки: пептидами (агонисты пептида десмоглеина 3 типа); агонистами холинергических рецепторов; ингибиторами протеинкиназы, активированной митогеном p38 (p38 MAPK); эпидермальным фактором роста; бактериальным каркасным белком на основе 10 домена фибронектина III типа человека, связывающего IgG4 (Бровман Г.В. и соавт., 2014; Tabrizi M.N. et al., 2007; Perez O.A., 2009; Koga H., 2013; Sajda T., Sinha A.A. 2018; Didona D., 2019). Эффективность терапии с использованием агонистов Dsg3 показана на мышинных моделях пузырчатки, клинические же исследования пока не проводились. По мнению H. Koga et al. (2013), выяснение патогенетической роли антител к Dsg3 в развитии пузырчатки может способствовать разработке более безопасной и эффективной терапии этого заболевания.

На рисунке 2 приведены разработанные к настоящему времени методы (и препараты) для лечения пузырчатки, воздействие которых направлено на различные терапевтические мишени: цитокины (биологические препараты: этанерцепт, инфликсимаб, ингибиторы p38 MARK), Т- и В-лимфоциты (азатиоприн, циклофосфамид, ритуксимаб), антитела (экстракорпоральные методы терапии, введение иммуноглобулина внутривенно), кератиноциты (ГКС, ингибиторы p38 MARK).

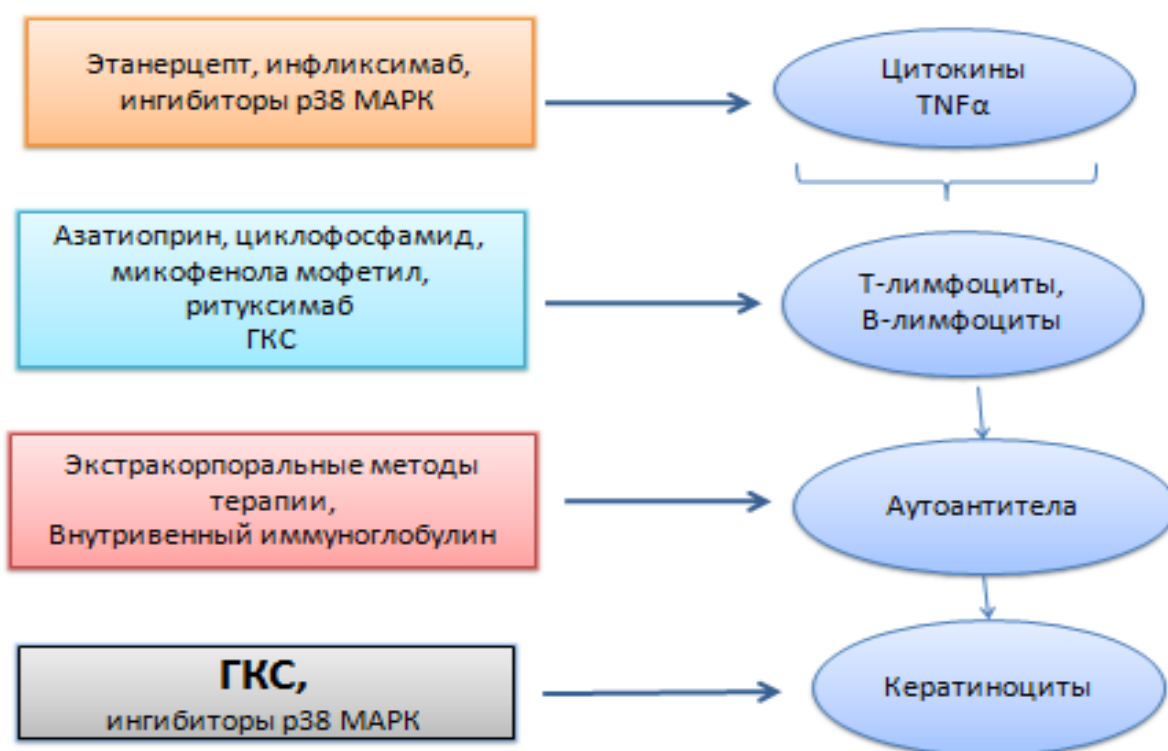


Рисунок 2. Методы терапии пузырчатки и терапевтические мишени
(Мао Х., Payne A.S., 2008, с изменениями)

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что актуальной темой практической дерматологии является изучение иммунологических и молекулярно-генетических механизмов развития заболевания, в том числе на уровне генетического аппарата клетки, совершенствование методов диагностики и лечения дерматоза. Несмотря на большой арсенал современных средств и методов лечения, подбор адекватной персонализированной терапии больных пузырчаткой остается сложной и актуальной проблемой. Ведущим методом терапии пузырчатки в настоящее время является длительное применение

системных ГКС. Однако возникающие при этом тяжелые осложнения вызывают необходимость разработки заместительных методов терапии. Идеальным для терапии пузырчатки является элиминация клеток-продуцентов аутоантител, но разработка данного метода терапии пока не представляется возможной. Для уменьшения риска развития инфекционных заболеваний при назначении больших доз ГКС целесообразно удаление IgG к десмоглеинам. В связи с этим, представляется перспективной разработка патогенетически обоснованных методов терапии, направленных на удаление из кровотока больных пузырчаткой антител с использованием селективных иммуносорбентов, с проведением апробации этих методов на экспериментальных моделях пузырчатки.

1.8 Экспериментальное моделирование пузырчатки

В изучении патогенеза пузырчатки значительный вклад вносят исследования, основанные на экспериментальном моделировании заболеваний.

В настоящее время применяется два основных вида моделей буллезных дерматозов на экспериментальных животных: а) модели с пассивным переносом антител; б) модели с активным иммунитетом, в том числе модели с переносом аутореактивных лимфоцитов, трансгенные модели, иммунизированные модели (Bieber K., Sun S. et al., 2010).

Модели с пассивным переносом антител. G.J. Anhalt et al. (1982) был проведен эксперимент по моделированию пузырчатки на новорожденных мышах. В ходе эксперимента новорожденным мышам линии BALB/c вводили фракцию IgG, полученную от больных пузырчаткой, в дозе от 1,5 до 16 мг на грамм веса в день. В ходе эксперимента была выявлена прямая зависимость между титрами антител к Dsg3 и Dsg1 в сыворотке больных и тяжестью клинических проявлений пузырчатки у мышей. После прекращения введения IgG отмечалась эпителизация эрозий. Однако, недостатками описанной модели является недостаточно высокая воспроизводимость. У части мышей признаки пузырчатки не развивались, что связано с толерантностью иммунитета.

В 1985 г. Y. Takahashi et al. однократно вводили новорожденным лабораторным мышам IgG с последующим исследованием сывороток крови и биоптатов кожи мышей. Через 1 час после введения IgG, полученных от больных пузырчаткой, в сыворотке крови мышей методом ИФА было зафиксировано повышение уровня антител к Dsg3; при гистологическом исследовании биоптатов кожи зафиксировано появление акантолитических щелей и полостей. Полная дезорганизация десмосом наблюдалась через 12-18 часов. Это исследование продемонстрировало, что ранние иммунологические и ультраструктурные изменения, типичные для вульгарной пузырчатки у человека, могут быть воспроизведены у лабораторных мышей.

В 1989 г. С.А. Грандо и соавт. были проведены опыты по индуцированию проявлений пузырчатки у аллогенных и ксеногенных животных. Белок, полученный от сывороток ужей обыкновенных, находящихся в начальной стадии линьки, вводили дробно в течение 1 суток подкожно до общей дозы 24 мг/г массы тела ужом, находящимся вне фазы линьки, а так же новорожденным мышам линии BALB/c. При иммуногистохимическом и морфологическом изучении аутопсийного материала лабораторных животных исследователями обнаружены выраженные изменения. У змей на мембранах кератиноцитов в верхних слоях эпидермиса выявлялись щели и микрополости, у мышей наблюдалось более интенсивное, чем исходное, люминесцентное окрашивание межклеточных промежутков кератиноцитов всего мальпигиева слоя эпидермиса; в ростковом слое - вакуольная дегенерация эпидермоцитов.

Несколько позже S.A. Grando et al. (1990) получили экспериментальную модель пузырчатки на морских свинках. Животным вводили IgG, полученные от больных пузырчаткой, а также содержимое пузырей, в которых определялись атипичные мононуклеары. Интраперитонеальное введение Ig вызывало дистрофию эпидермиса у экспериментальных животных, а подкожное введение содержимого пузырей животным - баллонную дистрофию. При морфологическом исследовании аутопсийного материала (кожи) морских свинок наблюдались: акантолиз, интраэпидермальные пузыри, при иммунофлуоресцентном

исследовании -- фиксация IgG в межклеточных промежутках шповатого слоя эпидермиса. В последующем показано, что Fab фрагменты IgG больных вульгарной пузырчаткой вызывают появление пузырей у новорожденных мышей. Однако, получение Fab фрагментов IgG трудоемко и финансово затратно (Mascaró J.M. et al., 1997).

Существуют определенные различия при использовании в моделировании пузырчатки с пассивным переносом антител у новорожденных и взрослых мышей. Для динамического наблюдения долговременных эффектов действия антител или оценки эффективности различных терапевтических методов более подходящими считаются новорожденные животные (Schneider M.R. et al., 2009).

K. Schulze et al. (2012) изучали целесообразность использования взрослых лабораторных мышей для моделирования вульгарной пузырчатки и обосновали свой выбор взрослых мышей тем, что у новорожденных мышей недоразвиты придатки кожи, включая волосяные фолликулы, а также ниши стволовых клеток. Авторы осуществляли пассивный трансфер моноклональных мышинных антител против Dsg3 8-недельным мышам линии C57Bl/6J. Через 2 часа после введения антител наблюдалось расширение межклеточных промежутков между десмосомами, активация рецепторов эпидермального фактора роста, а также увеличение экспрессии гена Мус, снижение содержания Dsg3 в десмосомах, образование пузырей на слизистых оболочках и в области скопления волосяных фолликулов, что типично для больных вульгарной пузырчаткой.

Модели с использованием человеческой кожи, пересаженной лабораторным животным. На примере данной модели возможно изучение акантолиза на образце человеческой кожи, однако с рядом преимуществ, которые дает мышинная модель. Перенос участков человеческой кожи мышам обеспечивает введение в экспериментальную модель человеческих аутоантигенов. На данный момент опыт использования указанной модели ограничен. По мнению G. Wier et al. (2010); D. Zillikens (2001) данная модель является многообещающей для изучения механизма акантолиза при пузырчатке.

Модели с активным иммунитетом. Для получения модели пузырчатки с развитием активного иммунитета у лабораторных животных вызывается продукция аутоантител к определенным антигенам. Модели с активным иммунитетом позволяют выявить клетки иммунной системы, опосредующие аутоиммунный ответ к различным структурным компонентам кожи и определить их роль в развитии акантолиза. Путем добавления или удаления определенных субпопуляций клеток возможно изучение эффекта различных типов клеток на механизмы аутореактивности и толерантности. Таким образом, модели с развитием активного иммунитета позволяют разрабатывать методы терапии, основанных на стимуляции или ингибировании определенных клеток (Лысенко А.А., Коцарева О.Д., 2004; Свирщевская Е.В. и соавт., 2006; Bieber K. et al., 2010).

Модели с переносом аутореактивных лимфоцитов. Механизмы потери толерантности к собственным антигенам были изучены при переносе лабораторным животным аутореактивных лимфоцитов, культивированных в нокаутных² мышах. В 2000 году группа исследователей во главе с М. Amagai, используя нокаутных по Dsg3 гену мышей, разработала модель заболевания *in vivo*. Dsg3^{-/-} мыши были иммунизированы рекомбинантным Dsg3 для получения антител к Dsg3, взаимодействующих с аутоантигеном. Пересадка спленоцитов от иммунизированных мышей к иммунодефицитным Rag2^{-/-} мышам, имевших Dsg3, приводила к развитию заболевания у последних..

Трансгенные модели. В 1997 была получена линия трансгенных³ мышей, не имеющих Dsg3. С их помощью было продемонстрировано, что Dsg3 играет важную роль в межклеточной адгезии. Такие мыши рождались нормальными, но позже у них наблюдалось образование пузырей и эрозий на слизистых оболочках рта, а также отставание в росте и развитии, что объяснялось затруднениями при поглощении пищи. Пузыри на коже появлялись только после механических воздействий (Koch P.J. et al., 1997).

² Нокаутные мыши - knockout mice - мыши, у которых выключены определенные гены.

³ Трансгенные мыши – линии мышей, которым введены чужеродные для них гены (например, гены человека)

Иммунизированные модели. В 2002 г. M.Ohyama et al. предложили модель пузырчатки, воспроизводимую на мышах с дефицитом главного комплекса гистосовместимости класса II (МНСII), трансгенных по ассоциированному с вульгарной пузырчаткой человеческому HLA класса II (DRB1*0402/DQB1*0302) и человеческому CD4. Животные были иммунизированы рекомбинантным человеческим Dsg3 с использованием различных адъювантов. Повторная иммунизация приводила к образованию антител к Dsg3, которые показали свою патогенность в ряде тестов *in vitro*, так как приводили к диссоциации кератиноцитов. У иммунизированных мышей развивались пузыри и эрозии, что демонстрировало кросс-реактивность человеческих антител с мышинным Dsg3. На настоящий момент выделить единственную, идеальную модель пузырчатки, невозможно.

Для исследования патогенетических механизмов развития пузырчатки, разработки и экспериментальной апробации новых методов терапии больных тяжелым дерматозом, представляется актуальным создание экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных, воспроизводящей клинические, гистологические и иммунологические признаки заболевания.

Таким образом, обобщая приведенные литературные данные, можно заключить, что пузырчатка представляет собой серьезную медицинскую проблему. Этиология аутоиммунного заболевания остается неясной, недостаточно изучены многие стороны патогенеза, не доказана роль предполагаемых антигенов, участие в развитии заболевания апоптотических и других сигнальных путей, что вызывает необходимость продолжения исследований. Представленные в обзоре публикации свидетельствуют о большом количестве побочных эффектов базисной иммуносупрессивной терапии, резистентности больных к ГКС терапии, что обуславливает поиск новых молекулярно-генетических мишеней и терапевтических подходов, направленных на элиминацию аутоантител или на подавление их выработки.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Клинико-лабораторное обследование проведено 132 больным пузырчаткой. Клиническое обследование больных пузырчаткой с определением тяжести заболевания проводилось с использованием клинических индексов тяжести пузырчатки (PDAI, ABSIS, PVAS, DIDS) (n=528). У больных пузырчаткой и здоровых лиц получены биологические образцы, в том числе, образцы крови (n=444) для проведения иммунологических (иммуноферментный анализ для определения антител к Dsg1 и Dsg3, n=149)); молекулярно-генетических исследований (метод секвенирования по Сенгеру для определения нуклеотидной последовательности гена *PERP*, n=117); выделения антител (IgG) из сывороток крови методом аффинной хроматографии (n=178). Биоптаты кожи (n=395) получали для проведения патоморфологического исследования (биоптаты пузырных элементов, n=152); иммуногистохимического исследования - нРИФ с использованием *ex vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) (для выявления фиксированных IgA, IgM, IgG в межклеточных промежутках эпидермиса (биоптаты из участка видимо здоровой кожи) и количественного определения экспрессии структурного белка десмосом *PERP* (биоптаты из пузырных элементов с захватом участка кожи, прилегающего к пузырю и видимо здоровой кожи), n=181; ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени для определения экспрессии гена *TLR7* (биоптаты из участка видимо здоровой кожи, n=62). Контрольную группу составили 100 здоровых лиц.

Для экспериментального моделирования пузырчатки использованы лабораторные животные - неонатальные мыши линии BALB/c. При проведении экспериментов проводились: клиническая оценка поражений кожных покровов 99 лабораторных животных; патоморфологическое исследование (n=99) и нРИФ с использованием *ex vivo* КЛСМ (n=99) аутопсийного материала (кожи) 99 мышей после введения препаратов IgG.

Для разработки селективного иммуносорбента для элиминации антител к десмоглеину 3 типа у больных пузырчаткой использовались крупнозернистая агарозная матрица Affi-Gel-15, рекомбинантный Dsg3, экспрессированного в клетках грибов Yeast. Для оценки эффективности селективного твердофазного иммуносорбента использовано 43 неонатальные мыши линии BALB/c, которым проводились: клиническая оценка поражений кожных покровов 43 мышей; патоморфологическое исследование (n=43) и нРИФ с использованием *ex vivo* КЛСМ (n=43) аутопсийного материала (кожи) мышей.

2.2 Методы исследования

В процессе работы применялись следующие методы исследования:

Клинические исследования (клиническое обследование, включавшее изучение данных анамнеза, жалоб пациента, клинический осмотр пациентов с выявлением пузырей и/или эрозий на коже и/или слизистых оболочках, определением симптома Никольского, степени тяжести пузырчатки с использованием клинических индексов оценки степени тяжести пузырчатки (индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI), балльная оценка тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи (ABSIS), индекс активности вульгарной пузырчатки (PVAS), дерматологический индекс тяжести заболевания (DIDS).

Лабораторные исследования: цитологический; патоморфологический; иммуногистохимический метод - нРИФ с использованием *ex vivo* КЛСМ (выявление отложений в коже иммуноглобулинов А, М, G, белка PERP); иммуноферментный анализ (ИФА) (определение антител к десмоглеинам 1 и 3 типов в крови); метод секвенирования (определение нуклеотидной последовательности гена *PERP*); метод ПЦР в реальном времени (количественное определение экспрессии гена толл-подобного рецептора 7 типа (*TLR7*) в коже); метод аффинной хроматографии (для выделения и очистки препаратов суммарных IgG из сывороток крови). Краткий перечень примененных методов исследования и количества проведенных исследований приведен в таблице 4.

Таблица 4 - Методы исследования

Задачи исследования	Методы исследования	Количество проведенных исследований
1. Изучить диагностическую значимость клинических индексов для оценки степени тяжести больных пузырчаткой.	<i>Клиническое обследование</i> больных с использованием клинических индексов тяжести пузырчатки: PDAI, ABSIS, PVAS, DIDS. <i>Статистические методы</i>	Оценка тяжести пузырчатки по 4 индексам: PDAI, ABSIS, PVAS, DIDS у 132 больных пузырчаткой (n=528)
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.	<i>Клиническое обследование</i> больных с использованием клинического индекса тяжести заболевания PDAI. <i>Иммуноферментный анализ</i> с определением антител к Dsg1 и Dsg3 <i>Статистические методы</i>	Оценка тяжести пузырчатки по клиническому индексу PDAI у 132 больных пузырчаткой. Полуколичественное определение антител к Dsg1 и Dsg3 в крови 119 больных пузырчаткой (n=238)
3. Изучить частоту встречаемости полиморфизмов гена <i>PERP</i> у больных пузырчаткой с количественным определением экспрессии структурного белка десмосом <i>PERP</i> в пузыре и в участках кожи, прилегающих к пузырчатым элементам у больных пузырчаткой.	<i>Молекулярно-генетический метод:</i> - метод секвенирования по Сенгеру для исследования белок-кодирующей последовательности ДНК гена <i>PERP</i> , <i>Иммуногистохимический метод:</i> - нРИФ с использованием <i>ex vivo</i> КЛСМ для количественного определения экспрессии белка <i>PERP</i> в коже. <i>Статистические методы</i>	Исследование белок-кодирующей последовательности ДНК гена <i>PERP</i> у 49 больных пузырчаткой и 68 здоровых лиц методом секвенирования (n=117) Количественное определение экспрессии структурного белка десмосом <i>PERP</i> в различных участках кожи (пузырь, участок кожи, прилегающий к пузырю и видимо здоровая кожа) 30 больных пузырчаткой и 10 здоровых лиц методом нРИФ с использованием <i>ex vivo</i> КЛСМ (n=51)
4. Исследовать уровни экспрессии гена толл-подобного рецептора 7 типа (<i>TLR7</i>) в коже больных пузырчаткой.	<i>Молекулярно-генетический метод:</i> -метод ПЦР в реальном времени для определения экспрессии гена <i>TLR7</i> в коже больных пузырчаткой <i>Статистические методы</i>	Определение экспрессии гена <i>TLR7</i> в коже 38 больных пузырчаткой и 24 здоровых лиц методом ПЦР в реальном времени (n=62)

<p>5. Разработать экспериментальный подход к патогенетической терапии больных пузырчаткой на основе селективной сорбции антител к десмоглеину 3 типа и оценить его эффективность на <i>моделях in vitro</i> и <i>in vivo</i>.</p> <p>5.1 Разработать экспериментальную модель пузырчатки с использованием лабораторных животных - мышей инбредной линии BALB .</p> <p>5.2 Разработать и оценить <i>in vitro</i> (метод ИФА с определением антител к десмоглеину 3 типа) и <i>in vivo</i> (экспериментальная модель пузырчатки с использованием лабораторных животных - мышей инбредной линии BALB) эффективность экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой</p>	<p><i>Экспериментальный метод:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Иммуноферментный анализ</i> - <i>Метод иммуноаффинной хроматографии</i> для получения суммарных IgG из сывороток крови больных пузырчаткой и здоровых лиц. <p>Введение полученных суммарных антител лабораторным животным, последующее <i>клиническое наблюдение, гистологическое и нРИФ</i> исследования кожи.</p> <p><i>Экспериментальный метод:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>разработка иммуносорбента</i> для селективного связывания IgG к Dsg3; - <i>ИФА с определением антител к Dsg3</i> - <i>метод иммуноаффинной хроматографии</i> для получения суммарных IgG из сывороток крови больных пузырчаткой и здоровых лиц, - <i>методом иммунохроматографии</i> для очистки суммарных IgG, полученных от больных пузырчаткой, от антител к Dsg3 на селективном иммуносорбенте , - введение полученных препаратов суммарных IgG лабораторным животным; <p><i>клиническое наблюдение; гистологические и нРИФ исследования аутопсийного материала мышей</i></p>	<p>Получение иммуносорбента путем иммобилизации рекомбинантного Dsg3 на твердофазном носителе (Affi-Gel-15) для селективного связывания и удаления антител к Dsg3 из крови больных пузырчаткой. Определение антител к Dsg3 в крови у 119 больных пузырчаткой методом ИФА. Выделение из сывороток крови 78 больных пузырчаткой, содержащих антитела к Dsg3, и 100 здоровых лиц суммарных IgG методом иммуноаффинной хроматографии для оценки эффективности <i>in vitro</i> и введения лабораторным животным</p> <p>5.1. Клиническое наблюдение 99 лабораторных животных. Исследования аутопсийного материала (кожи) 99 мышей при патоморфологическом исследовании (n=99) и методом нРИФ с использованием <i>ex vivo</i> КЛСМ (n=99)</p> <p>5.2. - Определение количественного содержания антител к Dsg3 в сыворотках крови 38 больных пузырчаткой и 20 здоровых лиц методом ИФА. Получение препаратов суммарных IgG из сывороток крови больных пузырчаткой, содержащих антител к Dsg3 и здоровых лиц, методом аффинной хроматографии для оценки эффективности разработанного иммуносорбента.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Очистка препарата суммарных IgG, полученного от больных пузырчаткой, от антител к Dsg3 на селективном иммуносорбенте методом иммунохроматографии - Оценка эффективности иммуносорбента по степени сорбции антител к Dsg3 из препаратов суммарных IgG, выделенных из пула сывороток крови больных пузырчаткой, методом ИФА, путем определения (количественного) антител к Dsg3 в суммарных IgG до и после сорбции; - Оценка эффективности иммуносорбента по сорбции антител к Dsg3 из сывороток крови больных пузырчаткой с разной активностью; - Экспериментальные работы с введением 43 лабораторным животным препаратов IgG от больных пузырчаткой и здоровых лиц; клиническое наблюдение мышей (n=43); исследования аутопсийного материала (кожи) при патоморфологическом (n=43) и нРИФ исследовании (n=43).
--	--	--

Исследования проводились в соответствии с принципами доказательной медицины и этическими нормами (Статья 21 Конституции Российской Федерации, Национальный стандарт «Надлежащая клиническая практика» ГОСТ Р 52379-2005, Хельсинская декларация, письмо ВАК «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека» (Бюллетень ВАК 2002г., №3.).

В процессе работы применялись следующие методы исследования:

2.2.1 Клиническое обследование больных пузырчаткой

Всем больным пузырчаткой проводилось клиническое обследование, включавшее сбор жалоб пациента, данных анамнеза, клинический осмотр, а также регистрацию результатов лабораторного обследования, подтверждавших диагноз. Диагноз пузырчатки устанавливался на основании данных клинической картины, результатов цитологического, патоморфологического, иммуногистохимического метода исследования (реакции иммунофлюоресценции, РИФ) с использованием *ex vivo* КЛСМ. Все данные вносились в индивидуальную карту больного пузырчаткой.

Для определения клинической формы пузырчатки пользовались классификацией, предложенной Самцовым А.В., Белоусовой И.Э. (2012), Japanese Association of Dermatologists (2011); European Academy of Dermatology and Venereology (2015); British Association of Dermatologists (2017).

При отборе пациентов в исследование использовались критерии включения в исследование и критерии исключения из исследования.

Критерии включения пациентов в исследование: пациент должен выразить готовность участвовать в данном исследовании и согласиться с его процедурами, подписав письменное информированное согласие; возраст пациента должен составлять не менее 18 лет; пациент должен следовать требованиям протокола исследования. *Критерии исключения пациентов из исследования:* возраст менее 18 лет; невозможность следовать требованиям протокола; наличие тяжелой сопутствующей патологии в стадии декомпенсации.

Участие пациента в исследовании могло быть прекращено вследствие: неспособности пациента следовать требованиям протокола исследования; добровольного желания пациента выйти из исследования. Если по какой-то причине пациент прекращал участие в исследовании до завершения исследования, причина и дата исключения были зафиксированы в соответствующем разделе Индивидуальной карты больного пузырчаткой.

В соответствии с Федеральным законом от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации", ГОСТ 52379-2005 "Надлежащая клиническая практика (GCP)" каждый больной пузырчаткой до начала проведения диагностики и терапии подписывал информированное добровольное согласие на проведение медицинских вмешательств..

Для выявления сопутствующих заболеваний и осложнений системной ГКС терапии больных консультировали терапевт, оториноларинголог, офтальмолог, эндокринолог, стоматолог, по показаниям - врачи других специальностей.

2.2.1.1 Оценка степени тяжести пузырчатки с использованием клинических индексов

Для оценки тяжести заболевания в процессе исследования у всех больных пузырчаткой были использованы наиболее часто используемые за рубежом клинико-диагностические индексы, позволяющие объективизировать оценку тяжести поражения при пузырчатке: бальная оценка тяжести аутоиммунных буллезных заболеваний кожи (ABSIS, Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score), индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index), оценка активности вульгарной пузырчатки (PVAS, Pemphigus Vulgaris Activity Score), дерматологический индекс тяжести заболевания (DIDS, Dermatology Index of Disease Severity).

Балльная оценка тяжести аутоиммунных буллезных заболеваний кожи (ABSI, Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score). В данном индексе оценивали тяжесть поражения кожных покровов и слизистых оболочек. Параметр тяжести поражения кожи включал площадь поражения кожи (BSA) и «отягчающий коэффициент». Для определения BSA использовали «правило девяток», которым традиционно оценивается распространенность ожогов. Согласно этому правилу, голова и шея составляют 9%, верхняя конечность, включая кисть – 9%, бедро – 9%, голень со стопой – 9%, передняя поверхность туловища – 18%, задняя – 18%, промежность и половые органы – 1% поверхности тела.

Площадь поражения кожи (BSA) умножали на «отягчающий коэффициент», который составлял 1,5 при наличии пузырей, эрозий с экссудацией и/или при положительном симптоме Никольского, 1 - при сухих эрозиях и 0,5 - при эпителизации эрозий (исключая поствоспалительную эритему и/или гиперпигментацию). «Отягчающий коэффициент» определялся типом поражения, которое доминировало в исследуемой анатомической области (Pfützte M., Niedermeier A. et al., 2007).

Тяжесть поражения слизистых оболочек рта включала два параметра: распространенность поражения и степень дискомфорта при приеме пищи или жидкости. Для установления распространенности поражения делили слизистую оболочку рта на 11 участков: верхние и нижние десны, верхняя и нижняя губа, левая и правая щека, язык, дно полости рта, твердое небо, мягкое небо, глотка. В зависимости от наличия или отсутствия высыпаний каждому участку слизистой оболочки присваивали 1 или 0 баллов соответственно. Таким образом, площадь поражения слизистой оболочки рта определялась от 0 баллов (отсутствие высыпаний) до 11 баллов (тотальное поражение). Степень дискомфорта при приеме пищи основана на оценке тяжести симптомов и рассчитывалась путем анализа дисфагии при приеме различных типов пищи (от жидких до наиболее твердых). Тяжесть поражения слизистой оболочки рта оценивали по выраженности боли и/или

кровотечения, связанной с приемом определенной пищи. Тяжесть дискомфорта выражалась как 0, 0,5 или 1 балл по следующим критериям: отсутствие дискомфорта, редкое появление боли/кровотечения, регулярное появление боли/кровотечения, соответственно.

По завершении оценки по балльной шкале ABSIS все данные в баллах суммировались (Приложение А).

Индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index). При подсчете индекса отдельно оценивались активность поражения кожи, волосистой части головы, слизистых оболочек и вторичные изменения, которые суммировались (Murrell D.F., 2008; Daniel B.S., Hertl M., Werth V.P. et al., 2012).

Для определения активности поражения кожные покровы делили на 12 анатомических участков (уши, нос, другие области лица, шея, грудь, живот, спина/ягодицы, руки, кисти, ноги, стопы, половые органы). Для каждого участка кожи рассчитывалась активность патологического процесса с учетом числа и диаметра пузырей и/или эрозий (от 0 до 10 баллов): 0 баллов - патологические элементы отсутствуют; 1 балл – 1-3 элемента, причем до 1 элемента более 2 см в диаметре, нет элементов более 6 см в диаметре; 2 балла – 2-3 элемента, по крайней мере 2 элемента более 2 см в диаметре, нет элементов более 6см в диаметре; 3 балла – более 3 элементов, нет элементов более 6см в диаметре; 5 баллов – более 3 элементов, и/или по крайней мере 1 элемент более 6 см в диаметре; 10 баллов – более 3 элементов, и/или по крайней мере 1 элемент имеет более 16 см в диаметре (или тотальное поражение). Далее подсчитывалась сумма баллов по всем анатомическим областям (Murrell D.F., 2008).

В случае, когда количество элементов на участке составляет менее трёх, причем 1 элемент более 2 см в диаметре, но нет элементов более 6 см в диаметре, необходимо отдельно указывать количество таких элементов. При этом 1 элементу соответствует 1 балл, 2 элементам – 1,3 балла, 3 элементам – 1,6 баллов.

Активность патологического процесса на волосистой части головы устанавливалась по числу пораженных квадрантов (максимальное значение - 10 баллов) в баллах в зависимости от наличия эрозий и/или пузырей: 0 баллов – элементы отсутствуют; 1 балл – элементы в 1 квадранте; 2 балла – в 2 квадрантах; 3 балла – в 3 квадрантах; 4 балла – по всей площади головы; 10 баллов – по крайней мере 1 элемент должен иметь более 6 см в диаметре.

Для вычисления активности поражения слизистых оболочек их делили на 12 анатомических областей (глаза, нос, слизистая щек, твердое небо, мягкое небо, верхние десны, нижние десны, язык, дно полости рта, слизистая губ, задняя стенка глотки, аногенитальная область), каждой из которых начислялись баллы по количеству и размеру эрозий и/или пузырей: 0 баллов – элементы отсутствуют; 1 балл – 1 элемент; 2 балла – 2-3 элемента; 5 баллов – более 3 элементов или 2 элемента более 2 см в диаметре; 10 баллов – поражение всех областей. Подиндекс PDAI слизистые оболочки подсчитывался путем сложения суммы баллов в анатомических областях слизистых оболочек.

PDAI (вторичные изменения) определялся для указанных выше анатомических областей кожи и волосистой части головы по наличию гиперпигментации или эритемы на местах разрешившихся высыпаний: 0 баллов – элементы отсутствуют, 1 балл – элементы имеются (Приложение Б).

Оценка активности вульгарной пузырчатки (PVAS, Pemphigus Vulgaris Activity Score). Значение PVAS зависело от типа поражения кожных покровов, количества, распространенности элементов поражения на коже и слизистых оболочках, а также от наличия симптома Никольского. Число баллов рассчитывалось отдельно для кожи (от 0 до 11 баллов) и слизистых оболочек (от 0 до 7), после чего все баллы суммировались. Баллы для PVAS (кожа) опрееляли следующим образом: $PVAS (кожа) = a(b+c+d)$, где а) тип поражения кожных покровов (пузырь – 1 балл, корка – 0,5 балла, нарушение пигментации – 0 баллов); б) количество элементов поражения (более 20 пузырей (средний диаметр составляет 1

см) – 2 балла, 20 пузырей и менее – 1 балл; в) распространенность элементов поражения (по 1 баллу при обнаружении элементов в каждой анатомической области: волосистая часть головы, лицо, шея, туловище, конечности (по 1 баллу при наличии элементов на каждой конечности)); симптом Никольского (на видимо здоровой коже – 1 балл, вблизи пузырей и/или эрозий – 0,5 баллов, отрицательный симптом – 0 баллов).

Баллы для PVAS (слизистые оболочки) рассчитывались следующим образом: PVAS (слизистые оболочки) = $a(b+c)$, где а) тип поражения слизистых оболочек (пузырь – 1 балл, эрозия – 0,5 балла, отсутствие поражения – 0 баллов); б) количество элементов поражения (более 2 пузырей – 2 балла, 1-2 пузыря – 1 балл); в) распространенность элементов поражения на слизистых оболочках (по 1 баллу при обнаружении элементов в каждой анатомической области: ротовая полость и/или глотка, глаза, верхние дыхательные пути, анус, гениталии) (Приложение В).

Дерматологический индекс тяжести заболевания (DIDS, Dermatology Index of Disease Severity). Суммарный показатель DIDS определялся площадью поражения кожи и степенью функциональных ограничений. Для подсчета степени поражения поверхности тела каждой из областей начислялись проценты в зависимости от площади поражения. Поверхность поражения 1 ладони оценивалась в 1%, поражение только лица - 5%, головы и шеи - 10%, обеих рук - 20%, всего туловища (грудь, живот, спина), кроме ягодичной области - 30%, ног, включая ягодичную область - 40%. При подсчете DIDS не оценивались участки посвоспалительной гиперпигментации и рубцы.

Вторым компонентом оценки в DIDS являлись функциональные ограничения при выполнении повседневных действий в быту и на работе. Умеренными считались функциональные ограничения: явно ограниченная или осуществляемая с большим трудом деятельность; при этом для осуществления повседневных действий не требовались ни механические приспособления, ни помощь других людей. Тяжелым

функциональным ограничением считалась неспособность выполнять действия без помощи другого человека или механических приспособлений (Приложение Г).

2.2.2 Цитологическое исследование мазков-отпечатков для определения акантолитических клеток Тцанка

Для выявления акантолитических клеток Тцанка (округлые клетки шиповатого слоя эпидермиса и эпителия слизистых оболочек, образующиеся в результате акантолиза) применялся метод цитологического исследования мазков-отпечатков с помощью стерильного кусочка резины, которая накладывалась на обнажённое дно свежих пузырей или эрозий. Материал с исследуемой поверхности переносился на стерильные обезжиренные предметные стекла, фиксировался метиловым спиртом и высушивался при комнатной температуре, затем окрашивался по Романовскому-Гимзе в течение 20-30 минут свежеприготовленным раствором азур-эозина. Высушенные препараты исследовались в световом микроскопе Leica DM4000B (Германия) с помощью иммерсионной системы.

2.2.3 Первичная обработка биопсийного материала

Получение биообразцов кожи проводилось для гистологического исследования (пузырные элементы кожи и/или слизистых оболочек), нРИФ с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа (пузырь с захватом видимо неповрежденной кожи для исследования экспрессии белка PEP, видимо неповрежденная кожа для исследования фиксации IgA, M, G) и исследования методом ПЦР в реальном времени (видимо неповрежденная кожа). Биоптат, полученный от больного пузырьчаткой, делили скальпелем на три равные части:

Одну часть биоптата, пузырьный элемент (биоптат А - для патоморфологического исследования) помещали в промаркированный пластиковый контейнер, содержащий 7-10 мл 10% раствора забуференного формалина. Фиксацию биопсийного материала осуществляли в течение 12-24 часов при

комнатной температуре (23° С). Вторую часть (1/3 части биоптата) (биоптат В - для количественного исследования экспрессии гена *TLR7* методом ПЦР в реальном времени) помещалась в стерильную пробирку с плотно закрывающейся крышкой, заполненную реагентом для хранения РНК *RNAlater RNA Stabilization Reagent* (фирма *QIAGEN*), после чего немедленно осуществляли транспортировку биообразца до места хранения. Образец биоптата, находившийся в пробирке с реагентом для хранения РНК, помещали на сутки при температуре -4°С, на следующий день пробирка с биоптатом переносилась на длительное хранение при температуре -20°С, как было рекомендовано в описании к реагенту. Повторное замораживание и размораживание образца не допускалось. Третью часть биоптата (биоптат С - для исследования фиксированных антител (IgA, IgM, IgG, белка PEPР методом нРИФ) помещали в марлевую салфетку, смоченную физиологическим раствором, в течение 30 минут после иссечения доставляли в патоморфологическую лабораторию. Сразу после доставки в лабораторию биоптат заливали в среду для замораживания Tissue-Tek («Sakura», Netherlands). На замороженный предварительно раствор Tissue-Tek толщиной 3-4,0 мм (в форме размером 1,0*1,0) выкладывали биоптат эпидермисом вверх, сверху заливали Tissue-Tek и полученный биообразец помещали в морозильную камеру при температуре -30°С.

2.2.4 Морфологическое исследование

Фиксацию биопсийного материала осуществляли в 10% растворе забуференного формалина в течение 12-24 часов при комнатной температуре (23° С). После отмывания фиксатора в проточной воде проводилась стандартная гистологическая проводка биоптатов в автоматизированной вакуумной системе обработки тканей Leica ASP (Германия) путем обезвоживания в 96% этиловом спирте. Затем кусочки ткани пропитывали парафином, заливали в парафиновые блоки, из которых на ротационном микротоме Leica RM2125RT (Германия) изготавливали срезы толщиной 5мкм, которые растягивали на предметных стеклах. Окраску

гематоксилин-эозином проводили в автоматическом устройстве для окрашивания срезов тканей Leica Autostainer XL ST5010 (Германия). Полученные гистологические препараты заключали под покровное стекло и изучали с помощью светового микроскопа Leica DM4000B (Германия).

2.2.5 Реакция непрямой иммунофлюоресценции с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа для выявления фиксированных антител (IgA, IgM, IgG)

Для постановки реакция непрямой иммунофлюоресценции (нРИФ) с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) и определения фиксированных IgA, IgM и IgG срезы кожи пациентов толщиной 5-6 мкм, полученные после замораживания на криостатном микротоме, растягивали на предметных стеклах с полилизинным покрытием Vision biosystems plus slides (Великобритания) и высушивали при комнатной температуре 25°C в течение 30 минут, после чего срезы фиксировали в ацетоне в течение 2-х минут, а затем промывали в растворе фосфатного буфера (PBS-tween, pH 7,4±1) трижды по 5 минут. Для уменьшения неспецифического свечения фона на срезы наносили 5% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA-tween), инкубировали при комнатной температуре 25°C в течение 60 минут. Не смывая БСА, на срезы наносили антитела к IgA, IgM, IgG (первичные антитела - rabbit polyclonal antibodies, ready-to-use, «Cell Marque antibody», USA, разведение-1,42 нг/мл; вторичные - Goatanti-RabbitIgGLight 488, «Epitomics» USA, разведение 1:400) и инкубировали при комнатной температуре (25°C) в течение 60 минут, по истечении которых срезы промывали в растворе фосфатного буфера (PBS-tween, pH 7,4±1) трижды по 5 минут.

После промывания на срезы наносили вторичные антитела, меченные флюорохромом (Alexa Fluor 488, флюоресценция в зеленом диапазоне), инкубировали при комнатной температуре 25°C в течение 60 минут, отмывали раствором фосфатного буфера (PBS-tween, pH 7,4±1) трижды по 5 минут. Затем

срезы слегка подсушивали, заключали под покровное стекло в среду, содержащую нуклеотидспецифичный флюорохром DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол) (Alexa Fluor 405, флюоресценция в синем диапазоне), и помещали в планшет-папку во избежание выцветания флюорохромов.

Готовые препараты изучали с использованием системы анализа изображений, включающей *ex vivo* конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (КЛСМ) Olympus IX81S1F-S (Германия) (объективы x200 и x600), оснащенный фотомикрографической системой, и персональный компьютер на базе Intel Pentium 4 с предустановленным программным обеспечением "Olympus Fluoview Ver. 1.7b" (Рисунок 3).

При анализе препаратов в каждом поле зрения при помощи программного обеспечения выделялась область эпидермиса, где наблюдалось свечение иммуноглобулинов в виде «сетки» (зеленое свечение – IgG в области межклеточных промежутков; синее свечение – ядра кератиноцитов) (Рисунок 4).

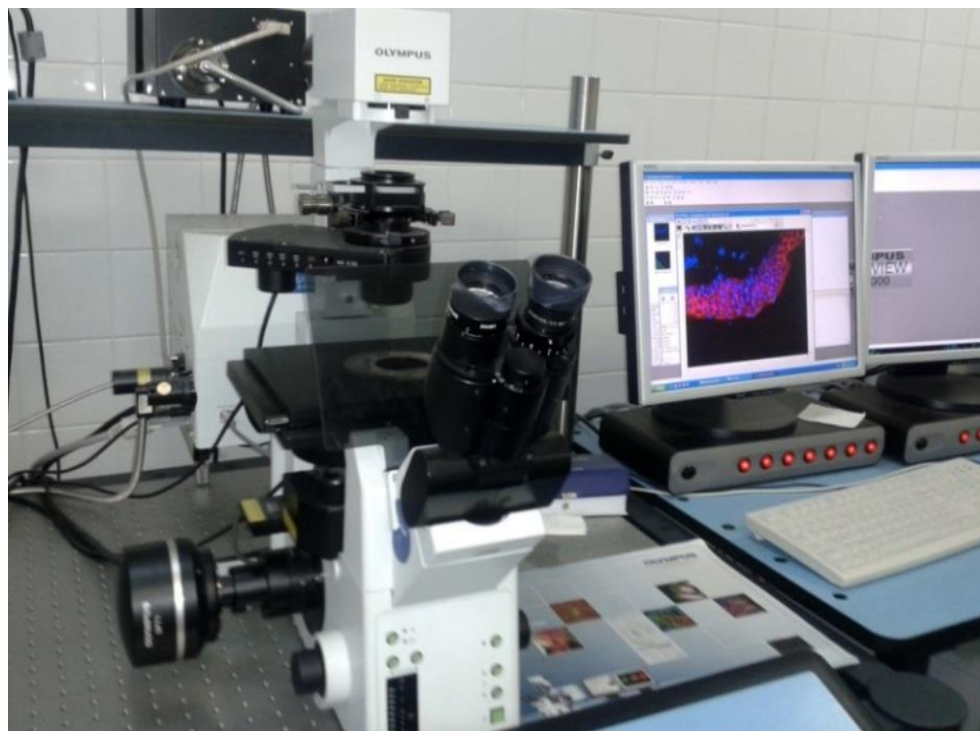


Рисунок 3. КЛСМ, оснащенный фотомикрографической системой, и персональный компьютер с программным обеспечением

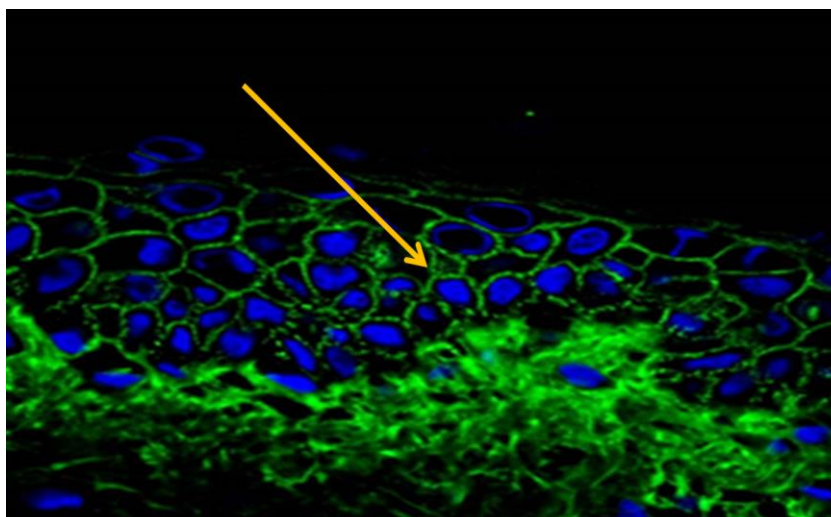


Рисунок 4. Фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса больного вульгарной пузырчаткой

2.2.6 Реакция иммунофлюоресценции с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа для изучения экспрессии структурного белка десмосом белка PEPР

Учитывая отсутствие данных относительно исследований экспрессии белка PEPР у больных пузырчаткой, проведено количественное определение экспрессии структурного белка десмосом PEPР в различных участках кожи (пузырь - зона 1, участок кожи, прилегающий к пузырю - зона 2 и видимо здоровая кожа - зона 3) у 30 больных пузырчаткой, (из них 17 (56,7%) мужчин и 13 (43,3%) женщин) в реакции иммунофлюоресценции с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Контрольную группу составили 10 здоровых лиц.

Для постановки непрямого РИФ (нРИФ) и определения экспрессии белка PEPР срезы кожи пациентов толщиной 5-6 мкм, полученные после замораживания на криостатном микротоме, растягивали на предметных стеклах с полилизинным покрытием Vision biosystems plus slides (Великобритания), высушивали при комнатной температуре 25°C в течение 60 минут, после чего срезы фиксировали в ацетоне в течение 2-х минут, а затем промывали в растворе фосфатного буфера (PBS-tween, pH 7,4±1) трижды по 5 минут.

Для предотвращения эндогенной пероксидазной активности на срезы наносили 5% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA-tween), инкубировали при комнатной температуре 25°C в течение 60 минут. Затем, не смывая БСА, на срезы наносили антитела к *PERP* в рабочем разведении 1:300, инкубировали при комнатной температуре 25°C в течение 60 минут, по истечении которых срезы промывали в растворе фосфатного буфера (PBS-tween, pH 7,4±1) трижды по 5 минут. После промывания на срезы наносили вторичные антитела, меченные флуорохромом, инкубировали при комнатной температуре 25°C в течение 60 минут. Вторичные антитела отмывали также раствором фосфатного буфера (PBS-tween, pH 7,4±1) трижды по 5 минут. По окончании промывания срезы подсушивали, заключали под покровное стекло в среду, содержащую DAPI, помещали в планшет-папку во избежание выцветания флуорохрома.

Готовые препараты изучали с использованием системы анализа изображений, включающей конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Olympus IX81S1F-S (Германия), оснащенный фотомикрографической системой, и персональный компьютер на базе Intel Pentium 4 с программным обеспечением "Olympus Fluoview Ver. 1.7b".

Количественные параметры экспрессии *PERP* определяли с использованием базового комплекта Программ - приложений к конфокальному лазерному сканирующему микроскопу Olympus Fluoview Ver.1.7 basic software package). Измерение производилось следующим образом. В каждом биоптате анализировали 5 полей зрения, выбранных подряд, с использованием объектива x20. В поле зрения выделяли область эпидермиса, в которой наблюдалась экспрессия белка *PERP*, после чего программа выдавала цифровое значение среднего показателя интенсивности свечения по заданному каналу в выделенной области (в условных единицах количества клеток, экспрессирующих белок *PERP*, на 100 кератиноцитов). Затем рассчитывали средний показатель экспрессии *PERP* для каждого биоптата (Рисунок 5).

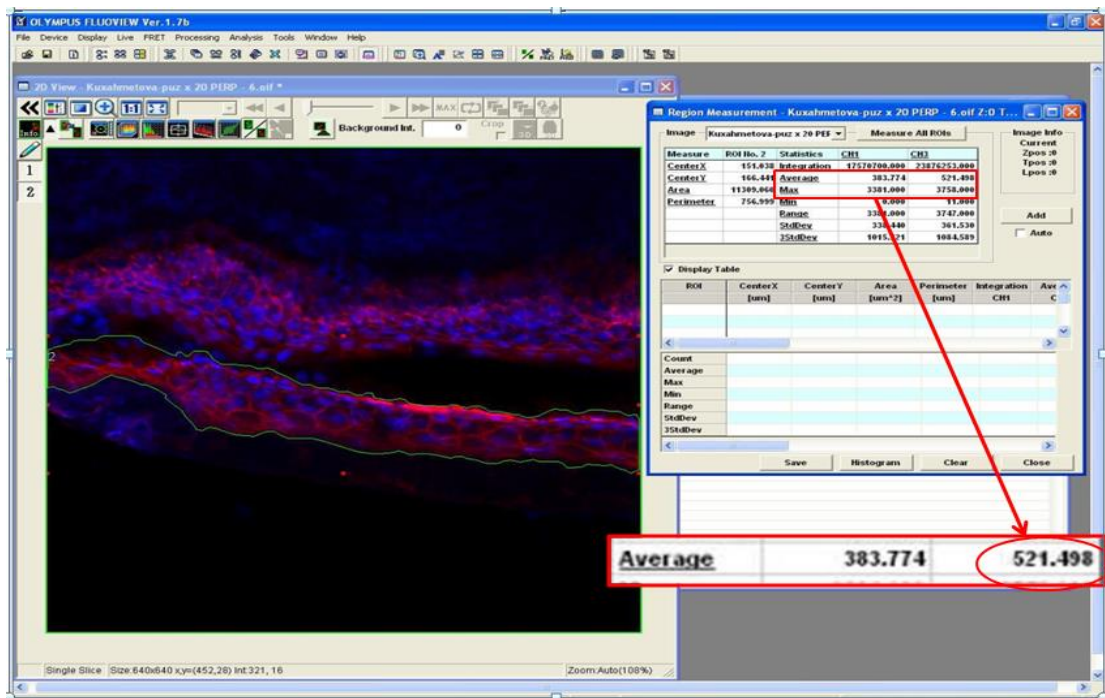


Рисунок 5. Подсчет экспрессии белка PERP в коже больного пузырчаткой

2.2.7 Метод обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов в режиме реального времени для количественного определения экспрессии гена толл-подобного рецептора 7 типа (*TLR7*)

Наиболее точным и чувствительным методом количественного определения изменений экспрессии генов является проведение обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в реальном времени. Для детекции и количественного определения экспрессии гена *TLR7* в коже больных пузырчаткой и здоровых лиц применялся метод ПЦР в реальном времени (Real-Time RCR).

Биоптат, предназначенный для исследований, помещали в стерильную пробирку, заполненную реагентом для хранения РНК *RNAlater RNA Stabilization Reagent* (фирма «QIAGEN», Нидерланды), после чего немедленно транспортировали биообразец до места хранения. Образец биоптата, находящийся в пробирке с реагентом для хранения РНК, помещался на сутки на +4°C, на следующий день пробирка с биоптатом переносилась на длительное хранение при -20°C, согласно рекомендациям в описании к реагенту. Непосредственно перед выделением

тотальной РНК из биообразца проводили взвешивание и гомогенизацию биообразца на приборе *TissueLyser II* (фирма QIAGEN, Нидерланды) в режиме 4 мин при 30 Гц/мин. Исследование проводилось в несколько этапов:

1. Выделение суммарной (тотальной) РНК. Суммарную РНК у больных пузырчаткой и здоровых лиц выделяли с помощью набора Rneasy Mini Kit (фирма «QIAGEN», Германия) согласно протоколу производителя. Предварительно образцы кожи были подвергнуты гомогенизации на гомогенизаторе Tissue Lyser (фирма «QIAGEN», Германия) в буфере с β -меркаптоэтанолом. Осадок РНК растворяли в воде, отбирали аликвоту и определяли концентрацию водного раствора РНК на биофотометре Eppendorf (Германия). Хранили раствор РНК при -20°C .

2. Проведение реакции обратной транскрипции. Синтез кДНК с использованием в качестве матрицы РНК, выделенной из изучаемых образцов, проводили при помощи коммерческого набора для постановки обратной транскрипции «ОТ-ПЦР» (фирма ЗАО «Силекс», Россия). Для постановки одной реакции брали 100 нг тотальной РНК. При постановке реакции обратной транскрипции следовали инструкции к набору. Водный раствор РНК (от 100нг) смешивали с гексапраймером Random и инкубировали при $+72^{\circ}\text{C}$ в течение 5 минут. Затем помещали на -20°C в течение 5 минут. Добавляли в реакционную смесь (буфер 5x, MgCl_2 – 25mM, обратная транскриптаза) вышеупомянутого набора и проводили реакцию по программе: $+40^{\circ}\text{C}$ – 60 минут, $+70^{\circ}\text{C}$ – 15 минут. Хранили кДНК при -20°C .

3. ПЦР - Real time с продуктами обратной транскрипции. Главной особенностью метода Real-Time RCR является возможность регистрировать накопление продукта реакции непосредственно в ходе ПЦР. ПЦР в реальном времени проводилась на приборе *LightCycler 480* (фирма «Roche» Швейцария) с использованием линейных разрушаемых зондов, меченных флуорофором и гасителем флуоресценции (TaqMan). Для амплификации исследуемых генов использовали наборы с HS Taq полимеразой в соответствии с инструкцией

производителя с добавлением по 20 пмоль каждого праймера и 10 пмоль соответствующего зонда и 2 мкл кДНК.

Для осуществления постановки Real-Time RCR были подобраны специфические праймеры и зонды. Праймеры для каждого гена, подбирались следующим образом: прямой праймер (Fw) должен быть комплементарным специфической последовательности экзона n , а обратный праймер должен быть комплементарным специфической последовательности экзона $(n+1)$.

Зонд для каждого гена подбирался таким образом, чтобы приблизительно половина последовательности зонда с 5'-конца была комплементарна 3'-последовательности одного экзона, а вторая половина зонда была комплементарна началу следующего экзона (Рисунок 6).

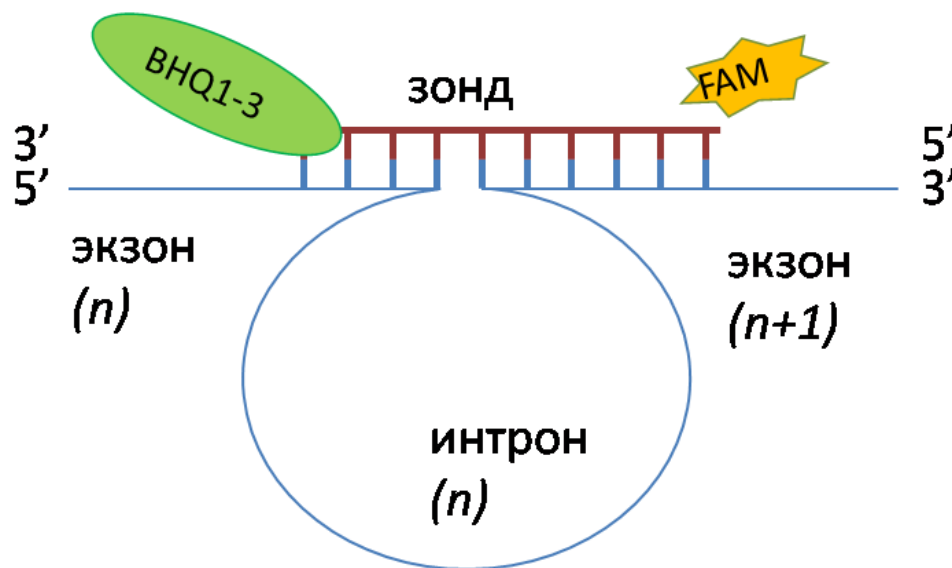


Рисунок 6. Схема подбора зонда для постановки ПЦР в реальном времени

Таким образом достигался максимум специфичности зонда к последовательности кДНК (копийной ДНК), получаемой при помощи реакции обратной транскрипции с использованием в качестве матрицы выделяемой из биообразца тотальной РНК.

Для определения уровня экспрессии гена *TLR7* применяли оптимизированные для метода Real-Time PCR пары праймеров QuantiTect Primer Assay (Qiagen, США).

Для оценки уровня экспрессии гена *TLR7* 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" (Таблица 5).

Таблица 5 - Последовательности праймеров генов *TLR7*, β -актин, *PANK*

Анализируемый ген	Олигонуклеотидные праймеры
<i>TLR7</i>	CTCCATGCCATCAAGAAAGTTG GTGTCCACATTGGAAACACCAT
β -актин	GGATGCAGAAGGAGATCACTG CGATCCACACGGAGTACTTG
<i>PANK</i>	GCCGTGTAICTCCAAGGACAA CAGCAGCTTCATGGAGACCA

Считывание сигнала флуоресценции с канала детекции FAM устанавливали на стадии отжига праймеров (62°C). Флуоресцентный сигнал был детектирован с помощью программного обеспечения LightCycler®480 Software release 1.5.0 SP4.

При элонгации праймеров в ходе реакции гибридизованные ранее на этапе денатурации зонды подвергались разрушению за счет 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы. Интенсивность сигнала возрастала с каждым циклом ПЦР пропорционально накоплению ампликонов.

Для обеспечения одинаковых условий прохождения реакции и исключения ошибки при внесении необходимых реактивов в каждую лунку анализируемой плашки готовили 2х ПЦР-премикс в расчете на все реакции: 10х буфер для ПЦР, 100 mM дезоксидинуклеотиды, деионизированная вода. Непосредственно перед постановкой ПЦР в реальном времени готовили ПЦР-микс с использованием 2х ПЦР-премикса: 2х ПЦР-премикс, 2.5 ед. Taq-полимеразы, деионизированная вода.

После разнесения ПЦР-микса в каждую пробу добавляли соответствующий предварительно подготовленный микс зонда и праймеров в двух повторах, а также кДНК в качестве матрицы в соответствии со схемой расположения проб. ПЦР проводили в режиме 45 циклов: 95°C (денатурация) – 10 сек., 62°C (отжиг) – 50 сек.,

72°C (элонгация) – 10 сек. При анализе уровня экспрессии генов в пределах одного эксперимента количество проводимых ПЦР-реакций составляло не менее 15-20 повторов. Флуоресцентный сигнал детектировали на программном обеспечении прибора *LightCycler®480 Software release 1.5.0 SP4*. В результате исследований были получены кривые, характеризующие течение амплификации транскриптов изучаемых генов, представленных в образцах кожи пациентов.

При анализе результатов амплификации использовали метод прямого сравнения графиков накопления продуктов реакции ПЦР в реальном времени по максимуму второй производной, предлагаемый разработчиком программного обеспечения. Полученные данные оценивали по значению *C_p* (crossing point) – значению цикла реакции, характеризующему кривую графика амплификации. Количество исследуемых кДНК, полученных из РНК путем обратной транскрипции, в образцах рассчитывали путем определения пороговых циклов Real-Time RCR. Для определения экспрессии каждого гена Real-Time RCR проводили в трех повторностях, после чего рассчитывалось среднее значение экспрессии гена. Уровень экспрессии генов *TLR7*, *β-актин*, *PANK* оценивали в условных относительных единицах экспрессии - относительных единицах (ОЕ) с расчетом *M* - среднего значения; *m* - ошибки среднего значения. Проводили нормирование общего количества РНК в образцах, которое позволило нивелировать различия в количестве и/или качестве стартового материала, а также в условиях пробоподготовки.

2.2.8 Иммуноферментный анализ для определения антител к десмоглеинам 1 и 3 типов

Содержание антител к десмоглеинам 1 и 3 типов в сыворотке крови больных пузырчаткой и здоровых лиц в настоящем исследовании оценивали методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в отделе лабораторной диагностики ИППП и дерматозов. Образцы крови для определения антител к Dsg 1 и 3 типов получали в пробирки с дозированным отрицательным

давлением (вакутейнеры), с двуокисью кремния (SiO_2) в качестве активатора свертывания и инертным полимером или гранулами для разделения сыворотки крови от сгустка (BD Vacutainer (Becton, Dickinson, США)). Сыворотку крови получали путем центрифугирования в течение 10 минут при охлаждении до 4°C в центрифуге при скорости вращения ротора 3000 оборотов в минуту. До исследования полученные образцы сохраняли в замороженном состоянии в морозильной камере при температуре минус $70\text{-}80^\circ\text{C}$. Повторение циклов замораживания и оттаивания в процессе хранения образцов не допускалось.

Постановку ИФА проводили с использованием диагностических наборов реагентов Anti-Desmoglein 3 ELISA и Anti-Desmoglein 1 ELISA (Euroimmun AG, Германия), позволяющих количественно охарактеризовать активность антител к Dsg1 и Dsg3 согласно инструкции производителя. В лунки планшета (96 лунок) для ИФА вносили по $100\ \mu\text{l}$ растворов калибраторов, позитивного или негативного контроля и сыворотки крови больных. Планшеты инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре (от $+18^\circ\text{C}$ до $+25^\circ\text{C}$), после чего отмывали 3 раза $450\ \mu\text{l}$ готовым к использованию промывочным буфером, удаляли остатки жидкости с микропланшета, перевернув его лунками вниз над абсорбирующей бумагой. С помощью пипетки в каждую лунку микропланшета вводили $100\ \mu\text{l}$ ферментного конъюгата (биотинилированные antirabbit IgG человека с пероксидазой). Инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре (от $+18^\circ\text{C}$ до $+25^\circ\text{C}$), после чего отмывали 3 раза $450\ \mu\text{l}$ готового к использованию промывочного буфера. С помощью пипетки в каждую лунку вводили $100\ \mu\text{l}$ раствора хромоген/субстрата. Инкубировали 15 минут при комнатной температуре (от $+18^\circ\text{C}$ до $+25^\circ\text{C}$), защищая от воздействия прямых солнечных лучей. Далее с помощью пипетки в каждую лунку вводили $100\ \mu\text{l}$ стоп-раствора в том же порядке и с той же скоростью, как и раствор хромоген/субстрата. Фотометрическое измерение интенсивности света (экстинция образцов) производилось с помощью фотометра Multiskan Ascent (hermoLabsystems, Финляндия) при длине волны $450\ \text{nm}$ с референсными длинами волн от 620 до 650

нм в течение 30 минут после добавления стоп-раствора. С помощью входящих в тест-систему калибраторов с активностью 2 RU/ml, 20 RU/ml и 200 RU/ml, по значениям оптической плотности, строилась стандартная калибровочная кривая.

Результаты вычислялись путем подсчета отношения экстинкции образца (оптической плотности) от пациента к экстинкции калибратора 2 (величина отношения $< 1,0$ – negative; величина отношения $\geq 1,0$ – positive). Если значение оптической плотности исследуемого образца меньше, чем значение для калибратора 20 RU/ml (cut-off тест-системы), образец рассматривался как отрицательный. Если значение оптической плотности исследуемого образца превышал значение для калибратора 200 RU/ml, результат повторяли с разведением исследуемой сыворотки в соотношении 1:400 с последующим умножением полученного по калибровочной кривой значения на 4. Расчет количественных показателей содержания антител к Dsg1 и Dsg3 производился путем определения относительных единиц - RU/ml (relative unit – относительная единица на миллилитр) по стандартной кривой, полученной с использованием калибраторов 1-3.

2.2.9 Метод секвенирования по Сенгеру для определения нуклеотидной последовательности гена *PERP*

Исследование молекулярной структуры кодирующей белок последовательности гена *PERP* человека проводилось в несколько этапов.

1 этап. Выделение ДНК из образцов крови, полученных от пациентов с пузырчаткой и здоровых лиц, проводили с помощью набора реагентов GeneJET (фирма «Fermentas», Литва) в соответствии с инструкцией производителя.

2 этап. Амплификация кодирующей белок последовательности ДНК трех экзонов гена *PERP* и визуализация продуктов амплификации в геле в результате электрофореза. На этапе проведения ПЦР в реальном времени определяли эффективность работы праймеров, которые были подобраны на основании найденных в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) последовательностей

транскриптов гена *PERP*. Нуклеотидная последовательность гена *PERP* была найдена в базе данных GenBank под номером ID: 64065. Праймеры для полимеразной цепной реакции подбирались с помощью программы Oligob, которая позволяет проектировать праймеры и олигонуклеотидные последовательности для ПЦР. Для проведения ПЦР использовали набор с HS Taq ДНК-полимеразой (фирма «Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Характеристика праймеров, ПЦР-продуктов, а также условия проведения амплификации трех экзонов гена *PERP* представлены в Таблице 6.

Таблица 6 - Последовательности праймеров для амплификации кодирующей белок последовательности ДНК трех экзонов гена *PERP*.

Условия проведения амплификации, размер ПЦР-продуктов

Экзон	Праймеры	Условия амплификации	Размер ПЦР-продуктов
1-й	Perplex for CTCTGAGTCACCGGAATCTAG Perplex rev TTCTGTTTCTGAGCTTGGTGTT	95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 10 сек; 62°C – 10 сек; 72°C – 25 сек; 72°C – 3 мин	1 экон: 609 пар оснований
2-й	Perp2ex rev TCCGAGAACAGATTAGAAACTG Perp2ex for CCTTAAAATATGGAGATGCTCA A	95°C – 3 мин; 5 циклов: 95°C – 10 сек; 68°C – 10 сек; 72°C – 25 сек; 5 циклов: 95°C – 10 сек; 64°C – 10 сек; 72°C – 25 сек; 25 циклов: 95°C – 10 сек; 62°C – 10 сек; 72°C – 25 сек; 72°C – 3 мин	2 экон: 419 пар оснований
3-й	Perp3ex for GCAGAAACTTGGTGGGAAGGA Perp3ex rev GTTCAAAGTCGCCTGGAGAA	95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 10 сек; 62°C – 10 сек; 72°C – 25 сек; 72°C – 3 мин	3 экон: 406 пар оснований

Для амплификации второго экзона гена *PERP* использовали подход «Touchdown» (или «ступенчатая ПЦР») с каскадным понижением температуры на этапах отжига праймеров. Применение варианта ПЦР «Touchdown» позволило снизить количество неспецифического продукта в реакции. Таким образом, были получены продукты амплификации трех экзонов гена *PERP* (Рисунок 7).

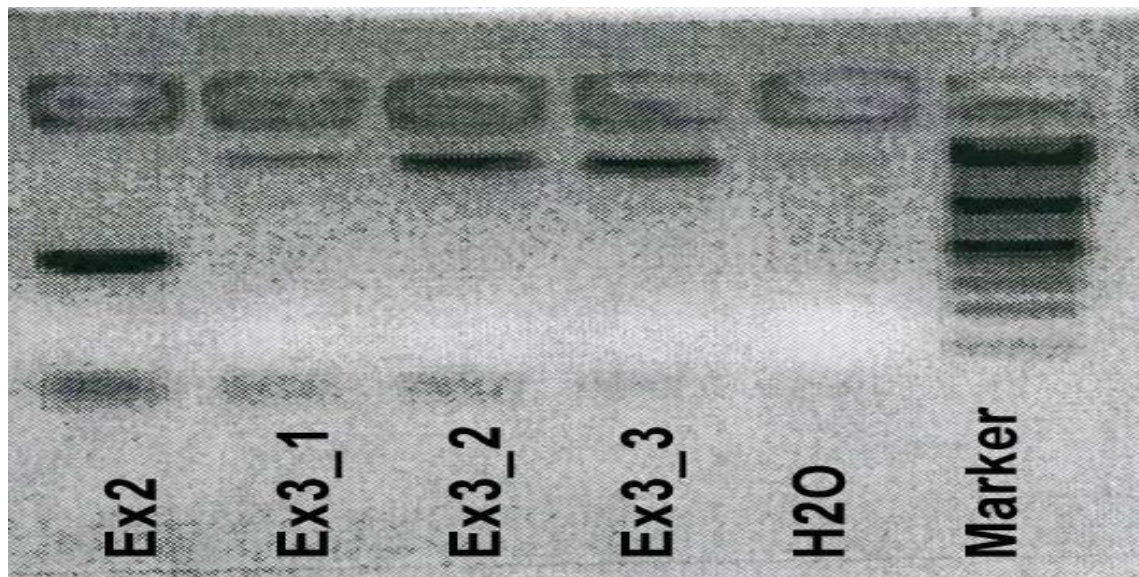


Рисунок 7. Электрофореграмма продуктов амплификации. Приведены ампликоны, соответствующие второму и третьему экзонам гена *PERP*, полученные в нескольких повторностях

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР-реакции проводили в 2% агарозном геле. Результаты прохождения реакций амплификации оценивали с помощью трансиллюминатора с фотокамерой для фотографирования гелей в ультрафиолетовом свете с длиной волны 310 нм. Полученные ПЦР-продукты осаждали с помощью ферментов: экзонуклеаза I из *E.coli* (*EcoI*) и щелочная фосфатаза (*SAP*) (*Fermentas*). В реакцию брали 0,5 мкл экзонуклеазы (20 ед. в мкл), 1 мкл фосфатазы (1 ед. в мкл) и 5 мкл ПЦР-продукта. Реакцию проводили при следующих условиях: 1) 37°C - 30 мин, 2) 90°C -20 мин. Продукты реакции осаждения использовали при постановке сиквенсной реакции.

3 этап. Секвенирование ДНК. Проведение сиквенсной реакции осуществляли с использованием набора реагентов для секвенирования ДНК Big Dye Terminator v3.1

Sequencing RR-100 (фирма Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Продукты сиквенсной реакции осаждали спиртом, после чего проводили их электрофоретическое разделение с использованием генетического анализатора 3130 Genetic Analyzer (фирма Applied Biosystems, США) (Рисунок 8).

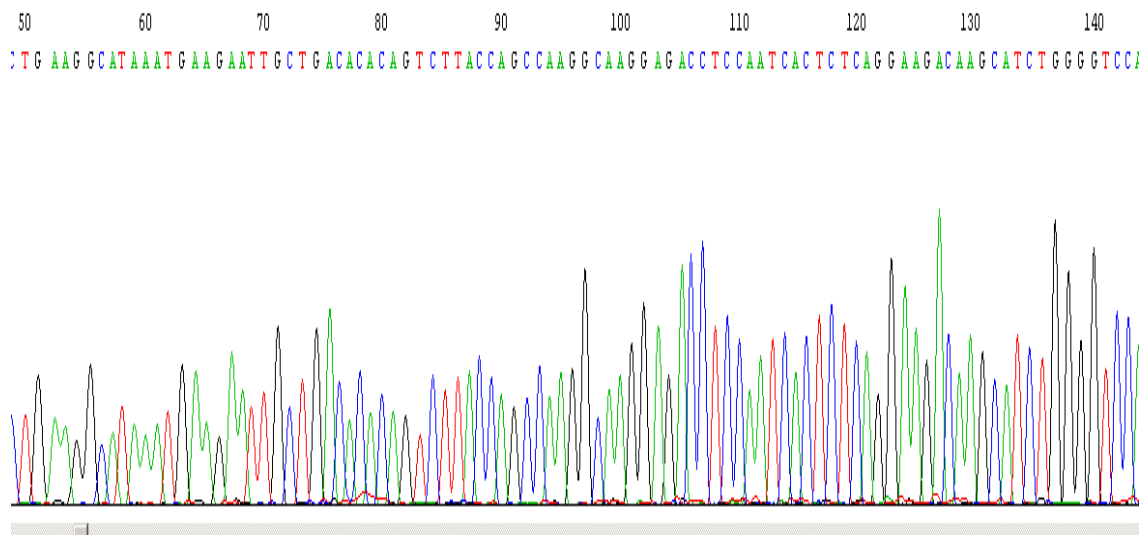


Рисунок 8. Электрофореграмма результатов постановки реакции секвенирования

4 этап. 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/>).

2.2.10 Методологии, использованные при получении экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных

2.3.10.1 Выделение и очистка антител класса G из сывороток крови больных пузырчаткой и здоровых лиц методом аффинной хроматографии

В основе метода выделения и очистки антител (IgG) из сывороток крови человека лежит способность бактериального белка G специфически связываться с Fc-фрагментами IgG. Белок G, иммобилизованный на носителе, через который

пропускают сыворотку крови, связывает и удерживает сывороточные IgG больных пузырчаткой.

Для создания экспериментальной модели пузырчатки и проведения исследований по определению условий эффективного функционирования селективного иммуносорбента для удаления IgG к десмоглеину 3 типа получены сыворотки крови 78 больных вульгарной пузырчаткой, содержащие антитела к Dsg3, и 100 здоровых лиц, не содержащие антитела к Dsg3, объединенные в пулы сывороток больных пузырчаткой и здоровых лиц соответственно. Наличие антител к Dsg3 у больных пузырчаткой определяется методом ИФА с помощью наборов Anti-Desmoglein 3 ELISA (Euroimmun AG, Германия).

Выделение препаратов IgG из пула сывороток крови больных пузырчаткой, содержавших антитела к Dsg3, и здоровых лиц проводилось методом иммуноаффинной хроматографии на колонке с белок G - сефарозой (сефароза с иммобилизованным белком G) (Биалекса, Россия) согласно стандартным технологиям (Anhalt G.J., 1982).

Материалы и реактивы: G-сефароза (сефароза с иммобилизованным белком G) (Биалекса, Россия); азид натрия 0,02%; буфер для промывки (0,1 М фосфатный буфер, 0,15М NaCl, pH 7,2–7,4); буфер для элюции (0,1М глицин, pH 2,5); 1 М трис-буфер, pH 8,0.

Оборудование: колонка хроматографическая разборная BioScale 10 мл (Bio-Rad, США); перистальтический насос Econo-Pump (Bio-Rad, США); центрифуга с охлаждением Allegra X-12R (Beckman-Coulter, США); центрифужные фильтры Amicon с пределом отсечения 100 кДа (Millipore, Франция); спектрофотометр BioPhotometer с длиной волны 280 нм (Eppendorf, ФРГ).

Колонку хроматографическую разборную BioScale 10 мл (Bio-Rad, США) заполняли суспензией G-сефарозы (сефароза с иммобилизованным белком G) (Биалекса, Россия), подсоединяли к перистальтическому насосу (BioRad, США) и уравнивали буфером для промывки (0,1 М фосфатный буфер, 0,15М NaCl, pH

7,2-7,4) (5-10 объемов колонки). Далее в колонку вносили сыворотку крови больных пузырьчаткой из расчета 2 мл сыворотки на 1 мл G-сефарозы. Затем колонку промывали буфером для промывки с периодическим измерением оптической плотности выходящего с колонки буфера в спектрофотометре BioPhotometer с длиной волны 280 нм (Eppendorf, ФРГ) до тех пор, пока уровень оптической плотности жидкости не сравнялся с оптической плотностью чистого буфера для промывки. При промывке выходящий с колонки буфер собирали в отдельную емкость, формируя т.н. "проскок" - смесь белков, содержащихся в сыворотке крови. Далее колонку промывали буфером для элюции (0,1М глицин, pH 2,5). Элюат собирали в пробирки с 1 М трис-буфером (pH 8,0) в соотношении 1 часть трис-буфера на 4 части элюата (процедура проводится для нейтрализации pH элюата). Длительность элюции контролировалась путем измерения оптической плотности вытекающего из колонки раствора элюата на спектрофотометре с длиной волны 280 нм. Элюцию прекращали, когда оптическая плотность раствора элюата снижалась до уровня оптической плотности буфера для элюции.

Проведение электрофореза

Реагенты: сток-раствор для приготовления геля: 29,2г акриламида и 0,8 г N'N'-бис-метиленакриламида растворить в 100 мл деионизированной воды (хранили в холодильнике в темной склянке); буфер для приготовления концентрирующего геля Tris-HCl 0,5М pH=6,8; буфер для приготовления разделяющего геля Tris-HCl 1,5М pH=8,8; персульфат аммония (ПСА) 10% (готовили в день приготовления геля); ТЕМЕД; меркаптоэтанол; электродный буфер 10x: 0,025 Tris -0,192 М-глициновый буфер pH=8,3; раствор белков с известной молекулярной массой (kDa).

После хроматографии производилась проверка качества выделения антител (элюата и "проскока") методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэммли на наличие и степень очистки антител

(Остерман Л. А., 1981). При обнаружении IgG в проскоке, проскок заново наносился на колонку и очистка повторялась (Рисунок 9).

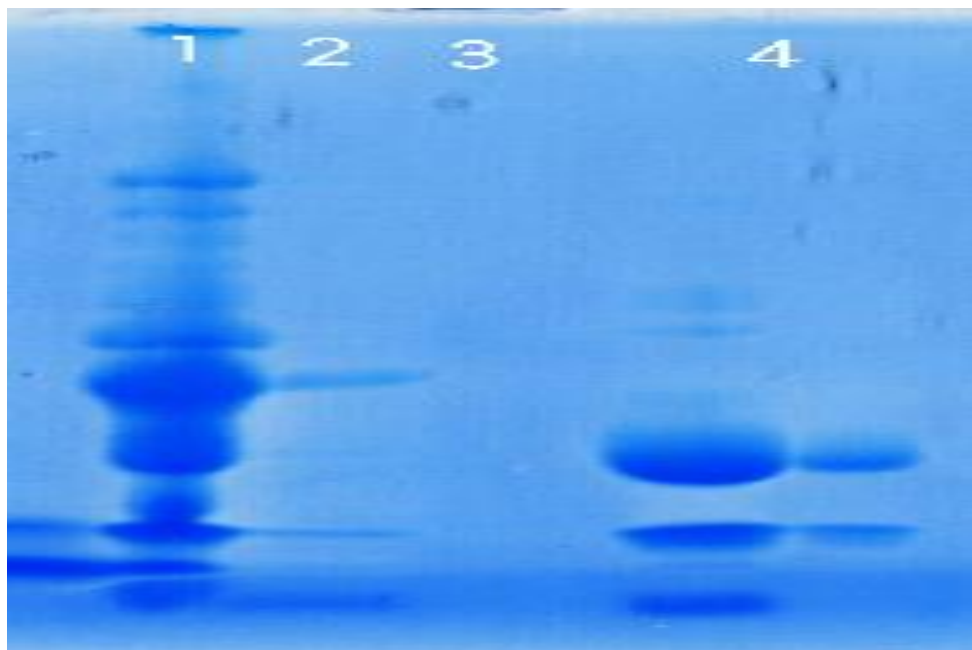


Рисунок 9. Электрофореграмма: 1 – образец сыворотки больного пузырчаткой, 2 – проскок, 3 – фракция элюата без IgG, 4 – фракция элюата с IgG

Фракции элюата, содержащие IgG, объединяли и концентрировали ультрацентрифугированием в центрифуге с охлаждением Allegra X-12R (Beckman-Coulter, США) при 3000g в фильтрах Amicon (Millipore, Франция) с пределом фильтрации 100 kDa. В процессе центрифугирования в фильтры добавляли стерильный изотонический буфер, в результате чего получали концентрированный раствор IgG в буфере. Далее из фильтров (Амикон) концентрированный раствор полученного препарата IgG количественно переносили в пробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 мл. В последующем 1 мкл препарата IgG растворяли в 1 мл 0,9% NaCl. Концентрацию белка измеряли в лабораторных условиях по оптической плотности УФ-методом при длине волны 280 нм. Полученное значение оптической плотности умножали на коэффициент 1,4 и получали концентрацию IgG в мг/мл. После определения концентрации IgG в препарате (прибор Konelab 20XTI), для приготовления необходимых доз, препарат разводили 0,9% NaCl. Полученные белки IgG хранили при $t - +4^{\circ}\text{C}$.

Для введения лабораторным животным препарат IgG стерилизовали фильтрацией через фильтры Millex (Merck Millipore, США) с размером пор 0,22мк.

2.2.10.2 Проведение экспериментальных работ с введением лабораторным животным (новорожденным мышам линии BALB/c) препаратов суммарных IgG человека

Для создания экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных и оценки эффективности разработанного иммуносорбента для селективного удаления антител к Dsg3 проводили серию экспериментов на группах мышей - новорожденных самцах инбредной линии BALB/c.

Эксперименты выполнялись в исследовательском учреждении Лаборатория биологических испытаний (ЛБИ) Филиала ФГБУ науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН, проспект Науки 6, г. Пущино, Московская обл., 142290 Россия, руководитель исследования Н.А. Мурашев). Питомник имеет международную аккредитацию AAALACi. Система управления качеством производства лабораторных животных в Питомнике сертифицирована на соответствие международным требованиям ИСО 9001:2008. Все исследования на животных выполняли согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н г. Москва «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», требованиям Национального стандарта Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ 53434-2009, актуализация 01.03.2018г.), постановлению локального этического комитета по вопросам биомедицинских исследований Филиала ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (№137/17 от 27.12.2017г.), а так же «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств») (Бунятян Н.Д., 2012).

Процедуры в исследовании выполнены согласно утвержденному Плану исследований и Стандартным операционным процедурам.

Источник животных. Эксперименты выполнялись на неонатальных мышах - самцах инбредной линии BALB/c с массой 2,5-3,5 г, в возрасте менее 24 часов от рождения, предоставленных научно-производственным предприятием «Питомник лабораторных животных» Филиала ИБХ РАН г. Пущино. Производитель животных предоставил данные последнего контроля здоровья животных, подтверждающие их SPF-статус (животные, свободные от патогенов). В эксперимент были отобраны животные без признаков отклонений здоровья, таким образом, чтобы индивидуальные значения массы не отклонялись от среднего значения в пределах одного пола более чем на 20%.

Содержание и уход. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, указанным в руководстве Guide for Care and Use of Laboratory Animals (ILA Rpublication, 1996, National Academy Press). Мыши получали стандартный корм и питьевую воду, фильтруемую системой MilliRO ad libitum.

Параметры окружающей среды. Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20-26°C, относительная влажность 30-63%). Показатели температуры и влажности постоянно контролировались в каждой экспериментальной комнате автоматически с помощью системы Eksis Visual Lab (EVL, ОАО «Практик-НЦ», СОП Gen/48) и документировались в электронном виде. В комнатах содержания животных поддерживался 12 часовой цикл освещения и 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час.

Клетки. Животных содержали совместно с матерью в макролоновых клетках Тип-2, оборудованных стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальными разделителями для корма и стальными держателями этикеток.

Подстил. В качестве подстилки использовался беспылевой подстил для грызунов LIGNOCEL (JRS, Germany), представляющий древесную крошку. В лаборатории

периодически осуществлялся анализ подстила на микробиологическую контаминацию. Данные о результатах анализов хранятся в документации лаборатории. Контаминации подстила, способной повлиять на результаты исследования, не было.

Идентификация. При формировании групп животных каждому животному был присвоен индивидуальный номер. На этикетке клетки указывали группу, номер животного, метку.

Все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с протоколом, утвержденным биоэтической комиссией ФИБХ РАН. Исследование выполнялось согласно требованиям Национального стандарта Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ 53434-2009). Все процедуры в исследовании выполнены согласно утвержденному письменному Плану исследований и Стандартным операционным процедурам.

Работа с лабораторными животными. Препараты IgG вводили животным из одного помета, которых распределяли на две группы: опытную и контрольную.

Для создания экспериментальной модели пузырчатки мышам из опытных групп (n=53) вводили препараты антител, полученные из пула сывороток больных пузырчаткой, содержащие антитела к Dsg3. Животным контрольных групп (n=46) вводили препараты IgG, полученные от здоровых лиц, не содержащие IgG к Dsg3.

Для оценки *in vivo* эффективности экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой, мыши были разделены на 4 группы (n=43): 1 группе вводили препараты IgG, выделенные из пула сывороток крови больных пузырчаткой (основная группа) (n=13); 2 группе вводили препараты IgG, полученные из пула сывороток крови больных пузырчаткой и очищенных на селективном иммуносорбенте от антител к десмоглеину 3 типа (n=13); 3 группе вводили препараты IgG, выделенные из сывороток крови здоровых лиц (контрольная группа) (n=12); 4 группе вводили фосфатно-солевой буфер (n=5). Статистически значимых различий между основной и контрольной группами новорожденных

мышей по массе тела и краниокаудальным измерениям выявлено не было. Препараты IgG вводились однократно в дозах 10, 15, 20, 30 мг/мышь, экспозиция 24, 48 часов; двукратно в дозе по 10, 15 мг/мышь с промежутком между введениями - 24 часа, двукратно в дозе 15 мг/мышь с промежутком между введениями - 24 часа, экспозиция 36 часов.

Препараты IgG, полученных от больных пузырчаткой и здоровых лиц (в стерильном фосфатно-солевом буфере, pH 7,2) вводили неонатальным мышам инсулиновым шприцом с иглой 27G. После завершения введения препаратов IgG животных подвергали эвтаназии путем ингаляции CO₂ в соответствии с планом эксперимента (через 24 или 48 часов), после чего проводили осмотр кожных покровов и получали аутопсийный материал кожи для патоморфологического исследования и нРИФ.

Клиническая оценка поражений кожных покровов животных. В ходе исследования проводили текущие наблюдения: клинический осмотр, взвешивание, краниокаудальные измерения и регистрацию симптома Никольского с периодичностью 18, 24, 48 часов. При визуальном осмотре проводили оценку выраженности поражений кожи в виде пузырей и/или эрозий: 1+ – три или менее пузырей и/или эрозий; 2+ – от 4 до 10; 3+ – более 10 пузырей и/или эрозий или наличие некроза кожи (более 20% кожного покрова лабораторного животного).

Морфологическое исследование аутопсийного материала. При морфологическом исследовании материал фиксировали 10% забуференным формалином. Гистологические образцы подвергали стандартной гистологической проводке, заливали в парафиновые блоки, ориентируя образцы строго в вертикальной плоскости. Из парафиновых блоков на микротоме изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином в устройстве Leica Autostainer XL ST5010 (Германия). Готовые препараты исследовались с помощью светового микроскопа Leica DM4000B (Германия).

Иммуногистохимическое исследование (ИРИФ ex vivo с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ)). Для исследования методом ИРИФ образцы кожи животных заливали в криоконсервирующую среду (Tissue-Tek ® O.C.T™ Compound, «Sakura», Япония) и замораживали. Из полученных блоков на криостатном микротоме изготавливали срезы толщиной 5-6 мкм, растягивали их на предметных стеклах с полилизинным покрытием, высушивали при комнатной температуре 25°C в течение 30 минут. После высушивания препараты со срезами помещали в фольгу, хранили в морозильной камере. Для проведения ИРИФ на срезы наносили первичные антитела - кроличьи поликлональные антитела к IgG человека (Rabbit polyclonal antibodies) («Cell Marque antibody», USA) и инкубировали в течение 1ч при комнатной температуре. Срезы промывали в растворе PBST трижды по 5 минут. Затем наносили вторичные антитела - козы антитела против IgG кролика (Goatanti-Rabbit) («Epitomics» USA), меченные флюорохромом (Alexa Fluor 488) и инкубировали в течение 1ч при комнатной температуре. Срезы отмывали раствором PBST трижды по 5 минут, подсушивали, заключали под покровное стекло в среду, содержащую нуклеотидспецифичный флюорохром DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол) (Alexa Fluor 405). Изображения анализировали с помощью *ex vivo* КЛСМ Olympus IX81S1F-S (Германия) с использованием объективов х60 и х100, с архивацией изображения для последующего морфометрического анализа.

2.2.11 Технологии, использованные при создании иммуносорбента для селективного удаления аутоантител к Dsg3 из крови больных пузырчаткой

При разработке нового, экспериментального способа терапии больных пузырчаткой путем экстракорпоральной селективной иммуносорбции для удаления антител (IgG) из крови больных, создан твердофазный иммуносорбент, в состав которого был включен один из основных антигенов, имеющих патогенетическое

значение при развитии пузырьчатки – рекомбинантный белок, полученный методом генной инженерии, экспрессированный в клетках грибов Yeast, являющийся полным аналогом Dsg3 человека, что позволило осуществлять селективную иммуносорбцию антител к Dsg3.

Материалы и реактивы: крупнозернистая агарозная матрица Affi-Gel-15 (Bio-Rad, США); человеческий рекомбинантный Dsg3, полученный методом генной инженерии, экспрессированный в клетках грибов Yeast («R&D Systems», США); центрифужные микроколонки с NHS-активированной сефарозой (Pierce, США); глицин (AppliChem, Германия); антитела к человеческому десмоглеину 3 типа (Sigma, США); вторичные антитела к кроличьему IgG, меченые пероксидазой хрена (Sigma, США); блокирующий раствор для вестерн-блоттинга (Sigma, США); субстрат для вестерн-блоттинга Opti-4CN (Sigma, США); хлористый водород (HCl) (Реахим, Россия); азид натрия (Sigma, США); этаноламин (Sigma, США); центрифужные микроколонки (Pierce, США); набор для определения концентрации белка по методу Бредфорд.

Используемые растворы: буфер для связывания/промывки – 0,1М фосфатный буфер, содержащий 0,15М NaCl, pH 7,2; блокирующий раствор – 1М этаноламин; раствор для хранения – 0,1М фосфатный буфер содержащий 0,05% азида натрия.

Оборудование: центрифуга с охлаждением Hettich Micro 24R; лабораторный шейкер Biosan PST-100HL; спектрофотометр Eppendorf Biophotometer.

Разработанная технологическая последовательность получения нового иммуносорбента в условиях лаборатории включала следующие этапы.

Для получения селективного твердофазного иммуносорбента для удаления антител (IgG) к Dsg3 из сыворотки крови больных вульгарной пузырьчаткой 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 приготовления раствора Dsg3 33 мкг рекомбинантного Dsg3 разводили в 400 мкл в охлажденном до 4°C буфере для связывания/промывки – (0,1М фосфатный буфер, содержащий 0,15М NaCl, pH 7,2). Микропробирку с раствором рекомбинантного десмоглеина 3 типа осторожно встряхивали, не допуская вспенивания. В пустую центрифужную микроколонку (Pierce, США) добавляли 33 мг сухой NHS-активированной агарозы. Вносили раствор Dsg3 в микроколонку с сорбентом, закрывали верхнюю крышку и инкубировали при 4°C в течении 12 часов, перемешивая на лабораторном шейкере. По окончании инкубации снимали верхнюю и нижнюю крышки микроколонки, помещали микроколонку в пробирку-приемник и центрифугировали при 4°C при 1000 g в течении 1 мин в центрифуге с охлаждением Hettich Micro 24R (Hettich, Германия); фильтрат отбирали. Для отмывки от несвязавшихся белков в колонку добавляли 200 мл буфера для промывки (0,1М фосфатный буфер содержащий 0,15М NaCl, pH 7.2) и центрифугировали при 4°C при 1000 g в течении 1 мин. Повторяли процедуру отмывки, фильтраты после отмывок отбирали. В фильтратах после иммобилизации и отмывки определяли концентрацию Dsg3 по методу Бредфорд для установления эффективности иммобилизации Dsg3.

Для блокирования остаточных активных групп матрицы аффигеля, не участвующие в связывании антител к Dsg, в микроколонку добавляли 100 мл раствора для блокирования (1М этаноламин), меняли пробирку-приемник микроколонки на нижнюю крышку, закрывали микроколонку крышкой. Инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 20 мин. По окончании инкубации снимали верхнюю и нижнюю крышки микроколонки и центрифугировали при 4°C при 1000 g в течение 1 мин, фильтрат удаляли. Для отмывки колонки от раствора для блокирования в колонку добавляли 200 мл буфера для промывки и центрифугировали при 4°C при 1000 g в течение 1 мин.

Для контроля неспецифического связывания антител, одновременно с колонкой, содержащей Affi-gel-15, связанный с Dsg3, аналогичным образом готовили колонку с «пустым» Affi-gel-15.

Длительное сохранение приготовленного иммуносорбента обеспечивали путем его погружения в консервирующий раствор (0,1М фосфатный буфер, содержащий 0,05% азида натрия) и хранения при 4 °С (в условиях бытового холодильника в течение 2 недель).

2.2.11.1 Иммуносорбция антител к десмоглеину 3 типа из препаратов суммарных IgG, полученных из пула сывороток крови больных пузырчаткой

Материалы и реактивы. Промывочный буфер (pH = 7.4) (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂), буфер для элюции (pH = 2.5) (0,1 M glycine, 5 mM CaCl₂, 0,2% Tween-20), нейтрализующий буфер (pH = 7.6) (1 M Tris, 5 mM CaCl₂), крупнозернистая агарозная матрица Affi-Gel-15 с иммобилизованным на ней рекомбинантным десмоглеином 3 типа, азид натрия (0,045%).

Оборудование. Хроматографическая колонка Bio-Spin (Bio-Rad, США), ротор Biosan (Латвия), центрифуга Allegra X-12R (Beckman Coulter, США).

Ход работы. В качестве иммуносорбента использовали носитель крупнозернистую агарозную матрицу Affi-Gel-15 с иммобилизованным на ней рекомбинантным десмоглеином 3 типа.

Матрицу помещали в хроматографическую колонку и уравнивали промывочным буфером (15 объемов сефарозы). Далее в колонку вносили сыворотку крови, содержащую антитела к Dsg3 из расчета 10 мл сыворотки на 1 мл сефарозы. Проводили инкубацию при комнатной температуре в течение 30 мин, вращая на ротаторе. После инкубации сыворотку удаляли центрифугированием. После адсорбции антител к Dsg3 хроматографическую колонку отмывали промывочным буфером (30 объемов сефарозы). Далее вносили буфер для элюции (5 мл на 1 мл сефарозы) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 минут. Затем

собирали элюат в отдельную емкость, добавляли нейтрализующий буфер из расчета 1мл на 5 мл элюата и хранили при температуре +4°C. В фильтрах после иммобилизации и отмывки определяли концентрацию Dsg3 методом ИФА для установления эффективности иммобилизации Dsg3 *in vitro*.

Получение препаратов суммарных IgG к человеческому Dsg3 из пула сывороток крови больных пузырчаткой для оценки эффективности сорбции антител в эксперименте *in vivo* проводилось методом иммунохроматографической очистки при прохождении растворов через иммуносорбент. Далее элюат, содержащий не связавшиеся с иммуносорбентом IgG, концентрировали путем центрифугирования в течение 10 минут при 4°C в фильтрах Amicore (Millipore, Франция) для проведения исследований по определению эффективности функционирования селективного иммуносорбента для удаления антител к десмоглеину 3 типа с последующим концентрированием препарата путем центрифугирования с использованием центрифужных микроколонок, заполненных NHS-активированной агарозой (Pierce, США).

2.2.11.2. Применение иммуносорбента для удаления антител к Dsg3 из крови больных пузырчаткой

Однократная сорбция сывороток с разной стартовой активностью. Сорбционные свойства матрицы Affi-gel-Dsg3 (плотность связывания Affi-gel-15 : Dsg 3=1:2) изучены на индивидуальных образцах сыворотки крови больных пузырчаткой. Использовали 9 образцов сывороток крови с низким (40, 120 и 320 RU/ml), средним (400, 480 и 520 RU/ml) и высоким (800, 1000, 1100 RU/ml) стартовым количеством антител. Сорбцию антител осуществляли на двух сорбентах Affi-gel-15 - Dsg 3 и на «пустом» Affi-gel 15, добавляя к 20μl сорбента 100μl сыворотки. Активность сыворотки до и после взаимодействия с сорбентами определяли в тест -системе Euroimmun Anti-Desmoglein 3 (IgG).

Определение количества циклов сорбции для снижения активности сыворотки.

100µl сыворотки крови больного пузырьчаткой со средней стартовой активностью 450 RU/мл последовательно пять раз адсорбировали, используя каждый раз новую порцию сорбента объёмом 20 µl. Опыт проводился на двух сорбентах – специфическом – Affi-gel-15 - Dsg 3 (плотность связывания Affi-gel-15 : Dsg 3= 1:2) и «пустом» Affi-gel-15. На каждом сорбенте опыт выполнен в трёх повторах. Активность сыворотки определяли после каждого цикла сорбции.

Изучение возможности регенерации сорбента. Возможность регенерации сорбента исследовали, добавляя каждый раз 100µl сыворотки крови больного пузырьчаткой с активностью 200 RU/ml к регенерируемой порции сорбента объёмом 20µl. Регенерацию сорбента после каждой процедуры иммуноадсорбции проводили 0,05М раствором глицинового буфера pH 2.5 (100 µl буфера добавляли к 20µl сорбента и инкубировали 15 мин при комнатной температуре и вращении 4rpm с последующим осаждением сорбента центрифугированием - 1000 g, 1 min). Глициновый буфер отмывали трижды буфером нанесения - 20 mM PBS (pH 7.4). Опыт выполнен в трёх повторах. Активность сыворотки определяли с использованием тест-системы Euroimmun Anti-Desmoglein 3 после каждого цикла сорбции- регенерации.

Изучение стабильности сорбента в процессе регенерации и эффективности сорбции. Исследовали влияние регенерации на сорбционные свойства Affigel 15-Dsg3 с плотностью связи 1:2 и немодифицированного Affigel 15. 100 мкл сыворотки крови больного пузырьчаткой с активностью 200 RU/мл добавляли к 20 мкл каждого сорбента. Суспензии инкубировали 30 мин при комнатной температуре и вращении 2 об/мин. Сорбенты осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 1 мин) и, после удаления супернатанта, регенерировали по описанной методике, затем вносили свежую порцию сыворотки. Процесс повторили 12 раз, определяя после каждого раза остаточную активность сыворотки в супернатанте.

Эффективность использования регенерируемого иммуносорбента изучали в эксперименте по последовательной сорбции аутоантител к Dsg3 из сыворотки крови больного ВП с начального значения 450 RU/мл до значения ниже 20 RU/мл, которое интерпретируется в системе «Anti-Desmoglein 3 ELISA (IgG)» как отрицательное. Опыт проводился на иммуносорбенте Affigel 15 - Dsg3 с плотностью связывания 1:2. Объем иммуносорбента был 20 мкл, объем каждой порции сыворотки – 100 мкл. Суспензии инкубировали 30 мин при комнатной температуре и вращении 2 об/мин. Сорбент осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 1 мин), удаляли супернатант и регенерировали. В первом цикле сорбции аутоантитела извлекали из сыворотки больного, в последующих циклах иммуносорбент взаимодействовал с супернатантом от предыдущей сорбции. Остаточную активность сыворотки в супернатанте определяли после каждого цикла сорбции. В контрольном эксперименте для каждого цикла сорбции использовали новые порции иммуносорбента

Истощение сыворотки на регенерируемом сорбенте. 100µl сыворотки крови больного пузырьчаткой со средней стартовой активностью 450 RU/мл последовательно пять раз адсорбировали, регенерируя одну и ту же порцию сорбента объемом 20 µl. Опыт проводился на двух сорбентах – специфическом – Affi-gel 15 - Dsg 3 (плотность связывания Affi-gel 15 : Dsg 3= 1:2) и «пустом» Affi-gel 15. На каждом сорбенте опыт выполнен в двух повторах.

2.3 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов Statistica 10.0 (StatSoft, Inc) и Excel 2010 (Microsoft). При статистической обработке материала использовали общепринятые 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, в случае сравнения признаков в связанных группах использовали непараметрический критерий Вилкоксона. 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.

Аллельные варианты гена *PERP* подвергались молекулярному анализу с сопоставлением встречаемости аллелей и генотипов у больных пузырчаткой и здоровых лиц. Частота встречаемости аллелей гена *PERP* определялась путем прямого расчета. 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(-DeltaDelta C(T) (2- $\Delta\Delta C_t$)), используя β -актин и *PANK* в качестве нормировочных генов. Нормализованная по β -актину и *PANK* экспрессия гена *TLR7* в коже больных пузырчаткой (основная группа) рассчитывалась относительно аналогичных показателей здоровых лиц (контрольная группа) (Livak K., Schmittgen T., 2001). Для статистической обработки результатов использовали критерий Стьюдента. Межгрупповые различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БОЛЬНЫХ ПУЗЫРЧАТКОЙ

3.1 Клиническая характеристика больных пузырчаткой

В основную группу больных пузырчаткой входили 81 (61,4%) женщина и 51 (38,6%) мужчина в возрасте от 18 до 70 лет (средний возраст 46,25 лет). Среди больных пузырчаткой преобладали лица в возрасте от 51 до 70 лет. В данной возрастной категории женщины страдали пузырчаткой чаще мужчин почти в 2 раза. В возрасте от 18 до 30 пузырчатка одинаково часто встречалась как у мужчин, так и у женщин. Следует отметить, что 52 (64,2%) женщины и 32 (62,7%) мужчин заболели в трудоспособном возрасте (Таблица 7).

Таблица 7 - Распределение больных пузырчаткой по возрасту и полу

Возрастные группы больных пузырчаткой (в годах)	Мужчины		Женщины		Итого	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
До 20 лет	1	0,8	2	1,5	3	2,3
21-30	5	3,8	6	4,5	11	8,3
31-40	9	6,8	15	11,4	24	18,2
41-50	11	8,3	17	12,9	28	21,2
51-60	13	9,8	18	13,7	31	23,5
61-70	11	8,3	24	18,2	35	26,5
Итого	50	37,8	82	62,2	132	100

67 (50,8%) больным, находившимся под наблюдением, диагноз пузырчатки был выставлен впервые. 65 (49,2%) больных получали лечение системными иммуносупрессивными препаратами (из них 54 больных - принимали глюкокортикостероидные препараты, 11 - глюкокортикостероидные препараты в сочетании с цитостатиками), длительность терапии составляла от 1 месяца до 10 лет (в среднем $10,1 \pm 6,9$ месяцев).

Начало заболевания больные пузырчаткой связывали с перенесенными вирусными и/или бактериальными заболеваниями (52; 39,4% больных), психоэмоциональными стрессами (43, 32,6% больных), приемом лекарственных препаратов (стрептококковый бактериофаг, цефтриаксон, бисептол, фроксипарин, рифампицин, протионамид, противогриппозная вакцина Инфлювак, магнерот, нейрелептики, джес) (15; 11,4% больных), оперативными вмешательствами (10; 7,6% больных), инсоляцией (4; 3,0% больных). У 8 (6,0%) больных факторы, провоцирующие развития заболевания, установить не удалось.

Диагноз пузырчатки у пациентов устанавливался в сроки от 1 месяца до 4,5 лет, в среднем через $6,6 \pm 3,2$ мес (Таблица 8).

Таблица 8 - 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

У большинства больных (76; 50,7%) диагноз пузырчатки был установлен в течение 6 месяцев после появления первых симптомов заболевания, из них только у 24 (18,2%) - в течение первых 3 месяцев заболевания; у 7 (35,6%) - в течение года, у 10 (7,6%) - от 1 года до 2 лет, у 8 (6,1%) больных - более 2 лет

Площадь поражения кожных покровов у больных пузырчаткой составляла от 1 до 18% (в среднем $4,3 \pm 0,3\%$). Длительность заболевания пузырчаткой составляла от 0,5 месяцев до 45 лет (в среднем $52,4 \pm 10,2$ месяцев) (Таблица 9).

**Таблица 9 - Распределение больных пузырчаткой
по длительности заболевания**

Длительность заболевания (месяцев)	Количество больных (n=132)	
	Абс.	%
до 6 мес	48	36,3
от 6 до 12 мес	34	25,8
от 13 до 18 мес	11	8,3
от 19 до 24 мес	6	4,6
от 25 до 30 мес	5	3,8
от 31 до 36 мес	6	4,5
от 37 до 42 мес	6	4,5
от 43 до 48 мес	5	3,8
более 48 мес	11	8,4

Более чем у половины больных (82; 62,1%) длительность заболевания была до 1 года, от 1 года до 2 лет - у 17 (12,9%), от 2 до 3 лет - у 11 (8,3%), более 3 лет - у 22 (16,7%) больных

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%). Таким образом, в основной группе больных преобладали пациенты с вульгарной пузырчаткой.

Вульгарной и паранеопластической пузырчаткой в 2 раза чаще страдали лица женского пола (60; 45,5% и 2; 1,5% соответственно у женщин против 36; 27,2% и 1; 0,8% мужчин), листовидная пузырчатка встречалась с одинаковой частотой у лиц обоего пола (у 15 (11,4%) мужчин и 16 (12,1%) женщин), герпетиформная пузырчатки была выявлена только у женщин (2; 1,5%) (Таблица 10).

Таблица 10 - Клинические формы пузырчатки

Клиническая форма пузырчатки	Кол-во мужчин		Кол-во женщин		Всего	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%
Вульгарная	36	27,2	60	45,5	96	72,7
Листовидная	15	11,4	16	12,1	31	23,5
Паранеопластическая	1	0,8	2	1,5	3	2,3
Герпетиформная	0	0	2	1,5	2	1,5
Всего	51	39,4	81	60,6	132	100

Первые признаки у 64 (66,7%) больных вульгарной пузырчаткой наблюдались на слизистых оболочках (у 62; 96,9% больных - на слизистых оболочках рта, у 2; 3,1% - на слизистых оболочка половых органов), на кожных покровах туловища и конечностей у 27 (28,1%) больных, реже (5; 5,2%) - на волосистой части головы.

У 27 (28,1%) пациентов с вульгарной пузырчаткой первые очаги поражения появились на кожных покровах (грудь, спина, плечи, голени, у 1 пациента - на коже вокруг колостомы); у 5 (5,2%) - на коже волосистой части головы (Таблица 11).

Таблица 11 - Локализация патологического процесса у больных вульгарной пузырчаткой при дебюте заболевания

Локализация патологического процесса при дебюте заболевания	Количество больных (n=96)	
	(абс)	(%)
Слизистые оболочки	64	66,7
Кожные покровы туловища и конечностей	27	28,1
Волосистая часть головы	5	5,2

В последующем, через 2 недели - 4 года (в среднем через $6,0 \pm 0,9$ месяцев) наблюдалась генерализация патологического процесса в виде появления пузырей и/или эрозий на коже туловища и конечностей.

У 29 (21,9%) больных вульгарной пузырчаткой при осмотре 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 в виде пузырей размером от 1–2 мм до 10 см и более с тонкой покрышкой, прозрачным или мутным содержимым, овальной, грушевидной формы (у 7; 10,9% больных); легко кровоточащих эрозий розовато-желтоватого цвета с блестящей влажной поверхностью, покрытых легко снимающимся фибринозным налетом, окаймленных обрывками эпителия (n=57; 89,1% больных). Пузыри и/или эрозии у больных локализовались на видимо неизмененных слизистых оболочках зева, щек (преимущественно в ретромолярной области), боковой поверхности языка, твердого и мягкого неба, подъязычной области, гортани, глотки, пищевода. В некоторых случаях эрозии быстро увеличивались в размерах, поражая обширные поверхности (Рисунок 10-12).

62 (64,6%) больных с вульгарной пузырчаткой жаловались на затруднение при жевании и глотании, 44 (45,8%) - на затруднение дыхания вследствие наличия корок на слизистой носа и/или носовые кровотечения. Больных также беспокоила резкая болезненность в местах высыпаний, выраженная саливация, глубокие трещины в углах рта, препятствующие его открыванию.

Изолированные поражения слизистой оболочки рта наблюдалось у 8 (8,3%) больных, у 88 (91,7%) спустя некоторое время (от 1 месяцев до 4 лет, в среднем через 1,6 месяцев) высыпания принимали распространенный характер. На видимо неизмененных кожных покровах появлялись вялые пузыри, быстро вскрывавшиеся с образованием болезненных эрозий. Некоторые пузыри на коже ссыхались в корки.

У 29 (21,9%) больных патологический процесс локализовался на слизистых оболочках; у 48 (36,4%) больных - на кожных покровах, у 55 (41,7%) больных отмечалось поражение кожных покровов и слизистых оболочек (Таблица 12, Рисунок 13-15).



Рисунок 10. Больной Р., 34 года. Вульгарная пузырчатка. Эрозии на слизистой оболочке нижней губы, неба



Рисунок 11. Больной К., 43 года. Вульгарная пузырчатка. Эрозии на коже нижней губы, языке



Рисунок 12. Больной С., 46 лет. Вульгарная пузырчатка. Эрозии на слизистой оболочке рта твердого неба, десен, коже губ

Таблица 12 - Распределение больных пузырчаткой по локализации патологического процесса

Локализация патологического процесса	Количество больных (n=132)	
	(абс)	(%)
Слизистые оболочки	29	21,9
Кожные покровы	48	36,4
Слизистые оболочки и кожные покровы	55	41,7

Эрозии у больных вульгарной пузырчаткой были ярко-розового или красного цвета с блестящей влажной поверхностью, тенденцией к периферическому росту. При генерализации кожного процесса формировались обширные очаги поражения (Рисунок 15). У всех больных наблюдалась медленная эпителизация эрозий даже при на фоне ГКС терапии.

Вегетирующая пузырчатка (тип Нойманна) была диагностирована у 1 (0,8%) женщины. Пузыри у больной вегетирующей пузырчатой были с дряблой, легко вскрывающейся покрывшей, с серозно-геморрагическим содержимым. После вскрытия пузырей образовывались эрозии, склонные к периферическому росту, на поверхности которых развивались вегетации ярко-красной окраски, покрытые сероватым налетом, со зловонным отделяемым. При слиянии эрозий формировались вегетирующие бляшки, по периферии которых наблюдались отдельные пустулезные элементы.



Рисунок 13. Больная Г., 42 года. Вульгарная пузырчатка. Поражение слизистой оболочки губ, языка



Рисунок 14. Больная Б., 47 лет. Вульгарная пузырчатка. Эрозии на слизистой оболочке рта, коже



Рисунок 15. Больной В., 36 лет. Вульгарная пузырчатка. Эрозии на коже шеи, спины

3 (2,3%) больным был установлен диагноз листовидная пузырчатка. У больных листовидной пузырчаткой на коже лица, волосистой части головы, туловища наблюдались вялые поверхностные дряблые пузыри с тонкой покрывкой. Пузыри быстро вскрывались с образованием ярко-красных эрозий, покрытых пластинчатыми корками, иногда довольно массивными. Вследствие слияния пузырей у 1 больного образовывались обширные эрозивные поверхности на коже туловища и конечностей, частично покрытые корками (сходство с эксфолиативной эритродермией) (Рисунок 16).

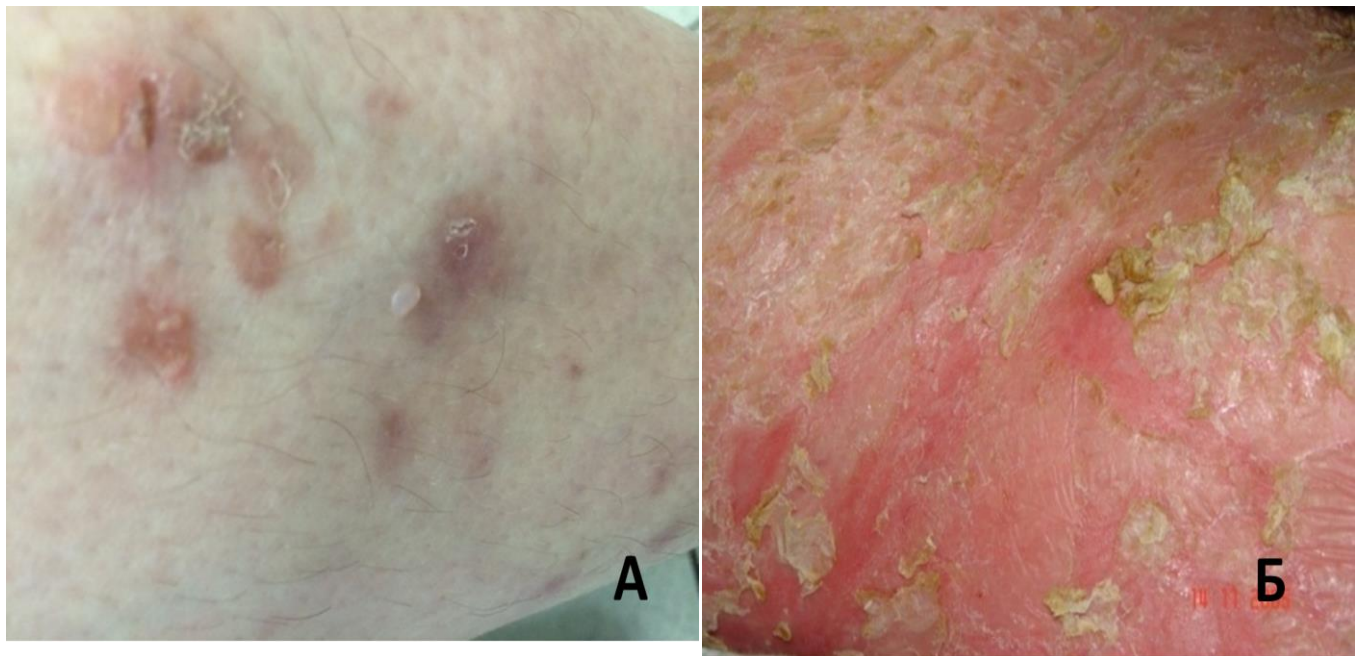


Рисунок 16. Листовидная пузырчатка. А. Больной Б., 34 года. Поверхностные пузыри, эрозии с остатками покрывок пузырей, чешуйко-корки. Б. Больной С., 52 года. Множественные чешуйко-корки на фоне эритродермии

Больных листовидной пузырчаткой беспокоили боль и жжение в местах высыпаний. Первые симптомы заболевания у пациентов с листовидной пузырчаткой наблюдались чаще на коже лица (преимущественно на носу и щеках) (n=12; 38,7% больных), волосистой части головы (n=9; 29,0% больных), реже на коже груди, спины и конечностей (n=4; 12,9%, n=3; 9,7%, n=3; 9,7% соответственно) (Таблица 13).

Таблица 13 - Локализация патологического процесса у больных листовидной пузырчаткой при дебюте заболевания

Дебют локализации патологического процесса	Количество больных (n=31)	
	(абс)	(%)
Волосистая часть головы	9	29,0
Лицо	12	38,7
Грудь	4	12,9
Спина	3	9,7
Конечности	3	9,7

У 28 (21,2%) больных была выявлена эритематозная (себорейная) пузырчатка, синдром Сенир-Ашера). У больных наблюдались эритематозные очаги с четкими границами, на поверхности которых имелись легко удаляемые серовато-желтоватые чешуйки или корки, которые образовывались вследствие ссыхания экссудата пузырей. Пузыри у больных эритематозной пузырчаткой были дряблыми, с тонкой покрывкой, быстро вскрывались, из-за чего пациенты зачастую не обращали на них внимания. После удаления корок обнажалась влажная, эрозивированная поверхность (Рисунок 17).

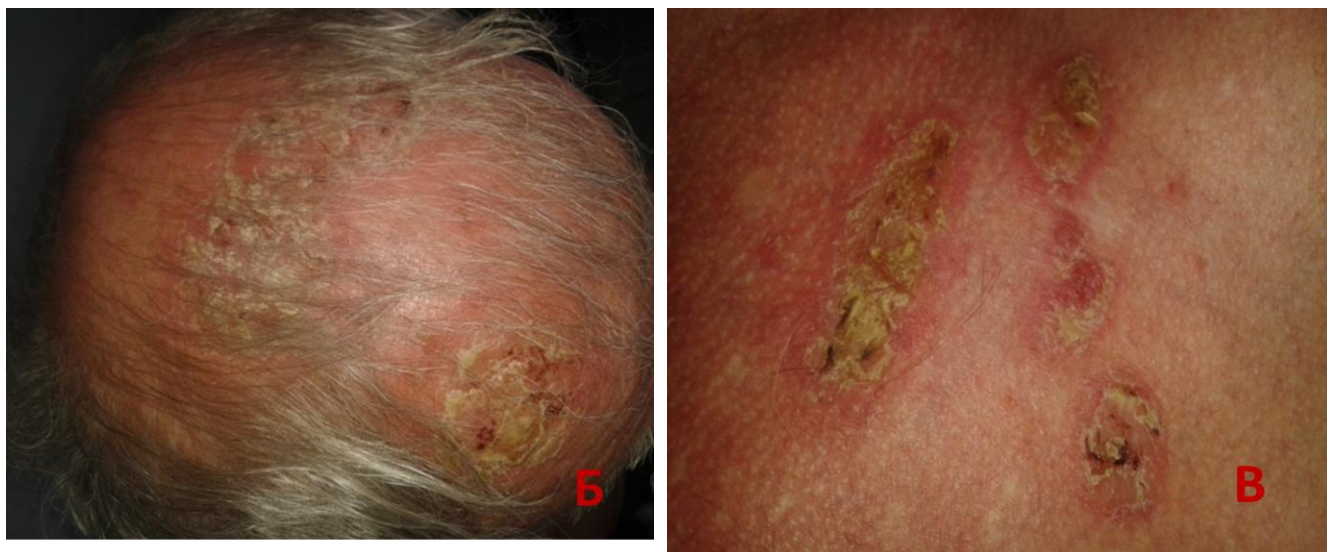


Рисунок 17. Эритематозная пузырчатка. А. Больная С., 64 года. Очаги поражения на коже левой щеки. Б, В. - Больной Х., 56 лет. Эрозии, покрытые корками на эритематозном фоне на коже волосистой части головы и туловища

У больных эритематозной пузырчаткой, несмотря на ограниченный характер поражения, наблюдалась медленная эпителизация эрозий даже при адекватной иммуносупрессивной терапии. Локализованная форма существовала ограниченно на лице от 1 мес до 5 лет (в среднем 2 года), затем патологический процесс принимал распространенный характер.

3 (2,3%) больных наблюдались с паранеопластической пузырчаткой - угрожающим жизни заболеванием, ассоциированным с опухолями (у 1 больной выявлен рак правого легкого T4N3M1, метастазы в кости, печень, плевру, у 2-ой - рак матки T1CN0M0, состояние после лапароскопической пангистерэктомии и сочетанной лучевой терапии, у 3-го больного - лимфолейкоз). Клиническая картина паранеопластической пузырчатки достаточно вариабельна; у больных наблюдались обширные поражения слизистой оболочки рта в виде болезненных эрозий. На кожных покровах туловища и конечностей определялись пузыри с тонкой и толстой покрышками, папулы на эритематозном фоне/

У 2 (1,5%) больных была диагностирована герпетиформная пузырчатка - атипичная форма заболевания, которая напоминает герпетиформный дерматит Дюринга. У больных наблюдались высыпания в виде поверхностных пузырей, везикул на отечном и эритематозном фоне. После вскрытия пузырей появлялись эрозии и корки.

Системную терапию ранее 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.

Сопутствующие заболевания выявлены у 126 (95,5%) больных. Наиболее часто выявлялись: заболевания желудочно-кишечного тракта (хронический холецистит, панкреатит, гастрит, дуоденит, язвенная болезнь желудка и 12 перстной кишки) - у

90 (68,2%); патология сердечно-сосудистой системы (гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца) - у 88 больных (66,7%) и в 3 раза реже - заболевания эндокринной системы (сахарный диабет, гипоталамический синдром, гипертиреоз) - у 29 (22,0%) больных и заболевания мочеполовой системы (пиелонефрит, мочекаменная болезнь, аднексит, миома матки) - у 23 (17,4 %). Заболевания органов дыхания (хронический бронхит, тонзиллит, фарингит, ринит, отит) – выявлены у 18 (13,6 %) больных (Таблица 14).

Таблица 14 - Сопутствующие заболевания у больных пузырчаткой

Сопутствующие заболевания	Количество пациентов (n= 132)	
	Абс.	%
Заболевания сердечно-сосудистой системы (ИБС, гипертоническая болезнь сердца, пороки сердца)	88	66,7
Заболевания органов ЖКТ (хронический гастрит, гастродуоденит, дискинезия желчевыводящих путей, хронический холецистит, гепатит, желчекаменная болезнь, реактивный панкреатит)	90	68,2
Заболевания эндокринной системы (сахарный диабет, гипоталамический синдром, гипертиреоз)	29	22,0
Заболевания мочеполовой системы (пиелонефрит, мочекаменная болезнь, аднексит, миома матки)	23	17,4
Заболевания органов дыхания (хронический бронхит, тонзиллит, хронический фарингит, ринит, отит)	18	13,6

Обращала на себя внимание высокая частота у больных пузырчаткой сахарного диабета (21; 15,9%). Как правило, диабет сопровождался ожирением. Сопутствующие заболевания довольно часто оказывали влияние на течение патологического процесса. Так, у больных пузырчаткой в сочетании с сахарным диабетом отмечалось резкое ухудшение кожного процесса в период декомпенсации диабета.

При обследовании больных выявлена ассоциация пузырчатки с другими аутоиммунными заболеваниями; в частности, аутоиммунный тиреоидит отмечен у 6 (4,5%) больных, ревматоидный артрит – у 3 (2,3%). У 9 (6,8%) больных отмечалось сочетание пузырчатки с другими дерматозами (псориазом, опоясывающим лишаем, пиодермией, микозами). Из аллергических заболеваний 37 (28,0%) больных отмечали лекарственную аллергию, 10 (7,6%) - пищевую аллергию, 7 (5,3%) - поллиноз, 4 (3,0%) - бронхиальную астму.

Следует отметить, что у 56 (86,2%) больных пузырчаткой, получавших системную иммуносупрессивную терапию, были выявлены побочные эффекты: 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 осложнений составляли от 1 до 11 месяцев от начала системной терапии глюкокортикостероидными препаратами (в среднем $2,95 \pm 1,33$ мес).

В контрольной группе (n=100) было 64 женщины (64%) и 36 мужчин (36%) в возрасте от 23 до 60 лет (средний возраст $35,71 \pm 11,53$ лет). Основная и контрольная группы были сопоставимы по полу и возрасту ($p > 0,05$).

3.2 Клинические индексы в оценке тяжести пузырчатки

Для сравнительного изучения диагностической значимости клинических индексов в оценке тяжести пузырчатки у 132 больных проведен подсчет 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.

3.2.1 Индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index) в оценке тяжести больных пузырчаткой

Подсчет показателей индекса PDAI по описанной методике (глава «Материалы и методы исследования» и Приложение А) был проведен у 132 пациентов. При этом учитывались данные, характеризующие поражение кожи (1), волосистой части головы (2), слизистых оболочек (3), показатель активности поражения кожи и слизистых оболочек (4), показатель наличия вторичных изменений (5) и общий (суммарный) показатель (6) в баллах. Средние значения отмеченных показателей составили, соответственно, $9,27 \pm 1,29$ баллов (1, кожа), $1,27 \pm 0,21$ баллов (2, волосистая часть головы), $6,61 \pm 1,22$ баллов (3, слизистые оболочки), $17,15 \pm 1,83$ баллов (4, показатель активности поражения), $3,27 \pm 0,34$ баллов (5, показатель вторичных изменений), $20,38 \pm 2,07$ баллов (6, общий (суммарный) показатель).

По величине индекса PDAI пациенты были разделены на три подгруппы: с легкой (суммарный показатель PDAI до 30, подгруппа 1), среднетяжелой (суммарный показатель PDAI до 60, подгруппа 2 и тяжелой (суммарный показатель PDAI более 60, подгруппа 3) степенью тяжести заболевания. Подгруппы пациентов с легкой, среднетяжелой и тяжелой степенью тяжести по возрасту статистически значимо не отличались ($p > 0,05$). По длительности заболевания пациенты также достоверно не отличались, хотя наблюдалась тенденция к меньшей длительности патологического процесса у больных с тяжелой степенью тяжести ($7,75 \pm 2,21$ лет) в сравнении с лицами со среднетяжелой ($13,57 \pm 4,28$ лет) и легкой степенью тяжести ($23,00 \pm 8,29$ лет). Указанное обстоятельство могло быть связано с длительным применением у последних системной глюкокортикостероидной терапии и снижением активности патологического процесса (Таблица 15).

Таблица 15 - Индекс PDAI больных пузырчаткой (в баллах)

Группы пациентов по степени тяжести	Кожа	Волосистая часть головы	Слизистые оболочки	Активность поражения	Вторичные изменения	Общий (суммарный) показатель	Возраст пациентов	Длительность заболевания, мес
	1	2	3	4	5	6	7	8
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	52,00±4,25	23,00±8,29
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	50,13± 6,07	13,57±4,28
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	49,25± 7,53	7,75±2,21
P₁₋₂	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p>0,05	p>0,05
P₁₋₃	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p>0,05	p>0,05
P₂₋₃	P<0,05	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p>0,05	p>0,05

Отмечено значительное отличие групп пациентов по величине индекса PDAI, в особенности по показателям «активность патологического процесса» и «общий (суммарный) показатель». Выявлено достоверное увеличение этих показателей по мере увеличения тяжести заболевания. Так, два названных показателя PDAI были достоверно ($p < 0,001$) выше у больных средней степени тяжести заболевания в сравнении с лицами с легкой степенью тяжести. Показатели PDAI «активность патологического процесса» и «общий (суммарный) показатель» у больных с легкой степенью тяжести составили, соответственно, $11,57 \pm 0,85$ баллов и $14,04 \pm 1,09$ баллов; у больных со средней степенью тяжести - $33,91 \pm 2,85$ баллов и $40,19 \pm 2,62$ баллов; $p < 0,001$. Также отмечено значительное различие между группами пациентов со средней и тяжелой степенью тяжести заболевания. У последних значение названных показателей составили, соответственно, $82,76 \pm 5,68$ баллов и $91,33 \pm 5,17$ баллов; разница с показателями группы со средней степенью тяжести высоко достоверна ($p < 0,001$).

У больных пузырчаткой в зависимости от тяжести заболевания значительно отличался показатель, характеризующий поражение кожных покровов. Так, у пациентов с легкой степенью тяжести он составил $5,97 \pm 0,73$ баллов, у больных со средней степенью тяжести - $20,09 \pm 2,56$ баллов, у больных с тяжелой степенью тяжести патологического процесса - $44,33 \pm 18,8$ баллов. Разница между показателями пациентов с легкой и средней степенью тяжести заболевания, а также между больными с легкой и тяжелой степенью тяжести заболевания высоко достоверна ($p < 0,001$); разница между показателями больных со средней и тяжелой степенью тяжести также была достоверной ($p < 0,05$).

У больных с разной степенью тяжести поражения отмечены существенные отличия в показателе активности поражения кожи волосистой части головы. У больных с легкой степенью тяжести данный показатель составил $0,84 \pm 0,15$ баллов, со средней степенью - $2,72 \pm 0,85$ баллов, с тяжелой степенью - $7,67 \pm 2,33$ баллов. Разница между показателями пациентов с легкой и средней степенью тяжести заболевания, между больными с легкой и тяжелой степенью тяжести

заболевания, а также между показателями больных со средней и тяжелой степенью тяжести заболевания была достоверной ($p < 0,05$).

Показатель PDAI поражения слизистых оболочек у пациентов групп с разной степенью тяжести заболевания также отличался. У больных с легкой степенью тяжести патогического процесса он составил $4,77 \pm 0,68$ баллов, при средней степени тяжести - $11,09 \pm 0,65$ баллов, при тяжелой степени тяжести - $32,00 \pm 2,34$ баллов, отличия между группами пациентов по данному показателю оказались высоко достоверными ($p < 0,001$).

Показатель PDAI, характеризующий развитие вторичных изменений у больных пузырчаткой (гиперпигментации или эритемы на местах разрешившихся высыпаний) у больных с разными вариантами степени тяжести пузырчатки также существенно отличался. У больных с легкой степенью тяжести заболевания данный показатель составил $2,51 \pm 0,32$ баллов, со средней степенью тяжести - $6,27 \pm 0,76$ баллов, с тяжелой степенью - $9,33 \pm 1,20$ баллов. Разница между показателями всех групп пациентов оказалась статистически значимой (p от $< 0,05$ до $< 0,001$).

Таким образом, сравнение между собой групп пациентов по средним значениям общего индекса PDAI и его «подиндексов» показало, что индекс PDAI позволяет дифференцировать степень тяжести у больных пузырчаткой; при этом, как при подсчете общего показателя, так и «подиндексов», между пациентами всех групп (легкая, средняя и тяжелая степень тяжести) были отмечены статистически значимые различия.

3.2.2 Балльная оценка тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи (ABSIS, Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score)

в оценке тяжести больных пузырчаткой

Подсчет показателей индекса ABSIS по описанной методике (глава «Материалы и методы исследования», Приложение Б) был также проведен у 132 пациентов. При этом учитывались данные, характеризующие поражение кожи (1) и слизистых оболочек. При оценке поражения слизистых оболочек оценивалось

два параметра: распространенность поражения (2) и тяжесть поражения (3); последняя определялась по степени дискомфорта, боли и кровотечении при приеме больным пищи и/или жидкости. Рассчитывался также общий (суммарный) показатель (4) в баллах. Средние значения отмеченных показателей составили, соответственно, $10,79 \pm 1,66$ баллов (1, кожа), $2,78 \pm 0,29$ баллов (2, слизистые оболочки, распространенность), $18,19 \pm 1,77$ баллов (3, слизистые оболочки, тяжесть поражения), и $31,90 \pm 2,52$ баллов (4, общий (суммарный) показатель).

По величине индекса ABSIS пациенты были разделены на три подгруппы: с легкой (суммарный показатель ABSIS до 30, подгруппа 1), средней (суммарный показатель ABSIS до 60, подгруппа 2 и тяжелой (суммарный показатель ABSIS более 60, подгруппа 3) степенью тяжести.

В процессе выполнения исследования не было выявлено различий по возрасту между пациентами с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести пузырчатки ($p > 0,05$). Также не было отмечено достоверных отличий по длительности заболевания.

Отмечено значительное отличие групп пациентов по величине общего индекса ABSIS, который составил: у больных с легкой степенью тяжести $13,25 \pm 1,70$ баллов, со средней степенью - $44,18 \pm 1,18$ баллов и с тяжелой степенью - $72,94 \pm 7,92$ баллов. Разница между всеми группами пациентов была статистически значимой ($p < 0,001$).

Показатель ABSIS, характеризующий поражение кожных покровов, не отличался существенно у больных с легкой ($6,94 \pm 1,37$ баллов) и средней ($9,51 \pm 2,01$ баллов) степенью тяжести заболевания ($p > 0,05$). В то же время, он значительно отличался у больных со средней ($9,51 \pm 2,01$ баллов) и тяжелой ($35,44 \pm 9,70$ баллов) степенью тяжести заболевания ($p < 0,05$).

Отмечены существенные отличия значений показателя ABSIS, характеризующего распространенность поражения слизистых оболочек у больных с легкой ($0,95 \pm 0,24$ баллов) и средней ($30,04 \pm 1,78$ баллов) степенью тяжести заболевания и, соответственно, у больных легкой ($0,95 \pm 0,24$ баллов) и тяжелой ($4,13 \pm 0,69$ баллов) степенью тяжести заболевания ($p < 0,001$). В то же время,

данный показатель практически не отличался у больных со средней и тяжелой степенью тяжести заболевания ($p>0,05$) (Таблица 16).

Таблица 16 - Индекс ABSIS у больных пузырчаткой (в баллах)

Группы пациентов по степени тяжести	Кожа	Слизистые оболочки (распространенность)	Слизистые оболочки (тяжесть поражения: дискомфорт при приеме пищи и/или жидкости)	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	$p<0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p<0,001$

Аналогичными были закономерности изменения показателя ABSIS, характеризующего тяжесть поражения слизистых оболочек, что определялось степенью дискомфорта, возникновением боли и кровотечения при приеме пациентами пищи и воды. Отмечены существенные отличия значений данного показателя ABSIS у больных с легкой (5,64±1,56 баллов) и средней (30,04±1,78 баллов) степенью тяжести заболевания и, соответственно, у больных легкой (5,64±1,56 баллов) и тяжелой (30,63±4,59 баллов) степенью тяжести заболевания ($p<0,001$). Однако, данный показатель практически не отличался у больных со средней и тяжелой степенью тяжести заболевания ($p>0,05$).

Таким образом, подсчет общего индекса ABSIS позволяет дифференцировать больных пузырчаткой по степени тяжести (легкая, средняя, тяжелая). Однако показатель не позволяет различить 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.

При использовании данного показателя в оценке степени тяжести заболевания целесообразно применять расчет общего (суммарного) показателя ABSIS с использованием «правила девяток» и «отягчающего коэффициента», который дифференцирует элементы в зависимости от наличия/отсутствия экссудации, эпителизации и результатов определения симптома Никольского.

3.2.3 Индекс активности вульгарной пузырчатки (PVAS, Pemphigus Vulgaris Activity Score) в оценке тяжести больных пузырчаткой

Подсчет показателей индекса PVAS по описанной методике (глава «Материалы и методы исследования», Приложение В) также был проведен у 132 пациентов. При этом учитывались данные, характеризующие поражение кожи (1), слизистых оболочек (2) и общий (суммарный) показатель поражения кожи и слизистых оболочек (3).

По величине индекса PVAS пациенты были разделены на три подгруппы: с легкой (суммарный показатель PVAS до 4, подгруппа 1), средней (суммарный показатель PVAS от 5 до 8, подгруппа 2 и тяжелой (суммарный показатель PVAS более 8, подгруппа 3) степенью тяжести заболевания.

В процессе выполнения исследования не было выявлено различий по возрасту между пациентами с легким, среднетяжелым и тяжелым течением пузырчатки ($p > 0,05$). Также не было отмечено достоверных отличий по длительности заболевания.

Отмечено значительное отличие групп пациентов по величине общего индекса PVAS, который составил: у больных с легкой степенью тяжести заболевания $2,22 \pm 0,19$ баллов, со средней степенью - $6,05 \pm 0,25$ баллов и с

тяжелой степенью - $10,44 \pm 0,36$ баллов. Разница между всеми группами пациентов было высоко достоверной ($p < 0,001$) (Таблица 17).

Таблица 17 - Индекс PVAS у больных пузырчаткой (в баллах)

Группы пациентов по степени тяжести	Кожа	Слизистые оболочки	Общий показатель
	1	2	3
Легкая степень (1) (n=79)	$1,28 \pm 0,20$	$0,99 \pm 0,11$	$2,22 \pm 0,19$
Средняя степень (2) (n=26)	$4,92 \pm 0,36$	$1,13 \pm 0,30$	$6,05 \pm 0,25$
Тяжелая степень (3) (n=27)	$9,26 \pm 0,34$	$1,21 \pm 0,22$	$10,44 \pm 0,36$
P₁₋₂	$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p < 0,001$
P₁₋₃	$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p < 0,001$
P₂₋₃	$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p < 0,001$

Показатель PVAS, характеризующий поражение кожных покровов, существенно отличался у больных с легкой ($1,28 \pm 0,20$ баллов), средней ($4,92 \pm 0,36$ баллов) и тяжелой ($9,26 \pm 0,34$ баллов) степенью тяжести ($p < 0,001$).

Нами не было отмечено существенных отличий значений показателя PVAS, характеризующего распространенность поражения слизистых оболочек у больных с легкой ($0,99 \pm 0,11$ баллов), средней ($1,13 \pm 0,30$ баллов) и тяжелой ($1,21 \pm 0,22$ баллов) степенью тяжести заболевания ($p > 0,05$).

Таким образом, подсчет суммарного индекса PVAS позволяет дифференцировать больных пузырчаткой по степени тяжести заболевания (легкая, средняя и тяжелая). В то же время, 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.

3.2.4 Корреляция индексов PDAI, ABSIS, PVAS и DIDS у больных пузырчаткой

Как следует из приведенных данных, на российской выборке больных пузырчаткой установлена высоко достоверная зависимость между общими показателями индексов PDAI, ABSIS и PVAS и степенью тяжести заболевания.

Следует отметить, что между индексами не установлено четкого параллелизма, в связи с чем больные при подсчете разных индексов могли попасть в разные группы. Это было обусловлено различными подходами к оценке распространенности и тяжести патологического процесса у больных пузырчаткой и различными методами подсчета баллов (Таблица 18).

**Таблица 18 - Индексы PDAI, ABSIS, PVAS и DIDS
у больных пузырчаткой**

Степень тяжести заболевания	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)

Так, при подсчете индекса PDAI в группе пациентов с легкой степенью тяжести оказалось 104 человека (78,8%), со средней степенью – 18 человек (13,6%), с тяжелой степенью – 10 человек (7,6%). При подсчете индекса ABSIS группу пациентов с легкой степенью тяжести составляло 64 человека (48,5%), со средней степенью – 55 человек (41,7%), с тяжелой степенью – 13 человек (9,8%).

При подсчете индекса PVAS в группе пациентов с легкой степенью было 79 человек (59,8%), со средней степенью – 26 человек (19,7%), с тяжелой степенью – 27 человек (20,5%).

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 в группе пациентов с легкой степенью тяжести оказалось 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 суммарных показателей индексов PDAI, ABSIS и PVAS существует умеренная прямая связь (Таблица 19).

Таблица 19 - Коэффициент корреляции Спирмена между индексами

Корреляции между индексами	Корреляция PDAI-PVAS	Корреляция ABSIS-PDAI	Корреляция ABSIS-PVAS:
R	+0,5783	+0,6405	+0,5301
Корреляции индексов с DIDS	PDAI	ABSIS	PVAS
R	+0,56	+0,42	+0,47

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 DIDS, были наиболее близки данным индекса PDAI ($r_{\text{PDAI}} = +0,56$). Индекс ABSIS давал повышенный процент больных с легкой степенью тяжести заболевания, индекс PVAS, напротив, давал повышенный процент больных тяжелой степенью тяжести

заболевания и, как было отмечено ранее, не позволял четко различить степень поражения слизистых оболочек у больных с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести пузырчатки.

Таким образом, как показали исследования, проведенные на российской выборке больных пузырчаткой, индексы PDAI, ABSIS и PVAS, являются объективным отражением степени тяжести пузырчатки, поскольку позволяют по величине суммарного (общего) показателя дифференцировать пациентов с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести заболевания. Полученные нами данные совпадают с результатами зарубежных исследований, проведенными только на пациентах с легкой и средней тяжестью заболевания, показавших, что данные индексы могут использоваться при оценке степени тяжести пузырчатки (Колос Ю.В., 2013; Rosenbach M. 2009; Chams-Davatchi C., 2013; Kamiya K, 2013; Murrell D.F., 2014; Patsatsi A., 2014; Rahbar Z., 2014; Zhao C.Y., 2015).

Показано наличие умеренной прямой связи между индексами PDAI и PVAS ($r= +0,5783$), ABSIS и PVAS ($r=+0,5301$), ABSIS и PDAI ($r=+0,6405$). Отмечено наличие умеренной прямой связи между данными индексами и дерматологическим индексом тяжести заболевания. Наиболее близким данному индексу, адекватным в использовании явился индекс PDAI ($r=+0,56$), характеризующий поражение поверхности кожи и слизистых оболочек (последнее - по двум параметрам: распространенности и тяжести поражения). В работе С. Chams-Davatchi et al. (2013) установлена сильная корреляция (0,751) между индексами PVAS и PGA.

Использование клинических индексов в оценке тяжести пузырчатки является удобным инструментом, позволяющим объективно оценивать степень тяжести больных пузырчаткой, что позволит персонализировать терапию больных тяжелым аутоиммунным дерматозом в зависимости от степени тяжести пузырчатки, и эффективность проводимой терапии, что особенно ценно при проведении клинических исследований новых фармакологических препаратов и методов лечения.

Таким образом, в результате выполнения исследований на российской выборке больных пузырчаткой показано, что клинические индексы PDAI, ABSIS, PVAS объективно отражают степень тяжести течения пузырчатки, что позволяет рекомендовать их для широкого применения в клинической практике специалистами медицинских организаций дерматовенерологического профиля Российской Федерации для объективной оценки тяжести состояния больных пузырчаткой и персонализации терапии пациентов. Наиболее адекватным для использования является индекс PDAI, позволяющий дифференцировать больных по степени тяжести заболевания.

Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ БОЛЬНЫХ ПУЗЫРЧАТКОЙ

4.1 Результаты цитологического, морфологического, иммунофлюоресцентного методов исследования при обследовании больных пузырчаткой

Помимо клинического исследования, для установления диагноза пузырчатки применялся ряд лабораторных методов: цитологический, патоморфологический, иммунофлюоресцентный.

Для выявления акантолитических клеток Тцанка при обследовании 132 больных пузырчаткой применялся *метод цитологического исследования мазков-отпечатков* со дна эрозий. При микроскопии мазков-отпечатков клетки Тцанка имели меньшие размеры в сравнении с нормальными клетками эпидермиса и содержали более крупное ядро интенсивно-синего или фиолетово-синего цвета с двумя или более крупными ядрышками более светлого тона. При цитологическом исследовании акантолитические клетки обнаружены у 78 (59,1%) больных, в том числе у 56 (42,4%) больных вульгарной пузырчаткой, у 18 (13,6%) - листовидной, у 3 (2,3%) - паранеопластической, у 1 (0,8%) - герпетиформной.

Патоморфологическое исследование биоптатов кожи (для выявления основного морфологического признака - акантолиза) проведено 122 больным пузырчаткой. При исследовании биоптатов кожи пациентов в стадии генерализации заболевания, выявлялись супрабазальные пузыри (в некоторых случаях - в нижних отделах шиповатого слоя эпидермиса), в полости которых присутствовали нити фибрина и акантолитические клетки округлой формы с эозинофильной цитоплазмой и крупными гиперхромными ядрами, располагавшимися изолированно или в виде небольших скоплений. Также в просвете пузыря обнаруживались единичные эозинофилы и нейтрофилы. В дне пузыря, как правило, определялись клетки базального слоя с разрушенными межклеточными контактами (Рисунок 18-19).

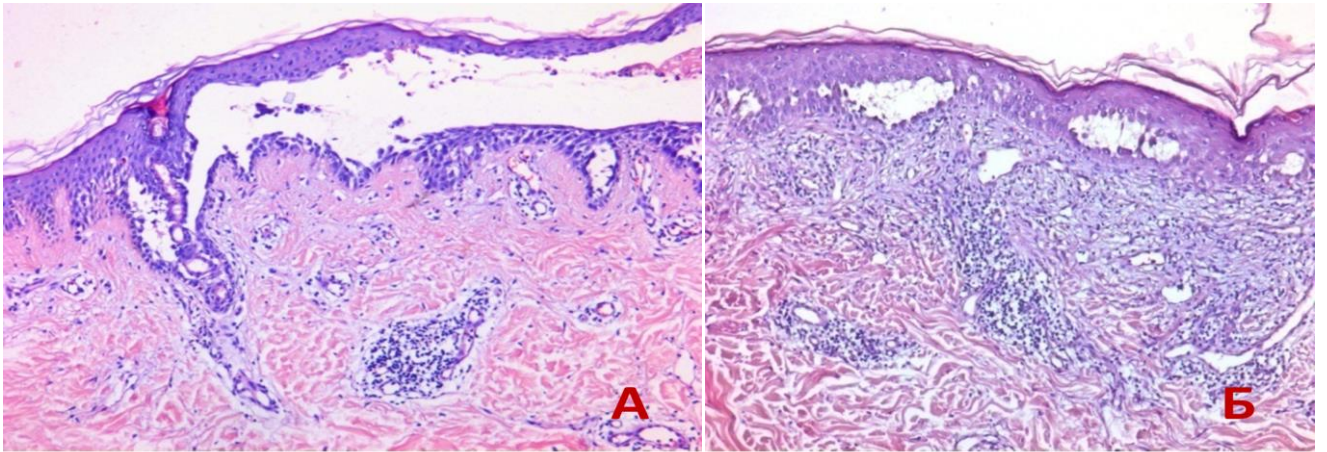


Рисунок 18. Больной Т., 57 лет. Гистологическая картина вульгарной пузырчатки в стадии обострения. А. Больная К., 61 год. Б. Больная С., 54 года. Окраска гематоксилин-эозином, х40.

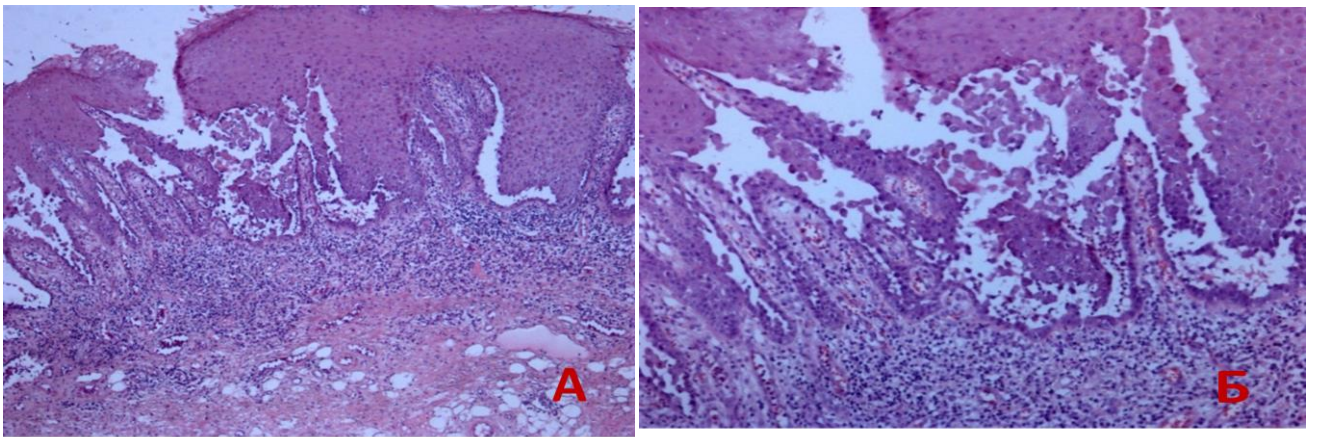


Рисунок 19. Гистологическая картина вульгарной пузырчатки (биоптат слизистой оболочки рта). А. Больная М., 44 года, х40; Б. Больная С., 48. Окраска гематоксилин-эозином, х200.

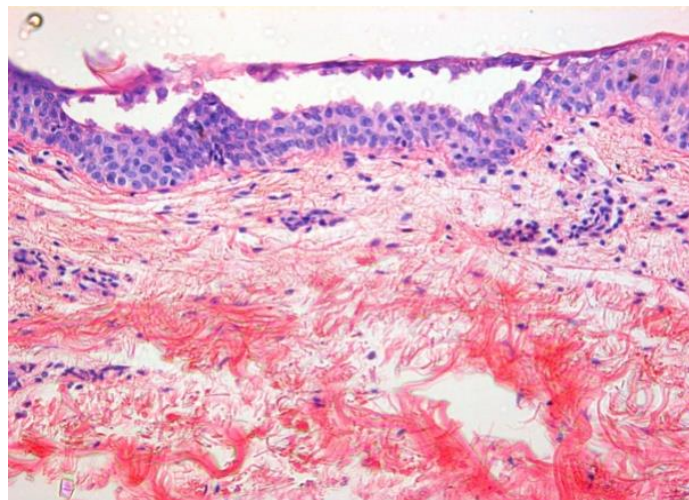


Рисунок 20. Больной Б., 34 года. Гистологическая картина листовидной пузырчатки. Больной К., 38 лет. Окраска гематоксилин-эозином, х100.

Морфологические признаки *листовидной пузырьчатки* проявлялись характерными для заболевания признаками: мелкими очагами акантолиза в зернистом и верхних отделах шиповатого слоя, при слиянии которых формировались щели, субкорнеальными пустулами с нейтрофилами и акантолитическими клетками в полости пузыря (Рисунок 20).

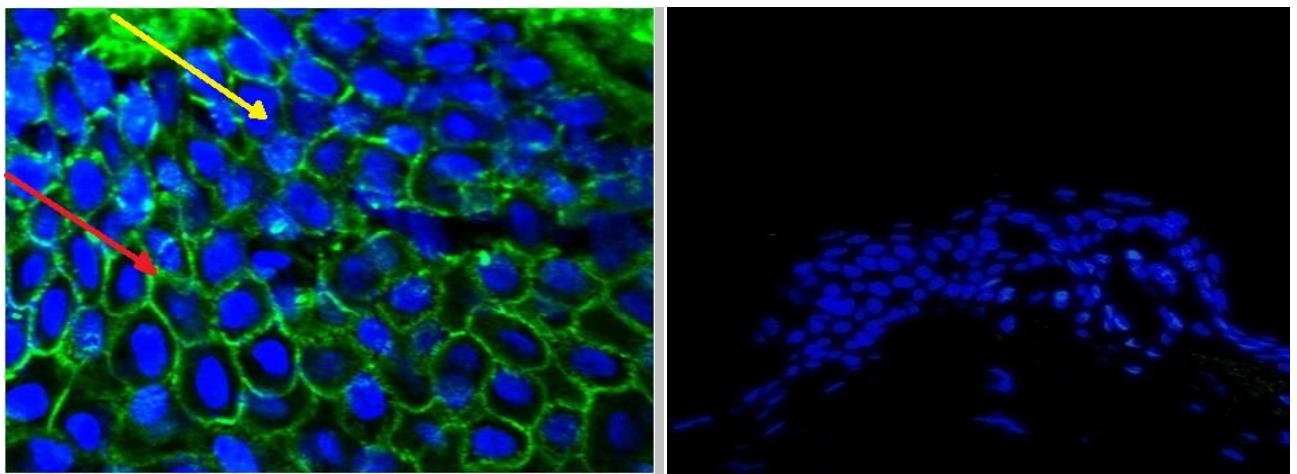
Таким образом, в результате патоморфологического исследования, проведенного у 122 больных пузырьчаткой, патогномоничный для пузырьчатки морфологический признак (акантолиз) выявлен у 93 (76,2%) больных.

Для определения отложения иммуноглобулинов А, М и G в видимо неповрежденной коже больных пузырьчаткой применялся *метод непрямой РИФ* с визуализацией изображений в системе КЛСМ *ex vivo*. Исследования были проведены у 111 (84,1%) больных пузырьчаткой, в том числе у 78 (70,3%) больных вульгарной, у 28 (25,2%) больных листовидной, паранеопластической 3 (2,7%), герпетиформной - 2 (1,8%) больных и 10 здоровых лиц (Рисунок 21Б). При исследовании биоптатов методом нРИФ с использованием КЛСМ *ex vivo* поиск флуоресцентных меток осуществлялся в области эпидермиса и дермо-эпидермальной границы. Синее свечение соответствовало ядрам кератиноцитов, зеленое свечение - флуорохромам, фиксированным к тканевым IgG (Рисунок 21А). Фиксации IgA и IgM в структурах кожи у больных пузырьчаткой не выявлено.

Фиксация в коже IgG у больных *вульгарной пузырьчаткой* была выявлена у 75 (96,2%) больных. При этом отложения IgG выявлялись уже на ранних стадиях заболевания и фиксировались в межклеточных промежутках всех слоев эпидермиса. В отдельных случаях отложение иммуноглобулинов наблюдались не только в межклеточном пространстве эпидермиса, но и в зоне дермо-эпидермального соединения. При проведении нРИФ у больных *листовидной пузырьчаткой* фиксация IgG выявлялась преимущественно в межклеточных промежутках верхних слоев эпидермиса (Рисунок 22). Отложения IgG были выявлены у всех больных (100%).

У больных паранеопластической пузырчаткой (n=3) отмечалось свечение как вдоль дермо-эпидермальной границы, так и в межклеточных промежутках эпидермиса. При герпетиформной пузырчатке (n=2) наблюдалась фиксация IgA и IgG в межклеточных промежутках всех слоев эпидермиса и вдоль дермо-эпидермальной границы.

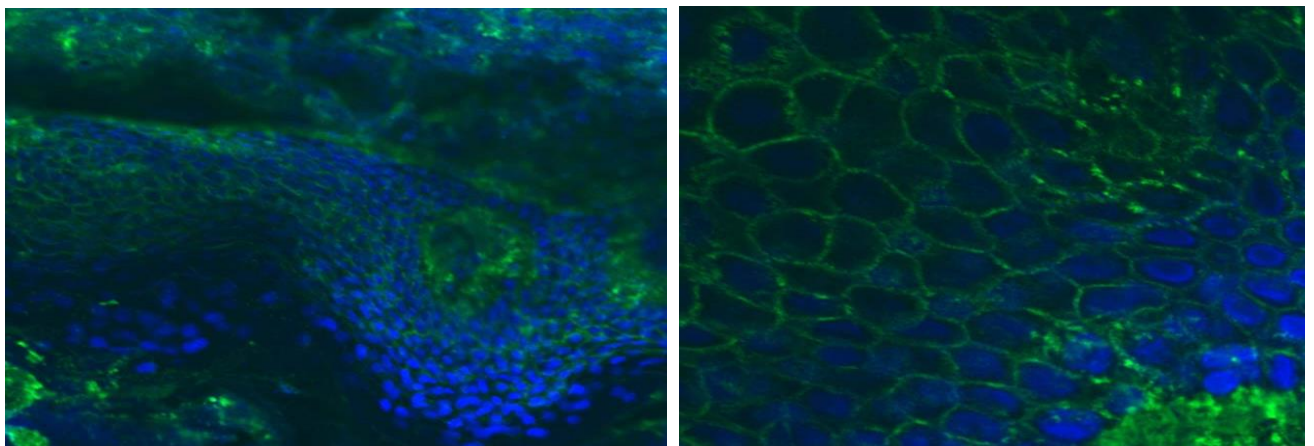
Таким образом, в результате проведения нРИФ с использованием *ex vivo* КЛСМ у 108 из 111 (97,3%) больных пузырчаткой отложения IgG обнаруживались в межклеточных промежутках эпидермиса, в зоне базальной мембраны, а также в зоне дермо-эпидермального соединения.



А

Б

Рисунок 21. нРИФ (КЛСМ). А. Больная П., 46 лет, вульгарная пузырчатка. Фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса (желтая стрелка-ядра эпителиоцитов, красная - фиксированные IgG) x600. Б. Отсутствие фиксации IgG в эпидермисе у здорового С., 32 года, x200.



А

Б

Рисунок 22. Больной Б., 34 года, листовидная пузырчатка. нРИФ (КЛСМ). А. x200, Б. x600.

4.2. Результаты изучения уровня циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных пузырчаткой

Для изучения диагностической значимости и прогностической роли антител к десмоглеинам (Dsg) 1 и 3 типов в развитии различных вариантов пузырчатки больные пузырчаткой были разделены по клиническим формам заболевания, в наибольшей степени представленным в настоящем исследовании. Первую из них составили больные вульгарной пузырчаткой, вторую – листовидной (в том числе себорейной) пузырчаткой. Антитела к десмоглеинам 1 и 3 типов в сыворотках крови больных пузырчаткой определены методом ИФА у 119 больных пузырчаткой, в том числе у 96 больных вульгарной пузырчаткой и у 23 больных листовидной пузырчаткой. В определяемых количествах антитела к десмоглеинам были выявлены у 78 (65,6%) больных.

Сравнительное изучение уровня антител к десмоглеинам 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) ($p_{1-2} < 0,001$)* (Таблица 20).

Таблица 20 - Уровень антител к десмоглеинам у больных пузырчаткой в зависимости от клинической формы заболевания, RU/ml (M±m)

Показатель/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)	$p_{1-2} < 0,001$

Напротив, уровень антител к десмоглеину 1 типа был существенно (достоверно) 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) ($p_{1-2} < 0,001$) (Рисунок 23).

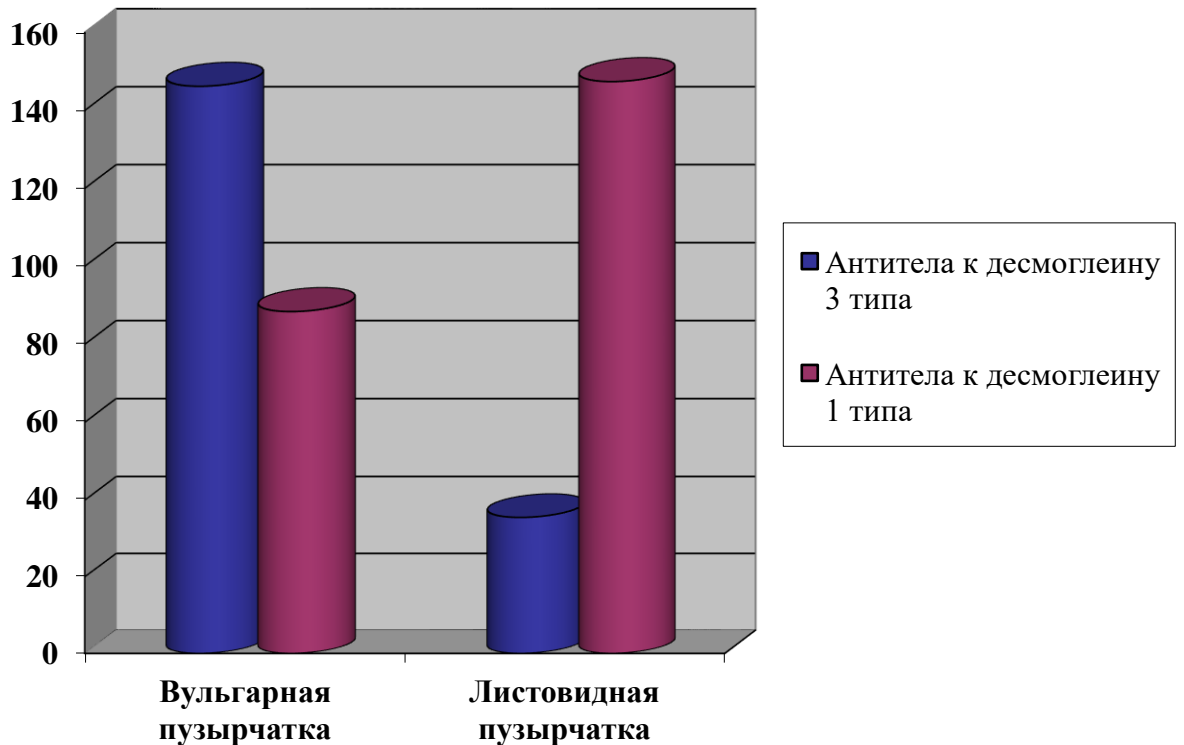


Рисунок 23. Уровень антител к десмоглеинам 3 и 1 типа у больных вульгарной и листовидной пузырчаткой (RU/ml)

Полученные нами данные соответствуют данным большинства современных авторов, 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 в многослойном и однослойном плоском эпителии (Махнева Н.В. и соавт., 2010; Chams-Davatchi С., 2005; Mysorekar V.V., 2015). При этом следует отметить, что для установления диагноза пузырчатки определение антител к десмоглеинам не являлось определяющим. Антитела к десмоглеинам были выявлены у 65,6% больных пузырчаткой.

Наши данные совпадают с мнением ряда авторов, в соответствии с которыми наличие антител к Dsg1 и к Dsg3 у больных различными видами пузырчатки не является абсолютным диагностическим критерием, поскольку такие антитела, в частности, к десмоглеину 3 типа, обнаруживаются не у всех пациентов (по данным И.Р. Дзудевой (2005) - у 85% больных вульгарной

пузырчаткой, S. Khandpur (2010), P.R. Cunha et al. (2014) - у 50-60% больных пузырчаткой, A. Belloni-Fortina et al. (2009) - только у 15% больных вульгарной пузырчаткой с изолированным поражением слизистых оболочек).

Для оценки прогностической роли определения антител к десмоглеинам в развитии различных вариантов степени тяжести пузырчатки, был 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).

При оценке результатов исследования, в соответствии с распределением больных по группам (с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести заболевания) установлено нарастание уровня антител к десмоглеинам 3 и 1 типов у больных пузырчаткой с увеличением степени тяжести заболевания (Таблица 21, Рисунок 24).

Таблица 21 - 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 тяжести	Средняя степень тяжести	Тяжелая степень тяжести	Достоверность различий между группами (1-2, 1-3, 2-3)
Группы больных по степени тяжести	1 (n=70)	2 (n=39)	3 (n=10)	
Оценка степени тяжести заболевания по индексу PDAI				
Антитела к десмоглеину 3 типа (RU/ml)	86,29±15,41	159,49±46,08	262,0±17,00	p ₁₋₂ <0,001 p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001
Антитела к десмоглеину 1 типа (RU/ml)	71,68 ±17,03	149,98±13,81	262,0±40,00	p ₁₋₂ <0,001 p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,05

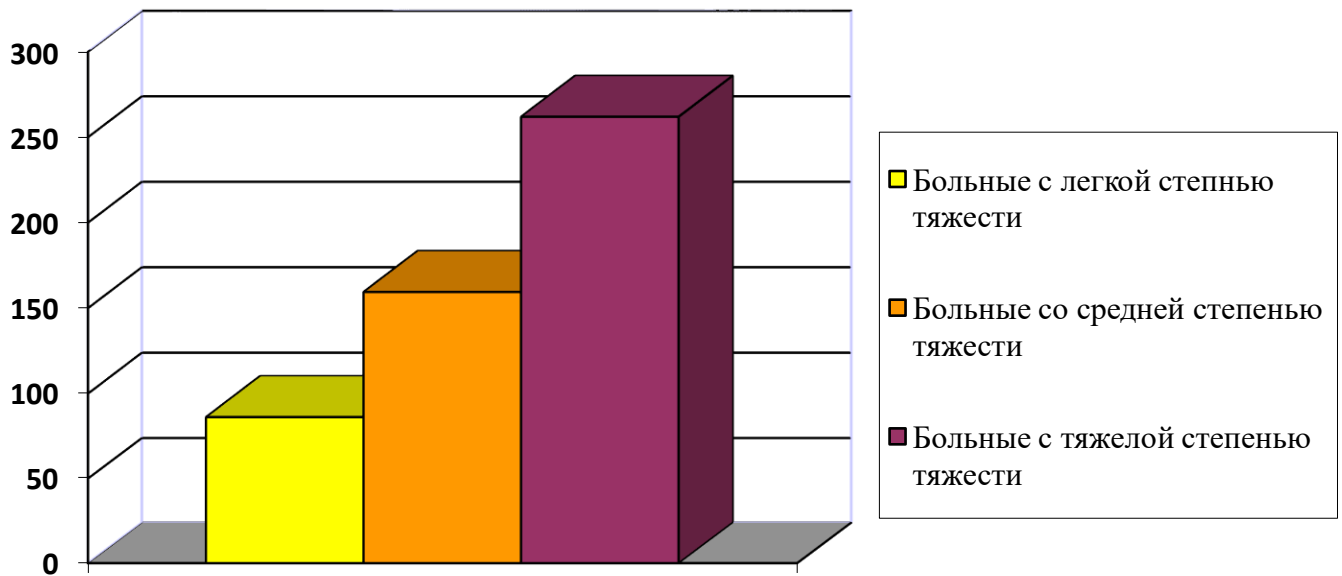


Рисунок 24. Уровень антител к Dsg3. Распределение больных по тяжести заболевания в соответствии с оценкой по клиническому индексу PDAI (RU/ml)

Уровень антител к десмоглеину 3 типа при оценке степени тяжести клинического течения заболевания больных пузырчаткой с использованием индекса PDAI у больных легкой степени тяжести составил $86,29 \pm 15,41$ RU/ml, у больных с заболеванием средней степени тяжести - $159,49 \pm 46,08$ RU/ml, у больных с тяжелой степенью - $262,0 \pm 17,00$ RU/ml; данные между группами пациентов 1-2, 1-3 и 2-3 статистически достоверны (p от $<0,05$ до $<0,001$)

Уровень антител к десмоглеину 1 типа при оценке степени тяжести клинического течения заболевания больных пузырчаткой с использованием индекса PDAI у больных с легкой степенью тяжести заболевания составил $71,68 \pm 17,03$ RU/ml, у больных с заболеванием средней степени тяжести - $149,98 \pm 13,81$ RU/ml, у больных с тяжелой степенью тяжести заболевания - $262,0 \pm 70,00$ RU/ml; данные между группами пациентов 1-2, 1-3, 2-3 статистически достоверны ($p < 0,001$) (Рисунок 25).

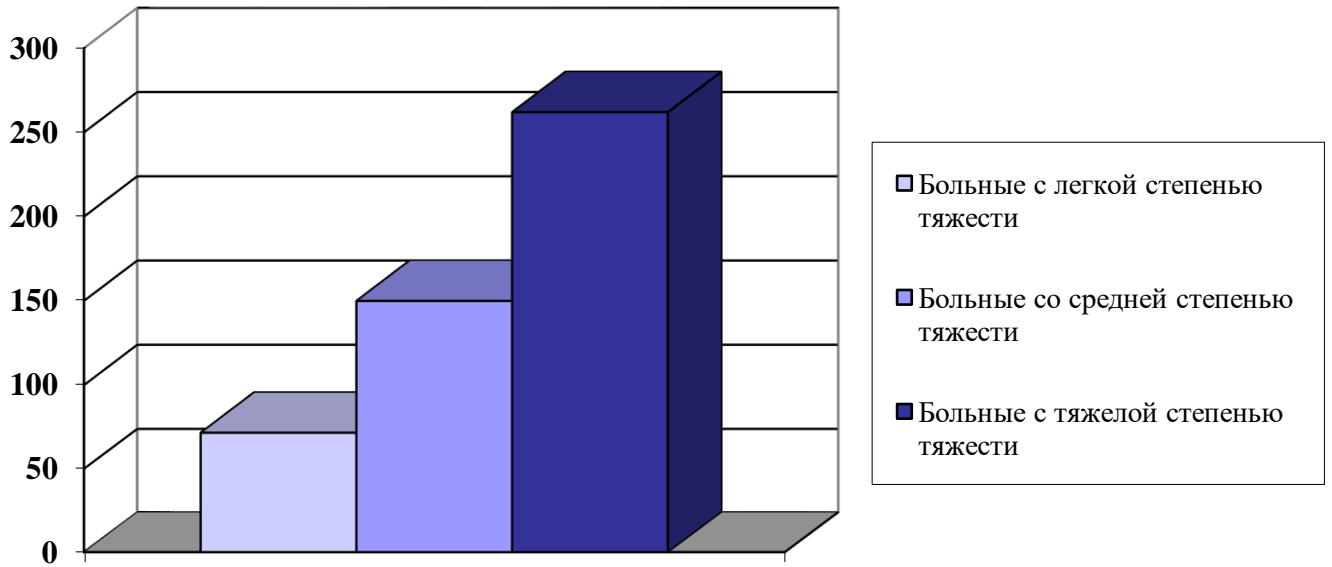


Рисунок 25. Уровень антител к десмоглеину 1 типа. Распределение больных по тяжести заболевания в соответствии с оценкой по клиническому индексу PDAI (RU/ml)

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 (RU/ml).

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 (Таблица 22).

Таблица 22 - Корреляционные связи индекса и подиндексов PDAI с уровнем антител к десмоглеинам 1 и 3 типа

Показатели	Индекс PDAI					
	кожа	волосистая часть головы	слизистые оболочки	активность	вторичные изменения	общий
Антитела к Dsg1	0,60	0,29	0,05	0,34	0,57	0,55
Антитела к Dsg3	0,11	0,006	0,46	0,47	0,16	0,27

Примечание: выделение ячеек светло-голубым цветом - умеренная связь между показателями; насыщенно-синим цветом – заметная связь.

Выявленные корреляции подтвердили существование прямой взаимосвязи между уровнем антител к Dsg3 и степенью поражения слизистых оболочек при пузырчатке и в меньшей степени – со степенью поражения кожи. Нами не было выявлено прямой корреляционной связи между подиндексами, характеризующими поражение кожи у больных пузырчаткой, и уровнем антител к Dsg3.

Резюмируя результаты проведенных исследований, можно заключить следующее. В настоящее время нет единой точки зрения о взаимосвязи между уровнем антител к десмоглеинам у больных пузырчаткой и степенью тяжести заболевания. Ряд авторов не усматривает такой взаимосвязи (Матушевская Е.В. и соавт., 2005; Cozzani V.E. et al., 2013). Нами с использованием разделения больных по степени тяжести заболевания с помощью клинических индексов для оценки тяжести пузырчатки были получены однотипные данные,

свидетельствующие о нарастании уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных пузырчаткой с увеличением степени тяжести заболевания. Полученные данные соответствуют наблюдениям большинства исследователей (Amagai M. et al., 1999; Kumar V. et al., 2006; Herrero-González J.E., 2010; Cozzani E., 2013), показавших похожие результаты. На этом основании можно сделать вывод о том, что уровень антител к десмоглеинам может являться объективным отражением степени тяжести заболевания, «ключевым» фактором, способствующим развитию клинического фенотипа у больных пузырчаткой (Amagai M., 1999), а определение уровня антител может быть использовано для прогноза развития варианта тяжести клинического течения пузырчатки.

Говоря о результатах изучения корреляционных взаимосвязей между уровнем антител к десмоглеинам и особенностями клинического фенотипа пузырчатки, хотелось бы подчеркнуть, что в данном вопросе тоже нет единого мнения исследователей. Так, V. Kumar et al. (2006) выявили статистически достоверную взаимосвязь титра антител к Dsg3 с тяжестью поражения слизистой оболочки рта, а также взаимосвязь титра антител к Dsg1 с тяжестью поражения кожных покровов. Указанные связи были обнаружены как у больных с вульгарной пузырчаткой, так и у больных с листовидной пузырчаткой.

Согласно результатам A. Belloni-Fortina et al. (2009), тяжесть поражения слизистой оболочки рта у больных пузырчаткой прямо коррелирует с титром антител и к Dsg1, и к Dsg3. По данным S.W. Cheng et al. (2002), IgG к Dsg3 встречаются у пациентов с вульгарной пузырчаткой при ограниченном поражении слизистых оболочек, у которых кожные проявления отсутствуют, и только при наличии антител и к Dsg3, и к Dsg1 наблюдается генерализация процесса с поражением кожи.

В нашем исследовании установлена статистически значимая прямая связь между уровнем антител к Dsg1 и тяжестью, определяемой подиндексами, отражающими поражение кожи у больных пузырчаткой. Результаты исследования 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. Полученные данные позволяют заключить, что уровень антител к Dsg3 в большей степени отражает степень поражения слизистых оболочек при пузырчатке.

В работе А. Patsatsi и соавт. (2014) при исследовании зависимости значений PDAI, ABSIS и титров антител к Dsg1 и Dsg3 у больных пузырчаткой показано, что значения индексов коррелируют с титрами антител к Dsg 1 типа у больных с поражением кожи и у больных с сочетанным поражением кожи и слизистых оболочек, однако не было выявлено их связи с уровнем антител к Dsg 3 типа у больных с изолированным поражением слизистых оболочек (Patsatsi A., Kyriakou A., Giannakou A. et al., 2014).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что повышенный уровень антител к Dsg3 более характерен для больных вульгарной пузырчаткой, в то время как высокий уровень антител к Dsg1 более характерен для больных листовидной пузырчаткой, что связано с экспрессией соответствующих антигенов в многослойном и однослойном плоском эпителии. Выявлено возрастание уровня антител к Dsg3 и Dsg1 в сыворотке крови пациентов по мере увеличения тяжести течения заболевания. Таким образом, определение уровня антител к Dsg3 и Dsg1 в сыворотке крови больных пузырчаткой может являться объективным критерием степени тяжести течения заболевания, использоваться с целью прогноза клинического течения и персонализации терапии пузырчатки. При оценке тяжести пузырчатки в соответствие с наиболее адекватным индексом PDAI дополнительно для оценки тяжести состояния пациента может быть использовано определение уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типа методом ИФА.

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 заболевания – 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 заболевания – при уровне антител к Dsg3 более 201 RU/ml и уровне антител к Dsg1 более 161 RU/ml.

4.3 Результаты изучения патогенетической роли гена *PERP* и кодируемого им структурного белка десмосом *PERP* в развитии пузырчатки

Одной из задач настоящего исследования явилось изучение патогенетической роли гена *PERP* и кодируемого им структурного белка десмосом *PERP* в развитии пузырчатки. Решение данной задачи предполагало проведение исследований по двум основным направлениям:

- определение нуклеотидной белок кодирующей последовательности гена *PERP* с оценкой взаимосвязи между выявленными полиморфизмами и развитием пузырчатки, особенностями ее течения;
- определение экспрессии белка *PERP* в коже больных пузырчаткой.

4.3.1 Характеристика белок-кодирующей последовательности экзонов гена *PERP* у больных пузырчаткой и оценка возможной взаимосвязи полиморфизмов с клиническими особенностями заболевания

Из данных литературы известно, что нарушение функции и дефект структурного белка десмосом *PERP* может сопровождаться нарушением строения десмосом и способствовать развитию акантолиза под действием аутоагрессивных антител при пузырчатке (Delva E. et al., 2008; Nguyen V.T. et al., 2009; Jheon A.H. et al., 2011; Kitajima Y. et al., 2013). Это обуславливает необходимость проведения исследований, направленных на изучение экспрессии белка *PERP* в коже больных пузырчаткой и определение наличия мутаций/полиморфизмов в кодирующем данный белок гене *PERP*. Ген *PERP* находится на шестой хромосоме и включает 3

экзона, кодирующих белковую цепь *PERP* длиной в 193 аминокислоты. Ген *PERP* кодирует четырехтяжевый мембранный белок, необходимый для реализации функций десмосом в коже и слизистых оболочках (Attardi L.D., et al., 2000).

Для установления возможной роли гена *PERP* в развитии пузырчатки был проведен сравнительный анализ частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфизмов rs648802 и rs648396 3-го экзона гена *PERP* в зависимости от: наличия/отсутствия заболевания (больные пузырчаткой - здоровые лица); пола пациентов; возраста манифестации заболевания (20-40 лет, 41-60 лет, 61 и старше); локализации высыпаний (с поражением только слизистых оболочек, только кожных покровов или сочетанным поражением слизистых оболочек и кожных покровов); сроков диссеминации процесса (0,5-4 недели; 5-12 недель; 13-48 недель); наличия или отсутствия сопутствующей онкологической патологии; клинической формы заболевания (вульгарная - листовидная пузырчатка); степени тяжести патологического процесса (легкая, средней степени и тяжелая степень тяжести).

Для определения нуклеотидной последовательности ДНК гена *PERP* в биообразцах больных пузырчаткой и здоровых лиц проведены исследования последовательности трех экзонов гена *PERP* методом прямого секвенирования по Сэнгеру (см. главу «Материалы и методы исследования»).

В результате анализа белок кодирующей нуклеотидной последовательности гена *PERP* у больных пузырчаткой и здоровых лиц в 1-м и 2-м экзонах мутаций/полиморфизмов обнаружено не было, в третьем экзоне гена *PERP* были обнаружены два SNP⁴. В базе данных NCBI выявленные SNP описаны и обозначаются как rs648802 (С611G, несинонимичный) и rs648396 (Т675С, синонимичный). Данные SNP являются полиморфизмами, поскольку встречаются в популяции с частотой более чем 1%. В случае полиморфизма rs648802 происходит замена нуклеотида С (цитозина) на G (гуанин) в положении 611

⁴ **Single nucleotide polymorphism, SNP** - однонуклеотидный полиморфизм — отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности).

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.

По данным секвенирования изучаемые полиморфизмы rs648802 и rs648396 наследуются сцеплено: G(rs648802) с C(rs648396), а C (rs648802) с T (rs648396). Показатель сцепления между локусами равен 100%, в связи с этим в дальнейшем приводится характеристика одного полиморфизма rs648802 3-го экзона гена *PERP*. При сравнении частоты встречаемости различных аллельных вариантов полиморфизма rs648802 и rs648396 гена *PERP* достоверных различий между группами больных пузырчаткой и здоровых лиц выявлено не было.

Частота аллельного варианта С полиморфизма rs648802 в группе больных составила 53%, в группе здоровых – 43%; частота аллельного варианта G полиморфизма rs648802 в группе больных составила 47%, в группе здоровых – 57% ($p=0,14$) (Таблица 23).

Таблица 23 - Частота аллелей и генотипов полиморфизма rs648802 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	52/0,53	59/0,43	> 0,05 ($\chi^2=2,14$)	1,48 [0,88-2,49]
Аллель G	46/0,47	77/0,57		0,68 [0,4-1,14]
Генотип C/C	10/0,20	16/0,24	> 0,05 ($\chi^2=0,16$)	0,83 [0,089-1,58]
Генотип C/G	32/0,65	27/0,340	< 0,01 ($\chi^2=7,47$)	2,86 [0,68-5,04]
Генотип G/G	7/0,143	25/0,37	$p<0,05$ ($\chi^2=1,57$)	0,56[0,05-1,07]

В результате сопоставления частоты встречаемости отдельных генотипов полиморфизмов rs648802 в третьем экзоне гена *PERP* у больных пузырчаткой и здоровых лиц было установлено, что у больных частота выявления мутантных гетерозиготных полиморфизмов C/G генотипа rs648802 в 3-м экзоне гена *PERP* составила 65,3% (у 32 из 49), частота генотипа G/G rs648802 составила 14,3% (у 7 из 49), частота гомозиготных генотипов «дикого» типа (генотип C/C) rs648802 определялась в 20,4% случаев (у 10 из 49).

У здоровых лиц частота выявления C/G генотипа rs648802 в 3-м экзоне гена *PERP* составила 39,7% (у 27 из 68), частота генотипа G/G rs648802 составила 36,8% (у 25 из 68), частота генотипа C/C rs648802 определялась в 23,5% случаев (у 16 из 68) (Рисунок 26).

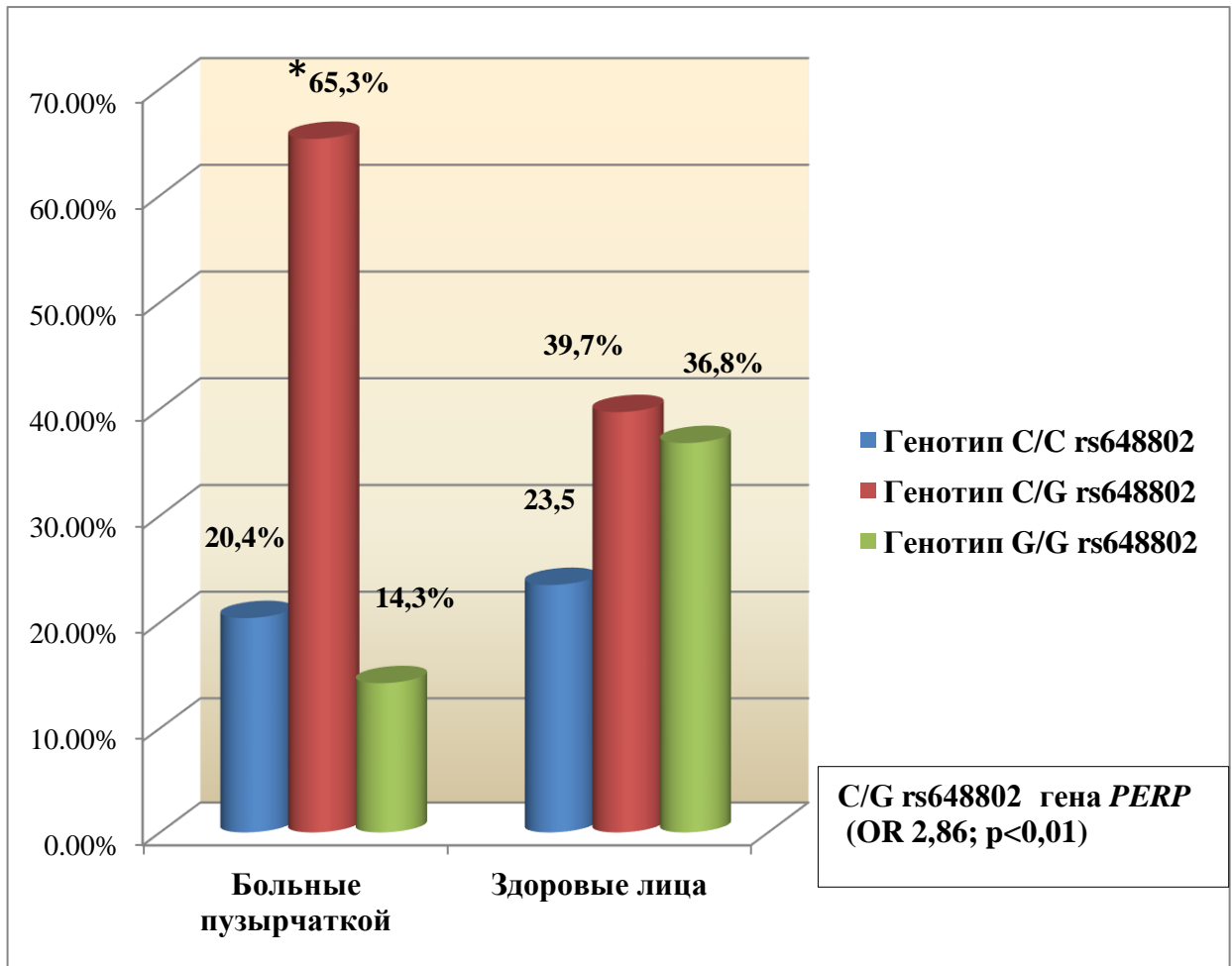


Рисунок 26. Частота генотипов полиморфизма rs648802 3-го экзона гена *PERP*

Таким образом, в результате сравнения частот выявления генотипов у больных пузырчаткой и здоровых лиц было установлено, что у пациентов с пузырчаткой достоверно чаще в сравнении со здоровыми лицами встречался гетерозиготный генотип *C/G* полиморфизма rs648802 гена *PERP*: 65,3% против 39,7%, в то время как у здоровых достоверно чаще встречался гомозиготный генотип *G/G* полиморфизма rs648802: 36,8% против 14,3% ($p < 0,05$).

При сравнении частоты встречаемости различных аллельных вариантов полиморфизма rs648396 гена *PERP* достоверных различий между группами больных пузырчаткой и здоровых лиц выявлено не было. Частота аллельного варианта *C* в группе больных составила 47%, в группе здоровых лиц – 57%; частота аллельного варианта *T* в группе больных составила 53%, в группе здоровых – 43%. Частота выявления *T/C* генотипа полиморфизма rs648396 гена *PERP* у больных акантолитической пузырчаткой составила 65,3% (у 32 из 49), частота генотипа *C/C* rs648396 составила 14,3% (у 7 из 49), частота генотипа *T/T* определялась в 20,4% случаев (у 10 из 49) (Таблица 24).

Таблица 24 - Частота аллелей и генотипов полиморфизма rs648396 гена *PERP*

Аллели и генотипы	Больные (n=49) абс. значение/ частота	Здоровые (n=68) абс. значение/ частота	P	OR [CI 95%]
Аллель <i>C</i>	46/0,47	77/0,57	> 0,05 ($\chi^2=2,14$)	0,68 [0,4-1,14]
Аллель <i>T</i>	52/0,53	59/0,43		1,48 [0,88-2,49]
Генотип <i>C/C</i>	7/0,14	25/0,37	< 0,05 ($\chi^2=1,57$)	0,29[0,11-0,73]
Генотип <i>T/C</i>	32/0,65	27/0,40	< 0,01 ($\chi^2=7,47$)	2,86 [0,68-5.04]
Генотип <i>T/T</i>	10/0,20	16/0,24	> 0,05 ($\chi^2=0,16$)	0,83 [0,089-1,58]

У здоровых лиц частота выявления *T/C* генотипа rs648396 в 3-м экзоне гена *PERP* составила 39,7% (у 27 из 68), частота генотипа *C/C* rs648396 составила 36,8% (у 25 из 68), частота генотипа *T/T* rs648396 определялась в 23,5% случаев (у 16 из 68).

Таким образом, при определении различий в частоте встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма rs648396 гена *PERP* между больными и здоровыми было установлено, что у больных пузырчаткой достоверно чаще в сравнении со здоровыми лицами встречался гетерозиготный генотип *T/C* полиморфизма rs648396 гена *PERP*: 65,3% против 39,7%, в то время как у здоровых достоверно чаще встречался гомозиготный генотип *C/C* полиморфизма rs648396: 36,8% против 14,3% ($p < 0,05$) (Рисунок 27).

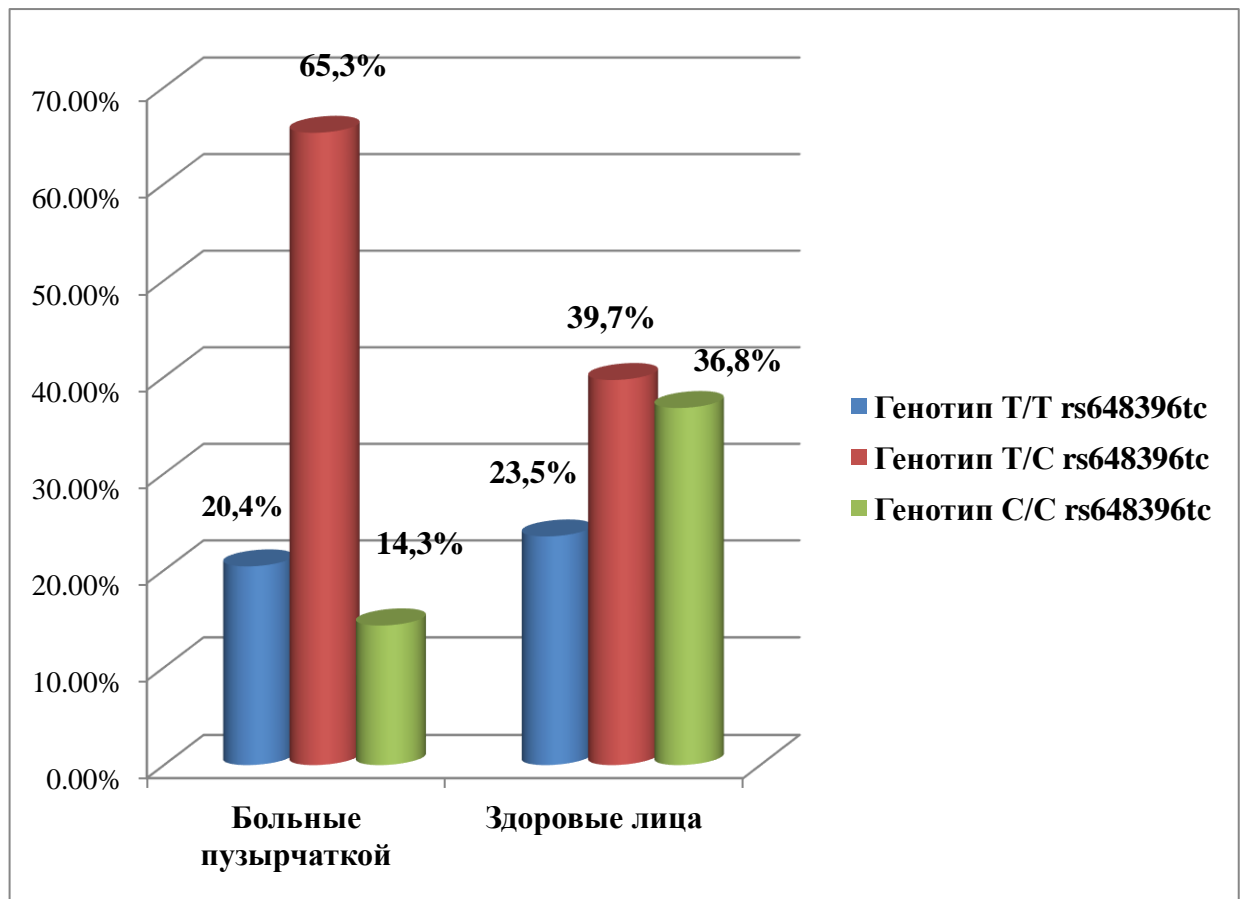


Рисунок 27. Частота генотипов полиморфизма rs648396 3-го экзона гена *PERP*

Гетерозиготные генотипы обоих полиморфизмов в 3-м экзоне гена *PERP* *C/G* (rs648802) и *T/C* (rs648396) встречались у больных пузырчаткой в 2,86 раз

чаще, чем у здоровых лиц, по сравнению с гомозиготными генотипами (обоими) и в 4,33 раза чаще по отношению к гомозиготным генотипам *G/G* (rs648802) и *C/C* (rs648396). По данным секвенирования изучаемые полиморфизмы rs648802 и rs648396 наследуются сцеплено: *G*(rs648802) с *C*(rs648396), а *C* (rs648802) с *T* (rs648396).

Таким образом, на основании сравнительного анализа частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфизмов rs648802 и rs648396 гена *PERP* между больными пузырчаткой и здоровыми лицами было установлено, что группы больных и здоровых лиц статистически значимо отличались по частоте распределения генотипов. При этом мутантные гетерозиготные генотипы *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396) достоверно чаще встречались в группе больных пузырчаткой, что позволяет рассматривать их как предикторы развития и молекулярные «маркеры» заболевания. Нуклеотидная замена в rs648802 является значимой, так как приводит к изменению аминокислотной последовательности белка *PERP* и, следовательно, к изменению его структуры и, возможно, функции.

Биологическое значение полиморфизма rs648802 в гене *PERP*, приводящего к замене аминокислоты в белке *PERP*, может заключаться в том, что наличие *G*-аллеля в rs648802 сопровождается изменением функции белка *PERP* и активацией процессов апоптоза (Flachsbar F., Franke A. et al., 2010).

В связи с вышеизложенным, гетерозиготный генотип *C/G* полиморфизма rs648802 3-го экзона гена *PERP*, приводящий к изменению структуры и, возможно, функции белка *PERP*, можно рассматривать как основной «маркерный», функционально значимый, генотип, указывающий на предрасположенность человека к развитию пузырчатки. Второй гетерозиготный генотип *T/C* полиморфизма rs648396 гена *PERP* также может рассматриваться как маркерный генотип, поскольку оба генотипа наследуются сцеплено.

Полученные данные несколько отличаются от результатов исследований, проведенных нами ранее на меньшей выборке обследуемых (18 больных пузырчаткой и 16 здоровых лиц) (Кубанов А.А., Миченко А.В., Абрамова Т.В. и

соавт., 2013). Однако это касается только частот встречаемости полиморфизмов, выявленных у здоровых лиц. Обнаруженная нами ранее тенденция к более высокой частоте встречаемости у больных пузырчаткой гетерозиготных генотипов *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396) сохранилась. Так же выявлено, что у здоровых лиц достоверно чаще встречались гомозиготные генотипы *G/G* (полиморфизм rs648802) и *C/C* (полиморфизм rs648396) (в более раннем исследовании – гомозиготные генотипы выявленных полиморфизмов *C/C* rs648802 и *T/T* rs648396), что можно объяснить значительно возросшим объемом выборки здоровых лиц (68 человек вместо 16-и) и изменением частоты встречаемости гомозиготных генотипов.

При сравнении частот встречаемости генотипов у больных пузырчаткой а) среди мужчин и женщин, б) у больных в зависимости от локализации высыпаний (с поражением только слизистых оболочек, только кожных покровов или сочетанным поражением слизистых оболочек и кожных покровов), в) в зависимости от сроков диссеминации процесса (0,5-4 недели; 5-12 недель; 13-48 недель), г) в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей онкологической патологии, д) в зависимости от клинической формы заболевания - статистически значимых различий между соответствующими группами больных пузырчаткой обнаружено не было.

При сравнении частот встречаемости различных 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 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%) (Рисунок 28).

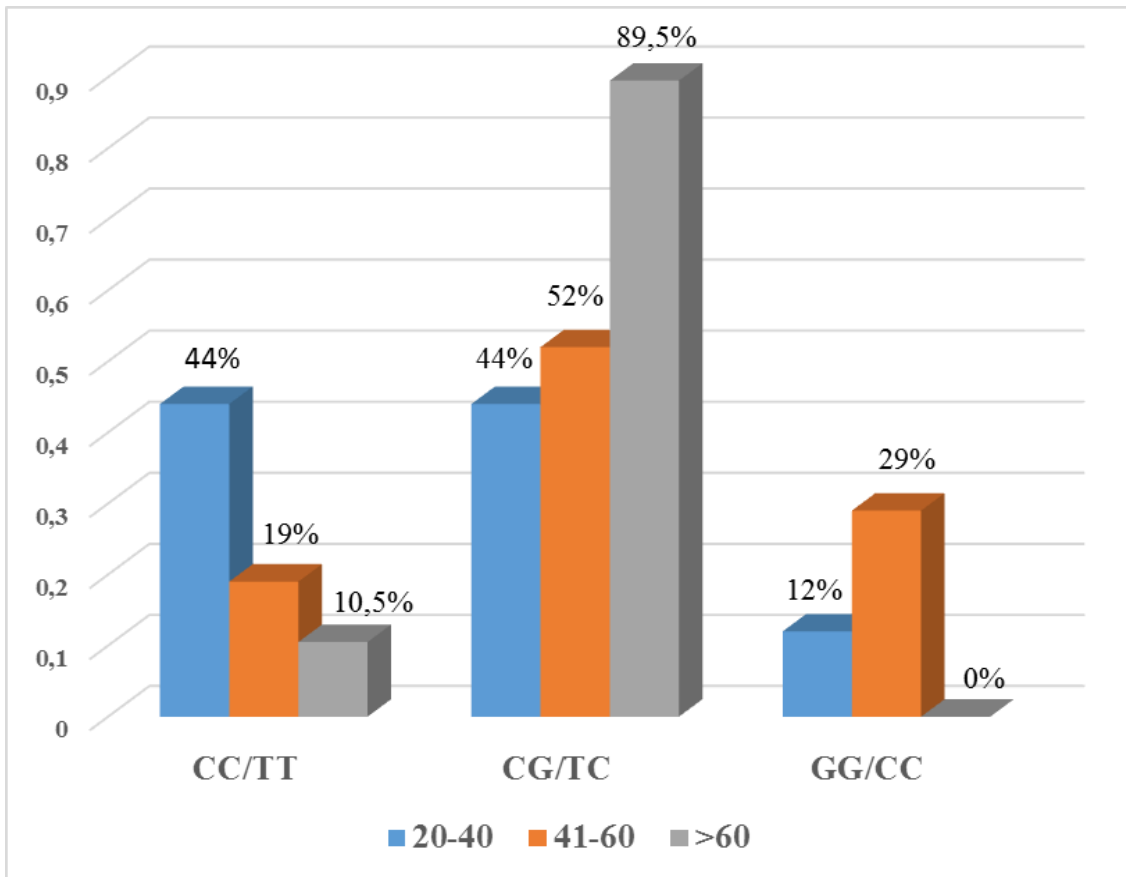


Рисунок 28. Распределение частот генотипов полиморфизмов rs648802/rs648396 гена PERP в группах пациентов с различным возрастом манифестации заболевания

Наиболее выраженные отличия были установлены между группами пациентов, у которых манифестация заболевания произошла в возрасте до 60 и после 60 лет.

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 25).

Таблица 25. 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 «сцепленных» 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)	2/0,11	17/0,90	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

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 пузырчатки 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 выяснения возможной взаимосвязи между генетической предрасположенностью и тяжестью течения заболевания был проведен анализ частоты распределения генотипов в полиморфизмах s648802 и rs6483963-го экзона гена *PERP* у больных пузырчаткой с различной тяжестью заболевания. Тяжесть заболевания оценивалась в соответствии с клиническим индексом PDAI (n=45), по тяжести заболевания были разделены на 2 подгруппы: легкого течения

(1-я группа, n=12) и средней тяжести – тяжелого течения (2-я группа, n=33) (Таблица 26).

Таблица 26. 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 тяжести (n=12) абс.значение/ частота	Среднетяжелая, тяжелая степень тяжести (n=33) абс.значение/ частота		
Аллель T/C	8/0,18	38/0,58	p<0,05 ($\chi^2=4,14$)	0,37 [0,08-0,73]
Аллель C/G	16/0,82	28/0,42		2,71 [0,056-5,37]
Генотип TT/CC	1/0,08	7/0,21	p>0,05 $\chi^2=0,99$	0,34 [0,41-1,08]
Генотип TC/CG	6/0,5	24/0,73	p>0,05 $\chi^2=2,0$	0,38 [0,14-0,89]
Генотип CC/GG	5/0,42	2/0,06	p<0,05 $\chi^2=8,5$	11,07 [0,22-31,37]

В результате проведенных расчетов было установлено, что группа пациентов со средней и тяжелой степенью тяжести патологического процесса статистически значимо отличалась от группы пациентов с легким течением заболевания как по частоте аллельных вариантов генов, так и по частоте генотипов.

Обращало на себя внимание то, что частота аллельных вариантов C/G полиморфизмов rs648802 и rs648396 3-го экзона гена *PERP* была существенно выше у больных с легкой степенью тяжести в сравнении с больными со

среднетяжелой и тяжелой степенью тяжести пузырчатки (81,8% против 42,0%), в то время как частота аллельных вариантов *T/C* полиморфизмов s648802 и rs6483963-го экзона гена *PERP*, напротив, была выше у больных со среднетяжелой и тяжелой степенью тяжести заболевания (58,0% против 18,2%; различия достоверны; $p=0,041$).

Частота гомозиготных генотипов *CC/GG* полиморфизмов s648802 и rs6483963-го экзона гена *PERP* была значимо выше у пациентов с легкой степенью тяжести заболевания (41,7%) в сравнении с пациентами со среднетяжелой и тяжелой степенью тяжести заболевания (6,0%). Данные статистически значимы; $p=0,018$.

Частота гомозиготных *TT/CC* генотипов полиморфизмов rs648802/rs648396 3-го экзона гена *PERP* была выше у больных со среднетяжелой и тяжелой степенью тяжести (21,0%) в сравнении с больными с легкой степенью тяжести заболевания (8,3%). Частота гетерозиготных (маркерных) *TC/CG* также была выше у больных со среднетяжелой и тяжелой степенью тяжести заболевания (73,0%) в сравнении с больными с легкой степенью тяжести заболевания (50,0%). Однако полученные по данным генотипам данные статистически недостоверны; $p>0,05$.

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

Установлено, что гетерозиготные генотипы *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396) достоверно чаще встречались у больных пузырчаткой в сравнении со здоровыми лицами, что позволяет рассматривать их как «маркерные» генотипы – предикторы развития заболевания. При этом гетерозиготный генотип *C/G* полиморфизма rs648802 3-го экзона гена *PERP*, приводящий к изменению структуры и, возможно, функции белка *PERP*, можно рассматривать как основной «маркерный», функционально значимый, генотип, указывающий на предрасположенность человека к развитию пузырчатки. Второй

гетерозиготный генотип *T/C* полиморфизма rs648396 гена *PERP* также может рассматриваться как маркерный генотип, поскольку оба генотипа наследуются сцеплено.

Установлена взаимосвязь между распределением генотипов полиморфизмов rs648802 и rs648396 3-го экзона гена *PERP* и возрастом манифестации заболевания. С увеличением возраста, в котором началось заболевание, частота выявления гетерозиготных («маркерных») полиморфизмов 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%). Выявлена достоверно более высокая частота обнаружения «маркерных» генотипов у лиц с манифестацией заболевания в возрасте 61 год и старше в сравнении с лицами, у которых заболевание началось в возрасте до 60 лет (соответственно, 89,5% против 50,0%; $p=0,012$). Отмеченные особенности позволяют говорить о том, что определение «маркерного» генотипа имеет высокую диагностическую значимость, в особенности у пациентов, у которых заболевание развилось в возрасте старше 60 лет.

Отмечена взаимосвязь между распределением аллельных вариантов и генотипов полиморфизмов rs648802 и rs648396 3-го экзона гена *PERP* и степенью тяжести патологического процесса у больных пузырчаткой: при легкой степени тяжести патологического процесса выявлено преобладание аллелей *C/G* и гомозиготных генотипов *CC/GG*, более характерных для здоровых лиц; при среднетяжелом и тяжелом течении заболевания установлено преобладание аллелей *T/C*. Полученные данные позволяют сделать предположение о существовании различных генетических механизмов эскалации патологического процесса, что приводит к различиям в тяжести клинического течения пузырчатки у пациентов и может использоваться для прогнозирования тяжести заболевания у больных.

4.3.2 Результаты определения экспрессии белка PERP в коже больных пузырчаткой

В последние десятилетия среди многочисленных белков десмосом особый интерес вызывает миелиновый белок PERP («p53 apoptosis effector related to PMP-22» – апоптотический эффектор белка p53), относящийся к периферическим миелиновым белкам-22 и член семейства трансмембранных белков PMP-22/gas3 (Attardi L.D., Reczek E.E., Cosmas C. et al., 2000; Kalantari-Dehaghi M., Molina D.M., Farhadieh M. et al., 2011; Kalantari-Dehaghi M., Anhalt G. et al., 2011). В коже человека белок PERP экспрессируется на поверхности кератиноцитов. Показано (Attardi L., 2000; Vektas M., 2009, Jheon A.H., 2011), что PERP необходим для реализации функций десмосом по обеспечению межклеточной адгезии в коже и слизистых оболочках, регуляции пролиферации кератиноцитов, а также для реализации процессов апоптоза. Изучению роли белка PERP в развитии пузырчатки посвящено лишь несколько зарубежных работ, которые проводились на экспериментальных моделях пузырчатки (Nguyen B. et al., 2009, Reaz S., 2013). Учитывая подтвержденную в экспериментальных исследованиях роль белка PERP в нарушении адгезии клеток и возможность его участия в процессе акантолиза, вызывающего формирование внутриэпидермальных пузырей на коже и слизистых оболочках лабораторных животных, представляло интерес изучить экспрессию данного белка в коже больных пузырчаткой.

При использовании метода ИРИФ отложения белка PERP у больных акантолитической пузырчаткой определялись в межклеточных промежутках эпидермиса. В биоптатах, полученных из очагов поражения, у двух больных пузырчаткой, отсутствовала экспрессия белка PERP в покрывке пузыря (Рисунок 29 А), но сохранялась в участках кожи, прилегавших к пузырьным элементам. У остальных пациентов экспрессия белка PERP определялась как в покрывке пузыря (зона 1) (Рисунок 29 Б), так и в участках, прилегавших к пузырьным элементам (зона 2) и видимо непораженной кожи (зона 3) на мембранах кератиноцитов всех слоев эпидермиса (Рисунок 29 В, Г).

Во всех биоптатах, полученных от здоровых лиц, экспрессия белка PERP так же наблюдалась на мембранах кератиноцитов всех слоев эпидермиса.

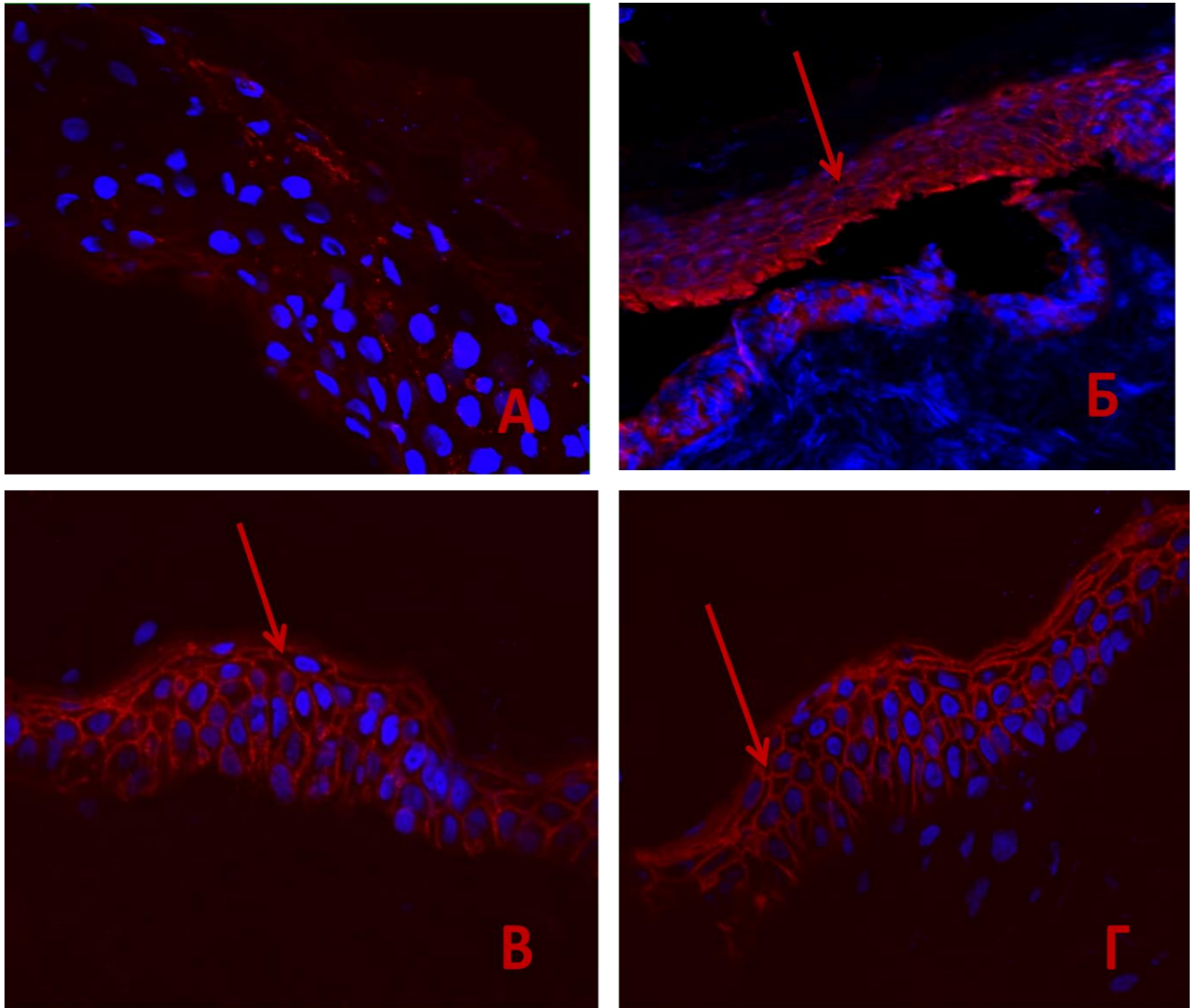


Рисунок 29. ИРИФ с антителами к PERP. А - отсутствие экспрессии PERP в покрывке пузыря у больного вульгарной пузырчаткой. Б-Г - Экспрессия PERP на мембране кератиноцитов у больного вульгарной пузырчаткой: Б. - в покрывке пузыря, В. - в участке кожи, прилегающей к пузырю, Г - в видимо здоровой коже; х600

Анализ количественных показателей экспрессии белка PERP показал высокую вариабельность экспрессии структурного белка десмосом PERP в биоптатах кожи больных пузырчаткой как в покрывке пузыря (от 29,73 до 1734,28 ед.), так и в участках видимо здоровой кожи (от 98,72 до 1213,32 ед.) (Рисунок 30).

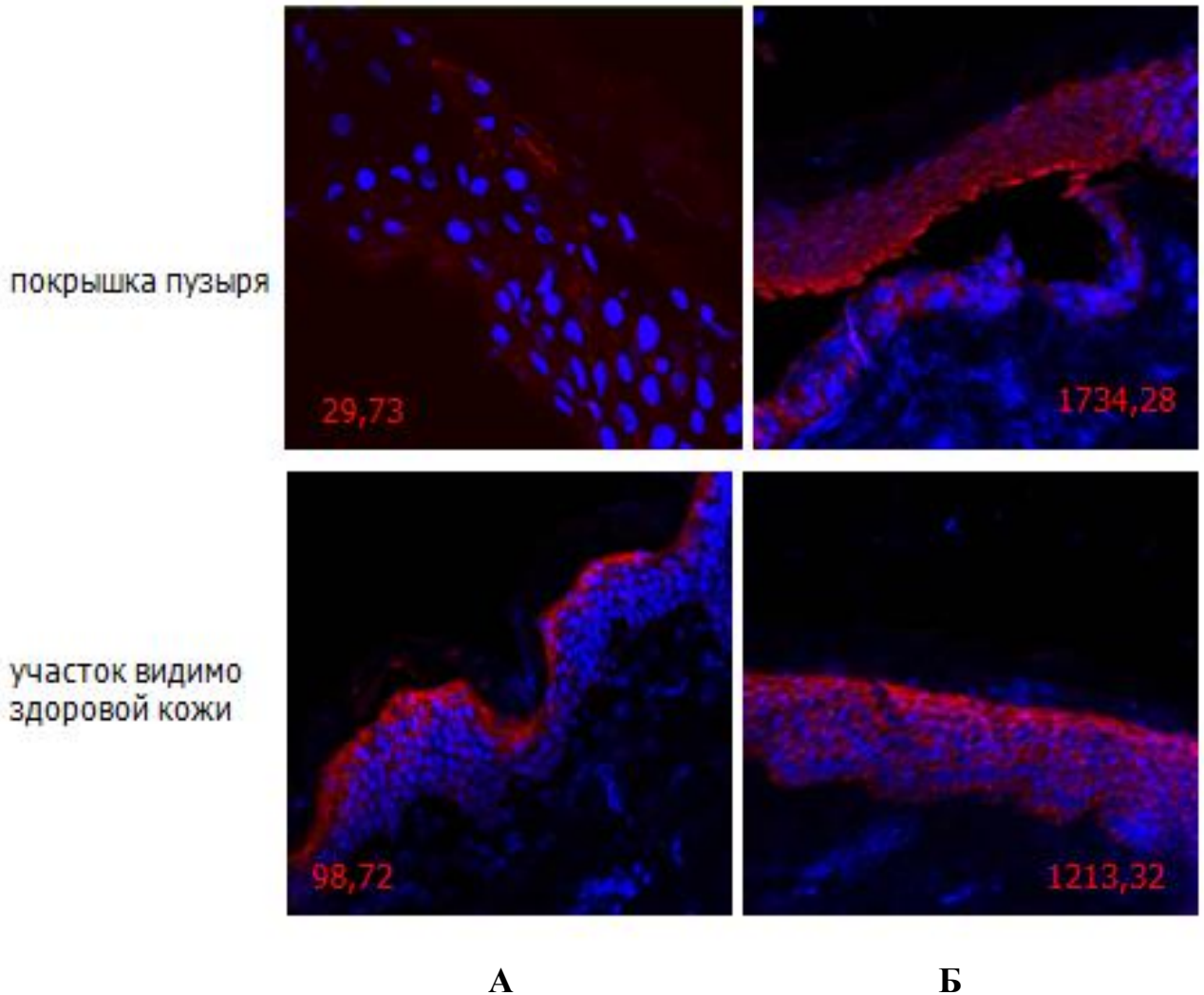


Рисунок 30. Вариабельность экспрессии белка PERP в покрышке пузыря и участке видимо здоровой кожи у больных пузырчаткой, x20; А - минимальные значения, Б - максимальные значения

Отмечено, что уровень экспрессии белка у больных пузырчаткой был значительно ниже, чем у здоровых лиц ($824,60 \pm 35,24$ ед.), как в области покрышки пузыря (зона 1; $409,67 \pm 34,56$ ед.), так и в прилегавших к пузырьному элементу участках (зона 2; $484,81 \pm 37,10$ ед.) и в видимо непораженной коже больных пузырчаткой (зона 3; $529,20 \pm 49,48$ ед.) ($p < 0,05$).

Статистически значимой разницы между количественными показателями экспрессии структурного белка десмосом PERP у больных пузырчаткой в покрышке 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 ($p < 0,05$) (Таблица 27).

**Таблица 27. Показатели экспрессии белка PEPР в коже
больных пузырчаткой и здоровых лиц
(количество клеток на 100 кератиноцитов) ($M \pm m$)**

Показатель	Здоровые добровольцы, ед (n=10)	Больные пузырчаткой (n=30)		
		Покрышка пузыря, ед (n=11)	Участок, прилегающий к пузырьному элементу коже, ед (n=11)	Видимо непораженная кожа, ед (n=19)
Белок PEPР	824,60±35,24	309,67±34,56	384,81±37,10	429,20±49,48
p ₁		<0,05		
p ₂		<0,05		
p ₃		<0,05		

Примечание: p₁, p₂ и p₃ – уровни статистической значимости при сравнении показателей экспрессии белка PEPР у здоровых лиц и больных пузырчаткой, соответственно, в покрышке пузыря, участках, прилегающих к пузырьному элементу, видимо непораженной коже

При проведении исследования установлена зависимость между уровнем экспрессии белка PEPР и степенью тяжести заболевания (Таблица 28).

Таблица 28. Количественные показатели экспрессии структурного белка десмосом PEPР в коже больных пузырчаткой в зависимости от тяжести течения заболевания (индекс PDAI)

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

Достоверных изменений экспрессии белка PERP в покрывке пузыря и в видимо здоровой коже рядом с пузырем у больных пузырчаткой в зависимости от тяжести заболевания выявлено не было ($p > 0,05$).

Корреляционный анализ позволил установить наличие достоверной умеренной обратной связи между количественными показателями экспрессии PERP у больных пузырчаткой в участке видимо здоровой кожи и длительностью заболевания ($r = -0,5$; $p = 0,03$). Корреляционных связей экспрессии белка PERP в покрывке пузыря ($r = 0,43$, $p = 0,8$), в участках кожи, прилегающих к пузырю ($r = 0,05$; $p = 0,68$) с длительностью заболевания не обнаружено.

Нами не установлено статистически значимых различий уровня экспрессии структурного белка десмосом PERP у больных пузырчаткой в зависимости от пола; возраста, локализации процесса и клинической формы заболевания (вульгарная, листовидная пузырчатка) ($p > 0,05$).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено наличие отложений структурного белка десмосом PERP в межклеточных промежутках, в покрывке пузырей; в участках, прилегающих к пузырьным элементам, а также в видимо здоровой коже больных пузырчаткой.

При количественном анализе экспрессии белка PERP у больных пузырчаткой установлен значительно более низкий уровень экспрессии данного белка, как в пузыре, так и в участках, прилегающих к пузырьным элементам и видимо непораженной коже в сравнении со здоровыми лицами ($824,60 \pm 35,24$ ед.) ($p \leq 0,05$).

Выявлена зависимость уровня экспрессии белка PERP от тяжести заболевания: отмечено существенное снижение количественных показателей

экспрессии белка PERP в видимо здоровой коже у больных с заболеванием тяжелой степени ($413,66 \pm 74,42$ ед.), средней тяжести ($563,46 \pm 82,72$ ед.) в сравнении с больными с легким течением заболевания ($702,58 \pm 78,44$ ед.) ($p < 0,05$), что свидетельствует о потенциальной «готовности» видимо непораженной кожи больных пузырчаткой к развитию фенотипических проявлений болезни.

Установлена обратная корреляционная связь между количественными показателями экспрессии PERP у больных пузырчаткой в участке видимо здоровой кожи и длительностью заболевания ($r = -0,5$; $p = 0,03$). Данное обстоятельство свидетельствует о том, что длительное течение пузырчатки способствует усугублению дефицита белка PERP и, возможно, развитию новых клинических проявлений на участках видимо неповрежденной кожи больных.

Полученные данные позволяют сделать заключение о несомненном участии белка PERP в патогенезе пузырчатке. Об этом свидетельствует значимое снижение экспрессии белка PERP у больных пузырчаткой в сравнении со здоровыми лицами, усугубление выявленных изменений с нарастанием тяжести и длительности течения 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. Данные экспериментов на животных моделях, в которых показаны нарушения структуры десмосом при отсутствии белка PERP, подтверждают данное предположение. Если к тому же учесть, что PERP - проапоптотический белок (Attardi L.D. et al., 2000), а в исследованиях, проведенных В. Pelacho (2004), М. Pretel (2009) продемонстрирована активация сигнальных и эффекторных белков апоптоза под действием иммуноглобулинов класса G, полученных от больных вульгарной пузырчаткой, логично предположить, что он запускает программу апоптоза кератиноцитов, протекающего параллельно или последовательно с акантолизом. Данное предположение укладывается в концепцию S.A. Grando (2012) об «апоптолизе». При этом, как показали наши исследования, белку PERP здесь, возможно, принадлежит ведущая роль.

4.4 Оценка роли толл-подобного рецептора 7 типа в патогенезе пузырчатки на основании изучения его экспрессии в коже больных методом ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени

Одними из наиболее значимых представителей семейства сигнальных паттерн-распознающих рецепторов и ключевыми структурами врожденного иммунитета являются толл-подобные рецепторы (TLR), относящиеся к трансмембранным белкам. Дефекты в системе TLR (изменение способности распознавать лиганды, нарушение экспрессии *TLR*, передачи сигнала, выработки эффекторных молекул, а также полиморфизм генов *TLR*) могут приводить к развитию тяжелых инфекционных, аллергических, онкологических, аутоиммунных и других заболеваний (Huiming Y., Yunfang L. et al., 2011; Netea M.G., Wijmenga C., O'Neill A., 2012). Активация TLR обуславливает экспрессию множества генов хемокинов и провоспалительных цитокинов. Помимо цитокинов, усиливается экспрессия молекул адгезии, противомикробных пептидов, белков острой фазы воспаления, NO-синтазы, циклооксигеназы, что приводит к развитию воспалительной и аутоиммунной реакции (Ковальчук Л.В., Хорева М.В. и др., 2008; Netea M.G., Wijmenga C., O'Neill L.A., 2012). О.Д. Коцаревой (2007) показано, что, в акантолизе при пузырчатке одну из ведущих ролей играет активация клеток эндотелия вследствие воспаления, что обеспечивает доступ аутоантител в эпидермис.

В нашей работе для оценки роли гена *TLR7* в патогенезе пузырчатки определяли его экспрессию в биообразцах кожи больных пузырчаткой (n=38) и здоровых лиц (n=24) по изменению уровня матричной РНК (мРНК). Амплификацию с последующим определением уровня экспрессии гена *TLR7* проводили методом ПЦР с детекцией накопления продуктов реакции в режиме реального времени (Real-Time RCR).

Для количественной оценки экспрессии генов, кодирующих белок TLR7, в программе "Oligo 6.0" были подобраны пары праймеров для детекции гена *TLR7*. В качестве референсных генов, относительно которых определялся уровень представленности транскриптов изучаемого гена, были выбраны гены

«домашнего хозяйства» (*от англ. housekeeping genes*), кодирующие β -актин (*ACTIN*) и *PANK*. Данные гены необходимы для поддержания важнейших жизненных функций организма и экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне (Saumil J.G., Gandhi S.J. et al., 2011).

Важным параметром для оценки правильности прохождения ПЦР в реальном времени является значение эффективности амплификации, или эффективности работы праймеров. Существует несколько вариантов расчета эффективности амплификации. В нашем исследовании мы применяли вариант определения величины эффективности амплификации путем анализа наклона кривой логарифмической функции. При помощи программного обеспечения *Real-time PCR Miner*, доступного на сайте <http://www.miner.ewindup.info/>, по данным, полученным в результате постановки ПЦР в реальном времени, вычисляли значение эффективности амплификации, после чего осуществляли пересчет данных с учетом полученного коэффициента.

В результате проведенных исследований для генов *TLR7*, β -актин и *PANK* была установлена эффективная работа праймеров, подобранных для проведения ПЦР в реальном времени (0,82, 0,89 и 0,90 соответственно) (Таблица 29), что позволило провести исследования методом ПЦР в реальном времени и получить кривые накопления транскриптов изучаемых генов, представленных в образце кожи здоровых лиц и в видимо непораженных участках кожи больных пузырчаткой.

Таблица 29 - Расчетные значения эффективности амплификации фрагментов генов *TLR7*, β -actin и *PANK*

Пары праймеров	Эффективность амплификации	Коэффициент амплификации
TLR7_FAM	0,82	1,82
β -actin_FAM	0,89	1,89
PANK_FAM	0,90	1,90

В результате исследований методом ПЦР в реальном времени были получены кривые, характеризующие процесс амплификации транскриптов изучаемых генов, представленных в образцах кожи пациентов (Рисунок 31).

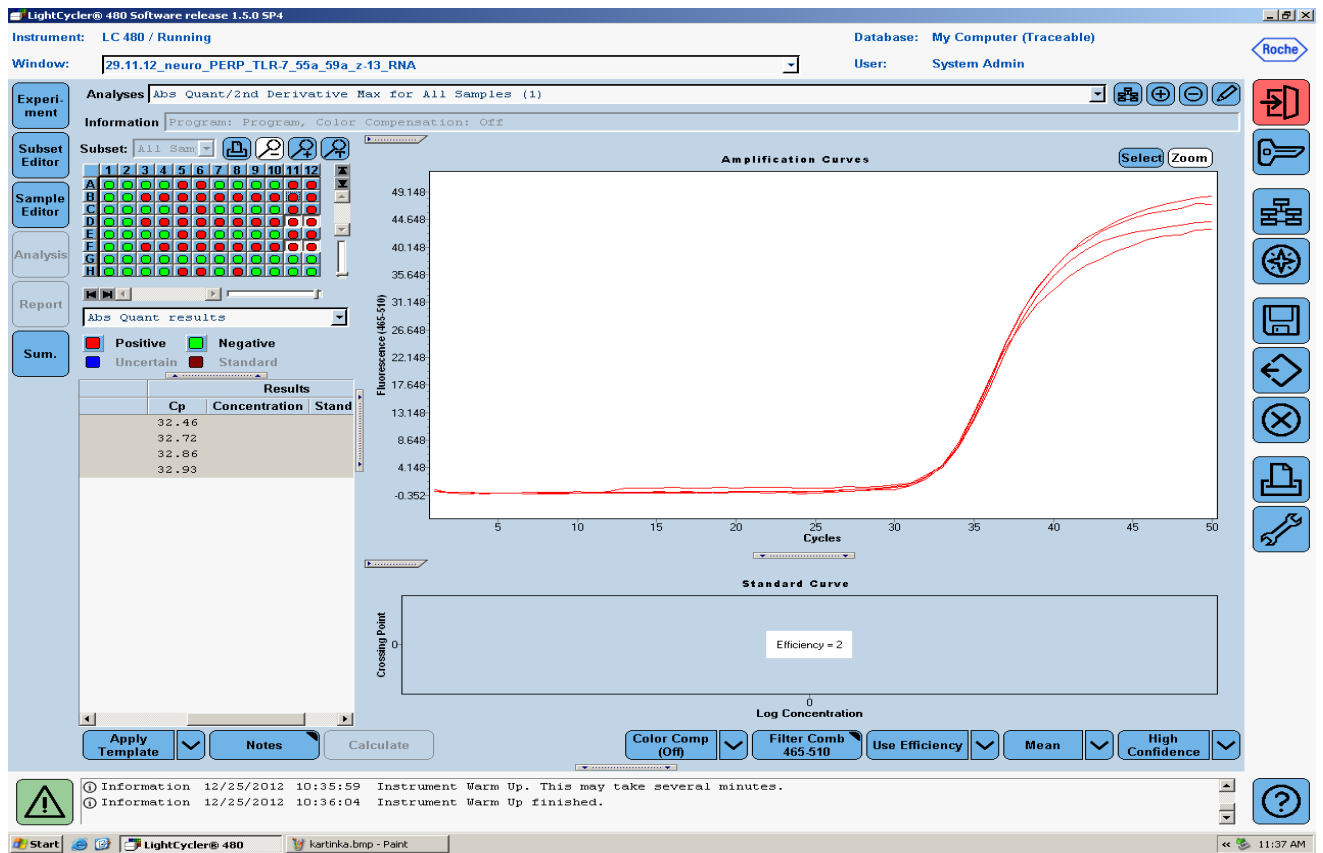


Рисунок 31. Скриншот интерфейса программы *LightCycler®480 Software release 1.5.0 SP4* с результатами ПЦР в реальном времени для образца здоровой кожи. На графике видны кривые, характеризующие течение амплификации транскриптов, представленных в образце кожи пациентов

Выполненное исследование продемонстрировало статистически значимые различия экспрессии *TLR7* у больных пузырчаткой в сравнении со здоровыми лицами при использовании в качестве эндогенного контроля генов домашнего хозяйства β -актин и *PANK*. Медиана экспрессии гена *TLR7* у больных пузырчаткой составила 0,3%, что почти в 80 раз превышало этот показатель у здоровых лиц (0,0035%). Средние значения уровней экспрессии гена *TLR7* в коже больных пузырчаткой и здоровых лиц относительно нормировочных генов β -актин и *PANK*, выраженные в условных относительных единицах экспрессии - относительных единицах (OE), представлены в таблице 30.

Таблица 30 - Уровень экспрессии гена *TLR7* в коже больных пузырчаткой и здоровых лиц, ОЕ (M±m)

Группы	Уровень экспрессии <i>TLR7</i> (M ±m)	Уровень экспрессии <i>Actin</i> (M ±m)	Нормализованная <i>TLR 7/Actin</i>	Уровень экспрессии <i>TLR7</i> (M ±m)	Уровень экспрессии <i>PANK</i> (M ±m)	Нормализованная <i>TLR 7/PANK</i>
Больные пузырчаткой (n= 38)	33,25± 8,42	23,18± 5,54	249,95± 21,89	31,34± 2,78	27,99± 3,03	2,96± 0,34
Здоровые лица (n=24)	32,34± 7,19	20,38± 6,68	186,13± 17,76	33,25± 3,35	30,51± 2,98	1,61± 0,23
p ₁₋₂			0,017			0,045

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

Как следует из представленных данных, при расчете экспрессии гена *TLR7* по отношению к нормировочному гену β -актину больных пузырчаткой был выявлен достоверно более высокий уровень экспрессии *TLR7*(249,95±21,89) по сравнению со здоровыми лицами 186,13±17,76 (p=0,017). Экспрессия *TLR7* по отношению к гену *PANK* была также статистически значимо выше у больных пузырчаткой (2,96±0,34) по сравнению со здоровыми лицами (1,61±0,23) (p=0,045).

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=0,0462), 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 силы связи.

Таким образом, в результате выполнения данного раздела диссертации: - проведена предварительная работа по выполнению исследований экспрессии гена

TLR7 методом ПЦР в реальном времени: осуществлен подбор праймеров и зондов, разработаны условия амплификации, подобраны «нормировочные» гены – гены «домашнего хозяйства» β -актин и *PANK*, относительно которых производился расчет экспрессии *TLR7*, проведена оценка эффективности амплификации путем анализа наклона кривой логарифмической функции, которая установила эффективную работу праймеров, подобранных для выполнения исследований методом ПЦР в реальном времени (для генов *TLR7*, β -актин и *PANK*, соответственно, 0,82, 0,89 и 0,90). Проведенная работа позволила провести исследования методом ПЦР в реальном времени и получить кривые накопления транскриптов изучаемых генов, представленных в образце кожи здоровых лиц и в видимо непораженных участках кожи больных пузырчаткой.

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 - $249,95 \pm 21,89$ ОЕ; по отношению к нормировочному гену *PANK* - $2,96 \pm 0,34$ ОЕ), значительно превышал экспрессию данного гена у здоровых лиц (показатели, соответственно, $186,13 \pm 17,76$ ОЕ и $1,61 \pm 0,23$ ОЕ; $p < 0,05$), что может свидетельствовать о повышении транскрипционной активности генома больных пузырчаткой и активации сигнальных путей в клетках.

К настоящему времени роль толл-подобных рецепторов в патогенезе пузырчатки не изучалась, однако предполагается, что толл-подобные рецепторы, в том числе *TLR7*, могут принимать участие в процессах индукции аутоиммунных реакций при акантолитической пузырчатке (Bauza A., Del Pozo L.J., Saus C., 2009; Brenner S., Goldberg I., 2011). 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 клетками иммунной системы, относящимся к адаптивному иммунитету и клетками кожи, относящимся к важным структурам врожденного иммунитета. Высокие концентрации *TLR7* в эпителиоцитах могут приводить к нарушению эффективной

работы иммунной системы, так как усиливают синтез провоспалительных цитокинов, что приводит к увеличению выработки аутоантител и активации процессов акантолиза. Полученные результаты являются дополнением существующих представлений о механизмах развития пузырчатки и могут быть использованы для разработки новых методов терапии больных, а также диагностики пузырчатки.

ГЛАВА 5

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

5.1 Создание экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных (неонатальных мышах инбредной линии BALB/c)

Принимая во внимание схожий характер распределения десмоглеинов, являющихся основными антигенами при пузырчатке у неонатальных мышей и человека (Wu I.C. et al., 2000), для проведения экспериментов по созданию модели пузырчатки на лабораторных животных *in vivo*, были выбраны неонатальные мыши - самцы инбредной линии BALB/c с массой 2,5-3,5 г, в возрасте менее 24 часов от рождения.

Для разработки экспериментальной модели пузырчатки предстояло решить задачи по стандартизации условий воспроизведения клинико-морфологических процессов, характерных для пузырчатки, на лабораторных животных. В ходе проведения эксперимента определяли дозу препарата суммарных IgG и время, необходимое для развития пузырчатки, клинически проявляющейся образованием пузырей и/или эрозий, патоморфологически – интраэпидермальными полостями в результате акантолиза, а иммуногистохимически – фиксацией IgG к структурным компонентам десмосом в межклеточных промежутках эпидермиса. Эксперимент считался успешным при проявлении у животных в опытной группе следующих признаков: видимые поражения кожи (образование эрозий и/или пузырей), патоморфологические изменения (наличие акантолиза в гистологических срезах эпидермиса животного), иммунологические признаки, выявляемые методом нРИФ (фиксация человеческих IgG в эпидермисе мыши).

При визуальном клиническом осмотре проводили оценку выраженности поражений кожи в виде пузырей и/или эрозий по следующей шкале: 1+ – три или менее морфологических элемента; 2+ – от 4 до 10; 3+ – более 10 или наличия на поверхности участков некроза кожи, составляющей более 20% эпидермиса лабораторного животного. При введении препарата IgG, полученного от больных пузырчаткой в дозах 10 (экспозиция 24 и 48 часов), 15 мг/животное (экспозиция

24 часа) не было зафиксировано патологических изменений на кожных покровах мышей при клиническом наблюдении.

Клинические симптомы пузырчатки в виде единичных пузырьков, легко вскрывающихся с образованием эрозий в абдоминальной области, по 3-х бальной шкале оцениваемые как 1+ (т.е. три или менее поражений кожи), были выявлены у животных, которым вводили препараты Ig в дозе 20 мг/мышь однократно со временем экспозиции 24 часа и 30 мг/мышь (однократно в дозе 30 мг/мышь или двукратно по 15 мг/мышь со временем экспозиции 24, 36 и 48 часов соответственно) (Рисунок 32, Таблица 31).



Рисунок 32. Эрозии на коже новорожденных мышей после введения препарата IgG, полученного от больных пузырчаткой, x20

При клиническом осмотре мышей, которым вводили препараты IgG от здоровых лиц, клинических признаков пузырчатки выявлено не было.

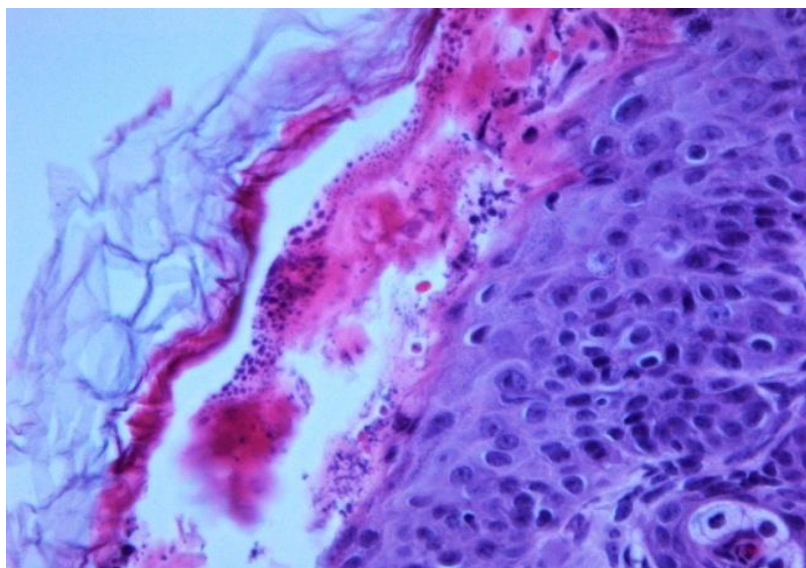
При *патоморфологическом исследовании аутопсийного материала* мышей, которым вводились малые дозы препаратов IgG, полученные от больных пузырчаткой (10, 15 мг/мышь), гистологические признаки пузырчатки не были выявлены.

Таблица 31 - Клинические, патоморфологические и иммуногистохимические признаки пузырчатки, выявленные при обследовании лабораторных животных после введения препаратов IgG больных пузырчаткой

Номер эксперимента	Доза препарата IgG, полученного от больных пузырчаткой, мг/ Мышь	Время экспозиции, часы	Кратность введения препарата IgG	Кол-во мышей в эксперименте	Клинические признаки пузырчатки (количество мышей)			Патоморфологические признаки пузырчатки (количество мышей)	нРИФ (фиксация IgG в эпидермисе животных) (количество мышей/интенсивность фиксации)
					+	++	+++		
1.	10	24	1	5	-	-	-	-	5/+
2.	10+10	48	2	6	-	-	-	-	6/++
3.	15	24	1	5	-	-	-	-	5/++
4.	15+15	48	2	6	4	-	-	6	6/+++
5.	20	24	1	5	1	-	-	3	5/++
6.	30	48	1	5	4	-	-	5	5/+++
7.	30	24	1	7	3	-	-	7	7/++
8.	30	36	1	7	4	-	-	7	7/++
9.	30	48	1	7	6	-	-	6	7/+++

Клинические проявления: + – три или менее поражений кожи, ++ – от 4 до 10 поражений кожи, +++ – более 10 поражений кожи. нРИФ: + - очаговая фиксация, ++ - умеренная фиксация, +++ - выраженная фиксация.

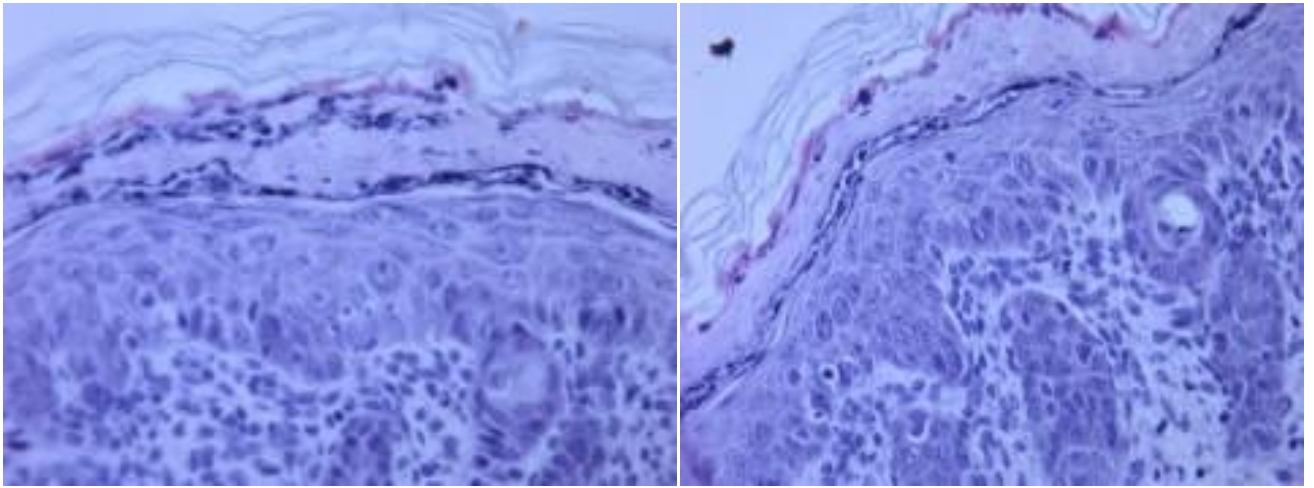
При исследовании биоптатов, полученных от мышей, которым были введены препараты IgG, полученные от больных пузырчаткой в дозе 20, 30 мг/мышь, наблюдалось 3 вида изменения кожи у животных. В гистологических препаратах у таких мышей выявлялось наличие супрабазального акантолиза, интраэпидермальных пузырей с сохранением связи между базальными клетками и дермой (1 тип) (Рисунок 33). Также у мышей основной группы наблюдались интраэпидермальные пузыри с единичными акантолитическими клетками и большим количеством полиморфно-ядерных лейкоцитов (2 тип). При 3 типе повреждения при исследовании гистологических препаратов мышей часто наблюдалась обширная отслойка эпидермиса, выявлялись акантолитические клетки, которые обнаруживались ниже зернистого слоя эпидермиса, часто с некрозом (или без некроза) пораженных кератиноцитов.



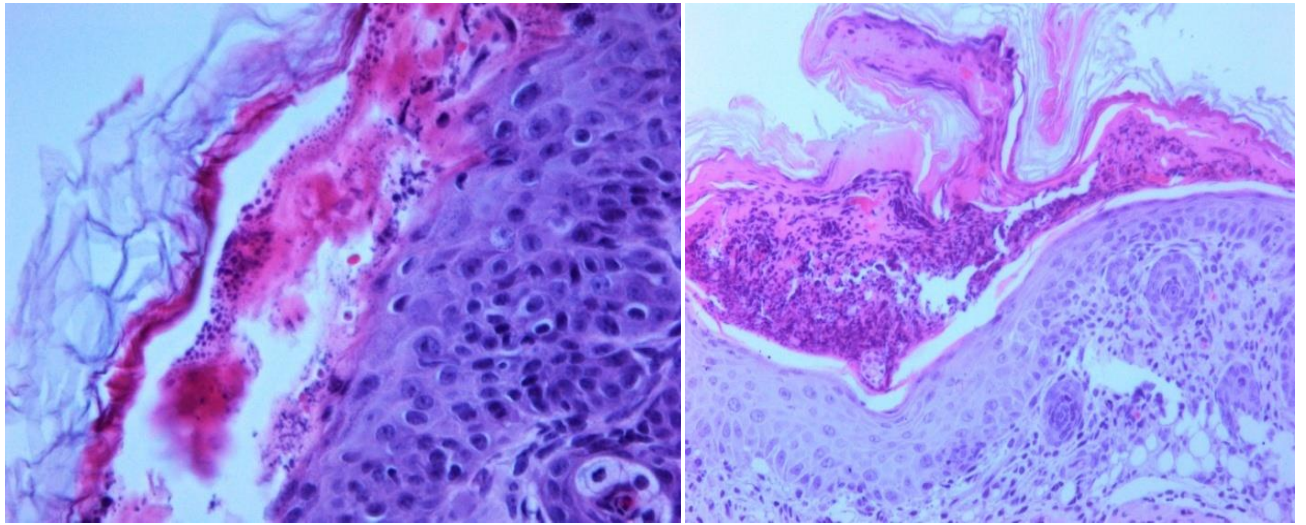
А

Рисунок 33. Гистологическая картина аутопсийного материала мышей, которым введен препарат IgG от больных пузырчаткой, г-э, x200

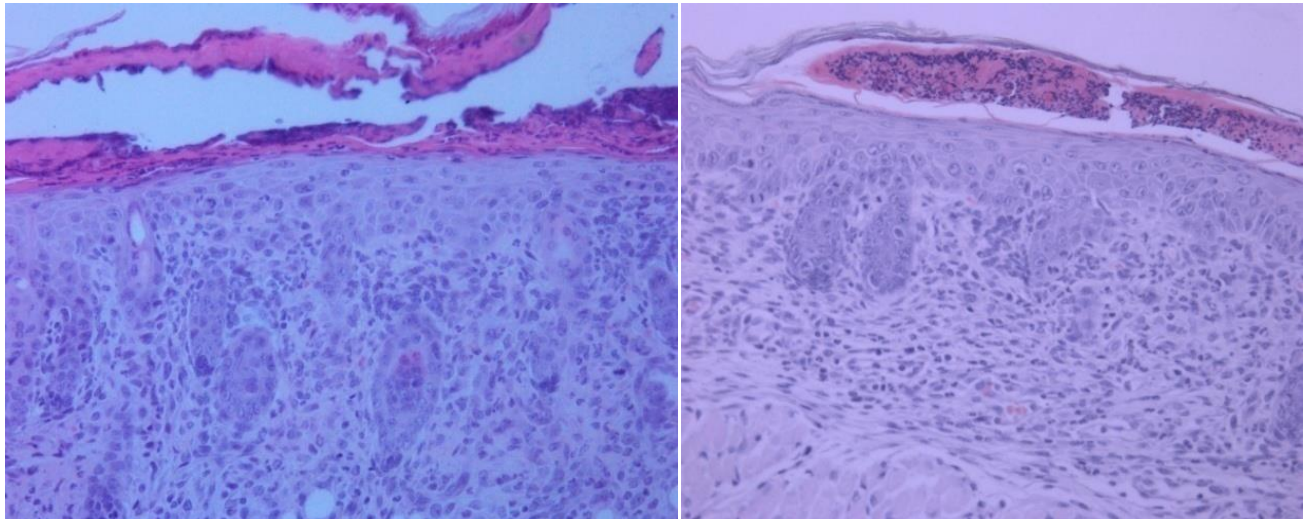
При патоморфологическом исследовании аутопсийного материала кожи мышей патогномоничный признак пузырчатки - акантолиз с формированием пузыря выявлялся во всех гистологических препаратах животных из опытных групп, которым были введены антитела в количестве 30 мг/мышь, как однократно, так и двукратно, со временем экспозиции 18, 24, 48 часов (Рисунок 34 А, Б, В).



А



Б



В

Рисунок 34. Гистологическая картина аутопсийного материала мышечной основной группы, которым был введен препарат IgG от больных пузырчаткой: А. Экспозиция 18 часов после введения. Б. Экспозиция 24 часа после введения. В. Экспозиция 48 часов после введения, г-э, х200

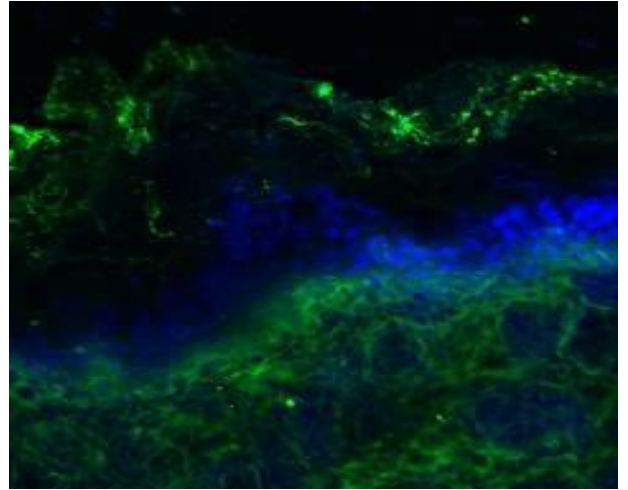
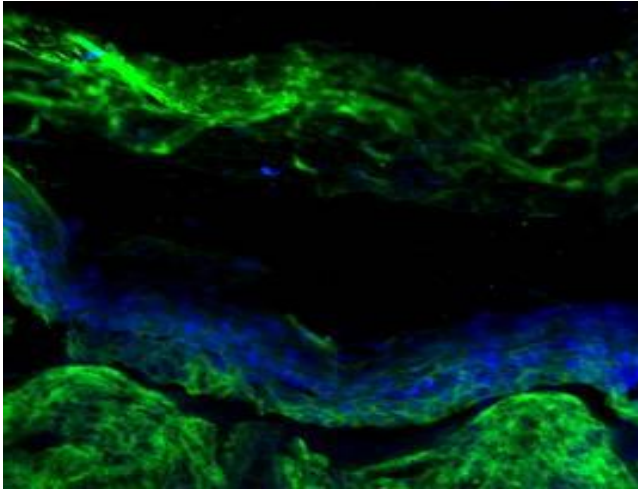
Проведенные исследования показали, что у экспериментальных животных после введения препаратов IgG, полученных от больных пузырчаткой, формируются акантолитические пузыри, которые за короткий срок (18-48 часов), за счет выраженной пролиферации эпидермиса, перемещаются в вышележащие отделы, воспалительная реакция в дерме сохраняется более длительное время.

При введении препаратов IgG от здоровых лиц в аутопсийном материале мышей патоморфологические признаки, характерные для пузырчатки, не были зарегистрированы.

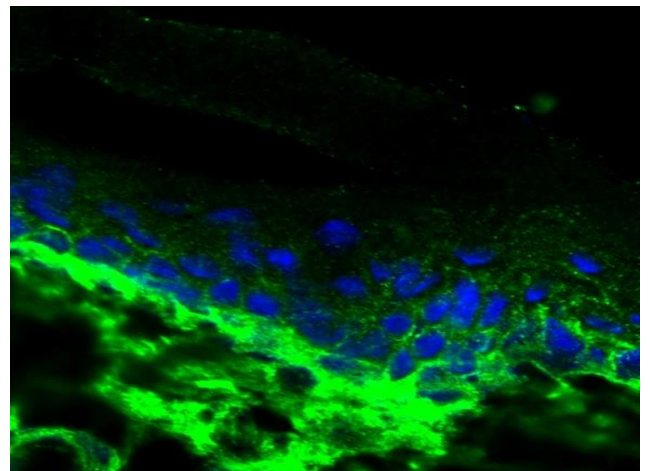
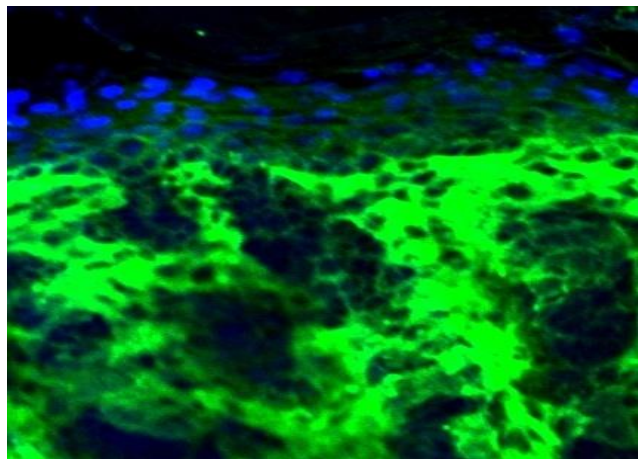
При исследовании криосрезов кожи мышей из опытных групп, которым были введены препараты IgG от больных пузырчаткой, методом нРИФ была обнаружена фиксация человеческих IgG в межклеточных промежутках эпидермиса у всех мышей. При проведении нРИФ с антителами к IgG во всех биоптатах мышей, которым были введены IgG от больных пузырчаткой, отмечались участки отложения депозитов IgG в межклеточных промежутках базального и надбазальных слоев эпидермиса (в виде «сетки»). Также выявлялась умеренная или выраженная диффузная инфильтрация IgG верхних отделов дермы. По интенсивности свечения, при проведении нРИФ выделено 3 группы образцов: 1) + - очаговая фиксация IgG, 2) ++ - умеренная фиксация IgG, 3) +++ - выраженная фиксация IgG.

У мышей основной группы, которым были введены препараты IgG в дозах 10 мг/мышь, была выявлена очаговая фиксация (+) IgG в межклеточных промежутках эпидермиса (Рисунок 35 А). При введении препарата в дозах 15, 20 мг/мышь и экспозиции 24 часов, а также 30 мг/мышь и экспозиции 24, 36 часов, определялась умеренная фиксация IgG (++) в межклеточных промежутка эпидермиса (Рисунок 35 Б).

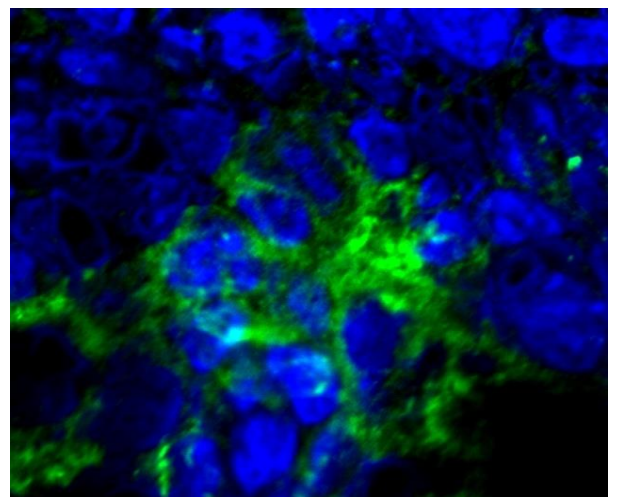
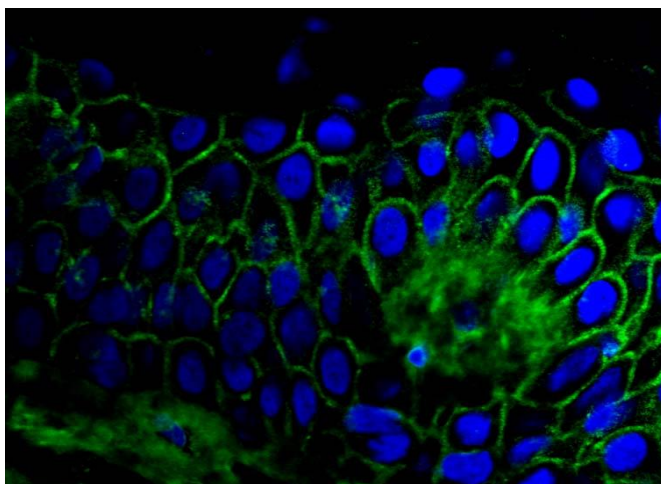
При исследовании криосрезов кожи мышей из опытных групп методом нРИФ была обнаружена выраженная фиксация (+++) человеческих IgG в межклеточных промежутках эпидермиса у всех мышей, которым был введен препарат IgG от больных пузырчаткой в дозе 30 мг/мышь, вводимых как одно-, так и двукратно при времени экспозиции 48 часов (Рисунок 35 В).



А. нРИФ IgG, x60



Б. нРИФ IgG, x200 (со свечением в дерме)



В. нРИФ IgG, x600

Рисунок 35. нРИФ. Препарат IgG в аутопсийном материале мышей при введении IgG больных пузырчаткой. Фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса. А. + - очаговая фиксация IgG, Б. ++ - умеренная фиксация IgG, В. +++ - выраженная фиксация IgG

В контрольных группах животных, которым вводились препараты IgG, полученные из сывороток здоровых лиц (n=46), в дозах 10, 15, 20 и 30 мг/животное, фиксации человеческих IgG в эпидермисе коже мышей не наблюдалось. После введения мышам фосфатно-солевого буфера (в каждом эксперименте буфер введен 2 мышам) клинических, патоморфологических и иммунологических признаков, характерных для пузырчатки, также выявлено не было.

Наличие пузырей и/или эрозий при клиническом осмотре, акантолиза в эпидермисе мышей при патоморфологическом исследовании, а также фиксация человеческих IgG в эпидермисе, выявляемых методом нРИФ только у животных опытной группы, которым вводили препараты IgG, содержавшие антитела к Dsg3, свидетельствовало о том, что антитела, содержащиеся в сыворотках крови больных пузырчаткой, индуцировали в коже животных процессы, сходные с симптомами пузырчатки.

В отличие от основной группы, в контрольной группе животных, которым вводились препараты IgG, полученные из сывороток здоровых лиц (n=46), в дозах 10, 15, 20 и 30 мг/животное и экспозиции 18, 24, 48 часов, клинических, патоморфологических признаков пузырчатки, а также фиксации человеческих IgG в эпидермисе не наблюдалось.

При этом степень выраженности клинических, патоморфологических, иммуногистохимических проявлений экспериментальной пузырчатки у лабораторных животных зависела от двух факторов: дозы вводимых антител и времени экспозиции. Выявлена прямая корреляция между дозой вводимых препаратов IgG и выраженностью проявлений.

Как следует из результатов проведенных экспериментов, сочетание всех трех признаков экспериментальной пузырчатки (клинических, патоморфологических и иммуногистохимических) наблюдалось в схеме проведения эксперимента с введением патологических IgG в дозе 30 мг/мышь (вводимых однократно и двукратно) и 20 мг/мышь. Учитывая, что наибольшее количество признаков экспериментальной пузырчатки было зарегистрировано при введении дозы

патологических IgG в дозе 30 мг/мышь, для экспериментального воспроизведения пузырчатки на неонатальных мышах-самцах инбредной линии BALB/c с массой 2,5-3,5 г, в возрасте менее 24 часов от рождения рекомендуется проведение экспериментов с данной дозой препарата IgG .

При проведении экспериментов для разработки модели пузырчатки на неонатальных мышах предпочтение следует отдать схеме проведения эксперимента с двукратным введением антител с интервалом в 24 часа, так как благодаря этому обеспечивается уменьшение объема раствора, вводимого одновременно, что приводит к снижению случайных потерь препарата IgG при инъекции и уменьшает риск проявления у животных негативных явлений, связанных с введением в организм больших объемов жидкости.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов была впервые в РФ создана экспериментальная модель пузырчатки, полученная путем внутрибрюшинного введения экспериментальным животным (неонатальным мышам инбредной линии BALB/c с массой 2,5-3,5 г, в возрасте менее 24 часов от рождения) препаратов IgG, полученных от больных пузырчаткой. Создание модели подтверждено развитием у лабораторных животных клинических, патоморфологических и иммуногистохимических признаков пузырчатки.

Для экспериментального воспроизведения пузырчатки рекомендуется введение препаратов IgG в дозе 30 мг/мышь при двукратном введении антител с интервалом в 24 часа, что позволяет получить наибольшее количество признаков экспериментальной пузырчатки, а также снизить риск случайных потерь препарата IgG и развития у животных негативных явлений, связанных с введением в организм больших объемов жидкости.

Созданная модель может быть использована в научных исследованиях, проводимых с целью изучения патогенеза пузырчатки и разработки новых методов терапевтического воздействия.

5.2 Разработка и оценка *in vitro* и *in vivo* эффективности экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой

5.2.1 Создание иммуносорбента для селективного связывания и удаления аутоантител - IgG к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой

При пузырчатке основными белками-антигенами, с которыми связываются антитела, являются десмоглеины 3 типа (выявляются у 60-100% больных). В соответствии с имеющимися данными литературы (Belloni-Fortina A. et al., 2009; Schmidt A. et al., 2010) и полученными нами результатами (Глава 3) концентрация IgG к Dsg3 прямо коррелирует с тяжестью заболевания. В связи с вышеизложенным, представляется перспективным и патогенетически обоснованным применение методов экстракорпоральной коррекции нарушений гомеостаза, позволяющих избирательно удалять из сывороток крови больных пузырчаткой специфические аутоантитела. Реализация данной идеи возможна при использовании биоспецифических сорбентов, обеспечивающих селективное удаление IgG к десмоглеину 3 типа, участвующих в патогенезе пузырчатки. В связи с высокой селективностью удаления пемфигусных аутоантител, при селективной иммуносорбции сохраняются положительные эффекты аферезных методик и минимизируются присущие им известные недостатки (Eming R., Hertl M., 2006, Marker M., 2011).

Концептуально экстракорпоральная селективная иммуносорбция основывается на принципах аффинной хроматографии и заключается в следующем: вещества-лиганды, способные избирательно взаимодействовать с определенными патогенными компонентами крови или плазмы, иммобилизируются на биосовместимом твердофазном носителе. При прохождении крови или плазмы через такой сорбент происходят взаимодействия типа антиген-антитело, фермент-субстрат, лиганд-рецептор, характеризующиеся высокой степенью специфичности (Голубович В.П. и соавт., 2001).

Рекомбинантный человеческий десмоглеин - 3 (Dsg 3) фирмы MyBiosource (USA), созданный в культуре клеток дрожжей, получен в количестве 1 мг в 1 мл

20m MTris-HCl буфера pH 8,0 с добавлением 0,5 M NaCl и 50% глицерина. Белок доставлен и хранился при -20°C . Молекулярный вес белка 77 kDa (Рисунок 36). Изоэлектрическая точка (pI) – 5,7. Иммунизация Dsg3 на аффинном носителе осуществляется через первичные аминогруппы белка.

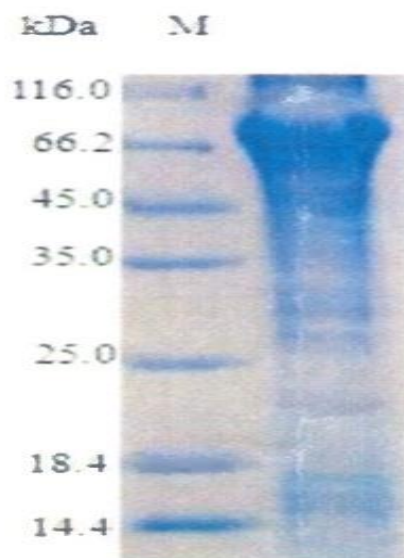


Рисунок 36. Электрофореграмма десмоглеина 3 типа

Affi-Gel 15 - агарозный и полиакриламидный гель, 15-членные гидрофильные спейсеры которого модифицированы присоединением N-оксисукцинимиды, представляет собой комплементарную аффинную среду для быстрого, высокоэффективного связывания с лигандами, имеющими первичные аминогруппы (Рисунок 37).



Рисунок 37. Образование связи Affi-Gel 15 с аминогруппой белка.

Сорбенты на основе полиакриламида обладают крайне незначительной неспецифической сорбцией, биологической инертностью, повышенной термической и химической устойчивостью.

Affi-Gel 15 образует стабильную амидную связь с белками при pH 6,5 и ниже (кислые белки). В соответствии с условиями производителя стабильная амидная связь формируется при использовании ряда 0,01M буферов с

физиологическим значением pH, однако, буферы типа Tris, содержащие первичные аминогруппы, будут конкурировать с белками за сайты связывания. Поэтому первой задачей стал перевод Dsg 3 из буфера доставки.

Рассмотрев все возможные способы перевода белка из одной буферной системы в другую - диализ, концентрирование на полиэтиленгликоле с последующим растворением, лиофильная сушка, ультрацентрифугирование – мы остановились на последнем, поскольку он сопряжён с наименьшими потерями белка. Постепенно замещая исходный буфер, был получен 1 мл раствора Dsg 3 в буфере связывания. Электрофоретический контроль свидетельствует о наличии Dsg3 в конечном буфере. По интенсивности окраски полос электрофореграмм можно судить о практически полном переносе Dsg 3 в буфер связывания. В результате мы получили 1 мл раствора Dsg 3 с концентрацией 1 мг/мл в 0,1 М NaHCO₃ pH 8,5.

Следующий этап работы – процесс связывания твердофазного носителя Affi-Gel 15 с Dsg3. В соответствии с методикой производителя оптимальное соотношение белок: гель составляет примерно 30 мг белка на 1 мл геля. Максимум связывания при этом достигается в течение 4 часов. Концентрация белка 1 мг/мл является минимальной для успешного связывания. Электрофорез проб супернатантов, взятых нами через два и через четыре часа, показал, что значительное количество белка осталось в свободном состоянии.

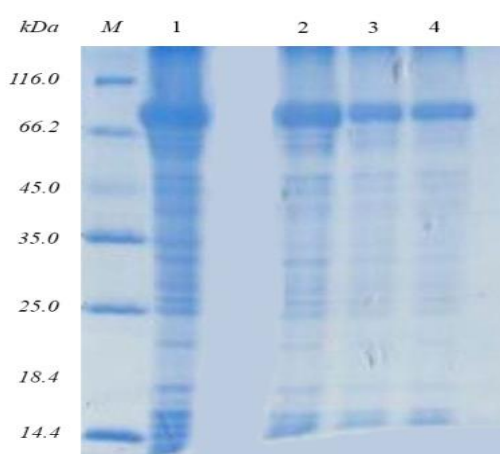


Рисунок 38. Dsg 3, полученный от My Biosource (дорожка 1) был переведён в буфер связывания (дорожка 2). Дорожки 3 и 4 – связывание Dsg 3 и Affi-Gel 15 через 2 и 4 часа инкубирования.

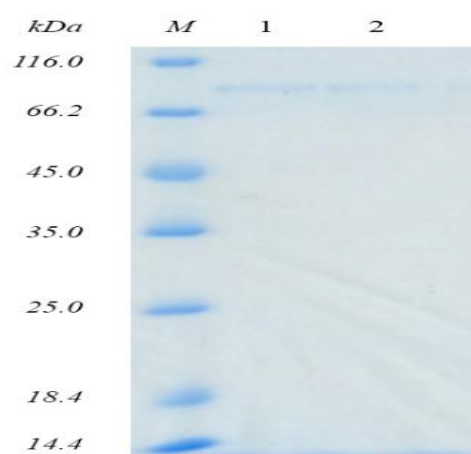


Рисунок 39. Контроль связывания Dsg 3 и Affi-Gel 15 после добавления NaCl. Дорожка 1 – супернатант, дорожка 2 – буфер отмывки.



Рисунок 41. Внешний вид хроматографической колонки с твердофазным иммуносорбентом

Одновременно с изготовлением специфического сорбента все описанные операции выполнялись с «пустым» Affi-gel 15, который использовался для контроля неспецифического связывания.

Полученные образцы были использованы для проведения экспериментов по оценке эффективности сорбции аутоантител к Dsg3 из клинических образцов крови, полученных от больных вульгарной пузырчаткой, *in vitro* и на экспериментальных моделях *in vivo*.

5.2.2 Оценка *in vitro* эффективности экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из суммарных IgG, выделенных из сывороток крови больных пузырчаткой

Лабораторные испытания опытно-экспериментальной серии разработанных твердофазных иммуносорбентов, в состав которых были включены рекомбинантные Dsg3 человека, ковалентно связанные с крупнозернистой агарозной матрицей Affi-Gel-15, позволили доказать их специфическую активность.

Для получения препаратов суммарных IgG из сывороток крови больных пузырчаткой и здоровых лиц методом аффинной хроматографии (для оценки эффективности разработанных иммуносорбентов) приготовлены пулы сывороток

крови больных вульгарной пузырчаткой, содержащие антитела к Dsg3 (определялись методом ИФА) и здоровых лиц, из которых были получены препараты, содержащие суммарные IgG больных пузырчаткой и здоровых лиц соответственно.

В результате иммуносорбции антител к Dsg3 из 75 мг препарата, содержащего IgG больных пузырчаткой, было получено 65 мг препарата IgG, очищенного от специфических антител к Dsg3 (в дальнейшем – очищенные IgG). При этом 10 мг антидесмоглеиновых IgG, связались с иммуносорбентом.

Из 65 мг препарата IgG, очищенного от антител к Dsg3, 5 мг антител были использованы для оценки эффективности иммуносорбента по степени сорбции Dsg3 из сыворотки крови больных пузырчаткой *in vitro*.

Для оценки эффективности иммуносорбента по степени сорбции антител к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови больных пузырчаткой *in vitro* определяли содержание антител к Dsg3 (оптическую плотность) в образцах препаратов IgG больных пузырчаткой до и после селективной иммуносорбции и в образцах препаратов IgG здоровых лиц методом ИФА с набором реагентов «Anti-Desmoglein 3 ELISA (IgG)» (Euroimmun AG, Германия).

Исследованы следующие образцы препаратов:

1. Препарат суммарных IgG, выделенный из пула сывороток крови больных пузырчаткой - АТ_{выд}.
2. Препарат суммарных IgG, выделенный из пула сывороток крови больных пузырчаткой, пропущенный через хроматографическую колонку с используемым иммуносорбентом, частично очищенный от антител (IgG) к десмоглеину 3 типа и не связавшийся с иммуносорбентом - АТ_{очищ}.
3. Препарат суммарных IgG, выделенный из пула сывороток крови здоровых лиц.

Препарат суммарных IgG, выделенный из пула сывороток крови больных пузырчаткой (АТ_{выд}), препарат суммарных IgG, выделенный из пула сывороток крови больных пузырчаткой, пропущенный через хроматографическую колонку с иммуносорбентом и очищенный от антител (не связавшихся с иммуносорбентом)

(АТ_{очищ}) и препарат суммарных IgG, выделенный из пула сывороток здоровых лиц, были взяты в одинаковой концентрации – 1 мг/мл, что позволило провести сравнительный анализ оптической плотности растворов, содержащих антидесмоглеиновые IgG-антитела (Таблица 32).

Таблица 32 - Оптическая плотность препаратов, содержащих суммарные IgG к десмоглеину 3 типа

Препараты, содержащие суммарные антитела - IgG	Оптическая плотность раствора (D)
Препарат суммарных IgG, выделенный из пула сывороток крови больных пузырчаткой (АТ _{выд})	0,892
Препарат суммарных IgG, выделенный из пула сывороток крови больных пузырчаткой, пропущенный через хроматографическую колонку с используемым иммуносорбентом, частично очищенный от антител к Dsg3 и не связавшийся с иммуносорбентом (АТ _{очищ})	0,339
Препарат суммарных IgG, выделенный из пула сывороток крови здоровых лиц	0,132

Как следует из таблицы 32, оптическая плотность препарата, содержащего IgG к десмоглеину 3 типа, полученного от больных пузырчаткой (0,892) была в 6,8 раза больше, чем в препаратах, полученных от здоровых лиц (0,132) (минимальная оптическая плотность, при которой результат определения антител к Dsg3 считается положительным, согласно инструкции к набору – 0,174).

После прохождения через селективный иммуносорбент оптическая плотность препарата, содержащего IgG к десмоглеину 3 типа, от больных пузырчаткой, уменьшилась до 0,339.

Изменение активности IgG-антител рассчитывали по формуле:

$$\frac{D(АТ_{выд}) - D(АТ_{очищ})}{D(АТ_{выд})} \times 100\%$$

где D(АТ_{выд}) - оптическая плотность препарата IgG, выделенного из пула сывороток крови больных пузырчаткой

$D(AT_{\text{очищ}})$ - оптическая плотность препарата IgG, пропущенного через используемый твердофазный агарозный сорбент, очищенного от антител к Dsg3, не связавшегося с иммуносорбентом.

Как следует из расчетов по формуле,

$$\frac{0,892-0,339}{0,892} \times 100\% = 62,0\%$$

изменение активности IgG в препаратах, выделенных из пула сывороток крови больных пузырчаткой до и после прохождения иммуносорбента, равно 62,0%, что свидетельствует о значительном снижении активности IgG в препаратах после прохождения сывороток через разработанный иммуносорбент.

Образец, полученный путем элюирования связавшихся с иммуносорбентом антител к десмоглеину 3 типа, был «положительным», что свидетельствовало о частичном связывании антител к Dsg3 с твердофазным агарозным сорбентом, несущим на своей поверхности матрицу Affi-Gel-15 с ковалентно связанным рекомбинантным человеческим десмоглеином 3 типа, при прохождении через него препарата суммарных IgG, полученного от больных пузырчаткой.

Таким образом, из результатов, представленных выше, следует, что предложенный селективный иммуносорбент для удаления IgG к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови больных пузырчаткой обладает способностью связывать более половины (62,0%) антител к Dsg3 из препарата IgG, полученного от больных пузырчаткой. Использование данного селективного иммуносорбента в клинической практике позволит уменьшить дозы и длительность терапии системными глюкокортикостероидными препаратами, снизить частоту развития побочных эффектов вследствие длительной иммуносупрессивной терапии.

5.2.3 Оценка *in vivo* эффективности экспериментального способа

элиминации антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой

Исследования по определению эффективности экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой с использованием селективного иммуносорбента для удаления IgG к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови больных пузырчаткой *in vivo* проводились с

использованием лабораторных животных (новорожденных мышей линии BALB/c).

Мыши были разделены на 3 группы: 1 группе - вводили по 30 мг препарата IgG, выделенного из сыворотки крови больных пузырьчаткой (не очищенного на иммуносорбенте) (основная группа); 2 группе - вводили по 30 мг препарата IgG, полученного из сыворотки крови больных пузырьчаткой и очищенных на селективном иммуносорбенте от антител к десмоглеину 3 типа; 3 группе - вводили по 30 мг препарата IgG, выделенного из сыворотки крови здоровых лиц (контрольная группа); 4 группе - фосфатно-солевой буфер. Время экспозиции от момента введения мышам препаратов антител до их эвтаназии составило 48 часов (Таблица 33).

Таблица 33 - Схема проведения экспериментов по оценке эффективности селективного иммуносорбента *in vivo*

Серия эксперимента	Доза IgG (мг)	Время экспозиции, ч	Количество мышей в эксперименте				
			IgG от больных пузырьчаткой	IgG от больных пузырьчаткой после прохождения через иммуносорбент	IgG от здоровых лиц	Фосфатно-солевой буфер	Итого
1	30	48	7	7	7	3	24
2	30	48	6	6	5	2	19

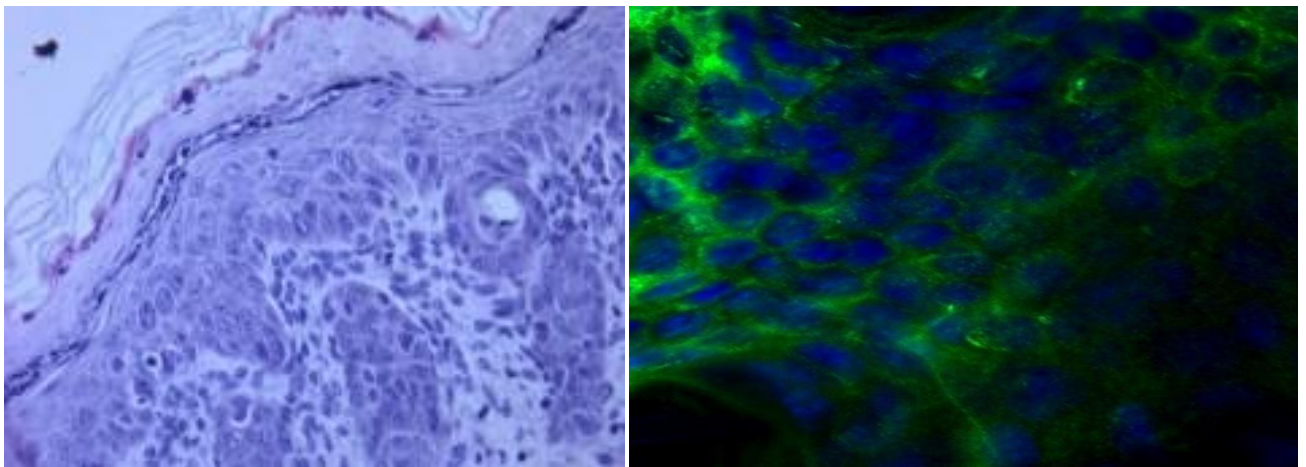
По истечении времени экспозиции производили эвтаназию мышей и получали биопсийный материал для гистологического исследования и исследования в реакции непрямой иммунофлюоресценции.

После введения IgG от больных пузырьчаткой у мышей наблюдались эрозии в абдоминальной области, по 3-х бальной шкале оцениваемые как 1+ (т.е. три или менее поражений кожи) (Рисунок 42).



Рисунок 42. Эрозии на коже мыши, которой были введены препараты IgG от больных пузырчаткой.

При патоморфологическом исследовании аутопсийного материала были выявлены признаки акантолиза; при исследовании фиксированных IgG методом нРИФ определялась фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса (Рисунок 43).



А

Б

Рисунок 43. А. Гистологическая картина биоптатов кожи мышей (субкорнеальная полость, содержащая акантолитические клетки), окр. гем. эоз, x 50, Б. нРИФ (КЛСМ). Фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса, x1000

При введении мышам препарата IgG от здоровых лиц патологических изменений при клиническом осмотре мышей, патоморфологическом исследовании и проведении нРИФ препаратов кожи мышей зафиксировано не было.

При введении препарата IgG, полученного от больных пузырчаткой и очищенных на разработанном иммуносорбенте от антител к Dsg3, у мышей не были выявлены клинические, патоморфологические и иммуногистохимические признаки пузырчатки.

Таким образом в эксперименте было установлено, что элиминация антител к Dsg3 из сыворотки крови при пропускании ее через селективный иммуносорбент для удаления IgG к десмоглеину 3 типа устраняет способность сывороток больных пузырчаткой к формированию клинических признаков пузырчатки и акантолиза *in vivo* при пассивном переносе препаратов IgG, полученных от больных пузырчаткой, лабораторным животным.

5.2.4. Оценка *in vitro* эффективности экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой

Однократная сорбция сывороток с разной активностью. При адсорбции на 20 μ l матрицы Affi-gel -Dsg3 индивидуальных образцов сыворотки крови во всех случаях отмечено уменьшение титра антидесмоглеиновых антител (Рисунок 44).

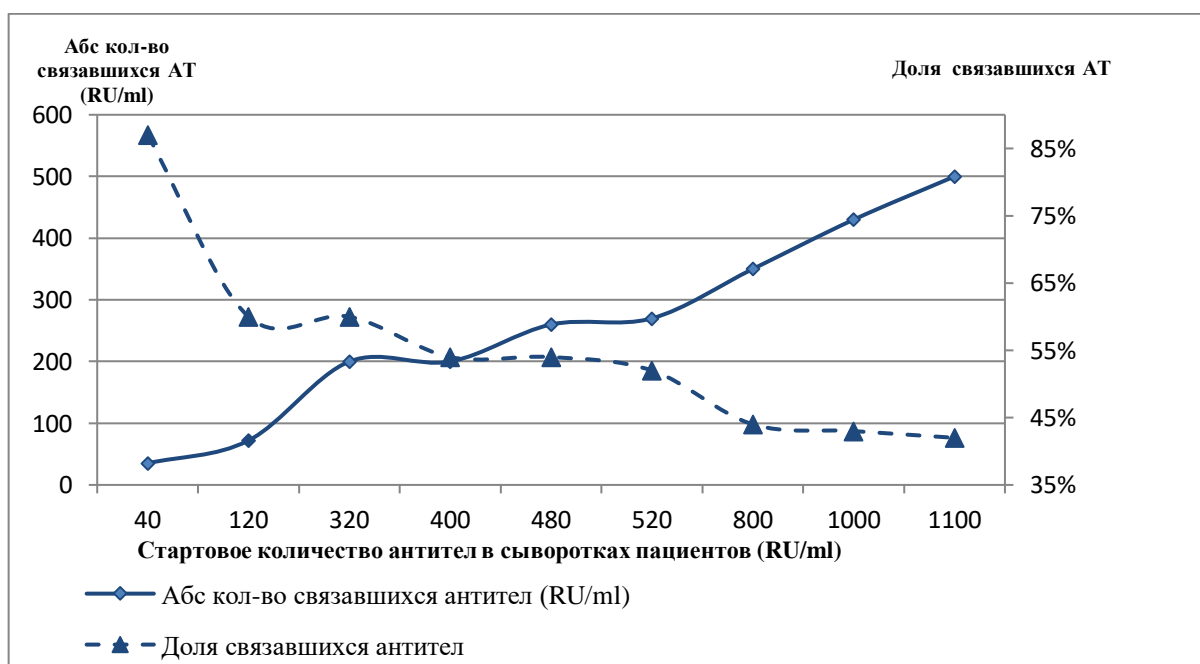


Рисунок 44. Зависимость эффективности связывания антител к Dsg3 из сыворотки больных пузырчаткой от стартового количества антител

Количество элиминированных сорбентом антител составляет 88% у сыворотки с низким стартовым титром антител (40 RU/ml) и плавно снижается с увеличением стартового титра. Из сыворотки с максимальной исходной активностью (1100 RU/ml) может быть удалено 42 % антител к Dsg3.

По мере возрастания общей антигенной нагрузки на сорбент возрастает вклад неспецифического связывания. Из сыворотки с максимальным в эксперименте стартовым количеством антител 1100 RU/ml 430 единиц активности (85%) удаляются за счёт специфического связывания и 72 единицы (15%) - за счёт неспецифического, что подтверждает высокую специфичность полученного сорбента (Рисунок 45).

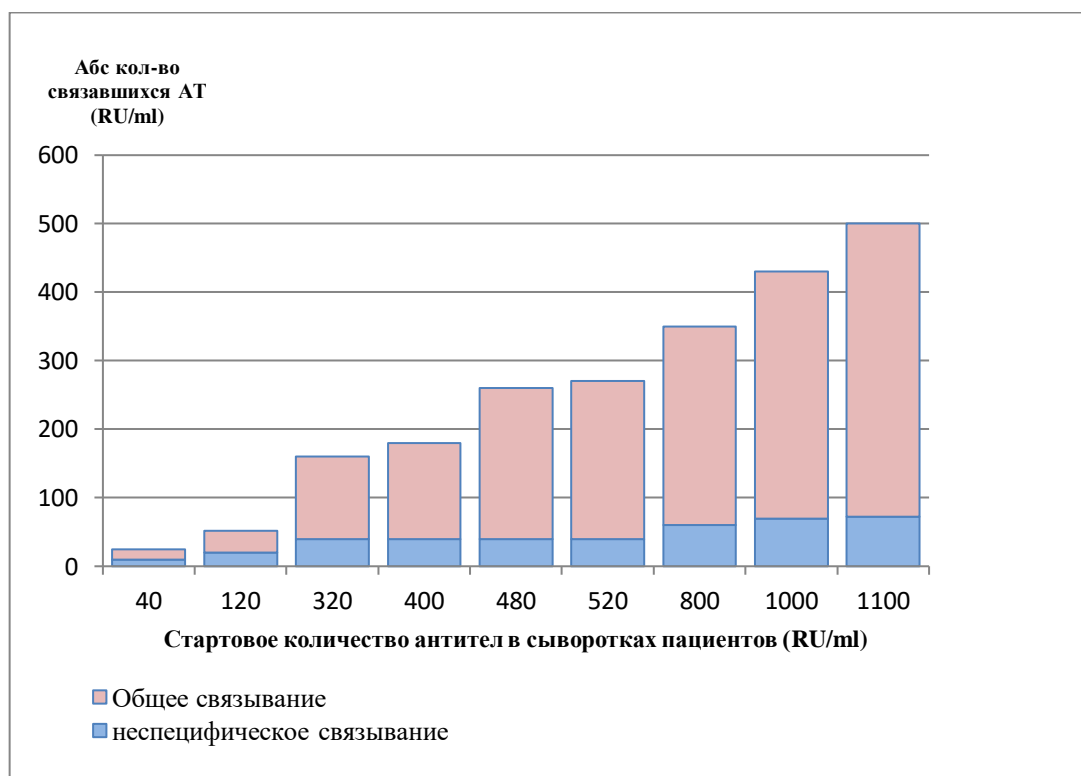


Рисунок 45. Соотношение специфического (на Affi-gel - Dsg3) и неспецифического (на матрице без Dsg3) связывания антител к Dsg3

При определении количества циклов сорбции для снижения антидесмоглеиновых антител в сыворотке крови больных пузырчаткой изучены сыворотки крови больного с уровнем антител с 450 RU/ml до 15 RU/ml (Таблица 34; Рисунок 46).

Таблица 34. Изменение активности сыворотки больного вульгарной пузырчаткой в процессе последовательной адсорбции с использованием новых порций сорбента (стартовая активность сыворотки 450 RU/ml)

	Циклы сорбции					
	До сорбции	I	II	III	IV	V
	Affi-gel 15- Dsg3					
Активность после каждого цикла сорбции (RU/ml)	450	210	70	30	20	15
Доля сорбированного IgG в каждом цикле (% от предыдущего значения)		51	67	57	33	25
	Affi-gel 15					
Активность после каждого цикла сорбции (RU/ml)	450	420	340	280	230	180
Доля сорбированного IgG в каждом цикле (% от предыдущего значения)		7	19	18	22	22

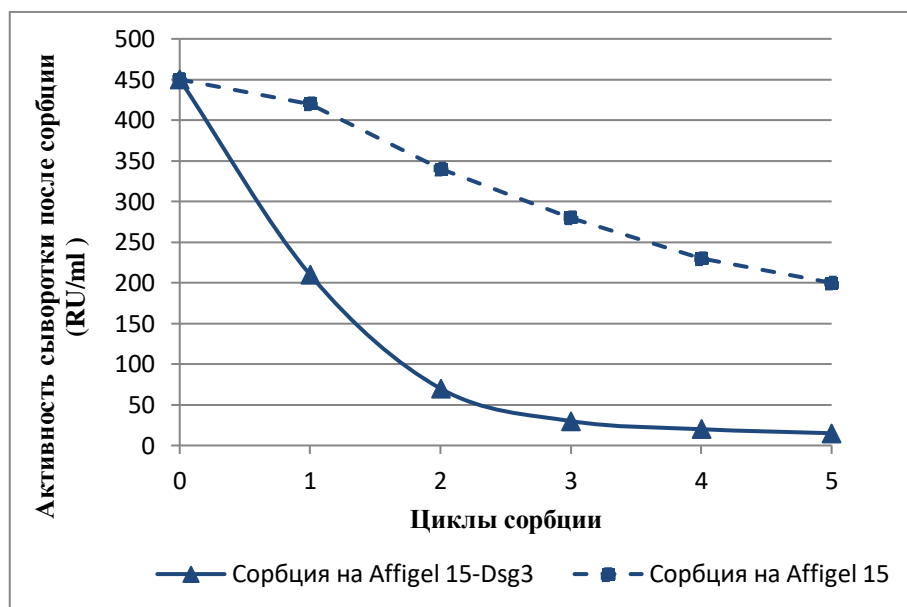


Рисунок 46. Изменение активности сыворотки больного вульгарной пузырчаткой в процессе последовательной адсорбции с использованием новых порций сорбента (стартовая активность сыворотки 450 RU/ml)

Достаточно четырёх циклов сорбции через сорбент Affi-gel 15- Dsg3, чтобы титр антидесмоглеиновых антител снизился с 450 RU/ml до значения, интерпретируемого как отрицательное (активность менее 20 RU/ml рассматривается как отрицательный результат тестирования). Важно отметить также специфичность адсорбции. При прохождении сыворотки через блокированную этаноламином матрицу Affi-gel 15 активность сыворотки после каждого цикла не изменяется более чем на 20% и после пяти циклов сорбции остаётся на достаточно высоком уровне - 200 RU/ml.

Изучение возможности регенерации сорбента. Способность к регенерации – удалению веществ, поглощённых в процессе адсорбции, с целью повторного использования сорбента, является важной характеристикой для сорбентов, используемых в клинике. Для десорбции антител применяют буферные растворы с низкими значениями pH (нами использовался 0,05М раствор глицинового буфера pH 2.5). Исследовано влияние кислотной регенерации на сорбционные свойства обоих сорбентов Affi-gel 15- Dsg3 и Affi-gel 15 в течение 12 циклов сорбции-регенерации (Таблица 35, Рисунок 47). Стартовая активность сыворотки в каждом цикле 200 RU/ml.

Таблица 35. Изменение активности сыворотки в процессе 12 циклов сорбции-регенерации через Affi-gel 15- Dsg3 и Affi-gel 15. Стартовая активность сыворотки 200 RU/ml

	Циклы сорбции											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	Affi-gel 15- Dsg3											
Активность после каждого цикла сорбции (RU/ml)	84	80	80	70	84	84	100	110	116	116	120	116
Доля сорбированного IgG (%)	58	60	60	63	58	57	50	45	42	42	40	42
	Affi-gel 15											
Активность после каждого цикла сорбции (RU/ml)	160	164	158	166	166	162	164	170	180	174	176	180
Доля сорбированного IgG (%)	20	18	21	17	17	19	18	15	10	13	12	10

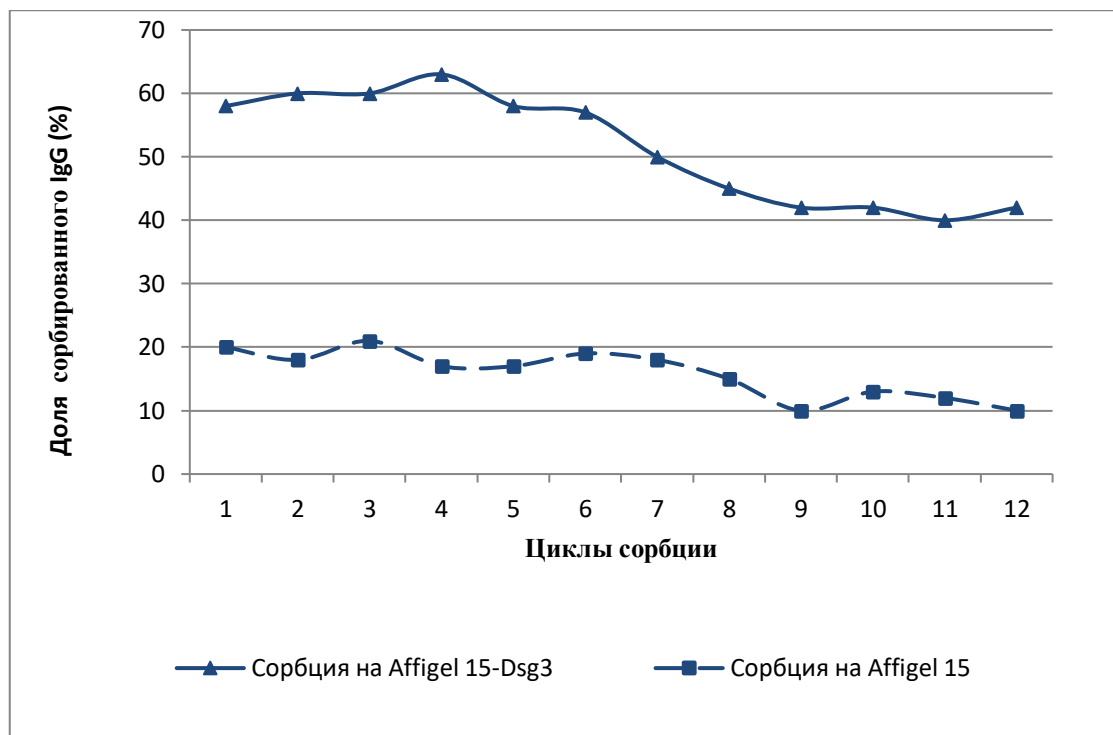


Рисунок 47. Изменение активности сыворотки в процессе 12 циклов сорбции-регенерации через Affi-gel-15-Dsg3 и Affi-gel-15. Стартовая активность сыворотки 200 RU/ml

Стабильность матрицы Affi-gel-15-Dsg3 сохраняется в процессе шести восстановительных циклов. После седьмого и восьмого циклов регенерации сорбционная способность снижается на 20% и сохраняется на этом уровне до последнего цикла. Снижение производительности сорбента может быть связано как с частичной кислотной элюцией Dsg3 с твёрдофазного носителя Affi-gel-15, так и с неполной элюцией антидесмоглеиновых антител после каждого цикла.

Истощение сыворотки на регенерируемом сорбенте. Изучена последовательная адсорбция (последовательное истощение) сыворотки больного со стартовой активностью 450 RU/ml на регенерируемом сорбенте.

При абсорбции на регенерируемой матрице Affi-gel 15- Dsg3 сыворотки со стартовым титром антидесмоглеиновых антител 450 RU/ml для достижения отрицательных значений (<10 RU/ml) необходимо 5 циклов сорбции-регенерации. Аналогично, 5 циклов сорбции необходимы для полного извлечения антидесмоглеиновых антител из того же образца сыворотки на матрице без регенерации. Полученные результаты подтверждают данные, приведенные выше, о стабильности матрицы (Таблица 36, Рисунок 48).

Таблица 36. Изменение активности препарата сыворотки больного вульгарной пузырчаткой в процессе последовательной адсорбции на регенерируемом сорбенте.

Стартовая активность сыворотки 450 RU/ml

	Циклы сорбции					
	До сорбции	I	II	III	IV	V
	Affi-gel 15- Dsg3					
Активность после каждого цикла сорбции (RU/ml)	450	197	100	45	20	<10
Доля сорбированного IgG в каждом цикле (% от предыдущего значения)		55	49	55	56	
	Affi-gel 15					
Активность после каждого цикла сорбции (RU/ml)	450	380	300	260	230	200
Доля сорбированного IgG в каждом цикле (% от предыдущего значения)		15	20	15	13	18

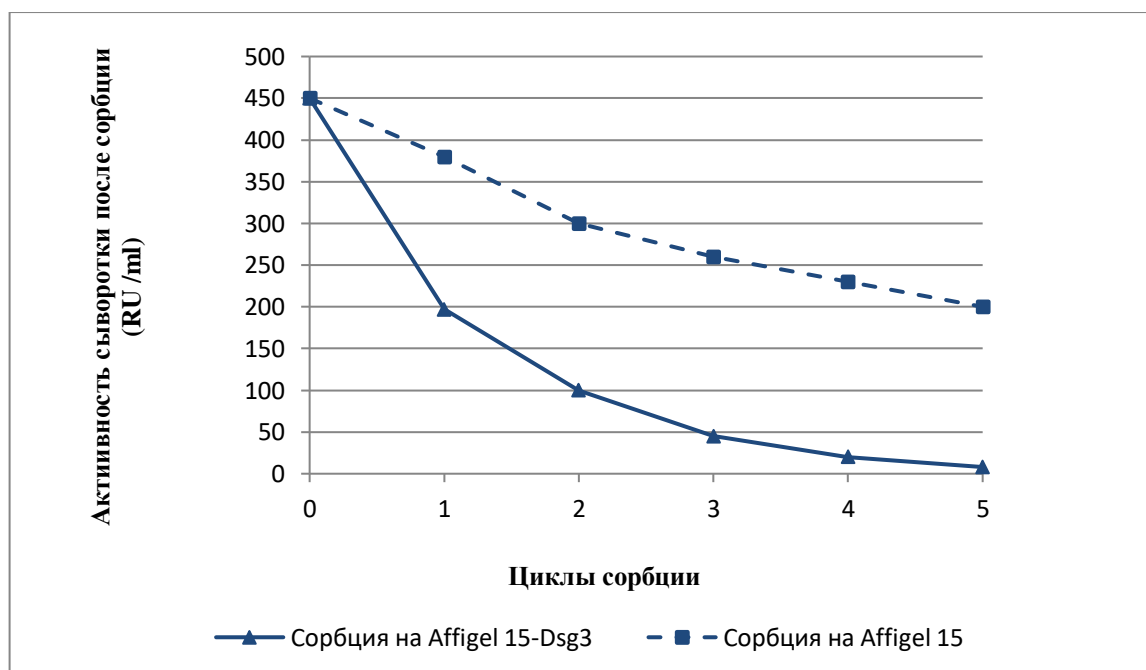


Рисунок 48. Изменение активности сыворотки больного вульгарной пузырчаткой в процессе последовательной адсорбции на регенерируемом сорбенте. Стартовая активность сыворотки 450 RU/ml

Таким образом, приведенные примеры свидетельствуют об эффективности удаления антител из сыворотки крови больных вульгарной пузырчаткой созданным твердофазным иммуносорбентом, который представляет собой крупнозернистую агарозную матрицу Affi-Gel-15 (Bio-Rad, США) с ковалентно связанным человеческим рекомбинантным Dsg3, полученным методом генной инженерии,

экспрессированного в клетках грибов Yeast («R&D Systems», США), помещенную в хроматографическую колонку. Применение разработанного иммуносорбента у больных пузырчаткой может улучшить качество проводимой терапии, позволит уменьшить дозы и длительность применения системных глюкокортикостероидных препаратов, снизить частоту развития побочных эффектов вследствие иммуносупрессивной терапии.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан экспериментальный способ элиминации антител к десмоглеину 3 типа у больных пузырчаткой, который может явиться основой для создания способа оказания терапевтической помощи больным пузырчаткой.

Способ элиминации антител к Dsg3 у больных вульгарной пузырчаткой основан на применении иммуносорбента для селективного связывания антител к Dsg3. Иммуносорбент представляет собой крупнозернистую агарозную матрицу Affi-Gel-15 (Bio-Rad, США) с ковалентно связанным человеческим рекомбинантным Dsg3, полученным методом генной инженерии, экспрессированного в клетках грибов Yeast («R&D Systems», США), помещенную в хроматографическую колонку. В связи с тем, что в качестве антигена, связывающего антитела, в иммуносорбенте применен рекомбинантный десмоглеин 3 типа человека, при его использовании из периферической крови больных вульгарной пузырчаткой будут выводиться только аутоантитела к десмоглеину 3 типа, играющие решающую роль в развитии акантолиза, а иммуноглобулины другой специфичности, отвечающие за гуморальный ответ на вирусные и бактериальные патогены, сохранятся, что будет способствовать снижению частоты развития инфекционных осложнений у больных пузырчаткой.

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показана высокая эффективность разработанного способа по элиминации антител к десмоглеину 3 у больных пузырчаткой (связывание более 50% антител к десмоглеинам 3 типа из препарата IgG, полученного от больных пузырчаткой; отсутствие клинических (наличие пузырей и/или эрозий), патоморфологических (наличие акантолиза) и иммуногистохимических признаков пузырчатки (фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса) при пассивном переносе лабораторным животным

препаратов IgG, полученных от больных пузырчаткой и очищенных от антител к Dsg3 на селективном иммуносорбенте.

Таким образом, разработанный селективный иммуносорбент, полученный за счет ковалентного связывания крупнозернистой агарозной матрицы с человеческим рекомбинантным десмоглеином 3 типа, помещенный в хроматографическую колонку, показал высокие сорбционные характеристики, оцененные *in vivo* на экспериментальной модели пузырчатки у лабораторных животных и *in vitro* методом иммуноферментного анализа. Введение суммарных IgG, полученных от больных пузырчаткой, после процедуры иммуносорбции на разработанном иммуносорбенте лабораторным животным (*in vivo*) предотвращало развитие клинических, патоморфологических и иммуногистохимических признаков пузырчатки. При применении селективного иммуносорбента активность IgG в препаратах, выделенных из пула сывороток крови больных пузырчаткой, уменьшается на 62,0% (*in vitro*), что подтверждает эффективность сорбции созданных образцов. Использование селективной иммуносорбции в клинической практике позволит снизить тяжесть заболевания, уменьшить нежелательные явления вследствие глюкокортикостероидной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пузырчатка – тяжелый аутоиммунный буллезный дерматоз кожи и/или слизистых оболочек, патогенетическую роль в развитии которого играют циркулирующие аутоантитела класса IgG, вызывающие разрушение десмосом и развитие акантолиза. Пузырчатка развивается преимущественно в молодом и трудоспособном возрасте (Торсуев Н.А. и соавт., 1979; Матушевская Е.В., Кубанова А.А. и соавт., 1995; Schiltz J.R., Grando S.A., 2012). Тяжесть заболевания, изменение внешности, ограничения в профессиональной деятельности (часто переход на инвалидность), необходимость длительного приема иммуносупрессивных препаратов значительно изменяют качество жизни больных (Пантелеева Г.А., Суздальцева И.В., 2008).

Изучение клиники, патогенеза, совершенствование диагностики и терапии пузырчатки является одной из актуальных проблем современной дерматовенерологии и основой для создания принципиально новых эффективных методов профилактики, диагностики и лечения, в том числе развития и реализации перспективного направления медицинской науки - персонализированной терапии. Несмотря на увеличение продолжительности жизни больных пузырчаткой после введения в схему лечения дерматоза глюкокортикостероидных препаратов, у пациентов наблюдается большое число осложнений вследствие длительной иммуносупрессивной терапии (Mimouni D. et al., 2010). Данное обстоятельство вызывает необходимость дальнейшего изучения иммунопатогенеза заболевания, в том числе на уровне генетического аппарата клетки, с целью выявления новых терапевтических мишеней и разработки новых методов ранней диагностики и патогенетической терапии.

Под наблюдением находилось 132 больных с пузырчаткой, составляющих основную группу (ОГ). Контрольную группу (КГ) составили 100 здоровых лиц. Для экспериментального моделирования пузырчатки были использованы *лабораторные животные* - неонатальные мыши линии BALB/c в возрасте менее 24 часов от рождения.

Материалами исследования служили биоптаты кожи и биообразцы крови, полученные от больных пузырчаткой и здоровых лиц. При проведении

экспериментов на лабораторных животных для исследования был использован аутопсийный материал - биоптаты кожи.

В процессе работы применялись следующие методы исследования: клинический (включая сбор данных анамнеза, анализ жалоб и осмотр пациентов с определением тяжести заболевания с использованием клинических индексов), цитологический, патоморфологический, нРИФ с использованием *ex vivo* КЛСМ, иммуноферментный анализ с определением антител к десмоглеинам 1 и 3 типов, метод секвенирования, метод ПЦР в реальном времени, метод аффинной хроматографии, статистические методы исследования.

Под наблюдением находилось 132 больных пузырчаткой в возрасте от 18 до 70 лет (средний возраст 46,25 лет), из них 81 (61,4%) женщина и 51 (38,6%) мужчина. Вульгарная пузырчатка диагностирована у 96 (72,2%) больных (в том числе вегетирующая - у 1 (0,8%)); листовидная – у 31 (23,5%) больных (в том числе себорейная – у 28 (21,2%)); паранеопластическая - у 3 (2,3%), герпетиформная – у 2 (1,5%).

В течение последних 20 лет учеными разных стран предложен ряд клинических индексов для оценки тяжести течения пузырчатки. Несмотря на большое количество предложенных индексов, ни один из них не является общепризнанным. Разработка и валидация индексов оценки тяжести аутоиммунных буллезных дерматозов осуществляется в рамках международного сотрудничества экспертов. Наиболее известными и удобными к применению в клинической практике в настоящее время за рубежом признаются: индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI), балльная оценка тяжести аутоиммунных буллезных заболеваний кожи (ABSIS), индекс активности вульгарной пузырчатки (PVAS). Для сравнительного изучения значимости клинических индексов PDAI, ABSIS и PVAS в оценке степени тяжести пузырчатки в Российской Федерации, в соответствии с методикой подсчета каждого из индексов, все больные основной группы были разделены на 3 подгруппы – с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести заболевания.

Индекс PDAI позволяет оценивать поражение поверхности кожи, волосистой части головы, слизистых оболочек, активность поражения кожи и

слизистых оболочек, наличие вторичных изменений и дает общий (суммарный) показатель тяжести заболевания в баллах. При оценке степени тяжести пузырчатки в соответствие с индексом PDAI 104 больных вошли в группу с легкой степенью тяжести заболевания (PDAI до 30 баллов), 18 человек - в группу с заболеванием средней степени тяжести (PDAI до 60 баллов) и 10 человек - в группу с тяжелой степенью 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 больных пузырчаткой; при этом, как при подсчете общего показателя, так и «подиндексов», между пациентами всех групп (легкой, средней и тяжелой степенью тяжести) были выявлены статистически значимые различия.

Подсчет общего индекса ABSIS (в баллах) включает поражение кожи и слизистых оболочек. При оценке поражения слизистых оболочек учитываются два параметра: распространенность поражения и тяжесть поражения, которая определяется по степени дискомфорта, боли и кровотечения при приеме больным пищи и/или жидкости. При оценке степени тяжести пузырчатки в соответствие с индексом ABSIS в группе пациентов с легкой степенью тяжести было 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 индекса ABSIS и его «подиндексов» показало, что подсчет общего индекса позволяет дифференцировать больных пузырчаткой 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.

При подсчете суммарного индекса PVAS оценивается поражение кожи и слизистых оболочек. При подсчете индекса PVAS в группе пациентов с легкой степенью тяжести оказалось 79 человек (PVAS до 4 баллов), со средней степенью

тяжести – 26 человек (PVAS до 8 баллов), с тяжелой степенью – 27 человек (PVAS выше 8 баллов).

Исследования показали, что подсчет суммарного индекса PVAS позволяет дифференцировать больных пузырчаткой по степени тяжести. В то же время, показатель не позволяет различить степень поражения слизистых оболочек у больных с легкой, средней и тяжелой степенью заболевания, что может ограничить его применение у больных с поражением слизистых оболочек.

Т.о., в результате выполнения исследований на репрезентативной российской выборке больных пузырчаткой показано, что клинические индексы PDAI, ABSIS, PVAS объективно отражают степень тяжести пузырчатки, что позволяет рекомендовать их для широкого применения в клинической практике специалистами медицинских организаций дерматовенерологического профиля Российской Федерации для объективной оценки степени тяжести состояния больных пузырчаткой и персонализации терапии пациентов. Наиболее адекватным для использования является индекс PDAI, позволяющий четко дифференцировать больных по степени тяжести заболевания.

Основными молекулярными структурами, к которым вырабатываются аутоантитела при пузырчатке, являются кадгериновые белки десмосомального аппарата - десмоглеины 1 и 3 типов.

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) ($p_{1-2} < 0,001$). В результате проведенных исследований установлено, что повышенный уровень антител к десмоглеину 3 типа более характерен для больных вульгарной пузырчаткой, в то время как высокий уровень антител к десмоглеину 1 типа более

характерен для больных листовидной пузырчаткой, что связано с экспрессией соответствующих антигенов в многослойном и однослойном плоском эпителии.

Полученные нами данные соответствуют данным современных авторов (Махнева Н.В. и соавт., 2010, Chams-Davatchi C., 2005; 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 в многослойном и однослойном плоском эпителии.

Для оценки прогностической роли определения антител к десмоглеинам в развитии различных вариантов клинического течения пузырчатки, был проанализирован уровень антител к десмоглеину 1 и 3 типов у больных с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести заболевания, определявшихся с использованием клинического индекса тяжести пузырчатки (PDAI). Наше исследование показало, что вне зависимости от клинических индексов, примененных для деления больных по степени тяжести заболевания, выявлено нарастание уровня антител как к Dsg 3, так и Dsg1 у больных пузырчаткой с увеличением тяжести заболевания. Таким образом, нами получены данные, свидетельствующие о нарастании уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных пузырчаткой с увеличением степени тяжести заболевания. Полученные данные соответствуют наблюдениям большинства исследователей (Amagai M., 1999; Kumar B. et al., 2006; Herrero-González J.E., 2010; Cozzani E., 2013), показавших похожие результаты.

Говоря о результатах изучения корреляционных взаимосвязей между уровнем антител к десмоглеинам и особенностями клинического фенотипа пузырчатки, хотелось бы подчеркнуть, что в данном вопросе нет единого мнения исследователей. Рядом авторов определена зависимость клинической формы пузырчатки от специфических антигенов, к которым образуются антитела (Kitajima Y., 2003; Capon F. U. et al., 2009 и др.).

Так, В. Kumar et al. (2006) выявили статистически достоверную взаимосвязь титра антител к Dsg3 с тяжестью поражения слизистой оболочки рта, а также взаимосвязь титра антител к Dsg1 с тяжестью поражения кожных покровов. Указанные связи были обнаружены как у больных с вульгарной пузырчаткой, так и у больных с листовидной пузырчаткой. Согласно результатам А. Belloni-Fortina et al. (2009), тяжесть поражения слизистой оболочки рта у больных пузырчаткой прямо коррелирует с титром антител и к Dsg1, и к Dsg3.

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.

В нашем исследовании была установлена достоверная 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.

В работе А. Patsatsi и соавт. (2014) при исследовании зависимости значений PDAI, ABSIS и титров антител к Dsg1 и Dsg3 у больных пузырчаткой показано, что значения индексов коррелируют с титрами антител к Dsg 1 типа у больных с поражением кожи и у больных с сочетанным поражением кожи и слизистых оболочек, однако не было выявлено их связи с уровнем антител к Dsg 3 типа у больных с изолированным поражением слизистых оболочек (Patsatsi A., Kyriakou A., Giannakou A. et al., 2014).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что уровень антител к десмоглеинам может являться объективным отражением тяжести течения заболевания и использоваться для прогноза развития варианта тяжести клинического течения пузырчатки.

При оценке степени тяжести пузырчатки в соответствие с индексом PDAI дополнительно для оценки тяжести состояния пациента может быть использовано определение уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типа методом ИФА.

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.

К настоящему времени выявлено более 40 белков, с которыми связываются аутоантитела при пузырчатке. В последние годы проводятся исследования по изучению роли в развитии акантолиза при пузырчатке не только десмоглеинов, но и других молекул адгезии, белка PERP, различных рецепторов клеточных мембран, митохондриальных белков и других молекул, входящих в состав десмосом (Grando S.A., 2009; 2012).

В 2004 году X. Wang предположил, что ведущую роль в индукции акантолиза при пузырчатке может играть апоптоз кератиноцитов, вызванный нарушением их функционирования из-за потери контакта с соседними клетками (так называемый анойкис) (Wang X., Brégégère F., 2004). Появляются новые данные (Grando S.A., 2009) подтверждающие участие апоптоза в формировании пузырей при пузырчатке, что позволило S.A.Grando сформулировать новый термин - "апоптолиз". Согласно новой гипотезе, аутоантитела активируют сигнальные пути, вызывающие акантолиз и апоптоз. Одним из белков, обладающих проапоптотической функцией, является структурный белок

десмосом PERP, который регулирует пролиферацию кератиноцитов и обеспечивает межклеточную адгезию.

Структурный белок десмосом PERP локализуется не только в многослойном эпителии, но так же встречается и в однослойном цилиндрическом, переходном эпителии, различных видах плоскоклеточной метаплазии и опухолях эпителиального происхождения. Кроме того, присутствие структурного белка десмосом PERP подтверждено в тканях сердца, плаценты, печени, поджелудочной железы и фибробластах кожи (Attardi L.D., Reczek E.E. et al., 2000; Bektas M., Rubenstein D.S., 2009; Jheon A.H., Mostowfi P. et al., 2011).

Принимая во внимание данные об активации структурного белка десмосом PERP белком p53 в процессе апоптоза и о непосредственном участии в его реализации, а также сведения о возможной активации сигнальных путей апоптоза в процессе акантолиза при пузырчатке (Bektas M., Rubenstein D.S., 2009; Grando S.A., Wystryn J., 2009), изучение экспрессии белка PERP при пузырчатке представляет особый интерес. В доступной литературе данные об экспрессии белка PERP у больных пузырчаткой отсутствуют.

В результате анализа белок кодирующей нуклеотидной последовательности гена *PERP* у больных пузырчаткой и здоровых лиц в 1-м и 2-м экзонах мутаций/полиморфизмов обнаружено не было, в третьем экзоне гена *PERP* были обнаружены два полиморфизма: rs648802 (несинонимичный) и rs648396 (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).

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

генотипов. При этом гетерозиготные генотипы C/G (полиморфизм rs648802) и T/C (полиморфизм rs648396) достоверно чаще встречались в группе больных пузырчаткой) (65,3% против 39,7%), что позволяет рассматривать их как предикторы развития заболевания. В то время как у здоровых лиц достоверно чаще встречался гомозиготный генотип G/G: 36,8% против 14,3% ($p < 0,05$). Следует заметить, нуклеотидная замена в rs648802/ rs648396 3-го экзона гена *PERP* является значимой, так как приводит к изменению аминокислотной последовательности белка *PERP* (в случае полиморфизма rs648802 происходит замена нуклеотида C (цитозина) на G (гуанин) в положении 611 нуклеотидной цепи, что приводит к замене пролина на аргинин в 143 положении белковой цепи *PERP*) и, следовательно, к изменению его структуры и, возможно, функции. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в *PERP*, участвующем в апоптотическом сигнальном пути, изменяют способность клеток к апоптозу и играют важную роль в развитии акантолиза (Reed J.C., 2010).

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

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

Количественный анализ экспрессии белка *PERP* (количество клеток на 100 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; $409,67 \pm 34,56$ ед.), так и в участках, прилегающих к пузырьному элементу (зона 2; $484,81 \pm 37,10$ ед.) и в видимо непораженной коже больных пузырчаткой (зона 3; $529,20 \pm 49,48$ 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. У больных при исследовании биоптатов кожи, полученных из участков видимо непораженной кожи, выявлено достоверное снижение экспрессии белка PERP при увеличении тяжести заболевания (у больных легкой степенью тяжести - $702,58 \pm 78,44$ ед.), средней степенью тяжести - $563,46 \pm 82,72$ ед.), тяжелой степенью тяжести - $413,66 \pm 74,42$ ед.) ($p < 0,05$). Также установлена обратная корреляционная связь между количественными показателями экспрессии белка PERP в участке видимо здоровой кожи и длительностью заболевания ($r = -0,5$; $p < 0,05$).

Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать заключение о несомненном участии белка 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.

Данные экспериментов на животных моделях, в которых показаны нарушения структуры десмосом при отсутствии белка PERP, подтверждают данное предположение. Так, при изучении кератиноцитов у нокаутных мышей, лишенных белка PERP, выявлены изменения механических и биохимических взаимодействий клеток, электрического заряда клеточной мембраны, зафиксировано «смещение» белков десмоглеина 3, плакоглобина, агрегация десмоплакина в цитоплазме, т.е. отсутствие белка PERP вызывает изменение нормального строения десмосомального комплекса, так как десмосомальные белки находятся во взаимодействии между собой (Delva E. et al., 2008).

Возможно, активация проапоптотического белка PERP в кератиноцитах приводит к индукции апоптоза и формированию пузырей. Данные предположения косвенно подтверждаются исследованиями J. Arredondo в экспериментах на культурах кератиноцитов человека: при нанесении сыворотки больных

пузырчаткой в кератиноцитах выявлена экспрессия проапоптотических белков (FASL, p53, vcl-2) и биохимические процессы, характерные для апоптоза (Arredondo J. et al., 2005). L.D. Attardi и соавт. (2000) продемонстрировали, что экспрессия гена *PERP*, кодирующего структурный белок десмосом *PERP*, регулируется супрессором опухолей p53. Несколько позже обнаружено, что ген *PERP* также регулируется геном p63, который в свою очередь является основным регулятором созревания клеток многослойного плоского эпителия. Сигнальный каскад p53 может быть индуцирован его гомологами - белками p63 и p73. В случае их суперэкспрессии, p63 и p73 связываются с p53, усиливая его способность к трансактивации специфических апоптотических мишеней, в том числе белка *PERP* (Bektas M., 2009; Jheon A.H., Mostowfi P., 2011). Однако эти данные не позволяют получить ответ на вопрос: протекает ли апоптоз параллельно или последовательно с акантолизом?

Биологическое значение полиморфизма rs648802 в гене *PERP*, приводящего к замене аминокислоты в белке *PERP*, может заключаться в том, что наличие G-аллеля в rs648802 сопровождается изменением функции белка *PERP* и активацией процессов апоптоза (Flachsbar F. et al., 2010). Полиморфизмы способны влиять на аллель-специфичность экспрессии путем постраскрипционной регуляции экспрессии гена, за счет блокирования связывания микроРНК, приводя к изменению экспрессии содержащего выявленный полиморфизм аллеля (Zhang W. et al., 2012).

На сегодняшний день изучение системы врожденного иммунитета и, в частности, группы толл-подобных рецепторов (TLR) является актуальным и одним из наиболее перспективных направлений современной иммунологии. Известно, что TLR осуществляют распознавание молекулярных паттернов, ассоциированных с различными патогенными микроорганизмами (Pathogen-Associated Molecular Patterns - PAMP), запуская, таким образом, эффекторные механизмы врожденного иммунитета (Ковальчук Л.В., Хорева М.В. и др., 2008; Drexler S.K., Foxwell B.M., 2010; Kawai T., Akira S., 2010; 2011). В настоящее время известно, что помимо бактериальных и вирусных компонентов, TLR могут распознавать и эндогенные молекулы, появляющиеся при повреждении тканей,

т.е. молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (Damage-Associated Molecular Patterns -DAMP). За счет этого происходит вовлечение системы врожденного иммунитета в асептическое воспаление, удаление некротических масс и, впоследствии, восстановление поврежденной ткани (Xiang M., Fan J., 2010; Piccininiand A.M., Midwood K.S., 2010). Однако, изменение активности TLR, в частности, чрезмерная продукция провоспалительных цитокинов, приводящая к усилению воспалительного ответа, может становиться повреждающим фактором, вовлекаясь тем самым в патогенез основного заболевания (Drexler S.K., Foxwell B.M., 2010).

Установлено участие TLR в патогенезе множества воспалительных (сепсис, менингит) и аутоиммунных заболеваний (системная красная волчанка, тромбоцитопеническая пурпура, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, офтальмопатия Грейвса) (Huiming Y. et al., 2011; Kawai T., Akira S., 2011; Netea M.G. et al., 2012). В единичных работах установлена ассоциация полиморфизма гена толл-подобного рецептора 7 типа с развитием таких аутоиммунных заболеваний как системная красная волчанка, целиакия (Tian J. et al, 2012). К настоящему времени роль толл-подобных рецепторов в патогенезе пузырчатки не изучалась, однако предполагается, что толл-подобные рецепторы, в том числе TLR7, могут принимать участие в процессах индукции аутоиммунных реакций при акантолитической пузырчатке (Bauza A. et al., 2009; Brenner S. et al., 2011).

При расчете экспрессии гена *TLR7* по отношению к нормировочному гену *β -актин* у больных пузырчаткой был выявлен статистически значимо более высокий уровень экспрессии *TLR7* по сравнению со здоровыми лицами. Экспрессия *TLR7* по отношению к гену *PANK* была также статистически значимо выше у больных пузырчаткой по сравнению со здоровыми лицами. При расчете экспрессии гена *TLR7* по отношению к нормировочному гену *β -актину* больных пузырчаткой был выявлен достоверно более высокий уровень экспрессии *TLR7*(249,95±21,89) по сравнению со здоровыми лицами 186,13±17,76 ($p<0,05$). Экспрессия *TLR7* по отношению к гену *PANK* была также статистически значимо выше у больных пузырчаткой (2,96±0,34) по сравнению со здоровыми лицами (1,61±0,23) ($p<0,05$).

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 - $249,95 \pm 21,89$ ОЕ; по отношению к нормировочному гену *PANK* - $2,96 \pm 0,34$ ОЕ), значительно превышал экспрессию данного гена у здоровых лиц (показатели, соответственно, $186,13 \pm 17,76$ ОЕ и $1,61 \pm 0,23$ ОЕ; $p < 0,05$).

Согласно результатам корреляционного анализа Спирмена в изучаемых выборках, с помощью W-теста Шапиро-Уилка, коэффициент корреляции (r_s) для показателей уровня антител к десмоглеину 1 типа и уровня экспрессии гена *TLR7/PANK* равен $0,819$ ($p = 0,0462$), что соответствует сильной выраженности силы связи. Коэффициент корреляции (r_s) для показателей уровня антител к десмоглеину 3 типа и уровня экспрессии гена *TLR7/PANK* равен $0,225$ ($p > 0,05$), что соответствует слабой выраженности силы связи.

Участие TLR в патогенезе пузырчатки подтверждается случаями обострения заболевания после приема различных лекарственных препаратов или перенесенных инфекционных заболеваний (Brenner, S., Goldberg, I., 2011; Green, N.M., Moody, K.S., 2012; Tavakolpour S., 2018). Так, компоненты лекарственных препаратов, бактерий и вирусов, распознаваемые как чужеродные частицы, могут стимулировать TLR, активируя несущие TLR клетки и провоцируя обострение заболевания. Подобная особенность течения описана при ряде дерматозов, поэтому активация сигнального каскада от TLR может носить неспецифический характер.

Каскад клеточных событий, инициируемых при стимуляции TLR, реализуется при участии следующих компонентов, составляющих единую систему: лиганды и распознающие их TLR; гены, кодирующие TLR; мРНК; адаптерные белки, осуществляющие трансдукцию сигнала; эффекторные молекулы, вырабатываемые в результате активации TLR (O'Neil L.A. et al., 2005).

М. Xiang и J. Fan (201) установили, что TLR7 после связывания с лигандом претерпевают конформационные изменения и формируют молекулярный каскад передачи сигнала к ядру клетки, включающий последовательную активацию дополнительных молекул: адапторных белков (например, MyD88), протеинкиназ

(например, IRAK-IV) и транскрипционных факторов (например, NF-κB), результатом чего является изменение экспрессии ряда генов, в том числе кодирующих провоспалительные цитокины. Это приводит к транскрипции генов молекул адгезии, провоспалительных цитокинов и молекул, инициирующих развитие адаптивного иммунного ответа (Xiang, M., Fan, J., 2010). Активация TLR NF-κB-зависимого сигнального пути является связующим звеном между врожденной и адаптивной иммунной системой. Стимуляция синтеза и секреции провоспалительных цитокинов (IL 1, 2, 6, 8, 12, TNF-α, интерферона (IFN)-γ, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора) приводит к развитию воспалительной реакции (Ковальчук Л.В. и др., 2008; Miller L.S., 2008; Cario E., 2010; Netea M.G. et al., 2012).

Таким образом, высокие концентрации TLR7 в эпителиоцитах могут приводить к нарушению эффективной работы иммунной системы, так как усиливают синтез провоспалительных цитокинов, что приводит к увеличению выработки аутоантител и активации процессов акантолиза.

Полученные результаты могут свидетельствовать о повышении транскрипционной активности генома больных пузырчаткой и активации сигнальных путей *TLR7* в клетках, являются дополнением существующих представлений о механизмах развития пузырчатки и могут быть использованы для разработки новых методов терапии, а также диагностики пузырчатки.

В изучении патогенеза заболеваний, разработки новых методов терапии значительный вклад вносят исследования, основанные на экспериментальном моделировании. Одной из задач настоящего исследования было создание экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных с последующей оценкой *in vivo* эффективности созданного образца иммуносорбента. Для динамического наблюдения долговременных эффектов действия антител или оценки эффективности различных терапевтических методов более подходящими считаются новорожденные животные (Schneider M.R., Schmidt-Ullrich R. et al., 2009). Принимая во внимание схожий характер распределения десмоглеинов, являющихся основными антигенами при пузырчатке у неонатальных мышей и человека (Wu I.C. et al., 2000), для

проведения экспериментов по созданию модели пузырчатки на лабораторных животных *in vivo*, были выбраны неонатальные мыши - самцы инбредной линии BALB/c.

На первом этапе проведения экспериментальных работ были получены препараты суммарных IgG: из сывороток крови больных пузырчаткой, часть которого была пропущена через созданный иммуносорбент, и здоровых лиц методом аффинной хроматографии.

Для разработки экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных были стандартизованы условия воспроизведения клинкоморфологических процессов, характерных для пузырчатки. Экспериментальным животным основной группы вводились препараты суммарных IgG, полученные от больных пузырчаткой, содержащие антитела к Dsg3; экспериментальным животным контрольной группы вводились препараты IgG, полученные от здоровых лиц по следующим схемам: однократно в дозах 10, 15, 20, 30 мг/мышь, экспозиция 24, 48 часов; двукратно в дозе по 10, 15 мг/мышь с промежутком между введениями - 24 часа, двукратно в дозе 15 мг/мышь с промежутком между введениями - 24 часа, экспозиция 36 часов. Также в каждом эксперименте 2 мышам вводился фосфатно-солевой буфер. После этого в различные сроки производились: осмотр кожных покровов животных и исследования аутопсийного материала (биоптатов кожи) методами патоморфологического исследования и нРИФ. В ходе проведения экспериментов 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, которым вводили препараты Ig 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 из 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 была обнаружена фиксация человеческих IgG в межклеточных промежутках эпидермиса у всех мышей, которым был введен препарат 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, в результате проведенных экспериментов была впервые в РФ создана экспериментальная модель пузырчатки, полученная путем внутрибрюшинного введения экспериментальным животным (неонатальным мышам инбредной линии BALB/c препаратов IgG, полученных от больных пузырчаткой). Создание модели подтверждено развитием у лабораторных животных клинических, патоморфологических и иммуногистохимических признаков пузырчатки. Созданная модель может быть использована в научных исследованиях, проводимых с целью изучения патогенеза пузырчатки и разработки новых методов терапевтического воздействия и оценки их эффективности.

Внедрение системных глюкокортикостероидных препаратов в терапию пузырчатки позволило снизить показатели смертности с 90 до 10% (Глухенький Б.Т., Грандо С.А., 1990). Однако у ряда больных отмечается резистентность к ГКС терапии, а длительный прием иммуносупрессивных препаратов сопряжен с развитием тяжелых осложнений (Теплюк Н.П. и соавт., 2005, 2006; Самцов А.В., Белоусова И.Э., 2012; Mimouni D. et al., 2010 Ahmed A.R. et al., 2011). В последние десятилетия для лечения пузырчатки используются заместительные экстракорпоральные методы терапии (гемосорбция, плазмаферез, иммуносорбция), которые назначаются при стероидорезистентных формах

пузырчатки, а так же при тяжелых формах, для более быстрого снижения больших доз ГКС препаратов (Кильдюшевский А.В. и соавт., 2008; Meyersburg D. et al., Kasperkiewicz M., 2012; Behzad M. et al., 2012).

Наиболее эффективными и безопасными методами адьювантной терапии при пузырчатке является экстракорпоральный метод терапии с использованием специфических иммуносорбентов. Известны способ получения триптофансодержащих сорбентов (Lüftl M. et al 2003), иммуноадсорбента с использованием стафилококкового протеина А (protein A affinity resin), представляющего собой рекомбинантный белок А *Staphylococcus aureus*, иммобилизованный на CNBr-активированной сефарозе FF (GEHealthcare) (Samuelsson G., 2001). Однако после проведения иммуноадсорбции с использованием данных сорбентов у больных пузырчаткой риск развития инфекционных заболеваний остается высоким, так как наряду с патогенетически значимыми аутоантителам IgG при пузырчатке во время процедуры выводятся иммуноглобулины всех подклассов (IgA, IgM, IgE), циркулирующие иммунные комплексы, иммунные комплексы другой специфичности (Samuelsson G., 2001; Schmidt E. et al., 2003). Сорбенты с высокой степенью селективности для удаления антител - IgG, строго специфичных именно к Dsg3, из доступных источников научной и научно-технической информации не известны.

В результате проведенных исследований разработаны образцы иммуносорбентов для селективного связывания антител к Dsg3 из крови больных пузырчаткой. Иммуносорбент представляет собой крупнозернистую агарозную матрицу Affi-Gel-15 (Bio-Rad, США) с ковалентно связанным человеческим рекомбинантным Dsg3, полученным методом генной инженерии, экспрессированного в клетках грибов Yeast («R&D Systems», США), помещенную в хроматографическую колонку. Полученные образцы селективного иммуносорбента использованы для проведения экспериментов по оценке эффективности сорбции аутоантител к Dsg3 из образцов, полученных от больных вульгарной пузырчаткой, *in vitro* и на экспериментальных моделях животных *in vivo*.

В экспериментах *in vitro* показана высокая эффективность разработанного способа, который обеспечивает связывание более 60% антител к Dsg3 из препарата IgG, полученного от больных пузырчаткой. В экспериментах *in vivo* выявлено отсутствие клинических (наличие пузырей и/или эрозий), патоморфологических (наличие акантолиза) и иммуногистохимических признаков пузырчатки (фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса) при пассивном переносе лабораторным животным препаратов IgG, полученных от больных пузырчаткой и очищенных от антител к Dsg3 на селективном иммуносорбенте. Такие же результаты были получены при введении лабораторным животным препаратов IgG, полученных от здоровых лиц,

Таким образом, основанный на применении селективного иммуносорбента способ элиминации антител к десмоглеину 3 типа у больных пузырчаткой является эффективным и высокотехнологичным. Использование способа в клинической практике позволит снизить тяжесть заболевания и добиться ремиссии у больных пузырчаткой.

В заключении хочется отметить, что полученные данные позволили предложить новые клинико-диагностические подходы к оценке степени тяжести пузырчатки, выявить ряд новых механизмов развития иммунопатологических реакций при пузырчатке, послужили основой для внедрения в практику новых подходов к диагностике и патогенетической терапии пузырчатки, а так же научно-обоснованных прогностических критериев течения аутоиммунного буллезного дерматоза.

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 ($309,67 \pm 34,56$ ед.), в участках кожи, прилегающих к пузырьным элементам ($384,81 \pm 37,10$ ед.) и видимо непораженной коже ($429,20 \pm 49,48$ ед.) у больных пузырчаткой значительно снижена в сравнении со здоровыми лицами ($824,60 \pm 35,24$ 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 ($249,95 \pm 21,89$ ОЕ) и *PANK* ($2,96 \pm 0,34$ ОЕ) статистически значимо превышал экспрессию гена по сравнению со здоровыми лицами (показатели соответственно $186,13 \pm 17,76$ ОЕ и $1,61 \pm 0,23$ 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 СОКРАЩЕНИЙ

ГКС глюкокортикостероидные препараты

ИФА иммуноферментный анализ

КГ контрольная группа

КЛСМ конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

нРИФ реакция непрямой иммунофлюоресценции

ОГ основная группа

ОТ-ПЦР (reverse transcription polymerase chain reaction - RT-PCR) полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПААГ полиакриламидный гель

пРИФ реакция прямой иммунофлюоресценции

ПРР паттерн-распознающие рецепторы

ПЦР полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ (Real-Time PCR) ПЦР в режиме «реального времени»

РАМП патоген-ассоциированные молекулярные структуры

РИФ реакция иммунофлюоресценции

РСК реакция связывания комплемента

ФБ фосфатный буфер

ФИПС Федеральный институт промышленной собственности

ФСБ фосфатно-солевой буфер

ABSIS (Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score) оценка тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи

DAMP (danger associated molecular patterns) молекулярные структуры собственного организма, ассоциированные с опасностью

DIDS (Dermatology Index of Disease Severity) Дерматологический индекс тяжести заболевания

Dsg демоглеин

Dsg1 демоглеин 1 типа

Dsg3 демоглеин 3 типа

EADV (European Academy of Dermatology and Venerology) Европейская академия дерматологии и венерологии

Ig иммуноглобулин

IgA иммуноглобулин А класса

IgM иммуноглобулин М класса

IgG иммуноглобулин G класса

IL интерлейкин

kD килодальтоны

MyD88 миелоидный фактор дифференцировки

OR (Odds Ratio) отношение шансов

PAMS (paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome) паранеопластический аутоиммунный полиорганный синдром

PBS (ФБ) phosphate-buffered saline (фосфатный буфер)

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

PVAS (Pemphigus Vulgaris Activity Score) индекс активности вульгарной пузырчатки

PRRs (pattern recognition receptors) паттерн-распознающие рецепторы

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)

Th Т-хелперные клетки

TLR (toll-like receptor) толл-подобный рецептор

BALB/c (Bagg albino C) инбредная линия белых мышей

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаскевич В.П. Количественная оценка степени тяжести дерматозов // Дерматология. – 2014. – № 2. – С. 24–31.
2. Акимов В.Г., Суколин Г.И., Трофимова И.Б., Хамаганова И.В. Буллезные дерматозы и болезни соединительной ткани: от традиционных подходов цинкви к современной диагностике и терапии // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2017. – Т. 20. № 2. – С. 77–78.
3. Баткаев Э.А., Галлямова Ю.А., Тогоева Л.Т., Дронова В.А. Анализ ошибок в диагностике вульгарной пузырчатки // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2006. – № 3. – С. 59–62.
4. Бровман Г.В., Петровская Л.Е., Ягудин Т.А. и соавт. Получение рекомбинантного каркасного белка для связывания патогенных аутоантител при вульгарной пузырчатке // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т.8(17), № 3. – С. 515–517.
5. Буллезные дерматозы (вопросы клинико–морфологической диагностики и морфогенеза по данным электронной и атомно–силовой микроскопии) / Под ред. В.И. Прохоренкова, А.А. Гайдаша, Л.Н. Синицы. – Красноярск: ООО ИПЦ «КАСС», 2008. – 188с.
6. Гайнулин Ш.М., Гребенюк В.Н., Резникова М.М., Цацаниди М.А. Вульгарная пузырчатка (клиническое наблюдение атипичного случая) // Клиническая дерматология и венерология. 2011. – № 2. – С. 40–44.
7. Галлямова Ю.А. Заболевания кожи и волос (актуальные вопросы) / Москва, 2012. – 352 с., ил.
8. Галлямова Ю.А., Некрасова–Штайн Л.В., Сюч Н.И. Вульгарная пузырчатка. – М.: Полиграф сервис, 2006. – 80 с.
9. Ганковская О.А., Зверев В.В. Взаимодействие вирусов и Toll–подобных рецепторов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 2. – С.101–115.
10. Глухенький Б.Т, Грандо С.А. Иммунозависимые дерматозы: экзема, атопический дерматит, истинная пузырчатка, пемфигоиды / Киев: Здоровье. – 1990. – 478с.
11. Грандо С.А., Глухенький Б.Т., Романенко А.Б. и соавт. Механизмы терапевтического действия экстракорпоральной детоксикации при аутоиммунных буллезных дерматозах // Вестник дерматологии и венерологии. – 1988. – № 7. – С. 6–11.

12. Гребенников В.А., Белявский А.Д., Каминский М.Ю. Изучение иммунокорректирующего и детоксицирующего воздействия гемосорбции, плазмафереза и энтеросорбции при пузырчатке // Вестник дерматологии. – 1990. – № 5. – С. 33–38.
13. Давиденко Е.Б. Прогнозирование характера течения аутоиммунной пузырчатки с применением клинических и иммуногистохимических методов исследования и лечение: Автор. дисс... канд. мед. наук: 14.01.10 / ФГБУ ГНЦДК МЗ РФ. Москва, 2013. – 23с.
14. Давиденко Е.Б., Махнева Н.В. Триггерные факторы и аутоиммунная пузырчатка // Клиническая дерматология и венерология. – 2012. – № 6. – С. 16–22.
15. Давиденко Е.Б., Махнева Н.В., Белецкая Л.В. Современный взгляд на патогенез и факторы, способствующие развитию аутоиммунной пузырчатки // Клиническая дерматология и венерология. – 2013. – № 3. – С. 4–12.
16. Дерматология Фицпатрика в клинической практике: в 3т // К. Вольф, Л. Голдсмит, С. Кац и др.; пер. с англ.; общ. ред. акад. А.А. Кубановой. – М.: Издательство Панфилова: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – Т.1. – 868с.
17. Дзущева И.Р. Диагностикум на основе рекомбинантного десмоглеина 2 человека для выявления циркулирующих аутоантител при вульгарной пузырчатке: Автор. ... канд. мед. наук: 14.00.11 / Москва, 2005. – 25с.
18. Дифференциальная диагностика кожных болезней: руководство для врачей / ред.: Б.А. Беренбейн, А.А. Студницин. – 2-е изд., переработ и доп. – М.: Медицина, 1989. – 671с.
19. Довганич А.А., Насонов А.В., Крылов А.С., Махнева Н.В. Метод анализа изображений образцов ткани кожи при иммунофлюоресцентной диагностике аутоиммунной пузырчатки // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2016. – Т. 19, № 2. – С. 87.
20. Духанин А.С., Теплюк Н.П., Лепехова А.А. Персонализированный подход в лечении стероидорезистентных форм истинной акантолитической пузырчатки // Здоровье, демография, экология финно-угорских народов. – 2016. – № 4. – С. 24–26.
21. Драгун Г.В., Сохар С.А., Абдель М.В. Акантолитическая вульгарная пузырчатка, вегетирующая форма Аллопо // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2013. – Т. 12, № 3 – С. 131–136.
22. Дрождина М.Б., Кошкин С.В. Современный взгляд на клинику, диагностику и лечение вульгарной пузырчатки. Презентация случаев // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – №3. – 2017. – С. 68–74.

23. Завадский В.Н. К вопросу диагностики и лечения себорейной пузырчатки // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2013. – № 1. – С. 18–21.
24. Знаменская Л.Ф., Шарапова К.Г. Себорейная (эритематозная) пузырчатка, ошибки в диагностике // Вестник дерматологии и венерологии. – 2008. – № 4. – С. 73–75.
25. Знаменская Л.Ф., Бутарева М.М., Капшусева И.А., Прокофьева Я.А., Нефедова М.А. Сложности диагностики и лечения буллезных дерматозов // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2017. – Т. 20, № 2. – С. 91.
26. Карачева Ю.В. Особенности морфогенеза и клинико–морфологической диагностики буллезных дерматозов с учетом ультраструктурных изменений эпидермиса и коллаген–протеогликанового комплекса дермы // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Новосибирский государственный медицинский университет. Новосибирск, 2012. – 35с.
27. Карачева Ю.В., Гайдаш А.А., Прохоренков В.И. Изучение взаимосвязи акантолиза и апоптоза в патогенезе вульгарной пузырчатки // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. – № 2. – С. 31–37.
28. Карачева Ю.В., Наумова А.С., Савченко А.А., Борисов А.Г., Камзалакова Н.И., Максименко В.Г. Изучение дендритных клеток крови у больных вульгарной пузырчаткой // Сибирское медицинское обозрение. – 2015. – № 6 (96). – С. 59–62.
- 29.
30. Карачёва Ю.В., Прохоренков В.И., Гайдаш А.А. Ультраструктурные изменения кожи при буллезных дерматозах // Сибирское медицинское обозрение. – 2010. – № 2 (62). – С. 40–45.
31. Катунина О.Р. Функции Toll–подобных рецепторов как компонента врожденного иммунитета и их участие в патогенезе дерматозов различной этиологии // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. – № 2. – С. 18–24.
32. Кильдюшевский А.В., Молочков В.А., Карзанов О.В. Фотофорез – новый метод лечения вульгарной пузырчатки // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т.1, № 1. – С. 42–46.
33. Кильдюшевский А.В., Молочков В.А., Карзанов О.В. Динамика клеточного иммунитета в процессе экстракорпоральной фотохимиотерапии у больных истинной пузырчаткой // Росс. журн. кож. и вен. бол. – 2008. – № 4. – С. 71–76.

34. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С. и др. Рецепторы врожденного иммунитета: подходы к количественной и функциональной оценке Toll-подобных рецепторов человека // Иммунология. – 2008. – Т. 29, № 4. – С. 223–227.
35. Колос Ю.В., Лукьянов А.М. Буллезные дерматозы: диагностическое значение определения аутоантител методом иммуноферментного анализа // Здоровоохранение (Минск). – 2014. – №3. – С. 55– 61.
36. Колос Ю.В., Лукьянов А.М. Использование клинических индексов для оценки степени тяжести течения пузырчатки // Медицинская панорама рецензируемый научно-практический журнал для врачей. – 2013. – № 1. – Р. 69–74.
37. Кубанова А.А., Акимов В.Г. Дифференциальная диагностика и лечение кожных болезней – М: Миа, 2009. – 304 с.
38. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Богданова Е.В. Дерматовенерология в Российской Федерации. Итоги 2014 г. Успехи, достижения. Основные пути развития // Вестник дерматологии и венерологии. – 2015. – № 4. – С. 13–26.
39. Кубанова А.А., Мелехина Л.Е., Кубанов А.А., Богданова Е.В. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля в Российской Федерации в 2013 году // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. – № 3. – С. 16–36.
40. Кубанова А.А., Самсонов В.А., Знаменская Л.Ф. и др Солкосерил дентальная адгезивная паста в лечении больных истинной пузырчаткой с поражением слизистой оболочки полости рта // Вестник дерматологии и венерологии. – 1999. – № 2. – С. 46–47.
41. Куклин И.А., Кохан М.М., Задаскевич Ю.М., Куклина М.К., Шакирова А.Н. Патогенетические аспекты обоснования цитостатической терапии больных вульгарной пузырчаткой (клиническое наблюдение) // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. – 2013. – Т.8, № 5(28). – С. 43– 51.
42. Лукьянов А.М., Колос Ю.В., Малютин В.А., Левченя М.В. Дифференциальная диагностика пузырных дерматозов // Здоровоохранение. –2011. – № 8. – Р. 29–38.
43. Лысенко А.А., Коцарева О.Д., Мушенкова Н.В. и др. Создание модели пузырчатки на мышцах // Медицинская иммунология. – 2004. – Vol. 6, № 3–5. – Р. 238.
44. Матушевская Е.В. Иммунохимический анализ антигенов эпидермиса и дермы в дифференциальной диагностике и оценке эффективности лечения больных

истинной акантолитической пузырьчаткой: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – 1996. – 32 с.

45. Матушевская Е.В., Кубанова А.А., Самсонов В.А. и др. Аутоантитела и аутоантигены при пузырьчатке и пемфигоиде // Вестник дерматологии и венерологии. – 1995. – № 5. – С. 28–33.

46. Матушевская Е.В., Свирцевская Е.В., Дзущева И.Р., Тогоева Л.Т., Лапшина Т.П. Изменение уровня антител к десмоглеину-3 в сыворотках крови больных пузырьчаткой до и после лечения // Вестник дерматологии и венерологии. – 2005. – № 6. – С. 12–16.

47. Матушевская Е.В., Свирцевская Е.В., Кубанова А.А. Изучение фенотипа и функции Т-клеток больных вульгарной пузырьчаткой при лечении сандиммуном (циклоспорином А) и глюкокортикостероидами // Вестник дерматологии и венерологии. – 1995. – № 6. – С. 6–11.

48. Махнева Н.В. Симптом Никольского в клинике аутоиммунных дерматозов // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2008. – №5. – С. 26–29.

49. Махнева Н.В. Современный взгляд на диагностику и лечение аутоиммунных буллезных дерматозов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований – 2011. – № 9. – С. 15–17.

50. Махнева Н.В., Белецкая Л.В. Экспрессия ранних компонентов комплемента в структурах эпидермиса при иммунопатологических заболеваниях кожи // Вестник дерматологии и венерологии. – 2008. – № 2. – С. 52–63.

51. Махнева Н.В., Белецкая Л.В. Молекулярно-биологическая характеристика десмосом как системы межклеточного соединения // Вестник дерматологии и венерологии. – 2009. – № 2. – С. 25–38.

52. Махнева Н.В., Белецкая Л.В. Иммунофлюоресценция в клинике аутоиммунных буллезных дерматозов: Пособие для врачей. – М.: Академия Естествознания, 2010. – 44 с.

53. Махнева Н.В., Белецкая Л.В., Лезвинская Е.М. Акантолитическая пузырьчатка – ложносеронегативный случай // Вестник дерматологии и венерологии. – 2002. – № 3. – С. 50–52.

54. Махнева Н.В., Бутов Ю.С., Васенова В.Ю. Иммуноморфологические и клинические аспекты патогенеза аутоиммунной пузырьчатки // Клиническая дерматология и венерология. – Т. 17, №3. – 2018. – С. 5–11.

55. Махнева Н.В., Давиденко Е.Б., Белецкая Л.В. О проблемах диагностики и дифференциальной диагностики аутоиммунной пузырьчатки // Альманах клинической медицины. – 2014 – № 34. – С. 9–14.

56. Махнева Н.В., Давиденко Е.Б., Зайденов В.А., Белецкая Л.В. Участие иммуноглобулина G и его субклассов в развитии и течении аутоиммунной пузырчатки // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 11. – С. 79–83.
57. Махнева Н.В., Молочков В.А., Белецкая Л.В. Медикаментозная пузырчатка // *Российский журнал кожных и венерических болезней*. – 2004. – № 3. – С. 14–18.
58. Машкиллейсон А.Л., Антонова Т.Н., Глебова Л.И. и др. Комбинированная терапия пемфигуса кортикостероидами и метотрексатом // *Вестник дерматологии*. – 1977. – № 3. – С. 60–63.
59. Меджито Р. Врождённый иммунитет // *Казанский мед. журн.* – 2004. – № 3. – С. 161–169.
60. Михеев Г.Н., Соколовский Е.В., Денисова Т.В. Длительная полная ремиссия вульгарной пузырчатки после отмены поддерживающей терапии преднизолоном // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2014. – № 4. – С. 54–57.
61. Миченко А.В., Знаменская Л.Ф., Львов А.Н. и соавт. Методы выявления терапевтических мишеней при истинной акантолитической пузырчатке // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2012. – № 5. – С. 38–43.
62. Миченко А.В., Знаменская Л.Ф., Львов А.Н. и соавт. Патогенез вульгарной пузырчатки: проблемы и перспективы // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2012. – № 3. – С. 40–47.
63. Музыченко А.П., Качук М.В., Сикорская Т.А., Касенок А.С., Страпко Е.В. Клинический случай ювенильной вульгарной пузырчатки // *Медицинский журнал*. – №3 (61). – 2017 – С. 156–160.
64. Насонов Е.Л. Перспективы применения ритуксимаба при аутоиммунных заболеваниях человека // *Российский медицинский журнал*. – 2007. – Т.15, № 26. – С. 1958–1963.
65. Олисова О.Ю. Циклоспорин в дерматологической практике // *Фарматека*. – 2008. – № 19. – С. 74–79.
66. Олисова О.Ю., Шимановский Н.Л., Духанин А.С. и соавт. Разработка схемы лечения больных аутоиммунной пузырчаткой азатиоприном при стероидной резистентности на основании исследования ее молекулярных механизмов на пострецепторном уровне // *Альманах клинической медицины*. – 2016. – Т. 44, № 1. – С. 6–12.
67. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука. – 1981. – 288с.

68. Пантелеева Г.А., Суздальцева И.В. Тактика лечения и реабилитации больных истинной акантолитической пузырьчаткой // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2008. – № 2. – С. 27–30.
69. Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Разживина Н.В. Пузырчатка слизистой оболочки рта // Клиническая стоматология. – 2006. – № 1. – С. 34–39.
70. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и болезнями кожи (Статистические материалы). – М., 2012–2014. – 220 с.
71. Решетникова Т.Б., Ефремов А.В. Комплексная терапия акантолитической пузырьчатки // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2005. – № 5. – С. 28–31.
72. Решетникова Т.Б. Лыкова С.Г., Спицына А.В., Макарова Я.Ю. Влияние гормональной терапии на состояние иммунной системы, частоту и характер осложнений у больных истинной акантолитической пузырьчаткой в зависимости от исходного состояния Т-хелперов // Сибирский медицинский журнал. – 2004. – № 4. – С. 13–17.
73. Рукко В., Бренер С., Рукко Е. Пузырчатка вульгарная. Европейское руководство по лечению дерматологических болезней. Под ред. А.Д. Кацамба, Т.М. Лотти. М: МЕД–пресс–информ., 2009. – 736с.
74. Самцов А.В., Белоусова И.Э. Паранеопластическая пузырьчатка, индуцированная саркомой из фолликулярных дендритических клеток, возникшей на фоне опухоли Кастанеллы // Вестник дерматологии и венерологии. – 2004. – № 1. – С. 37–39.
75. Самцов А.В., Белоусова И.Э. Буллезные дерматозы: Монография. – СПб.: ООО «Издательско–полиграфическая компания «Коста», 2012. – 144с.
76. Свирщевская Е.В., Лысенко А.А., Коцарева О.Д., Матушевская Е.В. Роль эндотелиальных клеток в патогенезе пузырьчатки: экспериментальная модель // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. – 2006. – Т. 1. – С. 10–17.
77. Свирщевская Е.В., Лысенко А.А., Матушевская Е.В. и др. Аутоиммунная пузырьчатка: идентификация патогенных эпитопов десмоглеина 3 // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. – 2009. – Т. 3, № 3. – С. 5–13.

78. Сердюкова Е.А., Родин А.Ю., Еремина Г.В. Ошибки в диагностике акантолитической пузырьчатки // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015. – Т. 18, № 4. – С. 41–44.
79. Снарская Е. С., Кряжева С. С., Лавров А.А. Роль толл-подобных рецепторов (TLR) активаторов врожденного иммунитета в патогенезе ряда дерматозов // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2012. – № 2. – С. 9–12.
80. Соколовский Е.В. Пузырные дерматозы. Псориаз. Современные методы лечения. Серия «Библиотека врача-дерматовенеролога». Выпуск 3. – СПб: СОТИС, 1999. – 134с.
81. Таций О.А., Мельникова В.И., Крюкова Е.В., Матушевская Е.В.и соавт. Есть ли аутоантитела к ацетилхолиновым рецепторам при вульгарной пузырьчатке? // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. – 2010. – Т. 5, № 5. – С. 10–20.
82. Теплюк Н.П. Истинная пузырьчатка и буллезный пемфигоид как паранеопластические процессы // Альманах клинической медицины. – 2006. – № 9. – С. 134–136.
83. Теплюк Н.П. Совершенствование глюкокортикоидной терапии истинной акантолитической пузырьчатки с учетом оценки функционального состояния гипофиз–надпочечники и цитокинового профиля // Автореф. дисс. ... докт. мед. наук: 14.00.11 / ГОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, – Москва, 2011. – 40с.
84. Теплюк Н.П., Дороженко И.Ю., Катранова Д.Г. Истинная акантолитическая пузырьчатка и коморбидные психосоматические расстройства: клиническая типология // Российский журнал кожных и венерических болезней. – Т. 20, №4. – 2017. – С. 200–205.
85. Теплюк Н.П., Духанина А., Потекаев Н.Н и др. Возможные причины стероидной резистентности при истинной акантолитической пузырьчатке и пути ее преодоления // Врач. – 2013. – № 2. – С. 68–74.
86. Теплюк Н.П., Кузьмина Т.С., Куприянова А.Г., Дулькин И.С., Давыдовская Н.И. Случай стероидорезистентной пузырьчатки с летальным исходом // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2006. – № 4. – С. 58–60.
87. Теплюк Н.П., Лепехова А.А. Клинические аспекты стероидной резистентности при аутоиммунной пузырьчатке // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2014. – Т.17, № 2. – С. 13–16.

88. Теплюк Н.П., Махнева Н.В. Из коллекции проф. Теплюк Н.П. и Махневой Н.В. Аутоиммунная пузырчатка и разнообразие ее клинических проявлений // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015. – Т.18, № 4. – С. 62–64.
89. Теплюк Н. П., Потекаев Н. Н., Кузьмина Т. С. и др. Летальный исход при кортикостероидной терапии акантолитической пузырчатки в результате инфекционных осложнений // Клини. дерматол. и венерол. – 2005. – № 2. – С. 16–19.
90. Ткаченко С.Б., Теплюк Н.П., Алленова А.С., Лепехова А.А. К вопросу о классификации буллезных дерматозов // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015. – Т.18, № 2. – С. 11–14.
91. Ткаченко С.Б., Теплюк Н.П., Миннибаев М.Т. и соавт. Современные методы дифференциальной диагностики истинной (аутоиммунной) пузырчатки и буллезного пемфигоида // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015. – № 3. – С. 17– 22.
92. Уфимцева М.А., Бочкарев Ю.М., Гурковская Е.П. и др. Остеопороз, вызванный длительным приемом глюкокортикоидов, у больных акантолитической пузырчаткой // Вестник дерматологии и венерологии. – 2016. – №3. – С. 56–61.
93. Уфимцева М.А., Бочкарев Ю.М., Гурковская Е.П. и др. Паранеопластическая пузырчатка // Клиническая медицина. – 2017. – Т. 95, № 3. – С. 278–280.
94. Уфимцева М.А., Гурковская Е.П., Изможерова Н.В. и др. Проблемы междисциплинарного взаимодействия при ведении пациентов с аутоиммунными буллезными дерматозами // Проблемы стоматологии. – 2017. – Т. 13, № 4. – С. 81–86.
95. Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. – 5–е изд., перераб. и доп. – М.: Деловой экспресс, 2016. – 768с.
96. Хамаганова И.В., Малярченко Е.Н., Денисова Е.В. и др. Ошибки в диагностике вульгарной пузырчатки: клинический случай // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2017. – Т. 20, № 1. – С. 30–33.
97. Хамаганова И.В., Новосельцев М.В., Лебедева Е.В. Эозинофилы при вульгарной пузырчатке // Клиническая дерматология и венерология. – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 112–116.

98. Хамаганова И.В., Хромова С.С., Маляренко Е.Н., Новосельцев М.В., Лебедева Е.В. Композиция бактериального состава микробиоты при истинной пузырчатке // *Дерматология в России*. – 2018. – № S2. – С. 27.
99. Цурова З.С., Свирцевская Е.В., Вискова Н.Ю. и др. Клинико–иммунологический анализ применения дипроспана для лечения вульгарной пузырчатки // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 1997. – № 5. – С. 4–7.
100. Чистякова И.А., Мугадова Р.Д., Дворовая Ю.Г. Вульгарная пузырчатка, спровоцированная ятрогенными факторами // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2008. – № 2. – С. 86 – 87.
101. Чистякова И.А., Лапина Е.Ю. Роль своевременной диагностики вульгарной пузырчатки, начинающейся со слизистой оболочки полости рта // *Вестник последипломного медицинского образования*. – 2012. – № 2. – С. 11 – 14.
102. Чеботарев В.В., Сирак А.Г., Аль–Асфари Ферас М.С., Сирак С.В. Обыкновенная пузырчатка: особенности терапии в полости рта // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2014. – Т.9, № 3(35). – С. 215 – 217.
103. Abasq C., Mouquet H., Gilbert D. et al. ELISA testing of anti–desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus // *Arch. Dermatol. American Medical Association*. – 2009. – Vol. 145, № 5. – P. 529–535.
104. Abida O., Zitouni M., Kallel–Sellami M. et al. Tunisian endemic pemphigus foliaceus is associated with the HLA–DR3 gene: anti–desmoglein 1 antibody–positive healthy subjects bear protective alleles // *BJD* – 2009. – Vol. 161. – P. 522–527.
105. Agarwal M., Walia R., Kochhar A.M., Chander R. Pemphigus Area and Activity Score (PAAS) – a novel clinical scoring method for monitoring of pemphigus vulgaris patients // *Int. J Dermatol.* – 1998. – Vol. 37, № 2. – P. 158–160.
106. Ahmed A.R., Gurcan H.M. Use of intravenous immunoglobulin therapy during pregnancy in patients with pemphigus vulgaris // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* – 2011. – №. 25. – P. 1073–1079.
107. Ahmed A.R., Carrozzo M., Caux F. et al. Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology // *Exp Dermatol.* – 2016. – Vol. 25. –P. 839–846.
108. Akarsu S., Özbağçivan Ö., Dolaş N., Aktan Ş. Possible triggering factors and comorbidities in newly diagnosed autoimmune bullous diseases // *Turk J Med Sci.* – 2017. – Vol.47, №3. – P. 832–840.
109. Akira S., Takeda K. Toll–like receptors in innate immunity // *Immunology.* – 2005. – Vol.17, № 1 – P. 1–14.

110. Alpsyoy E., Akman–Karakas A., Uzun S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid // *Arch Dermatol Res.* – 2015. – Vol. 307, № 4. – P. 291–298.
111. Amagai M., Karpati S., Prussick R. et al. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic // *J. Clin. Invest.* – 1992. – Vol. 90, № 3. – P. 919–926.
112. Amagai M., Nagai T., Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile // *J Am Acad Dermatol.* – 1999. – № 40 (2 Pt 1). – P. 167–170.
113. Amagai M., Tanikawa A., Shimizu T. et al. Japanese guidelines for the management of pemphigus // *J Dermatol.* – 2014. – Vol. 41, № 6. – P. 471–486.
114. Amagai M., Tsunoda K., Suzuki H. et al. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus // *J Clin Invest.* – 2000. – Vol.5. – P. 625–631.
115. Amber K.T., Maglie R., Solimani F. et al Targeted Therapies for Autoimmune Bullous Diseases: Current Status // *Drugs.* – 2018 Oct. – Vol. 78, №15. – P. 1527–1548.
116. Amber K.T., Valdebran M., Grando S.A. Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris // *Front Immunol.* – 2018 Jun. – Vol. 4, №9. – P. 1190.
117. Anandan V., Jameela W.A., Sowmiya R. et al. Rituximab: A Magic Bullet for Pemphigus // *J Clin Diagn Res.* – 2017. – Vol.11, № 4. – WC01–WC06.
118. Anhalt G.J., Labib R.S., Voorhees J.J. et al. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease // *N Engl J Med.* – 1982. – Vol. 306, № 20. – P. 1189–1196.
119. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Karaouni A., Grando S.A. Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in Pemphigus // *Am J Pathol.* – 2005. – Vol. 167, № 6. – P. 1531–1544.
120. Attardi L.D., Reczek E.E. Cosmas C. et al. PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family // *Genes. Dev.* – 2000. – Vol. 14. – № 6. – P. 704–718.
121. Atzmony L., Hodak E., Leshem Y.A. et al. The role of adjuvant therapy in pemphigus: A systematic review and meta-analysis // *J Am Acad Dermatol.* – 2015. – Vol.73, № 2. – P. 264–271.
122. Ayed M.B., Martel P., Zitouni M. et al. Tunisian endemic pemphigus foliaceus is associated with desmoglein 1 gene polymorphism // *Genes and Immunity.* – 2002. – Vol. 3. – P. 378–379.

123. Aoi J., Makino K., Sakai K. et al. Case of paraneoplastic pemphigus with follicular lymphoma treated with rituximab // *J Dermatol.* – 2013. – Vol.40, № 4. – P. 285–286.
124. Aoyama Y., Nagai M., Kitajima Y. Binding of pemphigus vulgaris IgG to antigens in desmosome core domains excludes immune complexes rather than directly splitting desmosomes // *Br. J. Dermatol.* – 2010. – Vol. 162, № 5. – P. 1049–1055.
125. Bakos L., Zoratto G., Brunetto L. et al. Photodynamic therapy: a useful adjunct therapy for recalcitrant ulceration in pemphigus vulgaris // *J Eur Acad Dermatol Venereol.* – 2009. – Vol. 23, № 5. – P. 599–600.
126. Bauza A., Del Pozo L. J., Saus C., Martin A. Pemphigus-like lesions induced by imiquimod. // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2009. – Vol. 34. – P. 60–62.
127. Behzad M., Möbs C., Kneisel A. et al. Combined treatment with immunoabsorption and rituximab leads to fast and prolonged clinical remission in difficult-to-treat pemphigus vulgaris // *Br. J. Dermatol.* – 2012. – Vol. 166, №.4 – P. 844–852.
128. Bektas M., Rubenstein D.S. Perp and Pemphigus: A Disease of Desmosome Destabilization // *J of Invest Dermatol.* – 2009. – Vol. 129. – P. 1606–1608.
129. Belloni-Fortina A., Faggion D., Pigozzi B. et al. Detection of autoantibodies against recombinant desmoglein 1 and 3 molecules in patients with pemphigus vulgaris: correlation with disease extent at the time of diagnosis and during follow-up // *Clin. Dev. Immunol.* – 2009. – 187864.
130. Benchikhi H., Nani S., Baybay H. et al. Pemphigus: use of the Japanese severity index in 56 Moroccan patients // *Pan Afr. Med. J.* – 2013. – Vol. 16. – P. 96.
131. Beutner E., Jordon R. Demonstration of skin antibodies in sera of Pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1964. – Vol. 117. – P. 505–510.
132. Bieber K., Sun S., Ishii N. et al. Animal models for autoimmune bullous dermatoses // *Exp. Dermatol.* – 2010. – Vol. 19. – P. 2–11.
133. Brenner S., Goldberg I. Drug-induced pemphigus // *Clin. Dermatol.* – 2011. – Vol. 29. – № 4. – P. 455–457.
134. Tavakolpour S. Pemphigus trigger factors: special focus on pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus // *Arch Dermatol Res.* – 2018. – Vol. 310, № 2. – P. 95–106.
135. Bystryn J.C., Rudolph J.L. Pemphigus // *Lancet.* – 2005. – Vol. 366. – P. 61–73.
136. Calkins C.C., Setzer S.V., Jennings J.M., Summers S. et al. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, № 11. – P. 7623–7634.

137. Capon F., Boulding H., Quaranta M. Genetic analysis of desmoglein 3 (DSG3) sequence variants in patients with pemphigus vulgaris // *Br. J. Dermatol.* – 2009. – Vol. 161, № 6. – P. 1403–1405.
138. Chams–Davatchi C., Rahbar Z., Daneshpazhooh M. et al. Pemphigus vulgaris activity score and assessment of convergent validity // *Acta Med. Iran.* – 2013. – Vol. 51, № 4. – P. 224–230.
139. Cheng S.W., Kobayashi M., Kinoshita–Kuroda K. et al. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme–linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 // *Br. J. Dermatol.* – 2002. – Vol. 146, № 2. – P. 261–265.
140. Chernyavsky A.I., Arredondo J., Kitajima Y. et al. Desmoglein versus non–desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens // *J Biol Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 18. – P. 13804–13812.
141. Cianchini G., Lupi F., Masini C. et al. Therapy with rituximab for autoimmune pemphigus: results from a single–center observational study on 42 cases with long–term follow–up // *J Am Acad Dermatol.* – 2012. – Vol. 67, № 4. – P. 617–622.
142. Cirillo N., Al–Jandan B.A. Desmosomal adhesion and pemphigus vulgaris: the first half of the story // *Cell Commun Adhes.* – 2013. – Vol. 20, № 1–2. – P. 1–10.
143. Craythorne E., du Viver A., Mufti G.J., Warnakulasuriya S. Rituximab for the treatment of corticosteroid–refractory pemphigus vulgaris with oral and skin manifestations // *J. Oral. Pathol. Med.* – 2011. – Vol. 40 – № 8. – P. 616–620.
144. Craythorne E.E., Mufti G., DuVivier A.W. Rituximab used as a first–line single agent in the treatment of pemphigus vulgaris // *J Am Acad Dermatol.* – 2011. – Vol. 65. – P. 1064–1065.
145. Cronstein B. How does methotrexate suppress inflammation? *Clin. Exp. Rheumatol* // 2010. – Vol. 28 (5 Suppl. 61). – P. 21–23.
146. Cunha P.R., Bystryn J.C., Medeiros E.P., de Oliveira J.R. Sensitivity of indirect immunofluorescence and ELISA in detecting intercellular antibodies in endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) // *Int. J. Dermatol.* – 2006. – Vol. 45, № 8. – P. 914–918.
147. Cozzani E., Dal Bello M.G., Mastrogiamomo A. Antidesmoplakin antibodies in pemphigus vulgaris // *Br. J. Dermatol.* – 2006. – Vol. 154. – P. 624–628.
148. Cozzani E., Di Zenzo G., Riva S. et al. Are clinical phenotype and autoantibody profile always concordant in pemphigus? A study in a cohort of pemphigus patients // *Eur J Dermatol.* – 2013. – Vol. 23, № 1. – P. 40–48.

149. Daneshpazhooh M. et al. Direct immunofluorescence of plucked hair for evaluation of immunologic remission in pemphigus vulgaris // *J. Am. Acad. – Dermatol.* – 2011. – Vol. 65, № 6. – P. 173–177.
150. Daneshpazhooh M., Chams–Davatchi C., Payandemehr P. et al. Spectrum of autoimmune bullous diseases in Iran: a 10–year review // *Int J Dermatol.* – 2012. – Vol. 51, № 1. – P. 35–41.
151. Daniel B.S., Hertl M., Werth V.P. et al. Severity score indexes for blistering diseases // *Clin. Dermatol.* – 2012. – Vol. 30, № 1. – P. 108–113.
152. Davies L., Gray D., Spiller D. et al. P53 apoptosis mediator PERP: localization, function and caspase activation in uveal melanoma // *J. Cell. Mol. Med.* – 2009. – Vol. 13. – P. 1995–2007.
153. De Ansari A., Sharma N., Sarda A. Shifting Focus in the Therapeutics of Immunobullous Disease // *Indian J Dermatol.* – 2017. – Vol. 62, №3. – P. 282–290.
154. De D., Khullar G., Handa S., Joshi N., Saikia B., Minz R.W. Correlation between salivary and serum anti–desmoglein 1 and 3 antibody titres using ELISA and between anti–desmoglein levels and disease severity in pemphigus vulgaris // *Clin Exp Dermatol.* – 2017. – Vol. 42, №6. – P. 648–650.
155. Delva E., Jennings J.M., Calkins C.C. et al. Pemphigus vulgaris IgG–induced desmoglein–3 endocytosis and esmosomal disassembly are mediated by a clathrin– and dynamin–independent mechanism // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 18303–18313.
156. Dhandha M.M., Seiffert–Sinha K., Sinha A.A. Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, morphology, duration and HLA association in Pemphigus vulgaris. // *Autoimmunity.* – 2012. – Vol. 45, № 7. – P. 516–526.
157. Didona D., Maglie R., Eming R., Hertl M. Pemphigus: Current and Future Therapeutic Strategies // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – 1418.
158. Drexler S.K., Foxwell B.M. The role of toll–like receptors in chronic inflammation // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2010. – Vol. 42, № 4. – P. 506–518.
159. Dusek R.L., Bascom, J.L., Vogel H. et al. Deficiency of the p53/p63 Target Perp Alters Mammary Gland Homeostasis and Promotes Cancer // *Breast Cancer Res.* – 2012. – Vol. 14, № 2. – P. 65.
160. Eberhard Y., Burgos E., Gagliardi J. et al. Cytokine polymorphisms in patients with pemphigus // *Arch Dermatol Res.* – 2005. – Vol. 296, № 7. – P. 309–313.
161. Min M.S., Damstetter E., Chen A.Y. Autoimmune blistering disorders in the setting of human immunodeficiency virus infection // *Int J Womens Dermatol.* – 2018. – Vol. 4, № 3. – P. 159–165.

162. Eming R. Pemphigus. Model disease for targeted therapy // *Hautarzt*. – 2015. – Vol. 66, № 8. – P. 574–582.
163. Eming R., Hertl M. Immunoabsorption in pemphigus // *Autoimmunity*. – 2006. – Vol.39, № 7. – P. 609–616.
164. Eming R., Sticherling M., Hofmann S.C. et al. S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid // *J Dtsch Dermatol Ges*. – 2015. – Vol.13. – P. 833–844.
165. Etesami I., Seirafi H., Ghandi N. et al. The association between ST18 gene polymorphism and severe pemphigus disease among Iranian population // *Exp Dermatol*. – 2018 Sep 7. – doi: 10.1111/exd.13778. [Epub ahead of print]
166. Faust H.B., Gonin R., Chuang T.Y. et al. Reliability testing of the dermatology index of disease severity (DIDS). An index for staging the severity of cutaneous inflammatory disease // *Arch Dermatol*. – 1997. – Vol.133, №11. – P. 1443 – 1448.
167. Feliciani C., Cozzani E. Marzano A.V. et al. Italian Guidelines in Pemphigus – adapted from the European Dermatology Forum (EDF) and European Academy of Dermatology and Venerology (EADV). – *G Ital Dermatol Venereol*. – 2018. –Vol. 153, № 5. – P. 599–608.
168. Feng S, Zhou W, Zhang J, Jin P. Analysis of 6 cases of drug-induced pemphigus // *Eur J Dermatol*. – 2011. – Vol. 21, № 5. – P. 696–699.
169. Fiorentino D.F., Garcia M.S., Rehmus W., Kimball A.B. A pilot study of etanercept treatment for pemphigus vulgaris // *Arch Dermatol*. – 2011. – Vol. 147, № 1. – P. 117–118.
170. Flachsbart F., Franke A., Kleindorp R. et al. Investigation of genetic susceptibility factors for human longevity – a targeted nonsynonymous SNP study // *Mutat Res*. – 2010. – Vol.10, №. 694 (1–2). – P. 13–19.
171. Frusic-Zlotkin M., Pergamentz R., Michel B. et al. The interaction of pemphigus autoimmunoglobulins with epidermal cells: Activation of the Fas apoptotic pathway and the use of caspase activity for pathogenicity tests of pemphigus patients // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 1050. – P. 371–379.
172. Giurdanella F., Diercks G.F., Jonkman M.F., Pas H.H. Laboratory diagnosis of pemphigus: direct immunofluorescence remains the gold standard // *Br J Dermatol*. – 2016. – Vol. 175, № 1. – P. 185–186.
173. Ghiasi M., Daneshpazhooh M., Ismonov M., Chams-Davatchi C. Evaluation of Autoimmune Bullous Diseases in Elderly Patients in Iran: A 10-Year Retrospective Study // *Skinmed*. – 2017. – Vol. 15, № 3. – P. 175–180.

174. Grando S.A. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities // *Autoimmunity*. – 2012. – Vol. 45, № 1. – P. 7–35.
175. Grando S.A., Bystryń J., Chernyavsky A.I. Apoptolysis: a novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis // *Exp. Dermatol.* – 2009. – Vol. 18. – P. 764–770.
176. Grando S.A., Glukhen'kii B.T., Kutsenko N.S. et al. Modeling of pemphigus vulgaris in guinea pigs // *Biull. Eksp. Biol. Med.* – 1990. – Vol. 109, № 6. – P. 604–605.
177. Gregoriou S., Efthymiou O., Stefanaki C., Rigopoulos D. Management of pemphigus vulgaris: challenges and solutions // *Clin Cosmet Investig Dermatol.* – 2015. – Vol. 8. – P. 521–527.
178. Grover S. Scoring systems in pemphigus // *Indian J Dermatol.* – 2011. – Vol. 56. – P. 145–149.
179. Gürcan H.M., Jeph S., Ahmed A.R. Intravenous immunoglobulin therapy in autoimmune mucocutaneous blistering diseases: a review of the evidence for its efficacy and safety // *Am J Clin Dermatol.* – 2010. – Vol. 11, № 5. – P. 315–326.
180. Guzzo C.A., Weiss J.S., Mogavero H.S. et al. A review of two controlled multicenter trials comparing 0.05% halobetasol propionate ointment to its vehicle in the treatment of chronic eczematous dermatoses // *J Am Acad Dermatol.* – 1991. – Vol. 25, № 6. – P. 1179–1183.
181. Harman K.E., Brown D., Exton L.S., Groves R.W. et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of pemphigus vulgaris // *Br J Dermatol.* – 2017. – Vol. 177, № 5. – P. 1170–1201.
182. Harman K.E., Gratian M.J., Bhogal B.S. et al. A study of desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris: racial differences in frequency and the association with a more severe phenotype // *Brit J Dermatol.* – 2000. – Vol. 143. – P. 343–348.
183. Harman K.E., Seed P.T., Gratian M.J. et al. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels // *Br. J. Dermatol.* – 2001. – Vol. 144, № 4. – P. 775–780.
184. Heizmann M., Itin P., Wernli M. et al. Successful treatment of paraneoplastic pemphigus in follicular NHL with rituximab: report of a case and review of treatment for paraneoplastic pemphigus in NHL and CLL // *Am J Hematol.* – 2001, Vol. 66. – P. 142–144.

185. Herbst A., Bystrin J. Patterns of remission in pemphigus vulgaris // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2000. – Vol.42. – P. 422–427.
186. Herrero–González J.E., Iranzo P., Benítez D. et al. Correlation of immunological profile with phenotype and disease outcome in pemphigus // *Acta Derm. Venereol.* – 2010. – Vol. 90, № 4. – P. 401–405.
187. Hertl M. Autoimmune diseases of the skin Pathogenesis, Diagnosis, Management. – 3rd ed. – 2011; XXII. – 594 p.
188. Hertl M., Jedlickova H., Karpati S. et al. Pemphigus. Guideline for diagnosis and treatment – guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV) // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* – 2015. – Vol. 29, № 3. – P. 405–414.
189. Higashihara T., Kawase M., Kobayashi M. et al. Evaluating the Efficacy of Double–Filtration Plasmapheresis in Treating Five Patients With Drug–Resistant Pemphigus // *Ther Apher. Dial.* – 2017. – Vol.21, № 3. – P. 243–247.
190. Ho J., Bhawan J. Mimickers of classic acantholytic diseases // *J Dermatol.* – 2017. – Vol. 44, № 3. – P. 232–242.
191. Hoffmann K., Hertl M., Sitaru C. Molecular diagnosis of autoimmune dermatoses // *Hautarzt.* – 2016. – Vol. 67, №1. – P. 33–39.
192. Hofmann S.C., Juratli H.A., Eming R. Bullous autoimmune dermatoses // *J Dtsch Dermatol Ges.* – 2018 Nov. – Vol. 16, № 11. – P. 1339–1358.
193. Hrabovska Z., Jautova J., Hrabovsky V. A study of clinical, histopathological and direct immunofluorescence diagnosis in pemphigus group Utility of direct immunofluorescence // *Bratisl Lek Listy.* – 2017. – Vol. 118, № 4. – P. 243–249.
194. Huiming Y., Yunfang L., Junqing H. et al. TLR7 regulates dendritic cell–dependent B–cell responses through BlyS in immune thrombocytopenic purpura // *Eur. J. Haematol.* – 2011. – Vol. 86. – № 1. – P. 67–74.
195. Horváth B., Huizinga J., Pas H.H. et al. Low–dose rituximab is effective in pemphigus // *Br J Dermatol.* – 2012. – Vol. 2, № 166. – P. 405–412.
196. Ihrle R.A., Marques M.R., Nguyen B.T. et al. Perp is a p63–regulated gene essential for epithelial integrity // *Cell.* – 2005. – Vol. 120. – P. 843–856.
197. Ikeda S., Immamara S., Hashimoto I. et al. History of the establishment and revision of diagnostic criteria, severity index and therapeutic guidelines for pemphigus in Japan // *Arch. Dermatol. Res.* – 2003. – Vol. 295. – P. 12–16.
198. Iwasaki A. A. Toll–like receptor control of the adaptive immune responses / A A Iwasaki, R. A Medzhitov // *Immunology.* – 2010. – Vol. 57, № 40. – P. 987–995.

199. Jacobi A., Shuler G., Hertl M. Rapid control of therapy–refractory pemphigus vulgaris by treatment with the tumour necrosis factor–alpha inhibitor infliximab // *Br. J. Dermatol.* – 2005. – Vol. 153, № 2. – P. 448–449.
200. Jheon A.H., Mostowfi P., Snead M.L. et al. PERP regulates enamel formation via effects on cell–cell adhesion and gene expression // *J Cell Sci.* – 2011. – Vol. 124. – P. 745–754.
201. Johnson, T.M., Meade K., Pathak N. et al. Knockin Mice Expressing a Chimeric p53 Protein Reveal Mechanistic Differences in How p53 Triggers Apoptosis and Senescence // *Proc Natl. Acad. – 2008. – Sci USA. – Vol. 105, № 4. – P. 1215–1221.*
202. Joly P., Bernard P., Bedane C. et al. Pemphigus. Guidelines for the diagnosis and treatment. Centres de reference des maladies bulleuses autoimmunes. Societe Francaise de Dermatologie // *Ann Dermatol Venereol.* – 2011. – Vol. 138. – P. 252–258.
203. Joly P., Maho–Vaillant M., Prost–Squarcioni C. et al. First–line rituximab combined with short–term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel–group, open–label randomised trial // *Lancet.* – 2017. – Vol. 389. – P. 2031–2040.
204. Kalantari–Dehaghi M., Anhalt G., Camilleri M. et al. Pemphigus vulgaris antibodies target PERP and several other keratinocyte membrane and mitochondrial proteins // *J Invest Dermatol.* – 2011. – Vol.131, № 1. – P. 11–16.
205. Kalantari–Dehaghi M., Molina D.M., Farhadieh M. et al. New targets of Pemphigus vulgaris antibodies identified by protein array technology // *Exp Dermatol.* – 2011. – Vol. 20. – P. 154–156.
206. Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y et al. A higher correlation of the antibody activities against the calcium–dependent epitopes of desmoglein 3 quantified by ethylenediaminetetraacetic acid–treated enzyme–linked immunosorbent assay with clinical disease activities of pemphigus vulgaris // *J Dermatol Sci.* – 2013. – Vol. 70, № 3. – P. 190–195.
207. Kanwar A.J., Vinay K. Rituximab in pemphigus // *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* – 2012. – Vol. 78, № 6. – P. 671–676.
208. Kasperkiewicz M., Ellebrecht C.T., Takahashi H. et al. Pemphigus. // *Nat Rev Dis Primers.* – 2017. – Vol.3. – P. 17026.
209. Kasperkiewicz M., Eming R., Behzad M. et al. Efficacy and safety of rituximab in pemphigus: experience of the German Registry of Autoimmune Diseases // *J Dtsch Dermatol Ges.* – 2012. – Vol. 10, № 10. – P. 727–732.

210. Kasperkiewicz M., Shimanovich I., Ludwig R.J. et al. Rituximab for treatment-refractory pemphigus and pemphigoid: a case series of 17 patients // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2011. – Sep. – Vol. 65, № 3. – P. 552–558.
211. Kautz O., Hertl M., Sticherling M. et al. Results of a survey of German dermatologists on the therapeutic approaches to pemphigus and bullous pemphigoid // *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* – 2009. – Vol. 7. – P. 227–233.
212. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity // *Immunity.* – 2011. – Vol. 34, № 5. – P. 637–650.
213. Kershenovich R., Hodak E., Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev.* – 2014. – Vol. 13, № 4–5. – P. 477–481.
214. Kitajima Y. New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. // *Kaohsiung J. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 29, № 1. – P. 1–13.
215. Kricheli D., David M., Frusic-Zlotkin M. et al. The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives // *Br. J. Dermatol.* – 2000. – Vol. 143, № 2. – P. 337–342.
216. Kubanova A.A., Karamova A.E., Kubanov A.A. Future Therapeutic Targets in Management of Autoimmune Skin Diseases // *Vestn Ross Akad Med Nauk.* –2015. – Vol. 2. – P. 159–164.
217. Kumar B., Arora S., Kumaran M.S. et al. Study of desmoglein 1 and 3 antibody levels in relation to disease severity in Indian patients with pemphigus // *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* – 2006. – Vol. 72, № 3. – P. 203.
218. Koch P.J., Mahoney M.G., Ishikawa H. et al. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris // *J. Cell Biol.* – 1997. – Vol. 137. – P. 1091–1102.
219. Koga H., Tsuruta D., Ohyama B. Desmoglein 3, its pathogenecity and a possibility for therapeutic target in pemphigus vulgaris // *Expert Opin Ther Targets.* – 2013. – Vol. 17, № 3. – P. 293–306.
220. Langan S.M., Smeeth L., Hubbard R. et al. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris—incidence and mortality in the UK: population based cohort study // *BMJ.* – 2008. – Vol. 9, № 337. – P. 180.

221. Langenhan J., Dworschak J, Saschenbrecker S. et al. Specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus requires the entire ectodomains of desmogleins // *Exp Dermatol.* – 2014. – Vol. 23, № 4. – P. 253–259.
222. Langley R.G., Ellis C.N. Evaluating psoriasis with Psoriasis Area and Severity Index, Psoriasis Global Assessment, and Lattice System Physician’s Global Assessment // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2004. – Vol. 51, № 4. – P. 563–569.
223. Lanza A., Cirillo N., Rossiello R. et al. Evidence of key role of Cdk2 overexpression in Pemphigus vulgaris // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 8736–8745.
224. Lee E., Lendas K.A., Chow S. Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with pemphigus vulgaris // *Hum. Immunol.* – 2005. – Vol. 66, № 12. – P. 1213–1222.
225. Leventhal J.S., Sanchez M.R. Is it time to re-evaluate the treatment of pemphigus? // *J Drugs Dermatol.* – 2012. – Vol. 11, № 10. – P. 1200–1206.
226. Lin R., Ladd D. J., Powell D. J. Localized Pemphigus Foliaceus Induced by Topical Imiquimod Treatment // *Arch. Dermatol.* – 2004. – Vol. 140, № 7. – P. 908–990.
227. Livak K., Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // *Methods.* – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 402–408.
228. Ludwig R.J., Vanhoorelbeke K., Leyboldt F. et al. Mechanisms of autoantibody-induced pathology // *Front Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 603.
229. Lüftl M., Stauber A., Mainka A. et al. Successful removal of pathogenic autoantibodies in pemphigus by immunoadsorption with a tryptophan-linked polyvinylalcohol adsorber // *Br J Dermatol.* – 2003. – Vol. 149, № 3. – P. 598–605.
230. Lotti R, Marconi A, Pincelli C. Apoptotic pathways in the pathogenesis of pemphigus: targets for new therapies // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2012 Aug. – Vol. 13, № 10. –P. 1877–1881.
231. Magliocca K.R., Fitzpatrick S.G. Autoimmune Disease Manifestations in the Oral Cavity // *Surg. Pathol. Clin.* – 2017. – Vol. 10, №1. – P. 57–88.
232. Mahajan V.K., Sharma N.L., Sharma R.C., Garg G. Twelve-year clinico-therapeutic experience in pemphigus: a retrospective study of 54 cases // *Int. J. Dermatol.* – 2005. – Vol. 44, № 10. – P. 821–827.
233. Malheiros D., Panepucci R.A., Roselino A.M. et al. Genome-wide gene expression profiling reveals unsuspected molecular alterations in pemphigus foliaceus // *Immunology.* – 2014. – Vol. 143, № 3. –P. 381–395.

234. Marazza G., Pham H.C., Schärer L. et al. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study // *Br J Dermatol.* – 2009 Oct. – Vol. 161, № 4. – P. 861–868.
235. Marker M., Derfler K., Monshi B., Rappersberger K. Successful immunoapheresis of bullous autoimmune diseases: pemphigus vulgaris and pemphigoid gestationis // *J Dtsch Dermatol Ges.* – 2011. – Vol. 19, № 1. – P. 27–31.
236. Marques M.R., Ihrie R.A., Horner J.S., Attardi L.D. The requirement for perp in postnatal viability and epithelial integrity reflects an intrinsic role in stratified epithelia // *J. Invest. Dermatol.* – 2006. – Vol. 126. – P. 69–73.
237. Martel P., Gilbert D., Drouot L. A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease // *Genes. Immun.* – 2001. – Vol. 2, № 1. – P. 41–43.
238. Martin L.K., Werth V., Villanueva E. et al. Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2009. – Vol. 1. – P. 387–394.
239. Mascaró J.M. Jr., España A., Liu Z. et al. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence // *Clin Immunol Immunopathol.* – 1997. – Vol. 85, №1. – P. 90–96.
240. Mashiah J., Brenner S. Possible Mechanisms in the Induction of Pemphigus Foliaceus by Topical Imiquimod Treatment // *Arch Dermatol.* – 2005 – Vol. 141, № 7. – P. 908–909.
241. Meggitt S.J., Anstey A.V., Mohd Mustapa M.F. et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the safe and effective prescribing of azathioprine // *Br. J. Dermatol.* – 2011. – Vol. 165, № 4. – P. 711–734.
242. Meyersburg D., Schmidt E., Kasperkiewicz M., Zillikens D. Immunoabsorption in Dermatology // *Ther Apher Dial.* – 2012. – Vol. 16, № 4. – P. 311–320.
243. Miller L.S. Toll-like receptors in skin // *Adv Dermatol.* – 2008. – Vol. 24. – P. 71–87.
244. Mimouni D., Bar H., Gdalevich M. et al. Pemphigus, analysis of 155 patients // *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* – 2010. – Vol. 24, № 8. – P. 947–952.
245. Miyagava S., Higashimine I., Lida T. et al., HI_A-DRB1*04 and DRB1*14 alleles are associated with susceptibility to pemphigus among Japanese // *J. Invest Dermatol.* – 1997. – Vol. 109. – P. 615–618.
246. Muller E.J. et al. Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? // *J. Invest. Dermatol.* – 2008. – Vol. 128, № 3. – P. 501–516.

247. Murrell D.F., Amagai M., Werth V.P. Scoring systems for blistering diseases in practice: why bother, and which one should you use? // *JAMA dermatology*. American Medical Association. – 2014. – Vol. 150, № 3. – P. 245–247.
248. Murrell D.F., Dick S., Ahmed A.R. et al. Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus // *J Am Acad Dermatol*. – 2008. – Vol. 58, № 6. – P. 1043–1046.
249. Mysorekar V.V., Sumathy T.K., Shyam Prasad A.L. Role of direct immunofluorescence in dermatological disorders // *Indian Dermatol Online J*. – 2015. – Vol. 6, № 3. – P. 172–180.
250. Mortazavi H., Kiavash K., Esmaili N., Chams– Davatchi C. Correlation of pemphigus vulgaris antibody titers by indirect immunofluorescence with activity of disease based on Pemphigus Area and Activity Score (PAAS) // *Acta Medicum Iran*. – 2008. – Vol. 46. – P. 239–244
251. Nagasaka T., Fujii Y., Ishida A. et al. Evaluating efficacy of plasmapheresis for patients with pemphigus using desmoglein enzyme–linked immunosorbent assay // *Br. J. Dermatol*. – 2008. – Vol. 158, № 4. – P.685–690.
252. Nagel A., Lang A. Engel D. et al. Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3 // *Clin. Immunol*.– 2010. – Vol. 134, № 3. – P. 320–330.
253. Narbutt J., Lesiak A., Klich I. et al. ICOS gene polymorphism may be associated with pemphigus // *J Cutan Med Surg*. – 2010 Nov–Dec. – Vol.14, № 6. – P.291–297.
254. Netea M.G., Wijmenga C., O'Neill L.A. Genetic variation in Toll–like receptors and disease susceptibility // *Nat. Immunol*. – 2012. – Vol. 13, № 6. – P. 535–542.
255. Nguyen B., Dusek R.L., Beaudry V.G. et al. Loss of the desmosomal protein Perp enhances the phenotypic effects of pemphigus vulgaris autoantibodies // *J Invest Dermatol*. – 2009. – Vol. 129. – P. 1710–1718.
256. Nguyen V.T., Arredondo J., Chernyavsky A.I. et al. Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes // *J. Biol. Chem*. – 2005. – Vol. 279, № 3. – P. 2135–2146.
257. Oliveira L.A., Marquart–Filho A., Trevilato G. et al. Anti–Desmoglein 1 and 3 Autoantibody Levels in Endemic Pemphigus Foliaceus and Pemphigus Vulgaris from Brazil // *Clin Lab*. – 2016. – Vol. 62, № 7. – P. 1209–1216.
258. Öktem A., Hayran Y., Uysal P. et al. Evaluation of the Importance of Immunological Profile for Pemphigus Vulgaris in the Light of Necessity to Modify Compensation Theory // *Acta Dermatovenerol Croat*. – 2018 Jun. – Vol. 26, № 2. – P. 100–104.

259. Patsatsi A., Kyriakou A. Giannakou A. et al. Clinical significance of anti-desmoglein-1 and -3 circulating autoantibodies in Pemphigus Patients Measured by Area Index and Intensity Score // *Acta Derm. Venereol.* – 2014. – Vol. 94, № 2. – P. 203–206.
260. Pereira N.F., Hansen J.A., Lin M.T. et al. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants // *Cytokine.* – 2004. – Vol. 21, № 28 (6). – P. 233–241.
261. Perez O.A., Patton T. Novel therapies for pemphigus vulgaris: an overview // *Drugs Aging.* – 2009. – Vol. 26, № 10. – P. 833–846.
262. Pfütz M., Niedermeier A., Hertl M., Eming R. Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus // *Eur. J. dermatology.* – 2007. – Vol.17. – P. 4–11.
263. Rabinovich O.F., Abramova E.S. Bullous lesions of the oral mucosa clinics and diagnostics *Stomatologia* // 2019. – Vol. 98, № 3. – P. 97–103.
264. Rahbar Z., Daneshpazhooh M., Mirshams-Shahshahani M. Pemphigus disease activity measurements: pemphigus disease area index, autoimmune bullous skin disorder intensity score, and pemphigus vulgaris activity score // *JAMA dermatology.* – 2014. – Vol. 150, № 3. – P. 266–272.
265. Reaz S., Mossalam M., Okal A., Lim C.S. A single mutant, A276S of p53, turns the switch to apoptosis // *Mol Pharm.* – 2013. – Vol. 10, № 4. – P. 1350–1359.
266. Reed J.C. Mechanisms of apoptosis // *Am. J. Pathol.* – 2000. – Vol. 157. – P. 1415–1430.
267. Ruocco E., Baroni A., Rossiello L., Ruocco V. Imiquimod contact pemphigus: a comment // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2004. – Vol. 115, № 2. – P. 242–224.
268. Ruocco E., Wolf R., Ruocco V. et al. Pemphigus: Associations and management guidelines: Facts and controversies // *Clin Dermatol.* – 2013. – Vol. 31, № 4. – P. 382–390.
269. Ruocco V., Ruocco E., Lo Schiavo A. et al. Pemphigus: etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: facts and controversies // *Clin Dermatol.* – 2013. – Vol. 31, № 4. – P. 374–381.
270. Roscoe JT, Diaz L, Sampaio SAP. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer // *Journal of Investigative Dermatology.* – 1985. – Vol.85, № 6. – P. 538–541.

271. Rosenbach M., Murrell D.F., Bystryn J.C. et al. Reliability and convergent validity of two outcome instruments for pemphigus // *J Invest Dermatol.* – 2009. – Vol. 129, № 10. – P. 2404–2410.
272. Roujeau J.C. Plasmapheresis therapy of pemphigus and bullous pemphigoid. *Semin Dermatol.* – 1988. – Vol. 7, № 3. – P. 195–200.
273. Sajda T., Sinha A.A. Autoantibody Signaling in Pemphigus Vulgaris: Development of an Integrated Model // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 692.
274. Saleh M.A., Hashimoto R., Kase Y. et al. Low pathogenicity of anti-desmoglein 3 immunoglobulin G autoantibodies contributes to the atypical clinical phenotypes in pemphigus // *J Dermatol.* – 2015. – Vol. 42, № 7. – P. 685–689.
275. Samuelsson G. Extracorporeal immunoadsorption with protein A: technical aspects and clinical results // *J Clin Apher.* – 2001. – Vol.16. – P. 49–52.
276. Saraceno R., Ruzzetti M., Lanti A. et al. Therapeutic options in an immunocompromised patient with pemphigus vulgaris: potential interest of plasmapheresis and extracorporeal photochemotherapy // *Eur. J. Dermatol.* – 2008. – Vol. 18, № 3. – P. 354–356.
277. Saraswat A., Bhushan K., India C. A new grading system for oral pemphigus // *Int. J. Dermatol.* – 2003. – Vol.42, № 5. – P. 413–414.
278. Sarig O., Bercovici S., Zoller L. et al. Population Specific Association between a Polymorphic Variant in ST18, Encoding a Pro-Apoptotic Molecule, and pemphigus Vulgaris // *J Invest Dermatol.* – 2012. – Vol. 132, № 7. – P. 1798–1805.
279. Saumil J.G., Gandhi S.J., Zenklusen D. et al. Transcription of functionally related constitutive genes is not coordinated // *Nat Struct Mol Biol.* – 2011. – Vol. 18, № 1. – P. 27– 34.
280. Schiavo A. L., Sangiuliano S., Puca R. V. Contact pemphigus: a side-effect of imiquimod therapy // *Int. J. Dermatol.* – 2008. – Vol. 47. – P. 765–767.
281. Schmidt E., Dährich C., Rosemann A. et al. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients // *Exp. Dermatol.* – 2010. – Vol. 19, № 5. – P. 458–463.
282. Schmidt E., Goebeler M, Hertl M. et al. S2k guideline for the diagnosis of pemphigus vulgaris/foiaceus and bullous pemphigoid. // *J. Dtsch Dermatol Ges.* – 2015. – Vol. 13, № 7. – P. 713–727.
283. Schmidt E., Klinker E., Opitz A. et al. Protein A immunoadsorption: a novel and effective adjuvant treatment of severe pemphigus // *Br J Dermatol.* – 2003. – Vol. 148. – P. 1222–1229.

284. Schmidt E., Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases // *Autoimmun. Rev.* – 2010. – Vol. 10. – P. 84–89.
285. Schneider M.R., Schmidt–Ullrich R., Paus R. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan // *Curr. Biol.* – 2009. – Vol. 19, № 3. – P. 132–142.
286. Schulze K., Galichet A., Sayar B.S. et al. An Adult Passive Transfer Mouse Model to Study Desmoglein 3 Signaling in Pemphigus Vulgaris // *J. Invest. Dermatol.* – 2012. – Vol. 132. – P. 346–355.
287. Sebaratnam D.F., Martin L.K., Rubin A.I. Reversible relapse of pemphigus foliaceus triggered by topical imiquimod suggests that Toll–like receptor 7 inhibitors may be useful treatments for pemphigus // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2011 – Vol. 36. – P. 91–100.
288. Shams S., Amirzargar A.A., Yousefi M. et al. HLA class II (DRB, DQA1 and DQB1) allele and haplotype frequencies in the patients with pemphigus vulgaris // *J Clin Immunol.* – 2009. – Vol. 29, № 2. – P. 175–179.
289. Shimanovich I., Herzog S., Schmidt E. et al. Improved protocol for treatment of pemphigus vulgaris with protein A immunoabsorption // *Clin Exp Dermatol.* – 2006. – Vol. 31, № 6. – P. 768–774.
290. Shimanovich I., Nitschke M., Rose C. et al. Treatment of severe pemphigus with protein A immunoabsorption, rituximab and intravenous immunoglobulins // *Br. J. Dermatol.* – 2008. – Vol. 158. – P. 382–388.
291. Shiraishi K., Sayama K. Pemphigus foliaceus induced by topical imiquimod treatment // *Int J Dermatol.* – 2018. – Vol. 57, № 12. – P.155–157.
292. Silva J.A., Mesquita Kde C., Igreja A.C. et al. Paraneoplastic cutaneous manifestations: concepts and updates // *An Bras Dermatol.* – 2013. – Vol. 88, № 1. – P. 9–22.
293. Spindler V., Drenckhahn D., Zillikens D., Washke J. Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3 // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 171. – P. 906–916.
294. Spindler V., Eming R., Schmidt E. et al. Mechanisms causing loss of keratinocyte cohesion in pemphigus // *J Invest Dermatol.* – 2017. – Vol. 138. – P. 32–37.
295. Stanley J. R., Koulu L., Thivolet C. Distinction between epidermal antigensbinding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies // *J. Clin. Invest.* –1984. – Vol. 74.– P. 313–320.
296. Stanley J.R., Yaar M., Hawley–Nelson P. et al. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes // *J. Clin. Invest.* – 1982. – Vol. 70. – P. 281–288.

297. Svecova D., Parnicka Z., Pastyrikova L. et al. HLA DRB1* and DQB1* alleles are associated with disease severity in patients with pemphigus vulgaris // *Int J Dermatol.* – 2015. – Vol. 54, № 2. – P. 168–173.
298. Szumilas M. Explaining odds ratios // *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* – 2010. – Vol. 19, № 3. – P. 227–229.
299. Song G.G., Choi S.J., Ji J.D., Lee Y.H. Toll-like receptor polymorphisms and vasculitis susceptibility: meta-analysis and systematic review // *Mol Biol Rep.* – 2013. – Vol. 40, № 2. – P. 1315–1323.
300. Surya V., Kumar P., Gupta S., Urs A.B. Childhood Pemphigus Vulgaris: Report of Two Cases with Emphasis on Diagnostic Approach // *Contemp Clin Dent.* – 2018. – Vol. 9 (Suppl 2). – P.S373–S376.
301. Tabrizi M.N., Chams-Davatchi C., Esmaeeli N. Accelerating effects of epidermal growth factor on skin lesions of pemphigus vulgaris: a double-blind, randomized, controlled trial // *Eur Acad Dermatol Venereol.* – 2007. – Vol. 21, № 1. – P. 79–84.
302. Takahashi Y., Patel H.P., Labib R.S. et al. Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural and cytochemical changes // *J. Invest. Dermatol.* – 1985. – Vol. 84. – P. 41–46.
303. Takeuchi O., Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation // *Cell.* – 2010. – Vol. 140. – P. 805–820.
304. Tamgadge S., Tamgadge A., Bhatt D.M. et al. Pemphigus vulgaris // *Contemp. Clin. Dent.* – 2011. – Vol. 2. – P. 134–137.
305. Taro Kawai, Shizuo Akira. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors // *Nature immunology.* – 2010. – Vol. 11, № 5. – P. 373–384.
306. Tian J., Ma Y., Li J. et al. The TLR7 7926A>G polymorphism is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus // *Mol Med Rep.* – 2012. – Vol. 6, № 1. – P. 105–110.
307. Timoteo R.P., da Silva M.V., Miguel C.B. et al. Th1/Th17-Related Cytokines and Chemokines and Their Implications in the Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris // *Mediators Inflamm.* – 2017. – 7151285.
308. Tjokrowidjaja A., Daniel B.S., Frew J.W. The development and validation of the treatment of autoimmune bullous disease quality of life questionnaire, a tool to measure the quality of life impacts of treatments used in patients with autoimmune blistering disease // *Br J Dermatol.* – 2013. – Vol. 169, № 5. – P. 1000–1006.

309. Tsunoda K., Ota T., Aoki M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3 // *J. Immunol.* – 2003 – Vol. 15, № 170 (4). – P. 2170–2178.
310. Tunca M., Musabak U., Sagkan R.I. et al. Association of human leukocyte antigen class II alleles with pemphigus vulgaris in a Turkish population // *J. Dermatol.* – 2010. – Vol. 37, № 3. – P. 246–250.
311. Torzecka J.D., Wozniak K., Kowalewski C. et al. Circulating pemphigus autoantibodies in healthy relatives of pemphigus patients: coincidental phenomenon with a risk of disease development? // *Arch. Dermatol. Res.* – 2007. – Vol. 299, № 5–6. – P. 239–243.
312. Uçmak D, Harman M, Uçmak F, Akpolat V. The frequency of osteoporosis in patients with pemphigus vulgaris on treatment // *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* – 2013. – Vol. 79, № 2. – P. 211–215.
313. Valins W., Amini S., Berman B. The Expression of Toll-like Receptors in Dermatological Diseases and the Therapeutic Effect of Current and Newer Topical Toll-like Receptor Modulators // *J Clin Aesthet Dermatol.* – 2010. – Vol. 3, № 9. – P. 20–29.
314. Van Beek N., Zillikens D., Schmidt E. Diagnosis of autoimmune bullous diseases // *J Dtsch Dermatol Ges.* – 2018. – Vol. 16, № 9. – P.1077–1091.
315. Van Der Wier G., Pas H.H., Jonkman M.F. Experimental human cell and tissue models of pemphigus // *Dermatol. Res. Pract.* – 2010. – P. 375 – 383.
316. Vandana D. P., Swaptagni Das, Prathamesh S., Kanjaksha G.. Toll-like receptors in autoimmunity with special reference to systemic lupus erythematosus // *Indian J Hum Genet.* – 2012. – Vol. 18, № 2. – P. 155–160.
317. Ventura F., Rocha J., Fernandes J.C. et al. Recalcitrant pemphigus vulgaris: aseptic meningitis associated with intravenous immunoglobulin therapy and successful treatment with rituximab // *Int J Dermatol.* – 2013. – Vol. 52, № 4. – P. 501–502.
318. Vu T.N., Lee T.X., Ndoye A. et al. The pathophysiological significance of nondesmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptors in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus // *Arch Dermatol.* – 1998. – Vol. 134, № 8. – P. 971–980.
319. Walker A., Favreau T. Localized pemphigus foliaceus // *Cutis.* – 2017. – Vol. 99, № 1. – P. 23–26.
320. Wallace A.B. The exposure treatment of burns. *Lancet.* – 1951. – Vol. 1. – P. 501–504.

321. Wang X., Brégègère F., Frušić–Zlotkin M. et al. Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins // *Apoptosis*. – 2004. – Vol. 9, № 2. – P. 131–143.
322. Waschke J. The desmosome and pemphigus // *Histochem Cell Biol*. – 2008. – Vol. 130. – P. 21–54.
323. Wu H., Wang Z.H., Yan A. et al. Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates // *N Engl J Med*. — 2000. — Vol. 343(1). — P. 31—35.
324. Wu I.C., Zhao Y., Zhai R. et al. Interactions between genetic polymorphisms in the apoptotic pathway and environmental factors on esophageal adenocarcinoma risk // *Carcinogenesis*. – 2011, Apr. – Vol. 32, № 4. – P. 502–526.
325. Wucherpfennig K.W., Yu B., Bhol K. et al. Structural basis for major histocompatibility complex (MHC) – linked susceptibility to autoimmunity: Charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self–peptides in pemphigus vulgaris // *Proc Natl Acad Sci USA Immunology*. – 1995. – Vol. 92. – P. 11935—11939.
326. Xiang M., Fan J. Pattern Recognition Receptor–Dependent Mechanisms of Acute Lung Injury // *Molmed*.– 2010. – Vol. 16, № 1– 2. – P. 69–82.
327. Yamada H., Yamaguchi H., Takamori K. et al. Plasmapheresis for the treatment of pemphigus and bullous pemphigoid // *Ther Apher*. – 1997. – Vol. 1. – P. 178–82.
328. Yamamoto T., Ikeda K., Sasaoka S. et al. Human leukocyte antigen genotypes and antibody profiles associated with familial pemphigus in Japanese // *J. Dermatol*. – 2011. – Vol. 38, № 7. – P. 711–716.
329. Yamamoto Y., Aoyama Y., Shu E. et al. Anti–desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3–depleting activities related to pathogenicity // *J. Biol. Chem*. – 2007. – Vol. 282, № 24. – P. 17866–17876.
330. Yan L., Wang J.M., Zeng K. Association between HLA–DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta–analysis // *Br J Dermatol*. – 2012. – Vol. 167, № 4. – P. 768–777.
331. Yoshimura K., Ishii N., Hamada T. Clinical and immunological profiles in 17 Japanese patients with drug–induced pemphigus studied at Kurume University // *Br.J Dermatol*. – 2014. – Vol. 171, № 3. – P. 544–553.
332. Zakka L.R., Shetty S.S., Ahmed A.R. Rituximab in the Treatment of Pemphigus Vulgaris // *Dermatol Ther (Heidelb)*. – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 17.

333. Zaraa I., Kerkeni N., Ishak F. et al. Spectrum of autoimmune blistering dermatoses in Tunisia: an 11-year study and a review of the literature // *Int J Dermatol.* – 2011 Aug. – Vol. 50, № 8. – P. 939–944.
334. Zhang W., Edwards A., Zhu D. et al. miRNA-mediated relationships between Cis-SNP genotypes and transcript intensities in lymphocyte cell lines. – *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, №2. P. 31429.
335. Zhao C.Y., Murrell D.F. Outcome measures for autoimmune blistering diseases // *J Dermatol.* – 2015. – Vol. 42, № 1. – P. 31–36.
336. Zillikens D., Derfler K., Eming R. et al. Empfehlungen für die Anwendung der Immunapherese bei der Therapie bullöser Autoimmun dermatosen // *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* – 2007. – Vol. 5. – P. 881–887.
337. Zillikens D., Schmidt E., Reimer S. et al. Antibodies to desmogleins 1 and 3, but not to BP180, induce blisters in human skin grafted onto SCID mice // *J. Pathol.* 2001. – Vol. 193, № 1. – P. 117–124.
338. Ohyama M., Amagai M., Tsunoda K. et al. Immunologic and histopathologic characterization of an active disease mouse model for pemphigus vulgaris // *J. Invest. Dermatol.* – 2002. – Vol. 118. – P. 199–204.
339. Oktarina D.A., Van der Wier G., Diercks G.F. et al. IgG-induced clustering of desmogleins 1 and 3 in skin of patients with pemphigus fits with the desmoglein nonassembly depletion hypothesis // *Br J Dermatol.* – 2011. – Vol. 165, № 3. – P. 552–562.
340. Oliver C., Jamur M.C. *Immunocytochemical methods and protocols* // 3rd ed. New York: Springer. – 2010. – 401 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение А

Индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index)

Кожа	Активность патологического процесса	Вторичные поражения
Анатомическая область	Эрозии/пузыри или новые очаги эритемы (0 – отсутствуют, 1 – 1–3 элемента, из которых не более одного >2 см в диаметре, ни одного >6 см, 2 – 2–3 элемента, из которых по крайней мере два >2 см в диаметре, ни одного >6 см, 3 – >3 элементов, из которых ни одного >6 см в диаметре, 5 – >3 элементов и/или по крайней мере один элемент >6 см в диаметре, 10 – >3 элементов и/или по крайней мере один элемент >16 см в диаметре или тотальное поражение)	Поствоспалительная гиперпигментация или эритема на местах разрешившихся высыпаний (0–отсутствуют, 1–присутствуют)
Уши		
Нос		
Другие области лица		
Шея		
Грудь		
Живот		
Спина/ягодицы		
Руки		
Кисти		
Ноги		
Стопы		
Половые органы		
Сумма баллов по коже	/120	/12

Волосистая часть головы

Волосистая часть головы	Эрозии/пузыри или новые очаги эритемы (0 – отсутствуют, 1 – в одном квадранте, 2 – в двух квадрантах, 3 – в трех квадрантах, 5 –	Поствоспалительная гиперпигментация или эритема на местах разрешившихся высыпаний
-------------------------	---	---

	присутствуют по всей площади головы, 10 – по крайней мере один очаг >6 см)	(0–отсутствуют, 1–присутствуют)
Сумма баллов по волосистой части головы (0–10)	/10	/1

Слизистые оболочки

Анатомическая область	Эрозии/пузыри (0 баллов–отсутствуют, 1–1 элемент, 2–2–3 элемента, 5– >3 элементов или 2 элемента > 2 см, 10– поражение всей области)
Глаза	
Нос	
Слизистая оболочка щёк	
Твердое небо	
Мягкое небо	
Верхние десны	
Нижние десны	
Язык	
Дно полости рта	
Слизистая оболочка губ	
Задняя стенка глотки	
Аногенитальная область	
Сумма баллов по слизистым оболочкам	/120

Сумма баллов по активности патологического процесса:

Сумма баллов по вторичному поражению:

PDAI

общий

Приложение Б

**Балльная оценка тяжести аутоиммунных буллезных заболеваний кожи
(ABSIS, Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score)**

Использование коэффициента отягчения (в зависимости от наиболее выраженных клинических проявлений)	
1,5	Эрозии с экссудацией
1	Сухие эрозии
0,5	Эпителизирующиеся очаги

Поражение кожи (максимальная площадь поражения кожи)	Площадь поражения кожи у пациента	Коэффициент отягчения
Голова и шея (9%)		
Левая рука, включая кисть (9%)		
Правая рука, включая кисть (9%)		
Туловище (передняя и задняя поверхности) (36%)		
Левая нога (18%)		
Правая нога (18%)		
Половые органы (1%)		

(Суммарный показатель поражения кожи: площадь поражения кожи (%) x коэффициент отягчения = 0–150 баллов)

Поражение слизистой оболочки рта:

Распространенность (1 балл – если высыпания присутствуют, 0 баллов – если высыпаний нет):

Слизистая оболочка верхних десен		Язык	
Слизистая оболочка нижних десен		Дно полости рта	
Слизистая оболочка верхней губы		Твердое небо	
Слизистая оболочка нижней губы		Мягкое небо	
Слизистая оболочка левой щеки		Глотка	
Слизистая оболочка правой щеки			

(Суммарный показатель варьирует в пределах 0–11 баллов)

Тяжесть поражения (дискомфорт при приеме пищи/ глотании)

Пища	Класс	Коэффициент дискомфорта	Показатель тяжести поражения
Вода	1		
Суп	2		
Йогурт	3		
Заварной крем	4		
Картофельное пюре/ омлет	5		
Запеченная рыба	6		
Белый хлеб	7		
Яблоко/ свежая морковь	8		
Жареное мясо/ зерновой хлеб	9		

(Показатель тяжести поражения = Класс x Коэффициент дискомфорта = 0–45 баллов)

Пояснение использования коэффициента дискомфорта	
1	Боль/кровотечение присутствуют всегда
0,5	Боль/кровотечение появляются иногда
0	Никогда не возникает вышеуказанных проблем

ABSIS (общий) =

Приложение В

**Оценка активности вульгарной пузырчатки
(PVAS, Pemphigus Vulgaris Activity Score)**

1) PVAS (кожа)

Критерий	Расшифровка	Балл
а) Тип высыпаний	Пузырь – 1 Корка – 0,5 Гиперпигментация – 0	
б) Количество высыпаний	> 20 пузырей (средний диаметр – 1 см) – 2 ≤20 элементов – 1	
в) Распространенность элементов поражения	По 1 баллу при обнаружении элементов в каждой анатомической области	
	Волосистая часть головы	
	Лицо	
	Шея	
	Туловище	
	Конечности (по 1 баллу за каждую)	
д) Симптом Никольского	На интактной коже – 1 Вблизи элементов поражения – 0,5 Отрицательный симптом – 0	
PVAS (кожа)	a(b+c+d)	ИТОГО:

2) PVAS (слизистые оболочки)

Критерий	Расшифровка	Балл
а) Тип высыпаний	Пузырь – 1 Язва (эрозия) – 0,5 Отсутствие поражения – 0	
Количество высыпаний	>2 пузырей – 2 балла 1–2 пузыря – 1 балл	
в) Распространенность элементов поражения	По 1 баллу при обнаружении элементов в каждой анатомической области:	
	Ротовая полость и/или глотка	
	Глаза	
	Верхние дыхательные пути	
	Анальная область	
	Гениталии	
PVAS (слизистые оболочки)	a(b+c)	ИТОГО:

PVAS (общий) = PVAS (кожа) + PVAS (слизистые оболочки) =



Приложение Г

**Дерматологический индекс тяжести заболевания
(DIDS, Dermatology Index of Disease Severity)**

Степень тяжести	Описание
0	Поражения кожи отсутствуют
I	<p align="center">Ограниченная форма заболевания:</p> <ul style="list-style-type: none"> – отсутствуют функциональные нарушения – поражено менее 5% поверхности тела
II	<p align="center">Легкая степень тяжести:</p> <ul style="list-style-type: none"> – отсутствуют функциональные нарушения – поражено более 5%, но менее 20% поверхности тела
III	<p align="center">Умеренная степень тяжести:</p> <ul style="list-style-type: none"> – поражено 20–90% поверхности тела или – поражены ладони, стопы и слизистые оболочки с умеренными функциональными ограничениями вследствие заболевания кожи, ограничения не требуют внешней посторонней помощи
IV	<p align="center">Тяжелая степень заболевания:</p> <ul style="list-style-type: none"> – поражено более 90% поверхности тела или – поражены ладони, стопы и слизистые оболочки с тяжелыми функциональными ограничениями вследствие кожного заболевания, причем эти ограничения требуют посторонней помощи (других людей или механических приспособлений)

Приложение Д

Клинические случаи, демонстрирующие примеры диагностики пузырчатки с использованием клинических и лабораторных методов исследования**Клинический случай 1.**

Больной С., 46 лет, поступил в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России в январе 2014г. с жалобами на высыпания на слизистой оболочке полости рта, коже волосистой части головы.

Анамнез заболевания. Считает себя больным с мая 2011 года, когда впервые после перенесенной пневмонии на коже волосистой части головы в правой височной области появился пузырь размером 0,8 см в диаметре, по поводу чего обратился к дерматологу по месту жительства, диагноз не был установлен. Через месяц на слизистой оболочке твердого и мягкого неба появились мелкие пузырьковые элементы, быстро вскрывающиеся с образованием эрозий, сопровождающиеся болезненностью во время приема пищи. При обращении к стоматологу установлен диагноз афтозного стоматита, назначены полоскания полости рта настоями лечебных трав. В течение 2 лет неоднократно обращался в дерматологам, стоматологам, эффекта от проводимой терапии не было. В августе 2013 года вновь появились высыпания на коже волосистой части головы. В онкологическом диспансере по месту жительства проведено гистологическое исследование биоптата, взятого из очага поражения, по результатам которого выявлен «изъязвляющийся базальноклеточный рак с воспалением в строме». На основании результатов гистологического исследования установлен диагноз базальноклеточного рака, проведено хирургическое иссечение очага в пределах здоровых тканей.

В октябре 2013 года на коже волосистой части головы вновь появились пузыри с прозрачным содержимым, при вскрытии которых обнажались влажные эрозии. В Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. Герцена было проведено повторное гистологическое исследование, данных за базалиому не обнаружено, рекомендована консультация в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России.

Локальный статус. При осмотре кожный процесс носил распространенный характер. На коже волосистой части головы отмечались множественные влажные эрозии розовато-красного цвета, размерами от 1 до 3 см в диаметре, частично покрытые чешуйко-корками желтоватого цвета (Рисунок 50А). Симптом Никольского положительный. В правой височной области имелся рубец длиной 2 см.

На слизистой оболочке верхней губы, в углах рта, твердого и мягкого неба отмечались эрозии красного цвета, диаметром 0,2 – 0,4 см, частично покрытые фибринозным налетом (Рисунок 50Б).

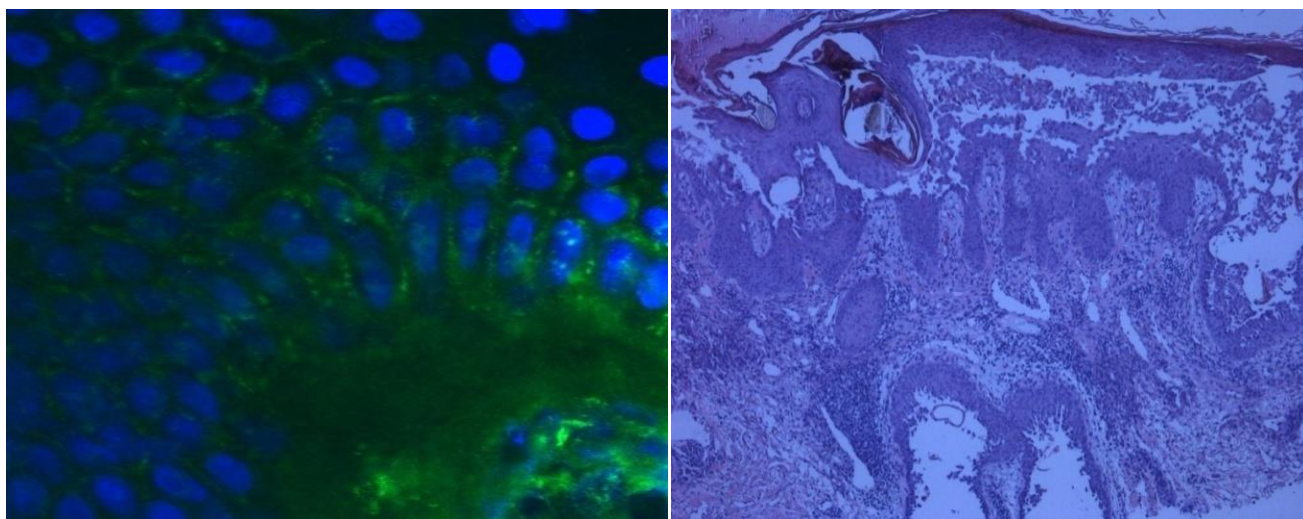


А

Б

Рисунок 50. Высыпания на коже волосистой части головы и слизистой оболочке полости рта у больного С. А– эрозии и корки на коже волосистой части головы. Б – эрозии на слизистой оболочке полости рта

При исследовании в непрямой РИФ в биоптате, взятом из участка неповрежденной кожи, установлено наличие IgG в межклеточных промежутках эпидермиса (Рисунок 55А).



А

Б

Рисунок 51. А – нРИФ с антителами к IgG (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, объектив х 60). Б – Патоморфологическая картина биоптата кожи волосистой части головы больного С., окраска г.-э., х50

Проведена консультация готового гистологического препарата, окрашенного гематоксилин–эозином: в материале фрагменты кожи без подкожно–жирового слоя, в утолщенном эпидермисе наблюдалось формирование

внутриэпидермальных щелей и пузырей, в том числе надбазальных, в полости которых присутствовали пласты акантолитических клеток. На поверхности эпидермиса присутствовали фибриновые корки, пропитанные лейкоцитарным детритом и гемолизированными эритроцитами. Акантолиз наблюдался также в эпителиальной выстилке волосяных фолликулов. Вокруг сосудов дермы – густая гистиолимфоцитарная инфильтрация с примесью плазматических клеток (Рисунок 51Б). Выявленные изменения характерны для акантолитической пузырчатки; признаков опухолевого роста не обнаружено.

ИФА с антителами IgA, IgM, IgG – выявлена фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса (Рисунок 51 А).

Метод ИФА показал наличие аутоантител к десмоглеину 3 типа (антитела к десмоглеину 1 типа не определялись).

Молекулярно–генетический метод (секвенирование 3–го экзона гена *PERP*) выявил наличие гетерозиготного генотипа C/G полиморфизма rs648802.

При цитологическом исследовании обнаружены акантолитические клетки.

Больному установлен диагноз вульгарной пузырчатки с поражением кожи волосистой части головы и слизистой оболочки полости рта.

Таким образом, правильный диагноз был поставлен больному только через 3 года после начала заболевания. Диагноз был установлен на основании клинических данных (наличие множественных влажных эрозий розовато–красного цвета на коже волосистой части головы и на слизистой оболочке полости рта, положительный симптом Никольского) и данных лабораторного обследования: выявление фиксации IgG в межклеточных промежутках эпидермиса, обнаружение патоморфологических признаков, характерных для вульгарной пузырчатки (формирование внутриэпидермальных пузырей, в полости которых присутствовали пласты акантолитических клеток), обнаружение акантолитических клеток при цитологическом исследовании, наличие антител к десмоглеину 3 типа, обнаружение «маркерного», гетерозиготного генотипа C/G полиморфизма rs648802 гена *PERP*) позволили поставить диагноз вульгарной пузырчатки и назначить адекватную терапию.

Клинический случай 2.

Больной Б., 31 года, поступил в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России в феврале 2014г. с жалобами на болезненные высыпания на коже волосистой части головы, туловища, верхних и нижних конечностей.

Анамнез заболевания. Считал себя больным с марта 2013 г., когда впервые отметил появление высыпаний на коже поясничной области в виде сгруппированных пузырей размером до 2 см в диаметр, которые быстро вскрывались с образованием эрозий. Дерматовенерологом по месту жительства был поставлен диагноз "Пиодермия", при проведении лечения

(гипосенсибилизирующие, антибактериальные, наружные средства) отмечался незначительный положительный эффект. В апреле 2013 г. в связи с ухудшением кожного процесса обратился в КДЦ ФГБУ "ГНЦДК" Минздрава России.

Локальный статус. При осмотре патологический кожный процесс носил распространенный характер. На коже волосистой части головы, лица, шеи, спины наблюдались мелкие пузырьки, эрозии размерами 1–3 см в диаметре ярко-розового цвета округлой формы на эритематозном фоне (Рисунок 52 А, Б), симптом Никольского – положительный.

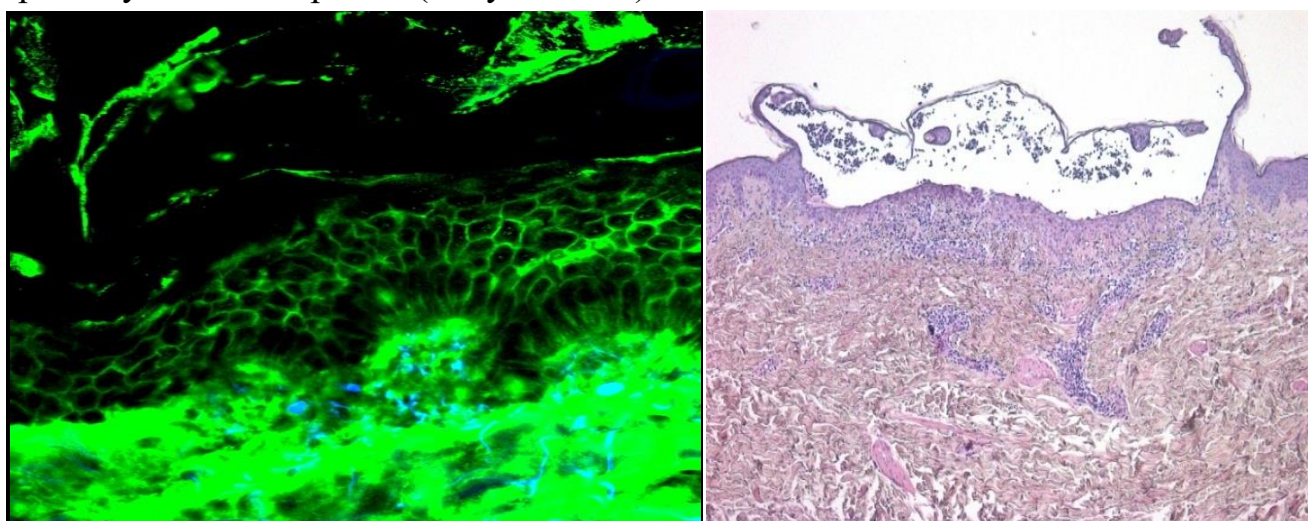


А

Б

Рисунок 52. Высыпания на гладкой коже у больного Б. А – эрозии и корки на коже волосистой части головы. Б – пузырьки, эрозии и корки на коже предплечья

При постановке нРИФ наблюдалась фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса (Рисунок 53А).



А

Б

Рисунок 53. А – РИФ с антителами к IgG (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, объектив x 60) 0. Б – Патоморфологическая картина биоптата больного Б., 31 год, окраска г.-э., x5

При гистологическом исследовании: эпидермис обычной толщины, в центре биоптата – подроговой пузырь, в полости которого присутствуют нейтрофильные лейкоциты, лимфоциты, обнаруживаются единичные акантолитические клетки. Субэпидермально в зоне локализации пузыря – умеренная гистиолимфоцитарная инфильтрация. В прилегающих участках дермы воспалительная реакция не выражена (рис. 53 Б). Заключение: выявленные изменения могут наблюдаться при листовидной пузырчатке.

Молекулярно–генетический метод (секвенирование 3–го экзона гена *PERP*) показал наличие гетерозиготного генотипа C/G полиморфизма rs648802.

При проведении цитологического исследования обнаружены акантолитические клетки.

На основании результатов клинического (распространенные по кожному покрову пузыри, эрозии ярко–розового цвета округлой формы на эритематозном фоне (симптом Никольского – положительный) и лабораторного обследования (фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса при постановке нРИФ, типичная гистологическая картина с наличием пузырей под роговым слоем эпидермиса, в полости которых присутствуют акантолитические клетки; положительный результат на антитела к десмоглеину 1 типа, выявление «маркерного» генотипа C/G полиморфизма rs648802 гена *PERP*) больному поставлен диагноз листовидной пузырчатки.

Таким образом, анализ клинико–морфологических данных с применением широкого спектра лабораторных исследований позволил поставить диагноз листовидной пузырчатки.

Клинический случай 3.

Больной **К.**, 70 лет, поступил в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России в феврале 2014г. с жалобами на высыпания на слизистой оболочке полости рта, сопровождающиеся болезненностью, с предположительными диагнозами: вульгарная пузырчатка? буллезный пемфигоид?

Анамнез заболевания: считает себя больным с марта 2013 года, когда впервые отметил появление пузырьков на слизистой оболочке полости рта. При обращении к врачу–стоматологу в научно–исследовательском институте стоматологии и челюстно–лицевой хирургии был поставлен диагноз доброкачественного пемфигоида слизистой оболочки рта и проведено лечение (антигистаминные, антибактериальные, иммуномодулирующие препараты, топические глюкокортикостероиды) без положительного эффекта. С мая 2013 года по январь 2014 года пациент отмечал периодическое появление пузырей с плотной крышкой на слизистой оболочке полости рта, которые сохранялись не менее 2 суток. В январе 2014 года, в связи сохраняющимися высыпаниями, обратился в ФГБУ "ГНЦДК" Минздрава России.

Локальный статус. Патологический процесс носил ограниченный характер и был представлен *пузырями с плотной крышкой* на слизистой оболочке правой щеки, деснах, мягком и твердом небе размером до 1 см в диаметре. В области нижней десны имелись эрозии красного цвета, частично покрытые фибринозной пленкой (Рисунок 54А, Б).

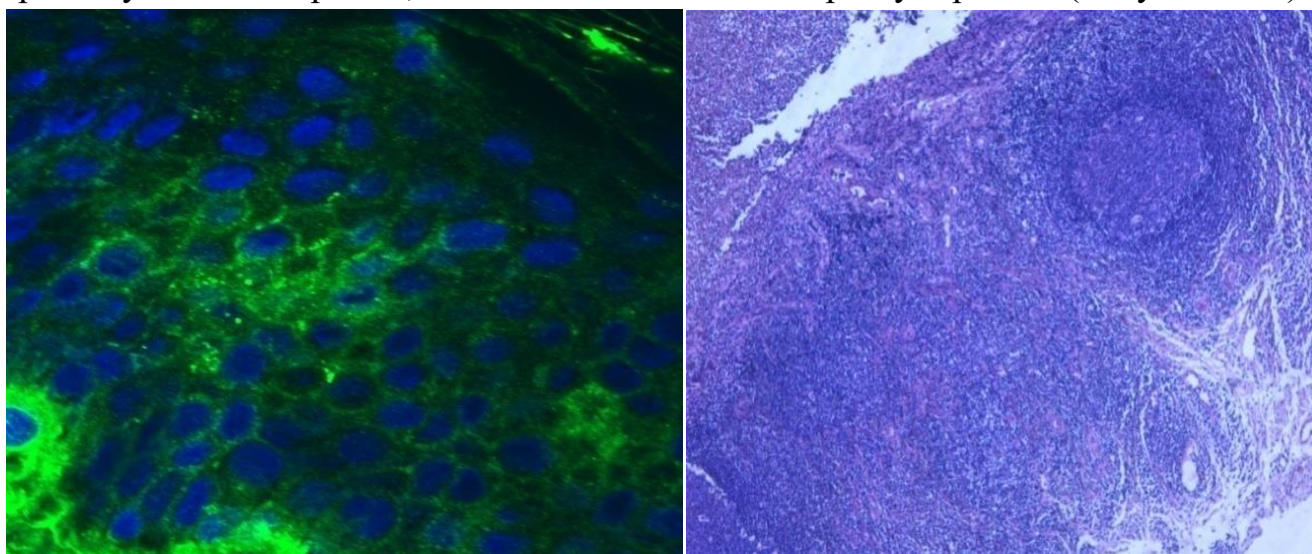


А

Б

Рисунок 54. Эрозии на слизистой оболочке полости рта в области нижней десны у больного К., 70 лет. А – справа, Б – слева

При проведении непрямой РИФ наблюдалась фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса, что могло наблюдаться при пузырьчатке (Рисунок 55А).



А

Б

Рисунок 55. А – нРИФ с антителами к IgG (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, объектив х 60). Б – Патоморфологическая картина биоптата больного К., 70 лет, окраска г.-э., х50

Однако, при гистологическом исследовании в препарате фрагменты соединительнотканной стромы слизистой оболочки полости рта без эпидермиса, на поверхности которых присутствуют некротические массы, пропитанные лейкоцитарным детритом, местами с примесью единичных многоядерных клеток. На фоне ангиоматоза стромы наблюдалась диффузная лимфоидная инфильтрация,

местами с формированием лимфоидных фолликулов, зародышевые центры которых состоят из крупных клеток полигональной формы с дольчатыми ядрами, почти в каждом зародышевом центре присутствовали фигуры митозов. Заключение: признаков пузырьчатки и буллезного пемфигоида не обнаружено; выявленные изменения носят характер ангиолимфоидной гиперплазии с формированием фолликулярных структур (Рисунок 55 Б).

Молекулярно–генетический метод (секвенирование 3–го экзона гена PERP) показал наличие гомозиготного генотипа G/G полиморфизма rs648802 и отсутствие гетерозиготного генотипа C/G полиморфизма rs648802.

ИФА не выявил наличия аутоантител к десмоглеинам 1 и 3 типов.

При проведении цитологического исследования акантолитические клетки не обнаружены.

На основании результатов лабораторного обследования (отрицательные результаты цитологического исследования; результаты гистологического исследования, не характерные для вульгарной пузырьчатки, отрицательные результаты обнаружения антител к десмоглеинам 1 и 3 типов, отрицательный результат исследования на наличие «маркерного» генотипа C/G полиморфизма rs648802 гена PERP) диагноз пузырьчатки был отвергнут, несмотря на положительные результаты тестирования в нРИФ. Больному предположительно был поставлен диагноз "Ангиолимфоидная гиперплазия слизистой оболочки полости рта". Пациент направлен на консультацию в Гематологический научный центр РАМН, где было подтверждено наличие системного лимфопролиферативного процесса.

Благодарность

Считаю своим долгом выразить сердечную благодарность и глубокую признательность:

- Академику РАН Анне Алексеевне Кубановой за предоставленную возможность выполнить работу и представить ее к защите на столь авторитетный Диссертационный Совет;*
- Научному консультанту и Учителю, член–корреспонденту РАН, д.м.н., профессору Алексею Алексеевичу Кубанову;*
- всем своим коллегам – сотрудникам ГНЦДК за участие, помощь, обсуждение результатов, полученных в ходе выполнения работы.*

Без Вашей помощи настоящая работа не могла бы быть.