



# Разработка схемы лечения больных аутоиммунной пузырчаткой азатиоприном при стероидной резистентности на основании исследования ее молекулярных механизмов на пострецепторном уровне

Олисова О.Ю.<sup>1</sup> • Шимановский Н.Л.<sup>2</sup> • Духанин А.С.<sup>2</sup> • Теплюк Н.П.<sup>1</sup> • Лепехова А.А.<sup>1</sup>

**Актуальность.** Аутоиммунная пузырчатка – самое тяжелое заболевание кожи и слизистых оболочек, при котором образуются аутоантитела иммуноглобулина класса G к десмоглеинам 1 и 3. Применение системных глюкокортикостероидов позволяет купировать активные проявления пузырчатки. Однако у некоторых больных не наблюдается выраженного положительного терапевтического эффекта при лечении системными глюкокортикостероидами в качестве монотерапии, а также в комбинации с иммунодепрессантами и цитостатиками.

**Цель** – разработка схемы лечения больных аутоиммунной пузырчаткой со стероидной резистентностью с использованием азатиоприна.

**Материал и методы.** На первом этапе для разработки схемы лечения стероидрезистентных больных пузырчаткой проводился ретроспективный анализ архивных клинических данных 23 больных, проходивших лечение с 2000 по 2014 г. и получавших наряду с основной терапией системными глюкокортикостероидами дополнительную терапию азатиоприном. На втором этапе были обследованы и по разработанной схеме комплексной терапии азатиоприном и системными глюкокортикостероидами пролечены в период с 2013 по 2015 г. 24 пациента с аутоиммунной пузырчаткой,

из них 14 стероидрезистентных и 10 стероидчувствительных (контрольная группа). Для определения молекулярных механизмов стероидной резистентности на пострецепторном уровне (влияние преднизолона на включение <sup>3</sup>H-уридина в мРНК лимфоцитов, динамика внутриклеточного содержания ядерного фактора транскрипции NF-κB) использовали полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени, радиоизотопный метод и жидкостную сцинтилляционную радиометрию. **Результаты.** На первом этапе разработана схема лечения больных со стероидрезистентной формой аутоиммунной пузырчатки с применением азатиоприна. Начальная доза азатиоприна составила 150 мг/сут. При достижении положительного эффекта доза препарата снижалась до 100 мг/сут. После снижения дозы системных глюкокортикостероидов до 20 мг/сут дозу азатиоприна снижали до 50 мг/сут (стероидрезистентные больные получали дозу азатиоприна 50 мг/сут от 3 месяцев до 2,5 года). При изучении молекулярных механизмов стероидной резистентности на втором этапе исследования было выявлено, что у 28% стероидрезистентных пациентов при воздействии преднизолона на включение <sup>3</sup>H-уридина в мРНК лимфоцитов обнаруживалось пониженное включение <sup>3</sup>H-уридина, что

выражалось в увеличении синтеза тотальной мРНК в лимфоцитах (интервал значений 68,67–78,35%,  $p < 0,05$ ). У всех стероидрезистентных пациентов ( $n=14$ ) выявлялось увеличение уровня экспрессии гена NF-κB в лимфоцитах по сравнению с контролем (интервал значений 88,8–98,61 и 65,39–86,17% соответственно,  $p < 0,05$ ). В результате сочетанной терапии системными глюкокортикостероидами и азатиоприном у стероидрезистентных больных установлено снижение внутриклеточного уровня экспрессии гена NF-κB ( $p < 0,01$ ), что лежит в основе стероидсберегающего эффекта азатиоприна. **Заключение.** Показано статистически значимое угнетение экспрессии гена NF-κB при изначально повышенных его показателях у больных аутоиммунной пузырчаткой до назначения комбинированной терапии. Наличие такого стероидсберегающего действия азатиоприна позволяет эффективно использовать препарат в случаях стероидрезистентной пузырчатки.

**Ключевые слова:** аутоиммунная пузырчатка, стероидная резистентность, NF-κB, <sup>3</sup>H-уридин, азатиоприн

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-1-6-12



**А**утоиммунная пузырчатка – тяжелое аутоиммунное заболевание, поражающее кожу и/или слизистые оболочки, характеризующееся образованием аутоантител иммуноглобулина класса G к десмоглеинам 1 и 3. Эти белки относятся к суперсемейству кальцийзависимых молекул клеточной адгезии, или кадгеринам, которые участвуют главным образом в межклеточных взаимодействиях, способствуя сохранению формы клеток [1]. Уровень акантолиза при различных формах аутоиммунной пузырчатки объясняется расположением десмоглеинов 1 и 3 в эпидермисе кожи и эпителии слизистой оболочки полости рта [2].

Сегодня при лечении аутоиммунной пузырчатки в качестве основных лекарственных средств применяют системные глюкокортикостероиды (СГК), для назначения которых не существует противопоказаний. Однако отмечается учащение случаев резистентности к терапии СГК [3, 4]. В Европейском руководстве по лечению дерматологических болезней (2015) предлагается начинать лечение вульгарной пузырчатки сразу с комбинации больших доз СГК (дефлазакорт в суточной дозе 120–150 мг) и азатиоприна (100 мг/сут). Этой схемы придерживаются до регресса всех активных очагов, в среднем 4 недели. Далее рекомендуется проводить снижение дозы дефлазакурта на фоне азатиоприна 100 мг/сут, а затем медленно и постепенно снижать дозу азатиоприна до 45 мг/сут. Азатиоприн (в отсутствие противопоказаний) назначают постоянно на срок до 2 лет [5]. Подчеркнем: представленная схема лечения азатиоприном применяется только при вульгарной пузырчатке. При этом в рекомендациях не предусмотрена адаптация схемы комбинированной терапии в зависимости от особенностей конкретного больного и в случае выявления терапевтических и биохимических критериев стероидной резистентности.

В этой связи целью нашего исследования стала разработка схемы лечения больных аутоиммунной пузырчаткой со стероидной резистентностью азатиоприном на основании изучения ее механизмов на пострецепторном молекулярном уровне.

## Материал и методы

На первом этапе для разработки схемы лечения стероидрезистентных больных аутоиммунной пузырчаткой проводился ретроспективный анализ архивных клинических данных 23 пациентов, проходивших лечение в клинике кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова

ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России с 2000 по 2014 г. и получавших наряду с основной терапией СГК дополнительную терапию азатиоприном. Диагноз аутоиммунной пузырчатки подтверждался цитологическим, гистологическим и иммуноморфологическим методами исследования. Истории болезней отбирались методом сплошной выборки. Лечение СГК основывалось на схемах терапии этого заболевания, разработанных на кафедре кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России [6, 7]. На основании выделенных профессором Н.П. Теплюк клинических критериев стероидной резистентности (отсутствие положительной клинической динамики на фоне высоких доз СГК при монотерапии, препятствующее снижению дозы гормонов, а также частые и упорно протекающие рецидивы) пациенты были разделены на 2 группы: одну составили 17 стероидрезистентных больных, другую – 6 стероидчувствительных (архивные данные) [7, 8]. Анализ полученных клинических данных проводили с помощью программы SPSS 2; вычисляли средние значения по группам стероидрезистентных и стероидчувствительных больных.

На втором этапе для определения молекулярных механизмов стероидной резистентности на пострецепторном уровне при проведении комплексной терапии СГК и азатиоприном были обследованы и пролечены находившиеся под непосредственным наблюдением в клинике кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России в период с 2013 по 2015 г. 24 пациента с аутоиммунной пузырчаткой (возраст – от 39 до 79 лет), из них 14 стероидрезистентных и 10 стероидчувствительных больных (контрольная группа). По возрасту и полу группы оказались сопоставимыми. Больные отбирались методом сплошной выборки. Пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании, критерием исключения служило несоблюдение назначенной схемы лечения. Методы клинко-инструментального обследования включали: осмотр, сбор анамнеза; у пациентов из локтевой вены проводился забор периферической крови, из которой были выделены лимфоциты.

У всех пациентов диагноз аутоиммунной пузырчатки был подтвержден цитологическим, гистологическим и иммуноморфологическим методами. В процессе обследования и лечения

**Олисова Ольга Юрьевна** – д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова лечебного факультета<sup>1</sup>

**Шимановский Николай Львович** – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии им. П.В. Сергеева<sup>2</sup>

**Духанин Александр Сергеевич** – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. П.В. Сергеева<sup>2</sup>

**Теплюк Наталия Павловна** – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова лечебного факультета<sup>1</sup>

**Лепехова Анфиса Александровна** – канд. мед. наук, ассистент кафедры кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова лечебного факультета<sup>1</sup>  
 ☒ 119992, г. Москва, ул. Большая Пироговская, 4/1, Российская Федерация.  
 Тел.: +7 (903) 543 30 74.  
 E-mail: anfisa.lepehova@yandex.ru

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, Российская Федерация

пациенты в зависимости от клинических проявлений и осложнений терапии СГК были консультированы терапевтом, неврологом, эндокринологом и другими специалистами. С целью исключения паранеопластической природы аутоиммунной пузырчатки всем пациентам проведено обследование по следующей программе: рентгенологическое исследование легких; ультразвуковое исследование органов брюшной полости, почек, щитовидной железы, органов малого таза; гастроскопия или рентгенологическое исследование желудка; ректороманоскопия; маммография; выявление в сыворотке крови онкомаркеров.

Исследование молекулярных механизмов стероидной резистентности на пострецепторном уровне включало выявление экспрессии транскрипционного фактора NF-κB (англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, а также оценку интенсивности биосинтеза матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) в лимфоцитах с помощью радиоизотопного метода и жидкостной сцинтилляционной радиометрии. ПЦР в режиме реального времени проводили на приборе IQ5 Cycler (BioRad, США), позволяющем наблюдать изменение уровня флуоресценции в реакционной смеси в течение хода реакции и таким образом отслеживать динамику накопления ампликонов. С полученной комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислотой (кДНК) проводили реакцию обратной транскрипции. Уровень мРНК анализируемого гена выравнивали по отношению к усредненным данным амплификации генов неизменного уровня экспрессии (англ. house keeping genes, гены домашнего хозяйства) GAPDH (англ. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа). При использовании математической модели анализа определялась флуоресценция в пороговой (англ. threshold) точке (Ст-значение порогового цикла) для данного гена. Стероидная резистентность определялась как точка, где подъем кривой флуоресценции ампликонов исследуемого гена значительно выше, чем фоновое свечение. Количественная оценка всегда осуществлялась в экспоненциальную фазу, так как оценка в фазу плато считается неэффективной из-за нарастающего истощения компонентов реакционной смеси.

Интенсивность биосинтеза мРНК в лимфоцитах оценивали по включению  $^3\text{H}$ -клеток в РНК клеток по следующей методике. К 0,5 мл

клеточной суспензии ( $15 \times 10^6$  кл/мл) лимфоцитов добавляли 20 мкл раствора гормона (конечная концентрация преднизолона в пробах  $10^{-6}$  М), после чего клетки инкубировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 4 часов. В контрольных пробах клетки инкубировали без стероида. Через 24 часа в каждую пробирку вносили по 2 мКи  $^3\text{H}$ -уридина в объеме 10 мкл (удельная радиоактивность  $^3\text{H}$ -уридина 5 мКи/ммоль в 1 мл). Пробы инкубировали еще 1 час, затем пробирки охлаждали до  $4^\circ\text{C}$  и центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. К осадку добавляли 3 мл 5% раствора предварительно охлажденной до  $4^\circ\text{C}$  трихлоруксусной кислоты. Полученную суспензию центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин и дважды отмывали в 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты (образующийся в результате материал состоит из преципитированной  $^3\text{H}$ -уридин-РНК). Полученный после центрифугирования осадок переносили во флаконы для определения содержания меченого уридина методом жидкостной радиометрии.

В основе метода жидкостной радиометрии лежит свойство бета-частиц вызывать сцинтилляцию веществ в специальных средах. Это дает возможность с большой эффективностью регистрировать бета-излучение, обладающее малой энергией. Для регистрации радиоактивности образец на фильтре помещали в 5 мл сцинтилляционной жидкости, имеющей следующий состав: РРО (2,5-дифенилоксазол) – 4 г, РОРОР (1,4-бис-2-метил-5-фенилоксазолбензол) – 0,4 г, толуол – до 1 литра. Смесь тщательно перемешивали, радиоактивность образца регистрировали на жидкостном сцинтилляционном радиометре Tri-Carb 3110 (PerkinElmer, США). Эффективность счета для  $^3\text{H}$  составляла 50–55%. Радиоактивность измеряли в количестве распадов в минуту (англ. decompositions per minute – dpm). Результаты исследования были получены на кафедре молекулярной фармакологии и радиобиологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы SPSS 2; вычисляли средние значения по нескольким измерениям, по группе стероидчувствительных пациентов находили медиану и интервал значений. Для определения статистически значимых различий между группами больных использовался интервал значений по стероидчувствительным пациентам. Данные по группе стероидрезистентных больных, которые не входили в интервал значений,



проверялись на статистическую значимость ( $p < 0,05$ ) межгрупповых различий с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни для небольшой выборки.

## Результаты

В рамках первого этапа исследования для определения суточной дозы СГК, при которой был назначен азатиоприн, а также длительности приема суточных доз азатиоприна в первый год от начала лечения проводился ретроспективный анализ клинических данных 23 больных аутоиммунной пузырчаткой, получавших терапию СГК и азатиоприном. При стероидной резистентности ( $n = 17$ ) азатиоприн назначался на фоне максимальной дозы СГК, в случае обострения заболевания – средней дозы СГК. Начальная доза азатиоприна у всех резистентных к СГК больных составила 150 мг/сут (табл).

Длительность приема суточных доз азатиоприна 150 и 100 мг была одинаковой в группе как стероидрезистентных, так и стероидчувствительных больных, составив в среднем  $29 \pm 1,6$  и  $58 \pm 3,2$  дня соответственно. Стероидчувствительные больные в период от 3 до 5 месяцев получали азатиоприн в дозе 50 мг/сут при снижении средних доз СГК с постепенной отменой: первоначально в течение 1 месяца через день, затем 2 раза в неделю (3–4 месяца) в зависимости от сопутствующих заболеваний или хирургических вмешательств (вирусные инфекции, посещение стоматолога и т.д.) и времени года (летом снижение малых доз СГК и азатиоприна прекращали). Стероидрезистентные больные получали дозу азатиоприна 50 мг/сут от 3 месяцев до 2,5 года. Спустя полгода в отсутствие обострений азатиоприн назначали через день, затем 2 раза в неделю.

На основании клинического наблюдения больных аутоиммунной пузырчаткой была разработана следующая схема преодоления стероидной резистентности с помощью азатиоприна. При выявлении стероидной резистентности и возникновении обострения проводилась замена одного СГК на другой в эквивалентной дозе, отсутствие стабилизации процесса в течение 4–6 дней требовало назначения дипроспана 2 мл внутримышечно. Прогрессирование заболевания в последующие 7 дней, то есть отсутствие положительного эффекта от применения дипроспана, приводило к назначению максимальной дозы СГК на 2–3 недели и 150 мг азатиоприна в течение 1,5 месяца (накопление препарата). Затем при достижении положительного эффекта

Суточная доза системных глюкокортикостероидов, при которой был назначен азатиоприн, в первый год от начала лечения стероидрезистентных больных ( $n = 17$ )

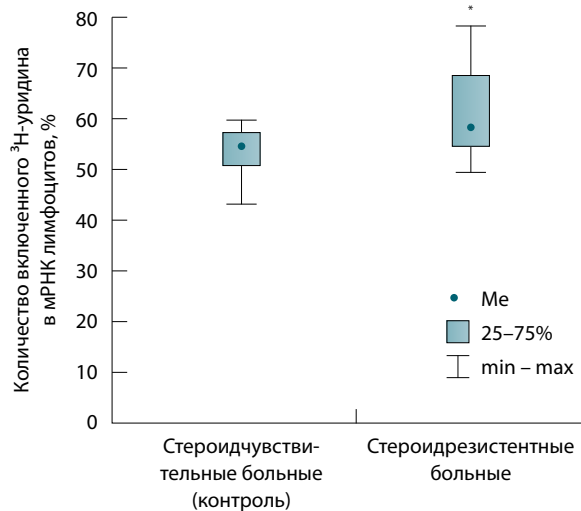
Доза системного глюкокортикостероида в преднизолоновом эквиваленте	Количество больных
$96,25 \pm 2,72$ мг/сут*	12
60 мг / 12 таб/сут	4
27,5 мг / 5,5 таб/сут	1

\* Максимальная доза. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение

на 80–90% (возможно сохранение единичных эрозий на слизистых оболочках в стадии эпителизации и 1–2 корочек на волосистой части головы) доза азатиоприна снижалась до 100 мг в сутки. После снижения дозы СГК до 20 мг в сутки дозу азатиоприна снижали до 50 мг в сутки. Через 2–3 месяца на фоне снижения СГК по схеме медленного снижения малых доз у некоторых больных суточную дозу азатиоприна начинали назначать через день, затем и 2 раза в неделю. В летнее время сохранялся ежедневный прием азатиоприна в дозе не менее 50 мг в сутки.

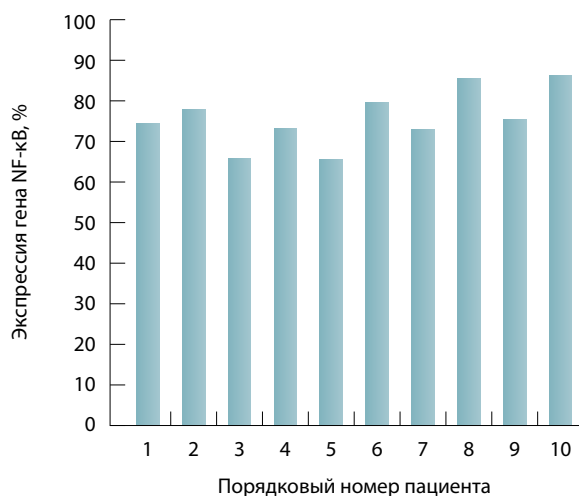
На втором этапе при изучении молекулярных механизмов стероидной резистентности с помощью радиоизотопного метода и жидкостной скинтилляционной радиометрии на пострецепторном уровне у больных аутоиммунной пузырчаткой было выявлено, что преднизолон ( $10^{-6}$  М) значительно угнетал синтез мРНК в группе стероидчувствительных больных (медиана 51,55%, интервал значений 43,12–59,70%). У 28% стероидрезистентных пациентов при воздействии преднизолона на включение  $^3\text{H}$ -уридина в мРНК лимфоцитов обнаруживалось пониженное включение  $^3\text{H}$ -уридина, что выражалось в усиленном синтезе мРНК (интервал значений 68,67–78,35%) при среднем значении контрольной группы 51,55% ( $51,55 \pm 8,1\%$ ) ( $p < 0,05$ ) (рис. 1).

В качестве обоснования разработанной схемы лечения аутоиммунной пузырчатки азатиоприном определяли экспрессию гена NF- $\kappa\text{B}$  и ее динамику на фоне комбинированной терапии СГК и азатиоприном методом ПЦР в режиме реального времени (рис. 2 и 3). В группе стероидчувствительных пациентов медиана относительного количества кДНК гена NF- $\kappa\text{B}$  составила 74,36% (интервал значений 65,39–86,17%), в группе стероидрезистентных пациентов – 95,44% (интервал значений 88,80–98,61%). До начала



**Рис. 1.** Сравнительная характеристика влияния преднизолона на включение <sup>3</sup>H-уридина в матричную рибонуклеиновую кислоту (мРНК) лимфоцитов у стероидчувствительных и стероидрезистентных больных аутоиммунной пузырчаткой; \*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем (группой стероидчувствительных больных)

лечения в группе стероидрезистентных пациентов относительное число копий кДНК гена NF-κB было выше, чем в группе стероидчувствительных больных, и снижалось в процессе лечения азатиоприном в качестве адъювантной терапии, достигая уровня показателя стероидчувствительных больных ( $p < 0,01$ ).



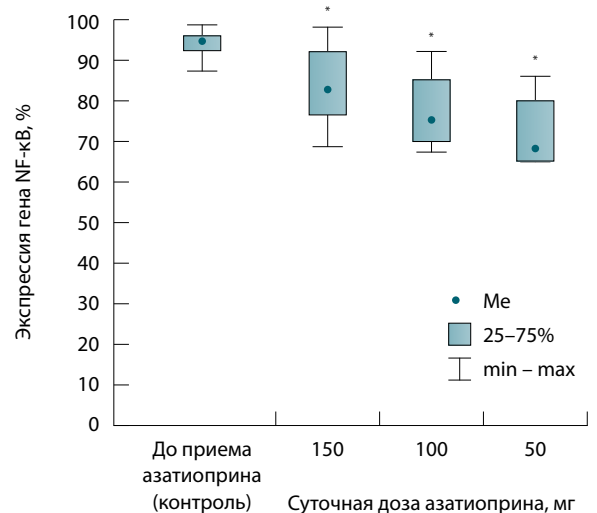
**Рис. 2.** Сравнительная экспрессия комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) гена NF-κB в группе стероидчувствительных больных ( $n = 10$ ); результаты приведены в двух измерениях по каждому пациенту (среднее значение); кДНК гена NF-κB вычисляли относительно экспрессии генов GAPDH (число копий  $10^6$ )

## Обсуждение

Вследствие способности транскрипционного фактора NF-κB индуцировать активность генов, его роль в воспалении весьма велика. SGK и NF-κB способны ингибировать активирующие эффекты друг друга. Этот антагонизм может быть одной из причин стероидной резистентности [9].

Медиаторы воспаления (интерлейкины, хемокины, фактор некроза опухоли-α) активируют NF-κB, который с помощью вторичных посредников отсоединяется от комплекса с ингибитором (IκB) и проникает в ядро, где активирует множественные гены воспаления, принимающие непосредственное участие в патогенезе аутоиммунной пузырчаткой. Определение маркеров стероидной резистентности представляется важным, поскольку они могут рассматриваться как потенциальные мишени для подбора индивидуализированной лекарственной терапии. Полученные нами результаты позволяют предположить, что клиническая резистентность может быть связана с нарушением механизмов передачи сигнала на пострецепторном уровне. Изучение последнего проводилось на основании включения меченого уридина в мРНК лимфоцитов больных аутоиммунной пузырчаткой. Оказалось, что в группе стероидрезистентных больных наблюдалось усиление синтеза мРНК.

Наличие хотя бы одного дефекта или их комбинации на молекулярном уровне приводит



**Рис. 3.** Динамика экспрессии комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) гена NF-κB у стероидрезистентных больных ( $n = 14$ ) до и на фоне приема азатиоприна; кДНК гена NF-κB вычисляли относительно экспрессии генов GAPDH (число копий  $10^6$ ); \*  $p < 0,01$  при сравнении с контролем (до приема азатиоприна)





к торпидному течению заболевания и необходимости коррекции терапии в виде дополнительного назначения препаратов цитостатического действия, в частности азатиоприна.

В нашем исследовании впервые продемонстрировано статистически значимое угнетение изначально повышенной экспрессии гена NF-κB у стероидрезистентных больных на фоне комбинированной терапии СГК и азатиоприном до таковых показателей у стероидчувствительных пациентов с аутоиммунной пузырчаткой. Наличие такого стероидсберегающего действия азатиоприна позволяет эффективно использовать препарат в случаях стероидрезистентной формы пузырчатки. Таким образом, на основании лабораторно-инструментальных методов исследования молекулярных механизмов резистентности на пострецепторном уровне к терапии СГК у больных аутоиммунной пузырчаткой определены предикторы стероидной

резистентности на пострецепторном (экспрессия гена NF-κB в лимфоцитах, пониженное включение <sup>3</sup>H-уридина) молекулярном уровне, позволяющие персонализированно применять таргетную терапию при этом тяжелом заболевании.

## Вывод

В результате сочетанной терапии СГК и азатиоприном у стероидрезистентных больных аутоиммунной пузырчаткой установлено статистически значимое снижение внутриклеточного уровня экспрессии гена NF-κB ( $p < 0,01$ ), что лежит в основе стероидсберегающего действия азатиоприна, включенного в разработанную схему преодоления стероидной резистентности у таких пациентов. На основании снижения экспрессии гена NF-κB продемонстрирована эффективность лечения комбинированной терапией азатиоприном и СГК при аутоиммунной пузырчатке. ☺

## Литература

1. Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5):477–81. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.011.
2. Jardin F, Lévesque H, Tilly H. Auto-immune manifestations in Non-Hodgkin's lymphoma. *Rev Med Interne.* 2005;26(7):557–71.
3. Antonucci A, Negosanti M, Tabanelli M, Varotti C. Treatment of refractory pemphigus vulgaris with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab): five cases. *J Dermatolog Treat.* 2007;18(3):178–83.
4. Craythorne E, du Viver A, Mufti GJ, Warnakulasuriya S. Rituximab for the treatment of corticosteroid-refractory pemphigus vulgaris with oral and skin manifestations. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(8):616–20. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01017.x.
5. Ruocco V, Schiavo AL, Ruocco E. Pemphigus vulgaris. In: Katsambas AD, Lotti TM, Dessiniotti C, Massimiliano D'Erme A. *European handbook of dermatological treatments.* 3<sup>rd</sup> edition. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag; 2015. p. 707–23.
6. Потекаев НС, Теплюк НП, Сергеев ЮВ, Ястребова РИ, Шкребец СВ, Паничкина ТС. Схема снижения низких доз кортикостероидных гормонов при истинной пузырчатке. *Клиническая дерматология и венерология.* 2003;(3):36–40.
7. Потекаев НС, Теплюк НП, Заборова ВА, Кабаева ТН, Шишкова ЕВ. Терапия истинной пузырчатки. *Клиническая дерматология и венерология.* 2004;(4):11–4.
8. Теплюк НП, Лепехова АА. Клинические аспекты стероидной резистентности при аутоиммунной пузырчатке. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2014;(2):13–6.
9. Теплюк НП, Духанин АС, Огурцов СИ, Бельшева ТС. Влияние преднизолона на обмен вторичных мессенджеров в лимфоцитах больных при истинной акантолитической пузырчатке. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2005;140(9):308–10.
1. Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5):477–81. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.011.
2. Jardin F, Lévesque H, Tilly H. Auto-immune manifestations in Non-Hodgkin's lymphoma. *Rev Med Interne.* 2005;26(7):557–71.
3. Antonucci A, Negosanti M, Tabanelli M, Varotti C. Treatment of refractory pemphigus vulgaris with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab): five cases. *J Dermatolog Treat.* 2007;18(3):178–83.
4. Craythorne E, du Viver A, Mufti GJ, Warnakulasuriya S. Rituximab for the treatment of corticosteroid-refractory pemphigus vulgaris with oral and skin manifestations. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(8):616–20. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01017.x.
5. Ruocco V, Schiavo AL, Ruocco E. Pemphigus vulgaris. In: Katsambas AD, Lotti TM, Dessiniotti C, Massimiliano D'Erme A. *European handbook of dermatological treatments.* 3<sup>rd</sup> edition. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag; 2015. p. 707–23.
6. Potekaev NS, Teplyuk NP, Sergeev YuV, Yastrebowa RI, Shkrebetz SV, Panichkina TS. Skhema snizheniya nizkikh doz kortikosteroidnykh gormonov pri istinnoy puzyrchatke [The scheme of decrease in low doses of the glucocorticoid hormones at pemphigus vulgaris]. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya.* 2003;(3):36–40 (in Russian).
7. Potekaev NS, Teplyuk NP, Zaborova VA, Kabaeva TN, Sishikova EV. Terapiya istinnoy puzyrchatki [Therapy of a pemphigus vulgaris]. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya.* 2004;(4):11–4 (in Russian).
8. Teplyuk NP, Lepekhova AA. Klinicheskie aspekty steroidnoy rezistentnosti pri autoimmunnnoy puzyrchatke [Clinical aspects of steroid resistance in autoimmune pemphigus]. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney.* 2014;(2):13–6 (in Russian).
9. Teplyuk NP, Belysheva TS, Dukhanin AS, Ogurtsov SI. Effect of prednisolone on secondary messenger metabolism in the lymphocytes from patients with acantholysis bullosa. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2005;140(3):323–5.



# Development of azathioprine-based treatment regimen for patients with steroid resistant pemphigus based on assessment of molecular mechanisms at the post-receptor level

Olisova O.Yu.<sup>1</sup> • Shimanovskiy N.L.<sup>2</sup> • Dukhanin A.S.<sup>2</sup> •  
Teplyuk N.P.<sup>1</sup> • Lepekhova A.A.<sup>1</sup>

**Background:** Autoimmune pemphigus is the most severe skin and mucous membranes disorders with production of IgG autoantibodies to desmogleins 1 and 3. Administration of systemic corticosteroids may help to abrogate active signs of pemphigus. However, some patients do not give an adequate response to systemic glucocorticosteroid monotherapy, as well as to their combination with immune suppressants and cytostatic agents. **Aim:** To develop an azathioprine-based treatment regimen for patients with autoimmune pemphigus resistant to steroids. **Materials and methods:** At the first step of development of a treatment regimen for patients with steroid-resistant pemphigus we analyzed retrospectively a clinical database on 23 patients who had been treated from 2000 to 2014 and whose treatment regimen included azathioprine, in addition to systemic glucocorticosteroids. At the second step, from 2013 to 2015, we assessed and treated with the azathioprine-based regimen 24 patients with autoimmune pemphigus, 14 of them being steroid resistant and 10, steroid sensitive (control group). To assess molecular mechanisms of steroid resistance at the post-receptor level (effect of prednisolone on incorporation of <sup>3</sup>H-uridine into lymphocyte mRNA, changes of intracellular levels of nuclear transcription factor NF-κB) we used a real-time polymerase chain reaction, radioisotope method and liquid scintillation radiometry. **Results:** At the first step, we developed an azathioprine-based treatment regimen for patients with steroid resistant autoimmune pemphigus. Initial dose of azathioprine was 150 mg daily. After

achievement of response, the dose was decreased to 100 mg daily. When the dose of systemic glucocorticosteroids was decreased to 20 mg daily, the dose of azathioprine was decreased to 50 mg daily, thereafter steroid resistant patients were taking azathioprine at a dose of 50 mg daily from 3 months to 2.5 years. Investigation of molecular mechanisms at the second step of the study showed that in 28% of steroid resistant patients there was a decreased incorporation of <sup>3</sup>H-uridine into lymphocyte mRNA under prednisolone treatment with an increase in synthesis of total mRNA in lymphocytes (range, from 68.67 to 78.35%,  $p < 0.05$ ). Compared to the control group, in all steroid resistant patients ( $n = 14$ ), an increased NF-κB gene expression in lymphocytes was found (range, from 65.39 to 86.17% and from 88.8 to 98.61%, respectively,  $p < 0.05$ ). The combination therapy with systemic glucocorticosteroids and azathioprine in steroid resistant patients resulted in a decrease in intracellular NF-κB gene expression ( $p < 0.01$ ), which underlies the steroid-sparing effect of azathioprine. **Conclusion:** We demonstrated a statistically significant suppression of NF-κB gene expression in the cases of its high baseline levels before combination therapy in patients with autoimmune pemphigus. The steroid-sparing effect of azathioprine allows for its effective use in steroid-resistant pemphigus.

**Key words:** pemphigus, steroid-resistant, NF-κB, <sup>3</sup>H-uridine, azathioprine

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-1-6-12

**Olisova Ol'ga Yu.** – MD, PhD, Professor, Head of the Chair of Skin and Venereal Diseases<sup>1</sup>

**Shimanovskiy Nikolay L.** – MD, PhD, Professor, Member-Correspondent of Russian Academy of Sciences, Head of the Chair of Molecular Pharmacology and Radiobiology<sup>2</sup>

**Dukhanin Aleksandr S.** – MD, PhD, Professor, Chair of Molecular Pharmacology and Radiobiology<sup>2</sup>

**Teplyuk Nataliya P.** – MD, PhD, Professor, Chair of Skin and Venereal Diseases<sup>1</sup>

**Lepekhova Anfisa A.** – MD, PhD, Assistant, Chair of Skin and Venereal Diseases<sup>1</sup>

✉ 4/1 Bol'shaya Pirogovskaya ul., Moscow, 119992, Russian Federation. Tel.: +7 (903) 543 30 74.

E-mail: anfisa.lepekhova@yandex.ru

<sup>1</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation

<sup>2</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovityanova ul., Moscow, 117997, Russian Federation