

УДК 616.527-092:612.017.1

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АУТОИММУННОЙ ПУЗЫРЧАТКИ В СТАДИИ КЛИНИЧЕСКОЙ РЕМИССИИ

^{1,2}Махнева Н.В., ¹Давиденко Е.Б., ¹Белецкая Л.В.

¹Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии
Департамента здравоохранения города Москвы;

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского, Москва, e-mail: makhneva@mail.ru

Аутоиммунная пузырчатка – это группа аутоиммунных буллезных заболеваний с вовлечением в патологический процесс органов, покрытых или выстланных многослойным плоским эпителием. Патогенетическая роль принадлежит специфическим аутоантителам, направленным против антигенов-мишеней десмосомального аппарата (межклеточная связывающая субстанция) эпидермиса. Антитела аутоиммунной пузырчатки обнаруживаются у больных на всем протяжении развития патологического процесса. Циркулирующие аутоантитела и фиксированные иммунные комплексы выявляются у больных и в стадии клинической ремиссии на фоне поддерживающей дозы глюкокортикостероидов. Вопрос о том, что же способствует поддержанию аутоиммунного процесса, остается до сих пор открытым. С помощью прямого и непрямого методов иммунофлюоресценции были обследованы 11 больных аутоиммунной пузырчаткой в стадии клинической ремиссии. Результаты иммунологического исследования больных продемонстрировали поликлональность гуморального ответа с наличием широкого спектра аутоантител. Изучение антигенов-мишеней продемонстрировало присутствие специфических IgG-аутоантител с преобладанием IgG4, направленных преимущественно к антигенам десмосомального аппарата базального слоя эпидермиса, что свидетельствует о наличии в этой структуре постоянно присутствующего фактора, способствующего постоянной выработке аутоантител.

Ключевые слова: аутоиммунная пузырчатка, патогенез, иммуноглобулин G, субклассы иммуноглобулина G, антигены-мишени

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF AUTOIMMUNE PEMPHIGUS IN CLINICAL REMISSION

^{1,2}Makhneva N.V., ¹Davidenko E.B., ¹Beletskaya L.V.

¹Moscow Research and Practical Center of Dermatovenerology and Cosmetology;

²Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, e-mail: makhneva@mail.ru

Autoimmune pemphigus is a group of autoimmune bullous diseases involving in pathological process of organs, coated or lined stratified squamous epithelium. The pathogenetic role in this disease belongs to specific autoantibodies directed against target antigens of desmosomal unit (intercellular binding substance) of the epidermis. Autoimmune pemphigus antibodies are detected in patients throughout the whole development of the pathological process. Circulating autoantibody and fixed immune complexes are detected in patients in clinical remission on the background of the maintenance dose of glucocorticosteroids. The question of what contributes to the maintenance of the autoimmune process remains still open. Using the direct and indirect immunofluorescence methods have studied 11 patients with autoimmune pemphigus in clinical remission. The results of immunological study of patients demonstrated antibody response polyclonality with the presence of a wide spectrum of autoantibodies. The study of target antigens demonstrated the presence of specific IgG-antibodies with a predominance of IgG4 directed mainly to antigens of desmosomal units of the epidermis basal layer. This indicate that there is the presence of a factor contributing to the constant production of autoantibodies in this structure of the epidermis.

Keywords: autoimmune pemphigus, pathogenesis, immunoglobulin G, immunoglobulin G subclasses, target antigens

Аутоиммунная пузырчатка – это группа аутоиммунных буллезных заболеваний с вовлечением в патологический процесс органов, покрытых или выстланных многослойным плоским эпителием. Патогенетическая роль принадлежит специфическим аутоантителам, направленным против антигенов-мишеней десмосомального аппарата (межклеточная связывающая субстанция, МСС) эпидермиса [6, 7]. Для подавления иммунопатологического процесса применяется иммуносупрессивная терапия пожизненно [8, 11]. По многолетним клиническим наблюдениям полная отмена глюкокортикостероида, даже после длительной клинической ремиссии на поддерживающей его дозе,

всегда приводит к обострению (возобновлению) аутоиммунной пузырчатки. Причина, способствующая сохранению аутоиммунного процесса, пока не известна и требует продолжения детального изучения патогенеза данного буллезного дерматоза.

Цель исследования – определение специфических аутоантител и фиксированных иммунных комплексов у больных аутоиммунной пузырчаткой в стадии ее клинической ремиссии.

Материалы и методы исследования

Были изучены образцы сывороток крови и биоптатов клинически интактных участков кожи 11 больных аутоиммунной пузырчаткой в стадии

клинической ремиссии с использованием прямого и непрямого методов иммунофлюоресценции. Диагноз каждого больного ранее был подтвержден прямым методом иммунофлюоресценции (выявлена фиксация IgG в межклеточных пространствах эпидермиса).

Среди обследуемых больных, страдающих аутоиммунной пузырчаткой, было 8 женщин и 3 мужчин в возрасте от 26 до 73 лет (средний возраст 56 ± 13 лет). Продолжительность болезни составляла от 3 до 16 лет, длительность клинической ремиссии – от полугода до 8 лет (в среднем $3,15 \pm 2,5$ года). Поддерживающая доза глюкокортикостероидов носила индивидуальный характер, от 5 до 20 мг/сутки в перерасчете на преднизолон.

При осмотре клиническая картина пузырчатки в стадии клинической ремиссии представлена пятнами гиперпигментации на месте разрешившихся высыпаний и атрофией кожи. Больные обращали внимание на слабую прочность кожного покрова, неустойчивость ее к механическим повреждениям и длительное заживление раневых поверхностей с формированием рубцов.

С целью выявления фиксированных иммунных комплексов в клинически интактных участках кожи обследуемых больных применяли классический прямой метод иммунофлюоресценции [1, 4, 5] с использованием моноспецифических люминесцирующих сывороток против основных классов иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM) (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. М.Ф. Гамалеи АМН РФ; ИМТЕК, Москва), люминесцирующих сывороток против C3 компонента комплемента (CHEMICON, Австралия), фибриноген/фибрина (DAKO CYTOMATION, Дания) и моноклональных антител к субклассам IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (SIGMA-ALDRICH, USA).

В случае отсутствия или слабой специфической иммуногистохимической реакции в МСС эпидермиса с целью выявления растворимых иммунных комплексов использовали модифицированный прямой метод иммунофлюоресценции, сущность которого заключается в предварительной обработке криостатных срезов стабилизирующим 40% раствором этанола в течение 1 минуты [2, 4, 5]. Далее партии срезов обрабатывали аналогично классическому прямому методу иммунофлюоресценции.

С целью выявления циркулирующих IgG-аутоантител в сыворотке крови обследуемых больных использовали непрямой метод иммунофлюоресценции [1, 3, 4] с применением люминесцирующей сыворотки против IgG (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. М.Ф. Гамалеи АМН РФ). В случае выявления циркулирующих специфических IgG-аутоантител к МСС эпидермиса, сыворотки обследованных пациентов дополнительно были исследованы с использованием моноклональных антител к субклассам IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (SIGMA-ALDRICH, USA). В качестве субстрата использовали кожу телянка.

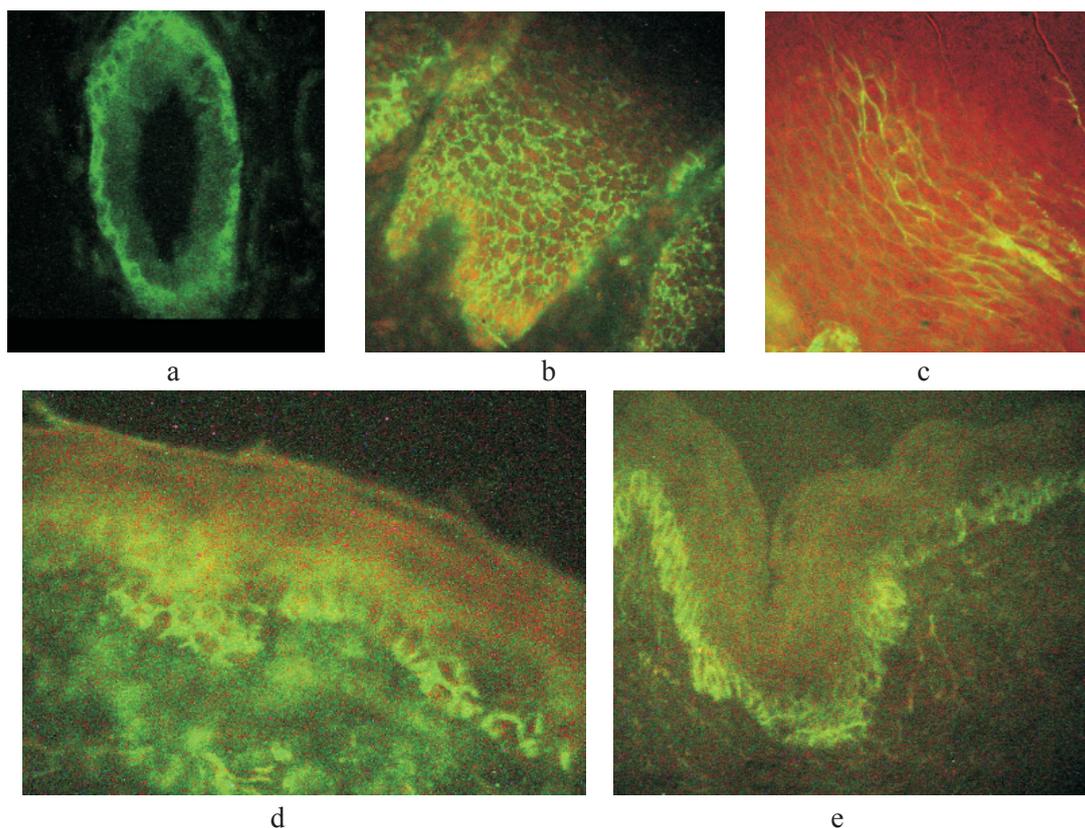
Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании в сыворотке крови у 7 (63,6%) из 11 обследованных больных выявлены специфические IgG-аутоантитела в титрах от 1:5 до 1:320. Мишенями во всех семи (100%) случаях были антигены МСС базального слоя эпидермиса и эпителия волося-

ных фолликулов (рисунок, а). У двух больных дополнительно антигеном-мишенью служила МСС шиповатого слоя с более выраженной иммунологической реакцией в МСС базального слоя эпидермиса. Кроме того, у всех обследованных больных в сыворотке крови выявлены сопутствующие антитела к различным структурам ткани: к поверхностным белкам недифференцированных и дифференцированных кератиноцитов, различным компонентам базальной мембраны эпидермиса, дермо-эпидермального соединения и ретикулярного слоя дермы, ядрам клеточных элементов и стенке сосудов дермы. При этом титр циркулирующих аутоантител к антигенам разных тканевых структур больных составлял от 1:5 до 1:1280, т.е. выше уровня естественных антител. Наличие широкого спектра аутоантител при аутоиммунной пузырчатке еще раз подтверждает серьезность этой патологии.

Субклассовая характеристика циркулирующих IgG-аутоантител продемонстрировала их поликлональность с участием IgG1-, IgG2-, IgG3- и IgG4-аутоантител к различным структурам многослойного плоского эпителия в 71,4; 100; 85,7; 57,1% случаев соответственно. При этом МСС (десмосомальный аппарат) базального и шиповатого слоев эпидермиса служила мишенью для циркулирующих IgG1-, IgG2-, IgG3- и IgG4-аутоантител в 20; 42,9; 16,7; 100% случаев соответственно (рисунок, б). Следует отметить, что для IgG2-аутоантител во всех (100%) случаях дополнительно мишенью служила и МСС зернистого слоя эпидермиса (рисунок, в). Это совпадает с локализацией сывороточного C3 компонента комплемента, что свидетельствует о связи комплемента с неполным иммунным комплексом и его участии в качестве дополнительного фактора, в частности, при переходе одной клинической формы пузырчатки в другую [5]. Кроме того, преобладание IgG2/IgG4-антител свидетельствует о хронической антигенной стимуляции с участием системы комплемента, активируемым классическим путем.

В клинически интактных участках кожи 10 обследуемых больных аутоиммунной пузырчаткой в стадии клинической ремиссии в 90% случаев выявлен фиксированный IgG в МСС базального и шиповатого слоев эпидермиса как в растворимой (50%), так и в нерастворимой (40%) формах с наиболее выраженной иммуногистохимической реакцией в МСС базального слоя эпидермиса (рисунок, д). При этом в данных структурах ткани присутствовало от одного до трех субклассов IgG (IgG1 – 22,2%, IgG2 – 11,1%, IgG4 – 88,9%) без участия IgG3 (рисунок, е).



Иммуногистохимическое исследование материала больных аутоиммунной пузырчаткой в стадии клинической ремиссии. x 400:
a-c – криостатные срезы кожи телянка. Обработка сывороткой больной аутоиммунной пузырчаткой. Непрямой метод иммунофлюоресценции: a – циркулирующие IgG-аутоантитела к МСС базального слоя многослойного плоского эпителия волосяного фолликула; b – циркулирующие IgG4-аутоантитела к МСС базального и шиповатого слоев эпидермиса; c – циркулирующие IgG2-аутоантитела к МСС зернистого слоя эпидермиса; d-e – криостатные срезы кожи больных аутоиммунной пузырчаткой: d – обработка меченой сывороткой против иммуноглобулина класса G человека. Модифицированный прямой метод иммунофлюоресценции. Фиксация IgG в МСС базального и шиповатого слоев эпидермиса с выраженной иммунофлюоресцентной реакцией в базальном слое; e – обработка моноклональными антителами к IgG4. Классический прямой метод иммунофлюоресценции. Фиксация IgG4 в МСС преимущественно базального слоя эпидермиса

Обращает на себя внимание факт, что в клинически интактных участках кожи обследованных больных антигеном-мишенью для фиксированного IgG всегда служила межклеточная связывающая субстанция базального слоя эпидермиса. В рутинной практике чаще всего при изучении иммуногистохимической картины аутоиммунной пузырчатки обращают внимание на МСС шиповатого и зернистого слоев эпидермиса. Это связано с тем, что в активный период иммунопатологического процесса отмечается наиболее выраженная иммунофлюоресцентная реакция связывания аутоантител и фиксации иммунных комплексов с антигенами-мишенями МСС многослойного плоского эпителия именно шиповатого и зернистого слоев эпидермиса. Тем не менее данные нашей экспериментальной работы продемонстрировали присутствие

специфических IgG-аутоантител к антигенам десмосомального аппарата базального слоя эпидермиса, что свидетельствует о наличии в этой структуре постоянно присутствующего фактора, способствующего выработке аутоантител.

Еще в 60-х годах XX столетия экспериментально путем иммунизации животных (кроликов) эпителиальным антигеном эпителия пищевода продемонстрирована продукция специфических аутоантител к антигенам межклеточной связывающей субстанции либо только базального слоя, либо всех слоев многослойного плоского эпителия [10]. In vitro эти антитела были идентичны аутоантителам, присутствующим в сыворотке больных аутоиммунной пузырчаткой. При этом in vivo в коже и пищеводе иммунизированных кроликов не происходило связывания антиэпителиальных

антител [9]. Эти данные свидетельствуют о существовании дермо-эпидермального барьера, способного предупреждать разрушительное действие этих антиэпителиальных антител в экспериментах *in vivo*.

Подобные исследования и наши наблюдения наводят на мысль о существовании ключевой роли десмосомального аппарата базального слоя эпидермиса в развитии аутоиммунной пузырчатки. По-видимому, в данной структуре эпидермиса присутствует фактор, который является причиной поддержания и активации аутоиммунного процесса с постоянной выработкой аутоантител. При этом проводимая массивная иммуносупрессивная терапия способствует только подавлению иммунопатологического процесса, но не устранению фактора тканевой структуры.

Заключение

Результаты иммунологического исследования аутоиммунной пузырчатки в стадии клинической ремиссии продемонстрировали поликлональность гуморального ответа с наличием широкого спектра аутоантител. Доминирующую патогенетическую роль играют IgG2/IgG4-аутоантитела, что свидетельствует о хронической антигенной стимуляции преимущественно гликопротеиновой природы. Мишенью для IgG2-аутоантител являются антигены десмосомального аппарата зернистого слоя эпидермиса, а для IgG4-аутоантител – антигены десмосомального аппарата базального и шиповатого слоев эпидермиса. При этом десмосомальный аппарат базального и шиповатого слоев эпидермиса служит антигеном-мишенью и для фиксированного IgG с преобладанием IgG4.

Выявленный факт участия десмосомального аппарата базального слоя эпителия при аутоиммунной пузырчатке требует молекулярно-биологического подхода в изучении данной структуры ткани. Это позволит приблизиться к пониманию «тонких» механизмов развития аутоиммунного буллезного дерматоза, тем самым создавая условия для разработки новых патогенетически обоснованных терапевтических схем лечения. Приближаясь к генетическому уровню (выявление и оценка экспрессии генов), задачей современной медицины является вмешательство в геном или эпигеном с целью возможности коррекции синтеза того или иного молекулярно-биологического соединения. И эта проблема будущего.

Список литературы

1. Белецкая Л.В., Данилова Т.А. Метод иммунофлюоресценции в иммунопатологии // Иммунолюминесценция в медицине / под ред. Е.Н. Левиной. – М.: Медицина, 1977. – С. 145–183.
2. Белецкая Л.В., Махнева Н.В. Выявление растворимых иммунных комплексов в тканях биопсии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1995. – № 11. – С. 545–547.

3. Белецкая Л.В., Махнева Н.В. Меченые антитела в нормальной и патологической морфологии (атлас). – М.: МНИПИ, 2000. – 108 с.

4. Махнева Н.В. Клинические и патогенетические аспекты иммуноморфологических исследований материала больных пузырчаткой и другими буллезными дерматозами: автореф. дис. ... д-ра мед. наук // специальности 14.00.11 – Кожные и венерические болезни, 14.00.36 – Аллергология и иммунология. – М., 1997. – 183 с.

5. Махнева Н.В., Белецкая Л.В. Иммунопатологические аспекты аутоиммунных буллезных дерматозов // *Palmarium academic publishing*. – 2012. – 408 с.

6. Потекаев Н.С. Дерматовенерология – синтез науки и практики (избранные труды). – М.: Медицина, 2004. – 560 с.

7. Свирщевская Е.В., Матушевская Е.В. Иммунопатогенез и лечение пемфигуса // Русский медицинский журнал. – 1998. – № 6. – С. 275–378.

8. Теплюк Н.П. Совершенствование глюкокортикостероидной терапии истинной акантолитической пузырчатки с учетом оценки функционального состояния системы гипофиз-надпочечники и цитокинового профиля: автореф. дис. ... д-ра мед. наук // специальности 14.01.10 – Кожные и венерические болезни. – М., 2010. – 43 с.

9. Grob P.J., Inderbitzin T. M. Experimental production in rabbits of antiepithelial autoantibodies // *J. Invest. Dermatol.* – 1967. – Vol.49. – № 6. – P. 637–641.

10. Inderbitzin T.M., Grob P.J. Acantholysis in pemphigus, an immunologic phenomenon // *Int. Arch. Allergy*. – 1968. – Vol. 33. – P. 576–582.

11. Martin L.K., Murrell D.F. Treatment of pemphigus: the need for more evidence // *Arch. Dermatol.* – 2008. – Vol. 144. – № 1. – P. 100–101.

References

1. Beletskaia L.V., Danilova T.A. Metod immunoflyuorescent-sii v immunopatologii / V kn. Immunolyuminestsentsiya v meditsine // Pod red. Levinoy E.N. Moskva, «Meditsina». 1977. pp. 145–183.
2. Beletskaia L.V., Makhneva N.V. Vyavlenie rastvorimykh immunnykh kompleksov v tkanyakh biopsii // *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* 1995. no. 11. pp. 545–547.
3. Beletskaia L.V., Makhneva N.V. Mechenye antitela v normalnoy i patologicheskoy morfologiya (atlas) // Moskva, MNIPI. 2000. 108 p.
4. Makhneva N.V. Klinicheskie i patogeneticheskie aspekty immunomorfologicheskikh issledovaniy materiala bolnykh puzyrchatkoy i drugimi bulleznymi dermatozami // *Avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchenoy stepeni doktora meditsinskikh nauk po spetsialnosti 14.00.11 Kozhnye i venericheskie bolezni*, 14.00.36. Allrgologiya i immunologiya. Moskva. 1997. 183 p.
5. Makhneva N.V., Beletskaia L.V. Immunopatologichesk- ie aspekty autoimminnykh bulleznnykh dermatozov // *Palmarium academic publishing*. 2012. 408 p.
6. Potekaev N.S. Dermatovenerologiya sintez nauki i praktiki (izbrannyye Trudy) // M.: Meditsyna. 2004. 560 p.
7. Svirshevskaya E.V., Matushevskaya E.V. Immunopatogenez i lechenie pemfigusa // *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 1998. no. 6. 275–378.
8. Teplyuk N.P. Covershenstvovanie glyukokortikosteroidnoy terapii istinnoy akantoliticheskoy puzyrchatki s uchetoм otsenki funktsionalnogo sostoyaniya sistemy gipofiz-nadpochechniki i tsitokinovogo profilya // *Avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchenoy stepeni doktora meditsinskikh nauk po spetsialnosti 14.01.10 Kozhnye i venericheskie bolezni*. Moskva. 2010. 43 p.
9. Grob P.J., Inderbitzin T. M. Experimental production in rabbits of antiepithelial autoantibodies // *J. Invest. Dermatol.* 1967. Vol.49. no. 6. pp. 637–641.
10. Inderbitzin T.M., Grob P.J. Acantholysis in pemphigus, an immunologic phenomenon // *Int. Arch. Allergy*. 1968. Vol. 33. pp. 576–582.
11. Martin L.K., Murrell D.F. Treatment of pemphigus: the need for more evidence // *Arch. Dermatol.* 2008. Vol. 144. no. 1. pp. 100–101.

Рецензенты:

Матушевская Е.В., д.м.н., профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии, ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства», г. Москва;

Авдеева Ж.И., д.м.н., профессор, главный эксперт Центра экспертизы и контроля иммунобиологических препаратов, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 18.02.2014.