

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Мак Дарья Витальевна

**Диагностическая и прогностическая значимость микроРНК  
при аутоиммунной пузырчатке**

3.1.23. Дерматовенерология

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент

Теплюк Наталия Павловна

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

член-корреспондент РАН

Шимановский Николай Львович

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	17
1.1. Аутоиммунная пузырчатка: современные представления.....	17
1.2. Проблема стероидной резистентности при аутоиммунной пузырчатке .....	26
1.3. МикроРНК – особенности биогенеза, функции и механизма действия.....	30
1.4. Секреция микроРНК во внеклеточную среду и их диагностический потенциал .....	35
1.5. Методы детекции и анализа уровня экспрессии микроРНК .....	40
1.6. Факторы, влияющие на точность и воспроизводимость анализа экспрессии микроРНК: ключевые методологические трудности.....	45
1.7. Современные данные о микроРНК в патогенезе и диагностике аутоиммунной пузырчатки.....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	52
2.1. Дизайн исследования .....	52
2.2. Характеристика пациентов.....	52
2.3. Методы исследования.....	67
2.3.1. Описание медицинского вмешательства .....	68
2.3.2. Методика выделения, детекции и анализа уровня относительной экспрессии микроРНК .....	69
2.3.3. Методы статистической обработки данных .....	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	74
3.1. Относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой и групп контроля .....	74
3.2. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой и групп контроля .....	85
3.3. Анализ относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в зависимости от клинических данных .....	89

3.3.1. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от клинической формы аутоиммунной пузырчатки .....	89
3.3.2. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от локализации патологического процесса.....	91
3.3.3. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от приема глюкокортикостероидов до начала стационарного лечения.....	94
3.3.4. Корреляционный анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от длительности заболевания и приема глюкокортикостероидов до начала стационарного лечения .....	96
3.4. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в процессе терапии системными глюкокортикостероидами.....	99
3.5. Корреляционный анализ относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой и оценкой тяжести заболевания по индексу площади поражения при пузырчатке .....	103
3.6. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от степени тяжести аутоиммунной пузырчатки.....	109
3.7. Оценка диагностической значимости относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p при аутоиммунной пузырчатке .....	111
3.7.1. Оценка значимости относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p для диагностики аутоиммунной пузырчатки .....	111
3.7.2. Оценка значимости относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p для определения степени тяжести аутоиммунной пузырчатки .....	114
3.8. Анализ особенностей относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов со стероидной резистентностью при аутоиммунной пузырчатке.....	117

3.8.1. Анализ различий относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в зависимости от наличия стероидной резистентности.....	118
3.8.2. Сравнительный анализ динамики снижения относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в зависимости от стероидной резистентности .....	120
3.8.3. Корреляционный анализ связи индекса PDAI с относительным уровнем экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в зависимости от стероидной резистентности .....	125
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	132
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	139
ВЫВОДЫ .....	141
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	142
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	144
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	146
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	166

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Аутоиммунная пузырчатка (АП) представляет собой группу тяжёлых и потенциально угрожающих жизни хронических дерматозов, проявляющихся образованием пузырей на коже и слизистых оболочках в результате акантолиза кератиноцитов [1, 12, 13, 21, 29]. Патогенез заболевания связан с аутоиммунной реакцией, в ходе которой аутоантитела фиксируются на ключевых белках десмосом – десмоглеинах 1 (Dsg1) и 3 (Dsg3) [1, 13, 65, 119].

Заболеваемость AP в Российской Федерации составляет 1,9 случая на 100 000 населения по данным за 2015 год, а распространённость — 4,8 случаев на 100 000 взрослого населения [13, 17, 28]. Однако ее распространённость на Евразийском континенте неравномерна, и варьирует в зависимости от географического региона, при этом наибольшее количество случаев на 100 000 населения ежегодно наблюдается в странах Индийского субконтинента, Средиземноморья и Ближнего Востока [160]. Например, самая высокая распространённость была выявлена в Иране — 30 случаев на 100 000 человек в год, а самая низкая — в Болгарии — 0,38 случая на 100 000 человек в год. Самый высокий уровень заболеваемости был зафиксирован в Иране — 5 случаев на 100 000 человек в год, в Индии (округ Триссур) — 0,44 на 100 000, в Греции — 0,93 на 100 000, в Турции — до 0,24 на 100 000 [160]. Эти различия могут быть связаны с генетическими факторами, такими как ассоциации с HLA-генами, и экологическими условиями [5, 140]. Среди различных форм AP наиболее распространены вульгарная и листовидная пузырчатка, которые составляют 90-95% всех случаев заболевания, при этом вульгарная пузырчатка (ВП) является наиболее частым вариантом заболевания и составляет до 65% всех случаев, листовидная пузырчатка (ЛП) встречается реже и составляет до 27% всех случаев AP [1, 13, 139, 161].

Среди больных АП наблюдается преобладание женщин, колеблющееся от 1:1,7 до 1:1,1 [140].

Поражения кожи и слизистых оболочек при АП приводят к значительному снижению качества жизни пациентов, при этом повреждение барьерных функций также увеличивает риск инфекционных осложнений, что усугубляет общее состояние и может привести к летальному исходу [97]. Однако, редкая встречаемость АП в сочетании со сложностями дифференциальной диагностики часто становится причиной задержки в постановке диагноза от момента манифестации, что в свою очередь приводит к отсрочке начала патогенетической терапии и утяжелению течения заболевания [18, 47, 50, 78].

В настоящее время диагностика АП основывается на комплексной оценке гистологической картины, результатах иммуноферментного анализа (ИФА), а также прямой и непрямой иммунофлюоресценции (РИФ) [1, 12, 13]. Однако данные методы в ряде случаев могут быть недоступны в клинической практике в связи с высокой стоимостью, недостаточной оснащённостью лабораторий или возможных расхождений в интерпретации результатов ИФА и непрямой РИФ, а также ложноотрицательных результатах серологических методов диагностики у пациентов с подтверждённым на основании биопсии диагнозом [98], или, в других случаях возможны ложноположительные результаты при отсутствии других лабораторных или клинических признаков АП, что усложняет постановку точного диагноза [1, 93].

Таким образом, несмотря на достаточную эффективность современных методов постановки диагноза АП, существенная доля диагностических ошибок обуславливает актуальность поиска новых специфичных диагностических методов [1].

Одним из перспективных направлений является применение биомаркеров, которые могут быть использованы для мониторинга прогрессирования заболевания и прогноза ответа на проводимую терапию, что может способствовать в выборе оптимального подхода к лечению [1]. В качестве таких биомаркеров рассматриваются микроРНК, которые, благодаря своей

стабильности в биологических жидкостях, демонстрируют более высокую чувствительность и специфичность по сравнению с традиционными методами диагностики [2, 110, 123].

МикроРНК — короткие (18-22 нуклеотида) некодирующие молекулы РНК, регулирующие посттранскрипционную экспрессию генов, блокируя трансляцию белков или вызывая деградацию мРНК, играющие ключевую роль в регуляции таких биологических процессов, как апоптоз, дифференцировка клеток, межклеточные коммуникации и иммунный ответ [2]. Нарушения в регуляции микроРНК могут способствовать развитию аутоиммунных заболеваний, включая АП, путем активации воспалительных путей и регулирования активности Т- и В-клеток [55, 67, 159].

Исследования последних лет показали, что микроРНК могут служить высокочувствительными и специфичными биомаркерами благодаря своей тканеспецифичности и способности быстро выходить из клеток, сохраняя стабильность в биологических жидкостях, что делает их потенциально более эффективными по сравнению с традиционными методами диагностики [145]. Однако число публикаций, посвящённых исследованию экспрессии микроРНК в контексте АП, остаётся ограниченным (Таблица 1).

Объективно оценить состояние больных АП возможно благодаря различным клинико-диагностическим индексам, активно внедренным в практику современных врачей: балльная 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), система градации для пузырчатки слизистой оболочки рта по Сарасвату (индекс Сарасвата, Saraswat oral pemphigus scoring) [1, 15]. Оценка степени тяжести заболевания играет особую роль в планировании дальнейшей терапевтической тактики ведения пациента, а также возможном прогнозировании

течения заболевания. [45]. Однако, все предложенные индексы являются субъективными, и не образуют единой системы оценки тяжести заболевания.

Основными средствами терапии АП являются системные глюкокортикостероиды (ГКС), однако наблюдается развитие стероидной резистентности как на уровне рецепторов, так и в процессе доставки глюкокортикоидов в клетки [26]. В связи с этим, оправдана адъювантная терапия цитостатиками и биологическими препаратами, однако исследования роли микроРНК в контексте резистентности к терапии не проводились, что открывает новые возможности для изучения их прогностической ценности при АП.

Таким образом, перспективной является разработка стандартизированного протокола для оценки экспрессии микроРНК при АП, что позволит не только повысить точность диагностики, но и может стать важным методом мониторинга тяжести заболевания, эффективности лечения и прогноза при стероидрезистентных формах АП.

### **Степень разработанности темы исследования**

На сегодняшний день при АП исследована экспрессия более 170 микроРНК [1, 6, 21, 81, 85, 86, 87, 94, 109, 122, 156], однако, особое внимание уделяется исследованию miR-338-3p и miR-424-5p в мононуклеарных клетках периферической крови, поскольку, согласно исследованиям, нарушение их экспрессии может быть ключевым элементом патогенеза АП [7, 8, 86, 87, 156].

Согласно одной из гипотез, miR-338-3p может способствовать дисбалансу Th1/Th2 клеток, снижая экспрессию матричной РНК (мРНК) гена RNF114 через трансфекцию, что, в свою очередь, влияет на регуляцию апоптоза и активацию Т-клеток [6, 9, 80, 85, 156]. В других работах предполагается, что TRADD может быть геном-мишенью для miR-338-3p, так как при сверхэкспрессии данной микроРНК наблюдается снижение уровня мРНК TRADD как *in vitro*, так и *in vivo*

[9, 85]. Таким образом, сверхэкспрессия miR-338-3p может быть одним из факторов, запускающих дисбаланс между Th1 и Th2 клетками, что является ключевым элементом патогенеза АП [21, 64, 88]. В других исследованиях было показано, что у пациентов с активной стадией АП уровень экспрессии miR-338-3p значительно выше, чем в контрольной группе; при этом его уровень коррелирует с тяжестью заболевания, на основании измерения индекса PDAI (Pemphigus Disease Area Index) [9, 21, 156]. Представленные данные делают miR-338-3p перспективным биомаркером для диагностики АП, а также для мониторинга активности заболевания и прогнозирования его течения.

В отличие от miR-338-3p, исследование роли miR-424-5p в патогенезе АП было проведено с использованием методов биоинформатики и компьютерного моделирования генов-мишеней, а не *in vitro* [87]. В результате анализа было выявлено 52 потенциальных гена-мишени miR-424-5p, которые участвуют в активации p38 MAPK киназы и активации MAPK сигнального пути [87]. Данный путь играет важную роль в регуляции аутоиммунных реакций, клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, а также связан с реорганизацией цитоскелета, разрушением десмосом и апоптозом кератиноцитов [58, 59, 143]. Кроме того, исследования показывают, что у пациентов с ВП наблюдается статистически значимое повышение уровня экспрессии miR-424-5p по сравнению со здоровой группой контроля [81, 87].

Таким образом, выявление и анализ экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p представляют собой перспективные направления для разработки новых методов диагностики АП.

### **Цель и задачи исследования**

Цель исследования — определить диагностическую значимость микроРНК при аутоиммунной пузырчатке и их прогностическую ценность для

оценки степени тяжести и эффективности терапии системными глюкокортикостероидами.

Задачи исследования:

1. Изучить экспрессию микроРНК в мононуклеарных клетках периферической крови у больных аутоиммунной пузырчаткой методом ПЦР в реальном времени.

2. Провести корреляционный анализ уровня экспрессии микроРНК с клинико-диагностическим индексом оценки тяжести аутоиммунной пузырчатки PDAI (Pemphigus Disease Area Index).

3. Исследовать динамику экспрессии микроРНК у больных аутоиммунной пузырчаткой в процессе лечения системными глюкокортикостероидами, включая пациентов с признаками стероидной резистентности.

4. Выявить возможные пороговые значения уровня экспрессии микроРНК для раннего прогнозирования эффективности терапии системными глюкокортикостероидами и стероидной резистентности.

### **Научная новизна**

Впервые в России изучены относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p при АП, в ходе исследования также получены данные ранее не описанные в источниках литературы.

Впервые изучена динамика экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с АП в зависимости от формы заболевания, активности патологического процесса, степени тяжести, длительности заболевания, локализации, получаемой терапии системными ГКС, а также признаков стероидной резистентности.

Установлено, что уровень miR-338-3p коррелирует с тяжестью и длительностью заболевания, указывая на её возможную роль в регуляции иммунного ответа и десмосомальной адгезии — ключевых звеньях в патогенезе АП. Также выявлены различия в динамике miR-424-5p у пациентов с резистентностью к ГКС, что открывает перспективы для дальнейшего изучения микроРНК как потенциальных терапевтических мишеней.

Впервые на основании полученных данных оптимизирован алгоритм ведения пациентов с АП.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Практическая значимость исследования связана с разработкой новых диагностических и прогностических инструментов для клинической практики.

Определены пороговые значения экспрессии: miR-338-3p ( $> 3.753$ ) и miR-424-5p ( $> 4.367$ ), которые обеспечивают диагностику АП с высокой чувствительностью (94.59%) и специфичностью (92.00% для miR-338-3p и 90.00% для miR-424-5p), что особенно ценно для раннего выявления АП, в том числе у пациентов с изолированным поражением слизистых оболочек, а также дифференциальной диагностики с другими буллезными дерматозами. Кроме того, разработана шкала оценки тяжести АП на основе miR-338-3p: лёгкая степень (3.753–5.313), средняя степень (5.313–17.47), тяжёлая степень ( $> 17.47$ ).

Также, установлено что, динамика экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p на фоне лечения системными ГКС отражает эффективность проводимой терапии, при этом стабильный или возрастающий уровень miR-338-3p в совокупности с тенденцией к увеличению относительного уровня экспрессии miR-424-5p в процессе патогенетической терапии системными ГКС, ассоциирован с риском развития стероидной резистентности, что способно помочь клиницистам своевременно определять состояние пациента и разрабатывать оптимальную терапевтическую стратегию.

## **Методология и методы исследования**

Сбор и обработка полученных данных осуществлялись в соответствии с разработанным дизайном исследования, включавшим оценку относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также статистических методов, соответствующих поставленным целям и задачам.

Проведено проспективное сравнительное исследование с формированием четырех независимых выборок — пациентов с АП в активной стадии заболевания, пациентов с АП в стадии ремиссии, контрольной группы условно здоровых добровольцев, а также контрольной группы пациентов с иными буллезными дерматозами в активной стадии.

Объектом исследования послужили пациенты с установленным диагнозом АП старше 18 лет с двумя клиническими вариантами пузырчатки: ВП и ЛП, а также условно-здоровая группа контроля и контрольная группа пациентов с иными буллезными дерматозами. Предметом исследования являются относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p.

Всем участникам проводилась клиническая оценка, включая определение степени выраженности заболевания по индексу PDAI (Pemphigus Disease Area Index), сбор анамнеза, а также комплекс лабораторных исследований (выделение мононуклеарных клеток периферической крови и оценка относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени).

## **Личный вклад автора**

Автором диссертационного исследования проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, на основании которого были сформулированы цели,

задачи, определен дизайн исследования, а также проведён набор пациентов и формирование групп пациентов, выполнена интерпретация клинических и лабораторных показателей. Осуществлена статистическая обработка полученных данных, послужившая основой для научных выводов и практических рекомендаций. Результаты исследования нашли отражение в публикациях в рецензируемых научных изданиях, а также были представлены в формате докладов на профильных научных конференциях

### **Положения, выносимые на защиту**

1. У пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в активной стадии заболевания уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p существенно повышены по сравнению с уровнем экспрессии у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в стадии ремиссии, условно здоровых субъектов, а также пациентов с иными буллезными дерматозами.
2. При аутоиммунной пузырчатке наблюдается положительная корреляция между уровнем экспрессии miR-338-3p и степенью тяжести заболевания, оцененной по индексу PDAI (Pemphigus Disease Area Index), на основании которой разработана шкала классификации тяжести аутоиммунной пузырчатки, которая может быть использована с целью объективизации и стандартизации оценки состояния пациентов.
3. Динамика экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p на фоне лечения системными глюкокортикостероидами отражает эффективность проводимой терапии, при этом снижение уровня miR-338-3p коррелирует с клиническим улучшением и положительным ответом на терапию глюкокортикостероидами, тогда как стабильный или возрастающий уровень miR-338-3p в совокупности с тенденцией к возрастанию относительного уровня экспрессии miR-424-5p в процессе

патогенетической терапии, ассоциирован с риском развития стероидной резистентности.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 3.1.23. Дерматовенерология:

п.1 — эпидемиологические показатели дерматологического профиля и инфекций. Особенности эпидемиологии дерматозов в различных регионах Российской Федерации.

п.2 — этиология и патогенез дерматозов (изучение причинно-следственных связей между генетическими, патоморфологическими, иммунологическими, биохимическими, функциональными особенностями и клиническими проявлениями заболеваний).

п.4 — диагностика дерматозов с использованием клинических, лабораторных, инструментальных и других методов исследования. Разработка диагностических критериев, дифференциальный диагноз дерматозов.

Также диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология:

п.9 — изучение взаимодействия лекарственных средств, разработка наиболее рациональных комбинаций при проведении современной фармакотерапии.

п.12 — разработка методологии и проведение терапевтического лекарственного мониторинга препаратов с учетом клинической эффективности и возможности проявления нежелательных реакций лекарственных средств.

## Степень достоверности и апробация результатов

Результаты настоящего исследования характеризуются высокой степенью достоверности, что обусловлено обширными клиническими и лабораторными данными, а также применением диагностических и статистических методов. Сделанные выводы и предложенные рекомендации корректны и аргументированы, логично следуют из полученных данных и непосредственно вытекают из полученных результатов, отражая цели и задачи исследования.

Материалы диссертации доложены на научно-врачебной конференции кафедры и клиники кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 21 марта 2023 года; VI съезде фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций, новые люди – новые лекарства» 22 ноября 2023 года; XVII научно-практической конференции дерматовенерологов и косметологов с международным участием Санкт-Петербургские дерматологические чтения 26 октября 2023 года; научно-врачебной конференции кафедры и клиники кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 18 июня 2024 года.

Апробация научно-квалификационной работы на соискание ученой степени кандидата медицинских наук состоялась на научно-практической конференции, проведенной на базе кафедры кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (протокол №20 от 3 июня 2025 года).

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования автором опубликовано 7 работ, в том числе 3 научные статьи в издании, индексируемом в международной базе Scopus, 4 публикации в сборниках материалов всероссийских научных конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Работа изложена на 166 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, раздела материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, приложения. Список литературы содержит 162 источника, в том числе 28 отечественных и 134 зарубежных. Текст иллюстрирован 40 рисунками и 23 таблицами.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Аутоиммунная пузырчатка: современные представления

Аутоиммунная пузырчатка – группа тяжелых буллезных дерматозов, характеризующихся образованием на коже и слизистых оболочках пузырей и эрозий вследствие акантолиза кератиноцитов и возникновения внутриэпидермальных полостей преимущественно на уровне шиповатого или зернистого слоёв эпидермиса [12, 13, 34, 91, 140].

АП представляет собой относительно редкую патологию, заболеваемость и распространённость которой варьируют в зависимости от географического региона и популяционных особенностей: наибольшая частота встречаемости АП регистрируется в странах Средиземноморья, на Ближнем Востоке и на Индийском субконтиненте [13, 34, 160]. В России ежегодная заболеваемость АП составляет 1,9 случая на 100 000 человек, а распространённость достигает 4,8 случая на 100 000 человек. [13, 17, 28].

Средний возраст начала заболевания составляет 45-65 лет, при этом у детей и подростков (до 18 лет) оно встречается крайне редко, составляя лишь 1-4 % всех случаев. Среди пациентов преобладают женщины, при этом соотношение мужчин и женщин варьирует от 1:1,1 до 1:1,7 в разных популяциях [13, 28, 90, 97, 161]. Наиболее часто встречающимися формами АП являются вульгарная пузырчатка и листовидная пузырчатка, на долю которых приходится 90-95 % всех случаев заболевания [1, 13, 139].

Вульгарная пузырчатка является наиболее распространённой формой АП, её доля составляет до 65 % всех случаев, причём в Европе и Северной Америке она достигает 65-90 % [11, 82, 84, 90, 97, 125]. Листовидная пузырчатка, занимающая второе место по распространённости, составляет до 27 % всех случаев [83].

Этиология АП неизвестна [5, 17, 76]. К возможным провоцирующим факторам относятся факторы окружающей среды, инфекции, лекарственные

препараты и опухоли [5]. Также установлено, что АП связана с конкретными HLA, такими как HLA-DRB1\*04:02 (еврейский) и HLADQB1\*05:03.10 [1, 5, 19, 79]

Патогенетически данный процесс обусловлен фиксацией циркулирующих аутоантител класса IgG на белковых компонентах десмосомального аппарата многослойного плоского эпителия кожи и слизистых оболочек - десмоглеинах 1-го (Dsg1) и/или 3-го (Dsg3) типа, что приводит к акантолизу кератиноцитов [1, 13, 34, 60, 68, 97]. В современной научной парадигме ведущей является теория, согласно которой под воздействием различных триггерных факторов антигенпрезентирующие клетки распознают белки десмосом как чужеродные структуры, что приводит к презентации антигена Т-лимфоцитам, инициируя их дифференцировку [148]. Аутореактивные Т-лимфоциты, в свою очередь, активируют В-лимфоциты, стимулируя выработку специфических аутоантител, при этом наблюдается дисбаланс между Th1- и Th2-лимфоцитами в сторону снижения уровня Th1-лимфоцитов и Th1-цитокинов (интерферон гамма, IL-2), при одновременном увеличении количества Th2-лимфоцитов и их цитокинов (IL-4, IL-10) [38, 88, 99, 100, 148] (Рисунок 1). Согласно другой теории, АП может развиваться как вследствие прямого действия антител IgG против Dsg1 и/или Dsg3, так и за счет последующего каскада передачи внутриклеточных сигналов, центральная роль в котором принадлежит митоген-активируемой протеинкиназе p38 (p38 MAPK) [35, 54, 76]. Связывание антител IgG с десмоглеинами индуцирует местную воспалительную реакцию и выработку провоспалительных цитокинов, которые приводят к феномену стресса эндоплазматического ретикулума [35, 70], что, в свою очередь, активирует сигнальный путь p38 MAPK [54, 76]. Каскад фосфорилирования с участием p38 MAPK, активируемой MAPK протеинкиназой 2 (MK2) и белком теплового шока 27 (HSP27), приводит к разрушению цитоскелета и, в последующем, к апоптозу кератиноцитов [59, 76] (Рисунок 2).

ВП практически всегда сопровождается поражением слизистых оболочек, причем в 50–70% случаев манифестация заболевания начинается с поражения

слизистой оболочки ротовой полости (буккальная область, дёсны, нёбо, дно полости рта, язык, губы) [113, 115, 118]. Эрозии на слизистых оболочках сопровождаются выраженными субъективными ощущениями, которые могут варьировать от дискомфорта до интенсивной боли, мешающей приему пищи, что зачастую приводит к значительной потере массы тела и ухудшению общего состояния пациента [1, 13, 43]. В дальнейшем в патологический процесс могут вовлекаться и другие слизистые оболочки, включая носовую, глоточную, ларингоэзофагеальную, уретральную, генитальную (головка полового члена, вульва), перианальную и конъюнктивальную слизистые [13, 44, 95]. На коже больных с ВП образуются пузыри с тонкой покрывкой, которые быстро вскрываются, образуя болезненные труднозаживающие эрозии, склонные к периферическому росту [40, 140] и быстро увеличивающиеся в размере, что существенно снижает качество жизни пациентов. Кроме того, нарушение целостности кожного и слизистого барьера значительно повышает риск вторичного инфицирования бактериальной или грибковой флорой, что приводит к ухудшению общего состояния пациентов, утяжеляет течение заболевания и может стать причиной летального исхода [1, 13, 112], особенно у пациентов со стероидрезистентными формами заболевания [26].

ЛП, в отличие от вульгарной, редко сопровождается поражением слизистых, однако у таких пациентов часто наблюдается синдром сухого глаза [13, 130]. Для данного типа АП характерна преимущественная локализация поражений на коже верхней трети туловища, волосистой части головы и лица, сопровождающаяся образованием пузырей и эритемой [89]. При ЛП, акантолиз развивается в субкорнеальном слое эпидермиса, что приводит к образованию пузырей с еще более хрупкой и вялой покрывкой, а в результате быстрого ссыхания отделяемого образующихся эрозий, клинически можно наблюдать слоистые тонкие чешуе-корки [91].

Несмотря на наличие характерных клинических признаков, проявления АП могут быть разнообразными, что затрудняет диагностику заболевания [14, 20, 22, 47, 50, 78, 117]. В результате частота диагностических ошибок остается высокой,

особенно среди пациентов с изолированным поражением слизистых оболочек, что в результате способствует стремительному прогрессированию патологического процесса и увеличивает риск развития осложнений [63].

На сегодняшний день лабораторная диагностика АП преимущественно основывается на комплексной оценке гистологической картины, результатах иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA), прямой и непрямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ) [1, 12, 19, 28, 108, 110]. Патоморфологическое исследование используется для выявления акантолиза и определения уровня формирования пузыря [103]. На ранних этапах развития АП при гистологическом исследовании образцов из пораженных участков можно выявить спонгиоз с экзоцитозом эозинофильных и, в некоторых случаях, нейтрофильных лейкоцитов в эпидермис, а также формирование внутриэпидермальных микроабсцессов [1, 103, 124]. При отсутствии убедительных гистологических данных в совокупности с характерной клинической картиной, для верификации диагноза рекомендуется проведение прямой РИФ, что позволяет детектировать фиксацию IgG в различных слоях эпидермиса [103, 140].

Стандартные методы серологической диагностики включают ИФА (ELISA, англ. enzyme-linked immunosorbent assay), который применяется для определения циркулирующих аутоантител к Dsg1 и Dsg3, а также непрямую РИФ, позволяющую визуализировать аутоантитела в виде сетчатой флуоресценции межклеточного вещества в шиповатом слое эпидермиса при обработке инкубированного с сывороткой пациента биоптата (например, пищевода обезьяны и т.д.) люминесцентной антиглобулиновой сывороткой [98, 142]. Однако данные методы могут оказаться недоступными в клинической практике из-за высокой стоимости исследований и отсутствия соответствующей лабораторной оснащённости [1].

Также, при интерпретации результатов рутинных серологических методов диагностики АП, могут возникать расхождения между данными ИФА и непрямой РИФ [1]. В некоторых случаях отмечаются ложноотрицательные результаты серологических тестов у пациентов с подтвержденным диагнозом на основании

биопсии [98], либо, напротив, ложноположительные результаты при отсутствии других лабораторных или клинических признаков АП [93]. Подобные диагностические несоответствия усложняют процесс постановки точного диагноза. Таким образом, золотым стандартом для диагностики АП остается исследование биоптата кожи с применением прямой РИФ, позволяющее визуализировать межклеточные отложения иммуноглобулина G (IgG) и/или компонента системы комплемента C3 в эпидермисе, а также патоморфологическое исследование биоптата, взятого на границе пузыря и здоровой кожи [25, 137]. Однако, несмотря на высокую информативность и диагностическую значимость данных методов, нельзя полностью исключить возможность получения ложноотрицательных результатов [18, 25, 29, 98, 138].

Для объективной оценки состояния пациентов, страдающих АП, применяются различные клинико-диагностические индексы [15]. Наиболее известными и широко используемыми в клинической практике являются: индекс площади поражения при пузырчатке (Pemphigus Disease Area Index, PDAI); балльная оценка тяжести аутоиммунных буллезных заболеваний кожи (Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score, ABSIS); индекс активности вульгарной пузырчатки (Pemphigus Vulgaris Activity Score, PVAS); шкала общей оценки врача (Physician's Global Assessment, PGA) [15, 116]. Однако, несмотря на практическую значимость, данные индексы сопряжены с выраженной субъективной составляющей при использовании, что ограничивает их универсальность, а низкая частота встречаемости АП и разнообразие её клинических проявлений затрудняют создание единой стандартизированной системы оценки тяжести заболевания, сравнимой, например, с PASI при псориазе, или SCORAD для атопического дерматита [15, 37, 48, 61]. Кроме того, попытки использования титра аутоантител к Dsg1 и Dsg3 в качестве метода объективной оценки тяжести заболевания не показали достаточной эффективности, поскольку уровень антител может оставаться высоким даже в периоды клинической ремиссии [57, 60, 71, 111, 158].

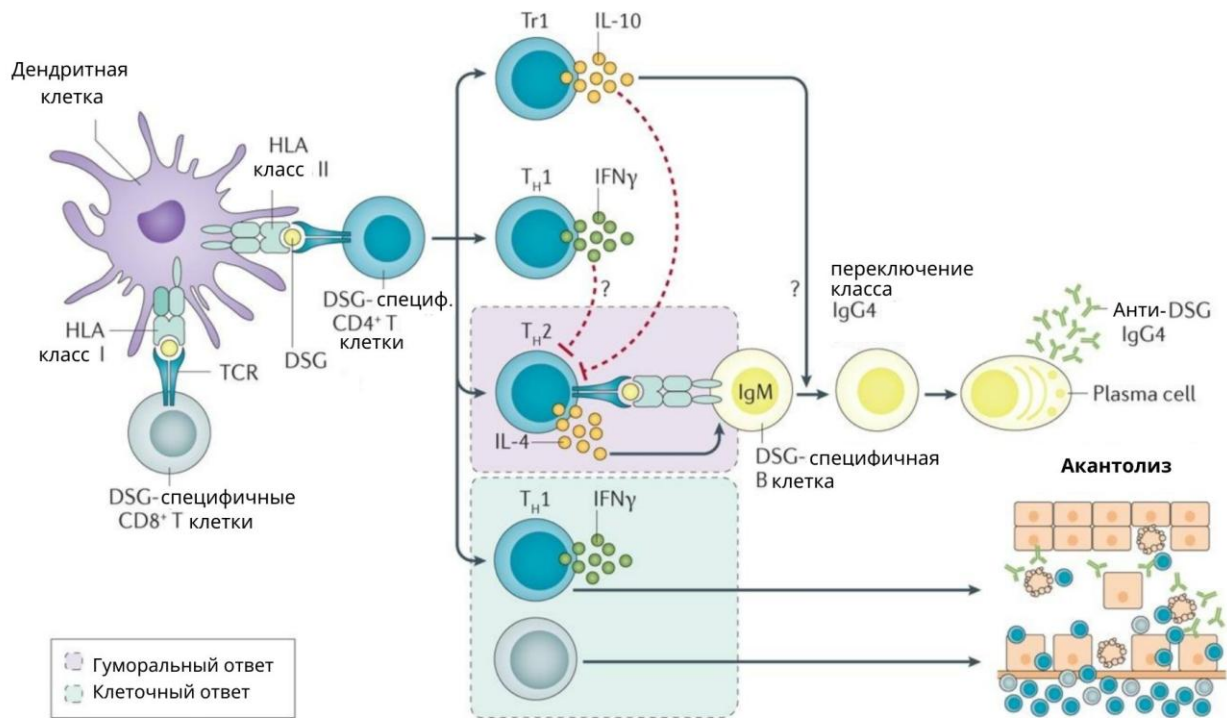
Системные глюкокортикостероиды (преднизолон или другие глюкокортикостероидные препараты в соответствии с преднизолоновым эквивалентом) выступают в качестве препаратов первой линии в лечении АП [28]. С момента их внедрения в 1950-х годах в терапевтическую стратегию при АП, наблюдалось значительное снижение уровня смертности среди пациентов, в частности, данный показатель уменьшился с 75% до приблизительно 30% [13, 49, 52, 62, 120]. В последующие годы, благодаря применению иммуносупрессивных препаратов в качестве адъювантной терапии, наблюдалось дальнейшее снижение смертности среди пациентов с АП до уровня менее 5% в исследуемых популяциях [13, 49, 52, 62, 120].

В современной клинической практике лечение АП с применением системных ГКС осуществляется поэтапно [13, 27]. На начальном этапе пациенты получают высокие дозировки ГКС, варьирующиеся от 80 до 100 мг/кг, что способствует стабилизации патологического процесса и эпителизации образовавшихся эрозий [13, 27]. В дальнейшем происходит постепенное «ступенчатое» в течение нескольких месяцев снижение дозировки ГКС: начиная с 65–70 мг/сут доза медленно уменьшается до 20 мг/сут [12, 13, 27, 28]. Заключительный этап предполагает длительное, зачастую пожизненное, применение поддерживающих низких доз ГКС [27], что позволяет достигнуть минимально эффективной дозировки (10 мг/сут) и обеспечить контроль над возможными рецидивами заболевания, а также способствует минимизации нежелательных побочных эффектов от приема ГКС [27, 28].

Однако, несмотря на существующую терапевтическую тактику, АП остаётся жизнеугрожающим заболеванием, а летальные исходы, хотя и редки, продолжают регистрироваться, особенно среди пациентов с рецидивирующим течением [1, 13]. По данным исследований, уровень летальности среди таких пациентов достигает 3,2%, что существенно превышает показатель среди пациентов с впервые диагностированной АП (1,6%) [13, 90]. Высокий уровень летальности подтверждается и в других популяционных исследованиях. Так, в одной из работ, было продемонстрировано, что смертность среди пациентов с ВП была в 3,3 раза

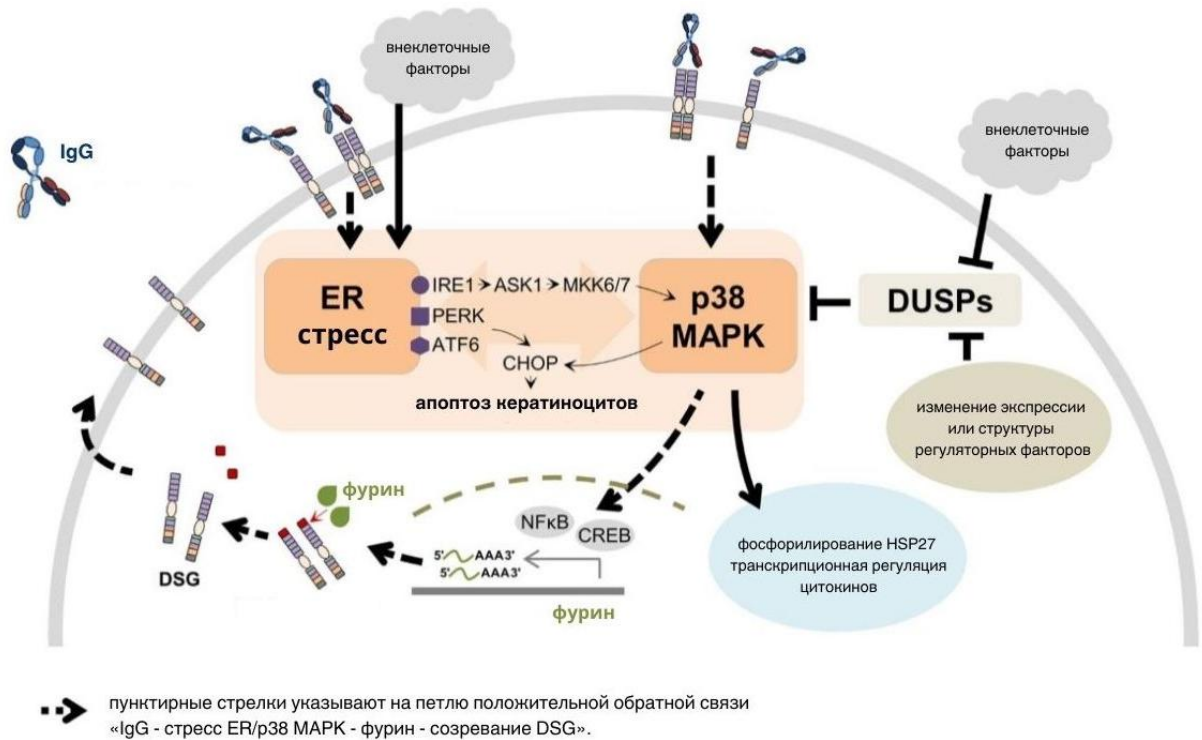
выше по сравнению с контрольной группой, сопоставимой по полу и возрасту [160]. Схожие результаты получены в исследовании Kridin K. (2018), где летальность среди пациентов с ВП превышала общепопуляционный показатель в 2,6 раза с учётом возрастных и гендерных характеристик [97]. При этом долгосрочная выживаемость пациентов с ВП снижалась по мере увеличения периода наблюдения: 95,2% через 1 год, 92,9% через 5 лет, 89,5% через 10 лет, 80,2% через 15 лет и 65,3% через 20 лет [13, 97]. В отличие от ВП, ЛП характеризуется более благоприятным прогнозом. Согласно данным того же исследования, смертность среди пациентов с ЛП лишь незначительно превышала уровень общей популяции (в 1,4 раза), при этом показатели общей выживаемости через 1, 5, 10, 15 и 20 лет достигали 100%, 96,7%, 92,5%, 81,2% и 81,2% соответственно [13, 97].

Тем не менее, у части пациентов с АП наблюдается низкая чувствительность к лечению высокими дозами ГКС, что проявляется отсутствием выраженного терапевтического ответа, частыми рецидивами и развитием осложнений [27, 97]. В литературе данное явление получило название «стероидная резистентность», обозначающее нечувствительность к стандартным дозировкам ГКС и необходимость поиска альтернативных терапевтических стратегий [12, 27].



Примечание: TCR – T-клеточный рецептор, Tr1 – регуляторные T-клетки 1-го типа, IFN $\gamma$  – интерферон- $\gamma$ , IL – интерлейкин, Th – T-хелперные клетки, Dsg – десмоглеин. Дендритные клетки представляют антигены десмоглеина (Dsg) и активируют CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T-клетки. IFN $\gamma$  подавляет формирование Th2-клеток, тогда как IL-10 может как ингибировать аутоиммунный ответ, так и способствовать переключению на IgG4 – основной подкласс анти-Dsg-антител. Th-клетки, продуцирующие IL-4, стимулируют В-клетки к продукции антител, что приводит к гуморальному аутоиммунному ответу и акантолизу.

Рисунок 1 – Механизмы иммунного ответа при аутоиммунной пузырчатке [115]



Примечание: MK2 – MAPK-активированная протеинкиназа 2, p38 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа p38, DSG – десмоглеин, HSP27 – белок теплового шока 27, ER – эндоплазматический ретикулум, CHOP – С/ЕВР-гомологичный белок, PERK – протеинкиназа R-подобная ER киназа, ATF6 – активирующий фактор транскрипции 6, IRE1 – инозитол-реквизинг киназа 1, ASK1 – апоптоз сигнал-регулирующая киназа 1, MKK6/7 – митоген-активируемая киназа 6/7, DUSP – фосфатаза двойной специфичности, NFκB – ядерный фактор каппа-лайт-цепи-энхансера активированных В-клеток, CREB – сАМР-респонсивный элемент-связывающий белок, FURIN – пропротеин-конвертаза фурин. Связывание IgG с десмоглеином (Dsg) инициирует активацию пути p38 митоген-активируемой протеинкиназы (p38 MAPK), что запускает каскад фосфорилирования с участием MAPK-активированной протеинкиназы 2 (MK2) и белка теплового шока 27 (HSP27), и, в последующем, приводит к разрушению цитоскелета, апоптозу кератиноцитов и локальному воспалительному ответу. Стресс эндоплазматического ретикулума, вызванный IgG-зависимыми и IgG-независимыми факторами, активирует p38 MAPK через сигнальный путь IRE1-ASK1-MKK6/7, что усиливает экспрессию С/ЕВР-гомологичного белка (CHOP) и способствует развитию воспалительной реакции. Фосфатазы двойной специфичности (DUSPs) могут ингибировать p38 MAPK, однако их регуляция нарушается под влиянием эндогенных и экзогенных факторов. Активация p38 MAPK также регулирует транскрипцию провоспалительных цитокинов и факторов, участвующих в процессах созревания десмоглеина. В частности, активация ядерного фактора NFκB и CREB способствует экспрессии FURIN, что усиливает созревание Dsg и формирует петлю положительной обратной связи, поддерживающую патологический процесс.

Рисунок 2 – Предполагаемый механизм действия митоген-активируемой протеинкиназы p38 (p38 MAPK) в патогенезе аутоиммунной пузырчатки [54]

## 1.2. Проблема стероидной резистентности при аутоиммунной пузырчатке

Первой линией терапии АП является применение системных ГКС [12, 27]. Однако, развитие стероидной резистентности (СР) может оказывать значительное препятствие для достижения клинической ремиссии и контроля заболевания, что требует разработки альтернативных терапевтических стратегий и более глубокого понимания механизмов ее формирования.

СР по современным оценкам затрагивает до 30% пациентов с аутоиммунными, воспалительными, а также злокачественными заболеваниями, и представляет собой серьезную клиническую проблему в достижении терапевтических результатов [41]. Тем не менее, несмотря на более чем 70-летнюю историю использования ГКС в терапии воспалительных заболеваний, на сегодняшний день в клинической практике не существует точного и общепринятого метода оценки или прогнозирования чувствительности к ГКС, что зачастую вынуждает полагаться на ретроспективный анализ клинического ответа и потенциально подвергает пациентов риску тяжелых побочных эффектов или неэффективности проводимой терапии [12, 16, 26, 28].

Так, для выявления СР при АП используются следующие клинические критерии: (1) отсутствие положительной динамики в виде заживления уже существующих высыпаний, а также появление новых и увеличение старых элементов на фоне монотерапии ГКС в относительно высоких дозах (трехнедельное лечение системными ГКС в дозе 1,5 мг/кг); (2) необходимость в комбинированной терапии с применением иммунодепрессантов или цитостатиков; (3) частые рецидивы на фоне терапии ГКС, имеющие упорное течение [12, 16, 28, 53].

СР может проявляться в виде первичной резистентности к ГКС, характеризующейся отсутствием начального ответа на терапию, либо в виде вторичной или приобретенной резистентности, которая

выражается в утрате контроля над заболеванием, несмотря на первоначальный положительный ответ [3].

Как отмечают в своей работе Angelousi A. et al. (2023), большинство исследований посвященных проблеме СР при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях сосредоточены на анализе количества глюкокортикоидных рецепторов (ГР), их способности и аффинности связываться с гормонами, уровне экспрессии  $\beta$ -изоформы ГР или исследованиях *in vitro* с использованием моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) [33]. Таким образом, можно сделать вывод, что СР является сложным многофакторным процессом, который может быть обусловлен изменениями на уровне рецепторов, внутриклеточных сигнальных путей и эпигенетической регуляции.

Известно несколько механизмов СР. Во-первых, причина может состоять в мутациях гена NR3C1 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1; картирован в хромосоме 5 (5q31-32)), кодирующего ГР, что нарушает его способность связываться с лигандом и перемещаться в ядро клетки, что делает пациентов устойчивыми к терапии, но также исключает развитие стероид-ассоциированных осложнений [16]. Однако чаще резистентность носит приобретенный характер и развивается под воздействием хронического воспаления, поскольку воспалительный процесс активирует киназные пути (МАРК, JNK, PI3K/АКТ), которые фосфорилируют ГР, уменьшая его способность взаимодействовать с ДНК и регулируемыми белками, что также ослабляет ответ на ГКС [30]. Воспалительные цитокины, выделяемые, в частности, при активации системы МАРК, способны снижать чувствительность тканей к ГКС, изменяя экспрессию и посттрансляционные модификации ГР, что приводит к ослаблению ответа на глюкокортикоидную терапию [3, 30]. Таким образом несмотря на то, что противовоспалительные эффекты ГКС достигаются за счет опосредованного ГР ингибирования активности цитокинов и киназных путей, противовоспалительная способность ГКС снижается в условиях чрезмерной их активации [30, 41] Снижается общее количество функциональных ГР, что приводит к ослаблению

ГКС-опосредованных эффектов и требует увеличения дозировки препарата [30, 41].

Еще одним механизмом является изменение альтернативного сплайсинга ГР, в результате чего возрастает экспрессия  $\beta$ -изоформы рецептора, не способной связывать ГКС [16, 30, 41]. Данная изоформа конкурирует с активной  $\alpha$ -изоформой за связывание с регуляторными элементами генов-мишеней, что снижает эффективность стероидной терапии [30, 41]. Дополнительно, фосфорилирование ГР под действием киназ, активируемых воспалением, может изменять его активность и взаимодействие с хроматином [30, 41]. Снижение активности гистондеацетилазы также приводит к ослаблению глюкокортикоидного ответа, препятствуя супрессии воспалительных генов [30, 41].

Помимо указанных механизмов резистентности, также стоит отметить, что системные ГКС способны модулировать экспрессию микроРНК, регулирующих иммунные и воспалительные процессы при АП [2, 114, 146]. В частности, в одном из исследований было показано, что системные ГКС, такие как метилпреднизолон, повышают экспрессию анти-воспалительной микроРНК miR-98 в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, что подавляет про-воспалительные гены, включая *IL-13* и *TNFRSF1B*, усиливая иммуносупрессивный эффект [56]. Одновременно ГКС снижают экспрессию про-воспалительной miR-155, уменьшая воспалительные реакции [23, 151]. Таким образом, дисрегуляция микроРНК может способствовать стероидной резистентности. Например, повышение экспрессии miR-125b связано с подавлением апоптотических путей, что препятствует действию ГКС, что было показано на модели множественной миеломы [39]. Понимание влияния ГКС на регуляцию экспрессии микроРНК открывает перспективы для поиска биомаркеров, прогнозирующих ответ на терапию и разработки стратегий преодоления резистентности при АП [105]. Однако, необходимы дальнейшие исследования для идентификации специфичных микроРНК-профилей заболеваний и их взаимодействия с ГКС.

Для преодоления СР и повышения эффективности проводимой терапии, у пациентов с АП в сочетании с системными ГКС используются адьювантные препараты, такие как азатиоприн, циклоспорин, метотрексат, микофенолата мофетил, циклофосфамид, а также внутривенные инфузии иммуноглобулинов (человеческий иммуноглобулин) и плазмаферез, что позволяет снизить потребность в высоких дозах ГКС, а также минимизирует побочные эффекты и облегчает постепенное снижение дозировки [12, 16, 28, 40]. Кроме того, альтернативной тактикой терапии является использование биологических препаратов, таких как ритуксимаб [40, 43, 90].

Анализ клинических данных показал, что у 44% пациентов, получавших терапию ГКС, в первый год лечения отмечались обострения, связанные со СР [3, 26]. Одним из возможных механизмов ее развития является генетическая предрасположенность: у 28% стероидрезистентных пациентов триггерные факторы обострения определить не удалось, что подтверждает роль наследственных факторов в формировании рефрактерности к гормональной терапии [3, 26]. Важную роль играет и стресс, статистически значимо повышающий частоту рецидивов у пациентов со СР, что согласуется с данными о влиянии стресс-индуцированных молекулярных механизмов на чувствительность к ГКС [3, 5, 26]. Кроме того, терапевтические аспекты также оказывают влияние на развитие резистентности: недостаточная начальная доза системных ГКС и быстрое снижение их концентрации способствуют развитию обострений как у стероидрезистентных, так и у стероидчувствительных больных [3, 26]. Однако при этом клинические проявления дебюта АП в обеих группах пациентов не имеют значимых различий, что свидетельствует о преобладании механизмов, обуславливающих резистентность, именно на этапе лечения [3, 26].

Таким образом, СР является сложным, многофакторным явлением, формирующимся под влиянием как генетических, так и внешних факторов.

### 1.3. МикроРНК – особенности биогенеза, функции и механизма действия

МикроРНК (microRNA, miRNA) представляют собой класс малых некодирующих РНК длиной 17–25 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию генов на уровне матричной РНК (мРНК) посредством её деградации или подавления трансляции [114].

Первая микроРНК (*lin-4*) была открыта в 1993 году у нематоды *Caenorhabditis elegans*, однако именно обнаружение в 2000 году микроРНК у человека (*let-7*) стало отправной точкой их активного изучения [10, 114], и в настоящее время микроРНК выявлены у животных, растений, простейших и вирусов [10, 102]. Информация о микроРНК аккумулируется в различных базах данных, таких как miRBase, microRNA.org, MicroRNAdb, miR2Disease и др., и согласно последним данным, в человеческом геноме насчитывается более 2 675 зрелых микроРНК, которые служат потенциальным регулятором более 60% кодирующих генов [95, 102].

МикроРНК в большинстве случаев кодируются последовательностями, расположенными в интронных участках белок-кодирующих генов [10]. Однако, они также могут находиться в экзонах, 5'- и 3'-нетранслируемых регионах генов или в межгенных областях [10, 102, 114]. Биогенез микроРНК включает несколько последовательных этапов, начиная с транскрипции и заканчивая включением зрелой молекулы в РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RISC; англ. RNA-induced silencing complex) [155]. Различают два основных пути созревания микроРНК: канонический и неканонический, отличающиеся по механизму процессинга предшественников микроРНК [2, 10, 77, 102, 114, 155] (Рисунок 3).

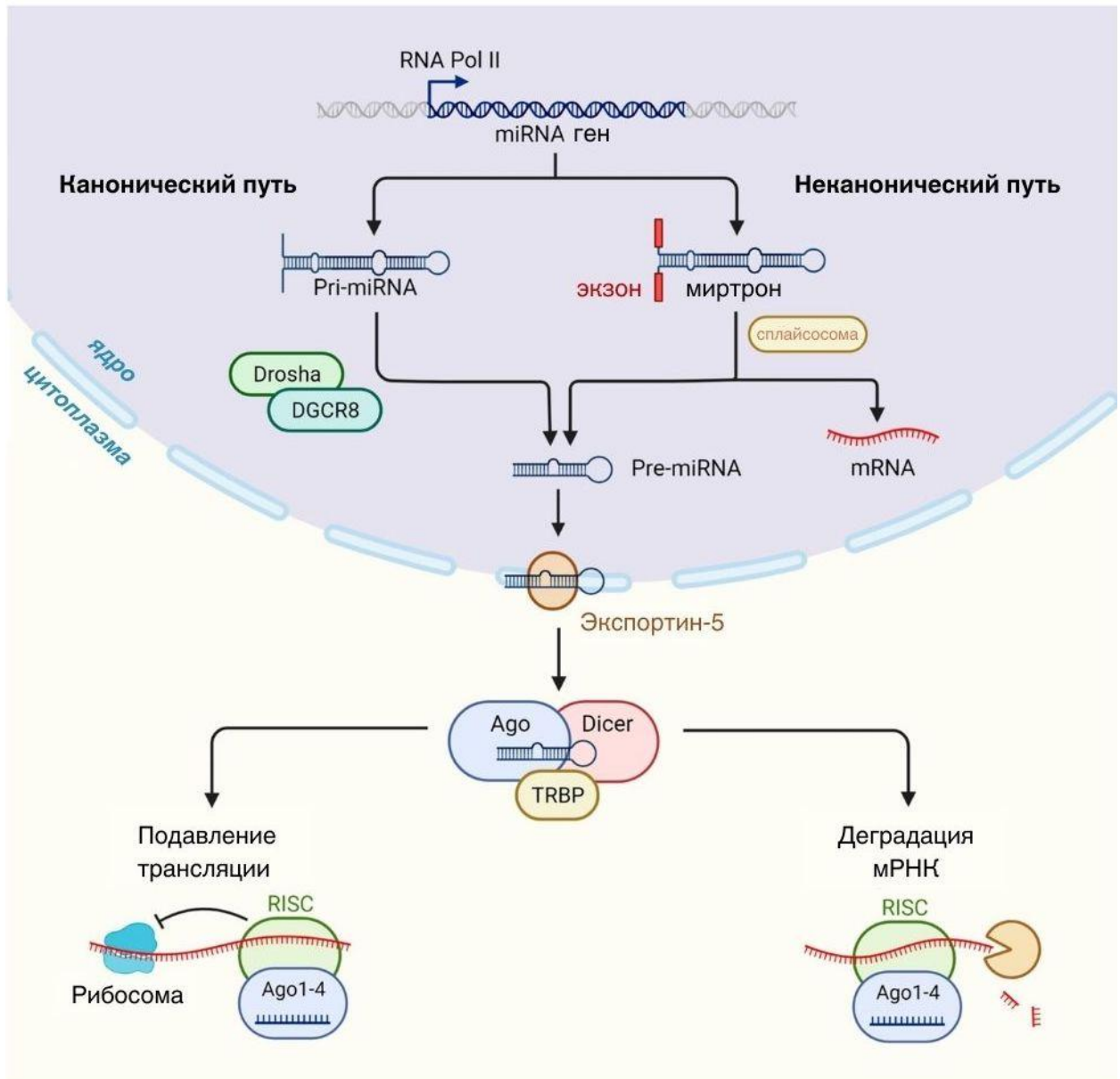
Канонический путь биогенеза микроРНК включает несколько ключевых этапов, происходящих как в ядре, так и в цитоплазме клеток [2, 10, 77, 102, 114, 155]. Начинается данный путь в ядре, где с участием РНК-полимераз II и III формируются длинные (могут в длину достигать нескольких тысяч нуклеотидов) первичные транскрипты – при-микроРНК (pri-miRNA). Pri-miRNA формируют

шпильковидные структуры, которые подвергаются гидролизу с участием микропроцессорного комплекса Drosha-DGCR8 (РНКаза III класса Drosha и белок DGCR8 – DiGeorge syndrome critical region gene), который идентифицирует характерную шпилечную структуру и разрезает транскрипт, высвобождая короткий предшественник – пре-микроРНК (pre-miRNA), содержащий около 70 нуклеотидов [2, 10, 77, 102, 114, 155]. Далее pre-miRNA экспортируется из ядра в цитоплазму при помощи транспортного белка Exportin-5, где она подвергается дальнейшему процессингу с участием РНКазы III Dicer, которая удаляет петлевой участок, образуя двухцепочечный дуплекс длиной ~22 нуклеотидов [2, 10, 77, 102, 114, 155]. Одна из цепей дуплекса, так называемая ведущая (guide strand), интегрируется в белок Argonaute (AGO), формируя RISC, и обеспечивая специфическое связывание с мРНК-мишенью, тогда как вторая цепь – пассажирская (passenger strand) деградирует и разрушается [2, 10, 77, 102, 114, 155]. Выбор ведущей цепи определяется её меньшей стабильностью на 5'-конце или наличием урацила в начальном положении [2, 10, 77, 102, 114, 155]. Основной функцией микроРНК является подавление экспрессии генов посредством деградации мРНК или ингибирования трансляции [46]. В каноническом механизме регуляции комплекс RISC, содержащий зрелую микроРНК, связывается с комплементарными участками мРНК-мишеней, что приводит либо к её разрушению, либо к подавлению трансляции [2, 10, 77, 102, 114, 155]. Критической для связывания микроРНК с мРНК-мишенью является затравочная область (seed region) длиной 6–8 нуклеотидов. В случае полной комплементарности взаимодействие приводит к деградации мРНК, а при частичной комплементарности – к подавлению её трансляции или дестабилизации [2, 10, 77, 102, 114, 155]. В некоторых случаях микроРНК могут опосредованно увеличивать экспрессию мРНК-мишени, взаимодействуя с определёнными белковыми комплексами [2, 10, 77, 102, 114, 155].

Некоторые микроРНК могут созревать без участия Drosha или Dicer, обходя один из этапов канонического процессинга [2, 10, 77, 102, 114, 155]. Такие пути получили название неканонических и подразделяются на Drosha-независимые и

Dicer-независимые [2, 10, 114]. Drosha-независимый путь характерен для микроРНК, кодируемых внутри интронов белок-кодирующих генов. Их процессинг включает: (1) вырезание интрона во время сплайсинга с последующим образованием шпилечной структуры, аналогичной pre-miRNA; (2) экспорт в цитоплазму через Exportin-5; (3) обработку Dicer, после чего микроРНК включается в RISC [9, 114, 123]. Данный путь позволяет клетке использовать уже существующие механизмы сплайсинга для генерации функциональных микроРНК. Dicer-независимый путь, в свою очередь, исключает цитоплазматический этап расщепления, таким образом pri-miRNA процессируется Drosha, формируя короткий pre-miRNA (~17 нуклеотидов) [114]. Из-за небольшой длины такая pre-miRNA не может быть обработана Dicer и сразу интегрируется в AGO2, который расщепляет одну из цепей [114]. Процесс созревания завершает дополнительное укорачивание при помощи поли-(А)-специфичной рибонуклеазы (PARN) [114]. Данный путь адаптирован для микроРНК, функциональность которых критична для клеток, но Dicer может быть слабо экспрессирован или отсутствовать [2, 10, 77, 102, 114, 155].

МикроРНК представляют собой важный компонент сложной регуляторной сети организма и играют ключевую роль в подавлении экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, связываясь с нетранслируемыми участками мРНК и вызывая их деградацию или обратимую инактивацию [10, 46]. Согласно последним оценкам, микроРНК могут регулировать экспрессию более 60% генов человека, тем самым участвуя в контроле важных биологических процессов, таких как рост и дифференцировка клеток, апоптоз, развитие иммунных реакций и т.д. [2, 4, 10, 46, 114, 153]. Чаще всего микроРНК лишь частично изменяют экспрессию гена-мишени, однако в редких случаях могут полностью её подавлять [46]. Они выполняют функцию микро-регуляторов экспрессии, формируя своеобразную систему защиты, предотвращающую неконтролируемый синтез белков [2, 10, 46, 155].



Примечание: Pol II – РНК-полимераза II, pri-miRNA – первичные транскрипты микроРНК, pre-miRNA – предшественник микроРНК, Drosha – РНКаза III Drosha, DGCR8 – белок DiGeorge синдром-критический регион 8, Dicer – РНКаза III Dicer, TRBP – TAR-связывающий белок РНК, AGO – белок Argonaute, RISC – РНК-индуцируемый комплекс выключения гена.

Рисунок 3 – Канонический и неканонический пути биогенеза микроРНК [102]

Процесс регуляции микроРНК осуществляется в два этапа: распознавание мишени и её последующее подавление [10, 155]. Распознавание происходит за счёт комплементарного взаимодействия участка узнавания (seed region) микроРНК с соответствующим фрагментом в мРНК [114, 155]. Одна микроРНК

может связываться и регулировать сотни мРНК-мишеней, и в то же время, каждая мРНК может содержать несколько сайтов связывания микроРНК, взаимодействующих как синергетически, так и антагонистически, формируя сложные регуляторные сети, что обеспечивает избыточность и пластичность системы (плейотропность действия) [2, 144, 162]. Таким образом, микроРНК представляют собой эволюционно консервативный механизм регуляции экспрессии генов, необходимый для нормального функционирования клеток и систем организма [10].

МикроРНК могут взаимодействовать с генами как на уровне транскрипции, так и после синтеза мРНК, что позволяет контролировать продукцию белков, отвечающих за функции клеток и тканей [46]. Нарушение этого регуляторного механизма, вызванное генетическими аномалиями (например, делециями, амплификациями или мутациями), может привести к различным патологиям [46, 144, 159]. Важным аспектом является и эпигенетическая регуляция экспрессии микроРНК, которая может быть изменена вследствие метилирования ДНК, модификации гистонов и других факторов, влияющих на транскрипцию и стабильность микроРНК [46, 144]. Например, снижение активности белков p53 и c-Myc, которые участвуют в регуляции транскрипции, может изменить экспрессию микроРНК, нарушая их нормальное функционирование [69]. Кроме того, нарушения на уровне молекул, отвечающих за биогенез микроРНК, таких как Drosha и Dicer, также могут привести к изменению их концентрации и активности, что способствует развитию различных заболеваний, включая аутоиммунные, в том числе АП [2, 36, 149].

#### **1.4. Секретия микроРНК во внеклеточную среду и их диагностический потенциал**

Помимо внутриклеточных функций, микроРНК активно участвуют в межклеточной коммуникации, и могут быть обнаружены в большинстве биологических жидкостей, таких как кровь (сыворотка, плазма, цельная кровь), моча, слюна, грудное молоко, семенная жидкость, спинномозговая жидкость и др. [10, 126, 141, 145, 154]. Впервые данное явление было обнаружено в 2008 году, когда в материнской плазме выявили микроРНК плацентарного происхождения, а также была отмечена их устойчивость и стабильность, что позволило рассматривать микроРНК как потенциальные биомаркеры [4].

На сегодняшний день установлено, что в отличие от молекул РНК, которые во внеклеточной среде подвержены быстрой деградации из-за высокой активности рибонуклеаз, фосфодиэстераз, а также за счет естественной лабильности химической структуры, молекулы микроРНК сохраняют устойчивость благодаря образованию комплексов с белками-переносчиками, ассоциации с липопротеинами и инкапсуляции во внеклеточные везикулы, тем самым сохраняя свою стабильность во внеклеточной среде до нескольких часов [4, 10, 114, 126, 141].

Одним из ключевых механизмов защиты микроРНК от деградации во внеклеточной среде на который приходится до 90% всех комплексов, является их связывание с белками-переносчиками [126, 155]. Наиболее изученными являются белки семейства AGO, в частности AGO1 и AGO2 [126, 155]. Помимо AGO-белков, в транспорте микроРНК могут участвовать и другие белки, такие как нуклеофосмин (NPM1), однако данный механизм требует дальнейших исследований [10, 77, 126, 155]. Кроме белковых комплексов, микроРНК могут быть ассоциированы с липопротеинами высокой (ЛПВП) и низкой (ЛПНП) плотности [10, 114, 155].

Иным способом секреции микроРНК во внеклеточную среду является их инкапсуляция во внеклеточные везикулы, такие как экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца [4, 114, 126, 141, 155].

Несмотря на то, что на долю данных переносчиков приходится около 10% от общего количества внеклеточных микроРНК, согласно последним исследованиям, микроРНК составляют около 50% всей везикулярной РНК и могут играть ключевую роль в процессах межклеточной коммуникации [4, 10, 77, 102, 114, 126, 155]. Экзосомы представляют собой эндосомально-образованные небольшие (по разным данным от 50 до 100 нм) частицы, окруженные двойной липидной мембраной, и образуются путем слияния мультивезикулярного тела (образуется путем инвагинаций стенок поздних эндосом) с клеточной мембраной и его последующей секрецией во внеклеточную среду [114, 126, 141, 155]. Они содержат микроРНК, сигнальные молекулы, белки и липиды, обеспечивая эффективную межклеточную коммуникацию [114, 126, 141, 155]. В ряде исследований *in vitro* была установлена способность соседних клеток поглощать экзосомы, что привело к концепции межклеточной коммуникации по типу «сообщения в бутылке» [141]. Более того, согласно другой гипотезе, существует селективность упаковки микроРНК в экзосомы [141, 144], поскольку состав внутриклеточного пула микроРНК часто не совпадает с набором микроРНК в экзосомах [114, 126, 141, 155]. Помимо экзосом, микроРНК могут высвобождаться в составе микровезикул (50–1000 нм), которые образуются путем прямого отпочкования клеточной мембраны [114, 126, 141, 155]. Данный механизм позволяет клеткам активно регулировать состав внеклеточного микроРНК-пула, влияя на соседние клетки [114, 141]. Также микроРНК могут высвобождаться в составе апоптотических телец (0,03–5 мкм), образующихся при программируемой клеточной гибели, однако из-за размеров апоптотические тельца при обработке образцов крови преимущественно осаждаются вместе с клеточной фракцией, в связи с чем данный тип везикул часто остается вне фокуса исследований, однако в ряде работ показано, что их микроРНК-профиль

соответствует профилю экспрессии в родительских клетках [10, 114, 126, 141, 155].

Таким образом, секреция и высвобождение микроРНК во внеклеточную среду осуществляются через несколько взаимосвязанных механизмов, включая белковые комплексы, липопротеиновую ассоциацию и инкапсуляцию во внеклеточные везикулы [126, 141]. Данные процессы обеспечивают стабильность микроРНК при циркуляции, а также в межклеточной коммуникации, что делает микроРНК перспективными кандидатами на роль биомаркеров [145].

Многочисленные исследования подтверждают значимость микроРНК в диагностике и прогнозировании различных заболеваний, например, в ревматологии при таких заболеваниях как ревматоидный артрит и системная красная волчанка [32, 51, 67, 74], в неврологии для диагностики болезни Альцгеймера, эпилепсии, повреждений спинного мозга и других нейродегенеративных патологий [92, 152], онкологии [66, 105, 121, 127, 144], при сердечно-сосудистых [135] и многих других заболеваниях [36, 106, 107, 149]. Однако существуют лишь единичные исследования, в которых изучается экспрессия микроРНК при АП (Таблица 1).

Идеальный биомаркер должен соответствовать определенным критериям. Во-первых, он должен быть легко доступен, что означает возможность его обнаружения и измерения с помощью минимально инвазивных процедур [110]. Другим важным критерием является его специфичность по отношению к исследуемой патологии, за которой следует чувствительность (биомаркер должен определяться предпочтительно до появления клинических симптомов и изменяться в зависимости от прогрессирования заболевания или реакции на лечение) [110]. Наконец, он должен быть реализуем не только в условиях научной лаборатории, но и экстраполироваться в клиническую практику [110].

Долгое время считалось, что РНК не могут использоваться в качестве биомаркеров из-за высоких уровней нуклеаз в плазме, однако данная гипотеза была опровергнута после открытия микроРНК [114]. Впервые микроРНК как возможные биомаркеры заболеваний начали обсуждать в 2008 году, когда

Lawrie et al. использовали их для диагностики диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы определяя экспрессию микроРНК в сыворотке крови пациентов [145]. С тех пор потенциал микроРНК как биомаркеров упоминается в литературе при различных патологиях, поскольку данный класс молекул обладает рядом преимуществ.

Как уже упоминалось, идеальный биомаркер должен быть легко доступен, и микроРНК соответствуют данному критерию, так как могут быть обнаружены с помощью жидкостной биопсии, например, из крови, мочи и других биологических жидкостей [4, 126, 145]. МикроРНК также обладают высокой специфичностью по отношению к тканям или типам клеток, из которых они происходят, и чувствительностью, изменяясь в зависимости от прогрессирования заболевания, что подтверждено в исследованиях по дифференциации стадий рака [4, 104, 126] и по оценке ответа на терапию [110]. Более того, технологии для обнаружения нуклеиновых кислот существуют и широко используются в лабораторной практике, тем самым разработка метода анализа экспрессии микроРНК требует меньше времени и средств по сравнению, например, с созданием новых антител для белковых биомаркеров [133]. Еще одно преимущество микроРНК заключается в их потенциале использования в качестве мульти-маркерных моделей для точной диагностики, целенаправленного лечения и оценки ответа на терапию [110]. В то время как анализ большого количества белковых маркеров может быть дорогостоящим и трудоемким, использование панелей из нескольких микроРНК предоставляет неинвазивный метод диагностики и прогноза заболевания [110, 129]. Например, определение в моче «портрета» микроРНК при волчаночном нефрите способствовало раннему выявлению почечного фиброза у таких пациентов [110]. Подобные методы ранней диагностики возможных исходов заболевания особенно важны для онкологических пациентов, поскольку при диагностике рака предпочтительна мульти-маркерная стратегия [110].

Таким образом, микроРНК в последние годы стали рассматривать как перспективные биомаркеры различных заболеваний, поскольку данные малые

некодирующие молекулы можно легко выделять из различных типов субстратов, в частности из биологических жидкостей, а также они обладают высокой специфичностью, так как экспрессия микроРНК строго связана с тканью или клеточным типом происхождения и уровни чувствительно изменяются при развитии патологического процесса, позволяя дифференцировать стадии заболевания и отслеживать реакцию на терапию [4, 110]. Кроме того, уже существуют разработанные методы детекции нуклеиновых кислот, и разработка новых тестов требует меньших экономических затрат. Помимо этого, малый размер микроРНК, устойчивость к действию РНКаз, многократным циклам замораживания и оттаивания, значительным изменениям pH, а также к длительной инкубации при комнатной температуре, делает их более стабильными и, следовательно, менее подверженными деградации [147].

Дополнительным преимуществом микроРНК является возможность их использования в многомаркерных панелях для повышения точности диагностики, персонализированного подбора терапии и мониторинга эффективности лечения. Например, в онкологии многомаркерный подход особенно важен из-за высокой гетерогенности опухолей, и уже было показано, что панель из девяти микроРНК значительно улучшает диагностику рака молочной железы [110].

Однако исследования микроРНК как биомаркеров всё ещё находятся на ранних стадиях, и на данный момент полученные данные часто трудно воспроизвести. Различия в методах сбора, транспортировки и хранения образцов, а также разнообразие аналитических подходов затрудняют стандартизацию результатов [154]. Разработка унифицированных протоколов позволит микроРНК стать ключевым инструментом персонализированной медицины, обеспечивая более точную диагностику и мониторинг заболеваний.

## 1.5. Методы детекции и анализа уровня экспрессии микроРНК

В настоящее время для определения уровня экспрессии микроРНК в биологических образцах используют несколько методов, а именно, секвенирование малых РНК, гибридизационный анализ на микрочипах и полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ; qRT-PCR, англ. Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR) [10, 126, 131, 132, 133, 134]. Однако, в настоящее время невозможно выделить один из них как наилучший, поскольку каждый метод применяется в зависимости от конкретных задач исследования, и представлен несколькими вариантами протоколов, обладающих как преимуществами, так и ограничениями [10, 126, 131, 132, 133, 134].

Отличительной особенностью секвенирования, является то, что данный метод позволяет оценить весь спектр РНК в образце, и таким образом одновременно анализирует экспрессию всей совокупности микроРНК, включая ранее не выявленные, их предшественники и другие классы РНК [126]. Однако, одним из основных недостатков является потребность в большем исходном количестве РНК для проведения исследования, что, однако, может быть не всегда доступно при работе с биологическими субстратами, полученными от пациентов [10, 126, 131, 132, 133, 134]. Процесс подготовки библиотек для секвенирования занимает продолжительное время, а стоимость расходных материалов, реактивов и оборудования остается высокой. Кроме того, в ходе создания библиотек для секвенирования, этапы лигирования и преамплификации могут вносить систематические ошибки в представленность отдельных микроРНК образца и даже приводить к потере редких последовательностей и изоформ [10, 126]. Также, полученные данные требуют сложной биоинформатической обработки, и выбор методики анализа напрямую влияет на итоговые результаты. Из-за малой длины микроРНК могут возникать специфические трудности при выравнивании и аннотации последовательностей [126]. В связи с этим результаты секвенирования

часто демонстрируют значительные расхождения между разными исследованиями и требуют независимого подтверждения, например с использованием ПЦР-РВ [133].

Гибридизационный анализ на микрочипах является альтернативным методом изучения экспрессии микроРНК [10, 31, 126, 131, 132, 133, 134]. В отличие от секвенирования, он позволяет анализировать заранее определённый набор микроРНК, но при этом способен одновременно детектировать сотни различных молекул [126, 131, 132, 133, 134]. Как и при секвенировании, для выполнения анализа требуется относительно большее стартовое количество исходной РНК (от 100 до 1000 нг), а также существует этап преамплификации, которая может вносить ошибки в итоговые данные [126]. Миниатюрные гибридизационные системы позволяют одновременно анализировать уровень экспрессии микроРНК и генов в одном образце, что способствует изучению их функциональных взаимодействий [31, 126]. Принцип данного метода основан на обратной гибридизации в твердой фазе: зонды ковалентно связаны твердым носителем, в то время молекулы микроРНК маркируются и находятся в жидкой фазе [126]. В последние годы предложены различные модификации данного метода. Например, система Nanostring nCounter использует флуоресцентно меченые зонды для мультиплексного анализа микроРНК [133, 134], или, для повышения точности могут применяться зонды на основе LNA (Locked Nucleic Acid), позволяющие минимизировать ошибки, связанные с различиями в температурах плавления при исследовании большого пула микроРНК [133, 134]. В целом, анализ на микрочипах является бюджетной и быстрой альтернативой секвенированию в случаях, когда предварительно известен спектр микроРНК в образце. Однако экстракция микроРНК из биологических жидкостей менее эффективна по сравнению с выделением из клеток или тканей [126]. Кроме того, микрочип не является количественным методом, поэтому применяется преимущественно для предварительного скрининга, а окончательная валидация значимых микроРНК должна проводиться с использованием ПЦР-РВ [126].

ПЦР-РВ остается наиболее доступным и широко используемым методом определения экспрессии микроРНК. Данный метод характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью, что делает возможным проведение исследования даже с минимальным количеством исходного биологического материала [42]. Также, ПЦР-РВ часто применяется в качестве подтверждающего метода для результатов, полученных с помощью секвенирования или гибридизационного анализа на микрочипах [42]. Одним из ключевых преимуществ ПЦР-РВ является простота использования в рутинной практике, широкий диапазон детекции, а также возможность анализа как отдельных микроРНК, так и в формате панелей, включающих сотни различных микроРНК [42]. Для этого используются микропланшеты, в которых каждая лунка содержит специфические праймеры для определенной микроРНК [42].

Для постановки ПЦР-РВ существует множество модификаций метода на различных его этапах, однако, преимущественно он выполняется с помощью двух основных подходов, которые различаются на этапе обратной транскрипции (ОТ), а именно применение петлевых праймеров (метод stem-loop) или олиготимидинового праймера (метод полиаденилирования), а также по способу количественной детекции продукта — с использованием флуоресцентно меченых гидролизующихся зондов (TaqMan ПЦР) или интеркалирующих флуоресцентных красителей (SYBR Green) [10, 133].

Если рассматривать метод stem-loop, то он подразумевает использование специально разработанных синтезированных праймеров, которые применяются на этапе ОТ [96]. Данные праймеры представляют собой олигонуклеотидные последовательности, образующие шпильковую (stem-loop) структуру, которая включает несколько функциональных элементов: его 3'-конец содержит участок, комплементарный последовательности микроРНК, что обеспечивает специфичное связывание и инициацию синтеза кДНК [96]. Центральная часть формирует петлевую структуру, стабилизирующую гибридизацию и предотвращающую неспецифическое связывание [96]. В 5'-концевом фрагменте праймера расположены дополнительные нуклеотидные последовательности, необходимые

для последующей амплификации [96, 126]. Все это обеспечивает селективность обратной транскрипции, позволяя различать даже изоформы микроРНК, отличающиеся всего одним нуклеотидом [96]. После обратной транскрипции кДНК амплифицируется с применением стандартных прямого и обратного праймеров, а количественный анализ проводится в реальном времени с использованием флуоресцентных меток, добавляемых в реакционную смесь [96].

Метод полиаденилирования предполагает использование на этапе обратной транскрипции олиготимидинового (поли(Т)) праймера [42, 126, 134]. После того как фермент поли(А)-полимераза добавляет к 3'-концу микроРНК поли(А)-хвост, для синтеза кДНК используется антисмысловый праймер, содержащий поли(Т)-последовательность [42, 126]. В результате, праймер комплементарно связывается с удлинённым поли(А)-хвостом, что позволяет запустить процесс ОТ [42, 126]. Дополнительно к поли(Т)-последовательности такой праймер может содержать универсальную последовательность на 5'-конце, которая затем используется в качестве участка для связывания обратного праймера в ПЦР-амплификации [10, 42, 126]. Преимущество метода полиаденилирования заключается в его универсальности, так как он позволяет амплифицировать любые микроРНК без необходимости разрабатывать индивидуальные праймеры [10, 42, 126, 131]. Однако, по сравнению с методом stem-loop он может обладать меньшей специфичностью, поскольку одинаковая поли(А)-последовательность присутствует во многих образцах [42, 126, 161].

TaqMan ПЦР основан на использовании флуоресцентно меченых зондов, которые специфически гибридизуются с целевой микроРНК [104, 126]. В процессе амплификации зонд разрушается ДНК-полимеразой, высвобождая флуоресцентный сигнал [42, 104, 126]. Использование TaqMan-зондов обеспечивает высокую специфичность метода, а также позволяет проводить мультиплексный анализ, детектируя несколько мишеней в одном образце за счет использования зондов с различными флуорофорами [42, 104, 126]. Однако к недостаткам метода можно отнести более высокую стоимость по сравнению с

SYBR Green ПЦР, поскольку для каждой анализируемой микроРНК требуется индивидуальный зонд, что увеличивает стоимость [42, 104, 126].

При SYBR Green ПЦР используется интеркалирующий агент, связывающийся с двухцепочечной ДНК, что позволяет регистрировать флуоресценцию по мере накопления продукта [10, 42, 104, 126, 131, 132]. Преимущество метода — универсальность и низкая стоимость, однако меньшая специфичность требует анализа кривых плавления для исключения неспецифической амплификации [10, 42, 104, 126, 131, 132].

Процесс анализа данных экспрессии микроРНК можно условно разделить на два ключевых этапа: подготовку данных и статистическую обработку результатов [42, 104, 126]. Одним из важнейших аспектов подготовки является выбор метода нормализации, который определяется объемом данных и используемой методологией [42, 104, 126].

Для нормализации данных гибридизационного анализа на микрочипах часто применяется усреднение значений порогового цикла для всех микроРНК в образце [126]. Аналогичный подход используется при секвенировании, где нормализация выражается в единицах встречаемости на миллион прочтений (RPM) [104, 126]. Данные методы позволяют выявлять основные закономерности в данных, но требуют значительного числа мишеней, что ограничивает их применение в исследованиях, включающих небольшие панели или единичные микроРНК [10, 126].

При использовании ПЦР-РВ для оценки уровня экспрессии микроРНК применяется метод  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , позволяющий рассчитывать относительный уровень экспрессии по сравнению со стандартом (внутренний контроль) [101]. В качестве нормализаторов предложены гены домашнего хозяйства (например, GAPDH), ядерные микроРНК (например, snRNU6, snRNU48), или ядерные малые РНК (U6, U48, U44) [10, 126]. Однако, не всегда нормализация способна обеспечить высокую воспроизводимость результатов, так как уровень их экспрессии может варьировать в зависимости от типа образца и условий эксперимента [126].

## **1.6. Факторы, влияющие на точность и воспроизводимость анализа экспрессии микроРНК: ключевые методологические трудности**

Анализ экспрессии микроРНК сопряжен с рядом сложностей и требует учета множества факторов, важнейшими из которых можно считать выбор типа образцов, их возможная "загрязненность" и отсутствие единого стандарта для интерпретации полученных данных [4, 31, 42].

Одним из ключевых аспектов является выбор анализируемого биологического материала [126]. В большинстве исследований предпочтение отдается плазме или сыворотке крови, поскольку данные субстраты наиболее стабильны для определения микроРНК [126]. При этом выбор антикоагулянта для осуществления забора играет критически важную роль [4, 31, 42]. Оптимальным вариантом считается использование этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), тогда как цитрат и гепарин не рекомендуются из-за их ингибирующего воздействия на ферменты, применяемые в ПЦР-РВ [4, 31, 42, 73]. Также необходимо учитывать объем пробы, используемой для экстракции микроРНК, поскольку данный параметр также влияет на воспроизводимость результатов и должен быть четко регламентирован в протоколе исследования [4, 31, 42].

Не менее важен вопрос хранения образцов [126]. Согласно ряду исследований, микроРНК сохраняют свою стабильность при +4°C в течение 72 часов, а при -20°C или -80°C — на протяжении нескольких месяцев [4, 31, 42]. Однако концентрация некоторых микроРНК может снижаться при хранении при +4°C, поэтому при необходимости предпочтительнее мгновенное замораживание образцов при -80°C [4, 31, 42]. Также необходимо учитывать возможные изменения уровня экспрессии микроРНК при повторных циклах замораживания и размораживания, поскольку данный фактор также может оказывать значительное влияние на результаты [4, 31, 42, 104].

Структура экспрессии микроРНК зависит от используемого метода экстракции [10]. Наиболее распространенные подходы включают использование

смеси гуанидин-тиоцианата, фенола и хлороформа или коммерческих наборов, таких как miRNeasy (Qiagen), mirVana (Ambion) и PureLink (Invitrogen) и др. [4, 10, 31, 42]. Исследования показывают, что сочетание фенольной экстракции и ультрафильтрации через спин-колонки позволяет добиться высокой эффективности выделения как общей, так и микроРНК [4].

Дополнительным фактором, влияющим на экспрессию микроРНК, является физиологическое состояние организма [4]. Например, голодание может влиять на уровень экспрессии микроРНК за счет изменения концентрации ЛПВП, участвующих в их транспорте [4, 114]. В свою очередь, после приема пищи повышенный уровень липопротеинов может затруднять процесс экстракции микроРНК, что также необходимо учитывать при планировании исследования [4, 114]. Кроме того, выраженные межиндивидуальные различия (возраст, пол, этническая принадлежность, уровень физической активности, циркадные ритмы и прием лекарственных препаратов) могут существенно повлиять на результаты анализа [4].

Важным аспектом количественной оценки микроРНК является их нормализация. Выделяют два метода: абсолютное и относительное количественное определение микроРНК, и в большинстве случаев используется относительный метод оценки уровня экспрессии, предполагающий сравнение уровня экспрессии целевых микроРНК с генами внутреннего контроля [126].

Дополнительно необходимо учитывать межметодическую вариабельность. Согласно исследованию Mestdagh P. et al., проведенному в рамках проекта miRQC, при сравнении 12 коммерчески доступных платформ для анализа микроРНК степень совпадения результатов между разными методами составила не более 55% [10, 72]. Это подчеркивает необходимость дополнительных валидационных экспериментов для получения достоверных данных.

Таким образом, исследование уровня экспрессии микроРНК требует строгого контроля преаналитических условий, выбора подходящего метода экстракции и нормализации данных. Учитывая вариабельность результатов,

особое внимание следует уделять стандартизации методов анализа и проведению валидационных исследований.

### **1.7. Современные данные о микроРНК в патогенезе и диагностике аутоиммунной пузырчатки**

Несмотря на продолжающиеся исследования в различных областях медицины направленные на изучение роли микроРНК в патологических процессах, данная область остается еще недостаточно глубоко изученной, поскольку микроРНК являются сравнительно молодой областью научного знания [114]. Однако обнаружение микроРНК, специфичных для определенных заболеваний, и понимание их роли в диагностике, прогнозировании и лечении открывают новые перспективы для современной медицины [36, 110].

Нарушение регуляции микроРНК играет ключевую роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний, способствуя развитию аутоиммунной реакции Т-клеток, активации воспалительных путей и продукции цитокинов, а также регулированию активации В-клеток и индукции апоптоза [2, 67, 74, 106, 149, 155]. Современные исследования свидетельствуют о том, что микроРНК, благодаря своей тканеспецифичной экспрессии и способности быстро покидать клетки и сохраняться в биологических жидкостях, могут обладать большей чувствительностью и специфичностью по сравнению с традиционными биомаркерами [155]. Однако на сегодняшний день существует ограниченное количество публикаций, посвященных изучению экспрессии микроРНК при АП (Таблица 1).

В исследованиях, касающихся экспрессии микроРНК в контексте АП, пока не выработан единый подход к выбору субстратов, протоколов выделения и оценки экспрессии, а также не достигнут консенсус относительно микроРНК, которые могли бы быть использованы в качестве диагностических маркеров

заболевания (Таблица 1). Так, например, в исследовании He W. et al. (2022) на основе анализа экспрессии микроРНК в плазме пациентов с АП было выявлено повышение экспрессии 12 микроРНК, среди которых, например, miR-584-5p и miR-155-5p продемонстрировали чувствительность и специфичность для диагностики АП 95,5% и 100% соответственно [81]. Также была установлена сильная корреляция между уровнем экспрессии miR-326 и тяжестью заболевания по индексу PDAI [81]. В другом исследовании, проведенном Lin N. et al. (2018), основной акцент был сделан на miR-338-3p, уровень которой при АП был не только повышен, но и постепенно снижался при эффективной терапии [156]. В то же время, в исследовании He W. et al. (2022) miR-338-3p была исключена как микроРНК с низкой экспрессией [81]. В работе Valentino A. et al. (2023) впервые сообщается о снижении экспрессии микроРНК при АП, а именно miR-148a-3p [122].

На сегодняшний день в опубликованных работах было проанализировано более 170 микроРНК в различных субстратах, однако особое внимание уделяется miR-338-3p и miR-424-5p, поскольку нарушения их экспрессии могут быть ключевыми звеньями в патогенезе АП [21, 85, 86, 87, 156].

Так предполагается, что miR-338-3p играет роль в патогенезе заболевания [85, 86] и, согласно одной из гипотез, может приводить к нарушению баланса Th1/Th2-клеток через снижение экспрессии мРНК *RNF114* (англ. E3 ubiquitin-protein ligase *RNF114*; убиквитин-протеинлигаза E3 *RNF114*), который участвует в регуляции апоптоза и активации Т-клеток [80, 150, 156]. Согласно другой гипотезе, еще одной целевой мишенью для miR-338-3p является ген *TRADD* (англ. Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein - белок домена смерти, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли типа 1), поскольку в исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo* при сверхэкспрессии miR-338-3p отмечалось снижение уровня мРНК *TRADD* [85]. Таким образом, сверхэкспрессия miR-338-3p может являться одним из пусковых механизмов нарушения баланса Th1/Th2 клеток, что, в свою очередь, лежит в основе теории патогенеза АП [64]. В ряде исследований было показано, что у пациентов с

активной стадией АП экспрессия miR-338-3p значительно повышена по сравнению с контрольной группой, при этом ее уровень демонстрирует прямую корреляцию с тяжестью заболевания, оцененной по индексу PDAI [88, 115, 119]. Это делает miR-338-3p перспективным биомаркером для диагностики АП, а также для мониторинга активности заболевания и прогнозирования его течения.

В отличие от miR-338-3p, исследования роли miR-424-5p в патогенезе АП проводились не *in vitro*, а с использованием биоинформатических методов и компьютерных моделей для предсказания генов-мишеней [87], и согласно полученным результатам, 52 потенциальных гена-мишени miR-424-5p участвуют в активации p38 MAPK-киназы и в MAPK сигнальном пути, который регулирует аутоиммунные реакции, клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, а также влияет на реорганизацию цитоскелета и разрушение десмосом [35, 54, 59, 76]. Кроме того, у пациентов с АП наблюдалось статистически значимое повышение уровня экспрессии miR-424-5p по сравнению с контрольной группой [9, 87].

Таким образом, miR-338-3p и miR-424-5p являются перспективными биомаркерами для диагностики АП.

Таблица 1 – Сравнение публикаций, посвященных изучению экспрессии МикроРНК при аутоиммунной пузырчатке [21]

Публикация	Фенотип АП	Общее число изученных микроРНК	Ключевые микроРНК	Субстрат	Метод детекции	Внутренний контроль
Valentino A. et al. [122]	ВП	86	hsa-miR-148a-3p; hsa-miR-146b-5p; hsa-miR-126; hsa-miR-139	Экзосомы, полученные из плазмы крови	ПЦР-РВ, TaqMan	U6
Khabou B. et al. [108]	ЛП	6	hsa-miR-17-5p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-146a-5p; hsa-miR-155-5p; hsa-miR-338-3p; hsa-miR-21	Мононуклеарные клетки периферической крови/биоптаты кожи	ПЦР-РВ *	*
He W. et al. [81]	ВП	12	hsa-miR-125b-5p; hsa-miR-146a-5p; hsa-miR-148a-3p; hsa-miR-150-5p; hsa-miR-155-5p; hsa-miR-181a-5p; hsa-miR181b-5p; hsa-miR-326;	Плазма крови	ПЦР-РВ, SYBR Green I	5S рРНК

Продолжение Таблицы 1

			hsa-miR-338-3p; hsa-miR-423-5p; hsa-miR-424-5p; hsa-miR-584-5p			
Xu M. et al. [86]	ВП	1	hsa-miR-338-3p	Мононуклеарные клетки периферической крови	ПЦР-РВ, SYBR Green I	U6
Lin N. et al. [156]	ВП	1	hsa-miR-338-3p	Мононуклеарные клетки периферической крови	ПЦР-РВ, SYBR Green I	U6
Liu Q. et al. [85]	ВП	1	hsa-miR-338-3p	Мононуклеарные клетки периферической крови	ПЦР-РВ, SYBR Green I	18srRNA
Wang M. et al. [87]	ВП	124	hsa-miR-424-5p	Мононуклеарные клетки периферической крови	ПЦР-РВ, SYBR Green I	U6
Примечание. АП – аутоиммунная пузырчатка; ВП – вульгарная пузырчатка; ЛП – листовидная пузырчатка; ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени. Во всех исследованиях детекция экспрессии осуществлялась с использованием метода ПЦР-РВ * Подробная информация о методе не доступна						

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1. Дизайн исследования**

Перед началом исследования, в соответствии с поставленной целью и задачами, был определен его дизайн, представленный на Рисунке 4. Дизайн исследования сформулирован как проспективное сравнительное исследование.

Диссертационная работа была выполнена на клинической базе кафедры кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова Института клинической медицины Н.В. Склифосовского УКБ № 2 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Лабораторные исследования проводились на базе кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет). Диссертационная работа проводилась в период с 2022 по 2025 годы. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Протокол №02-23 от 26.01.2023).

### **2.2. Характеристика пациентов**

Всего в исследование было набрано 82 пациента, которые в соответствии с клиническими данными разделены на четыре группы: 1 – пациенты с АП в активной стадии заболевания; 2 – пациенты с АП в стадии ремиссии; 3 – контрольная группа условно здоровых добровольцев; 4 – контрольная группа пациентов с иными буллезными дерматозами в активной стадии.

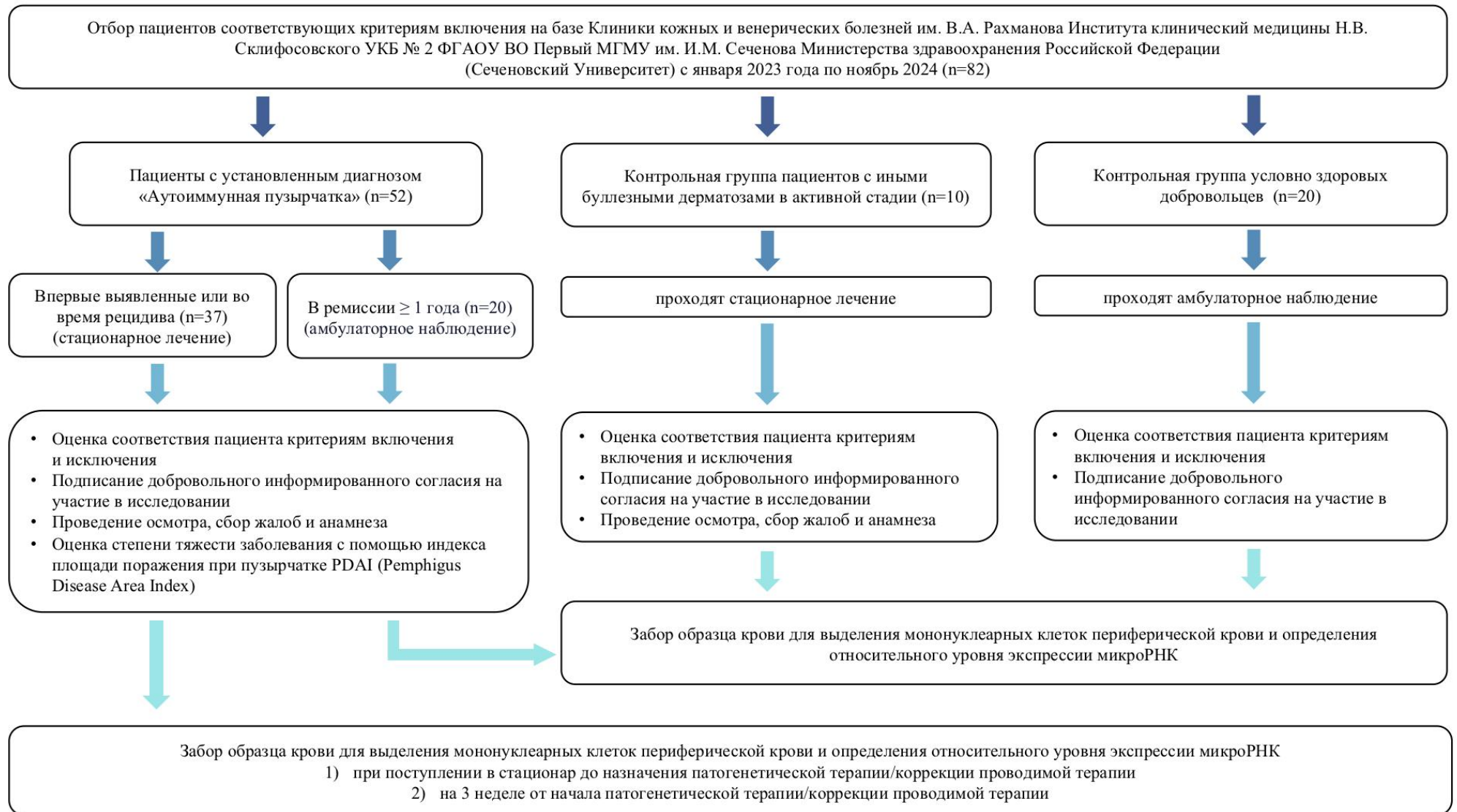
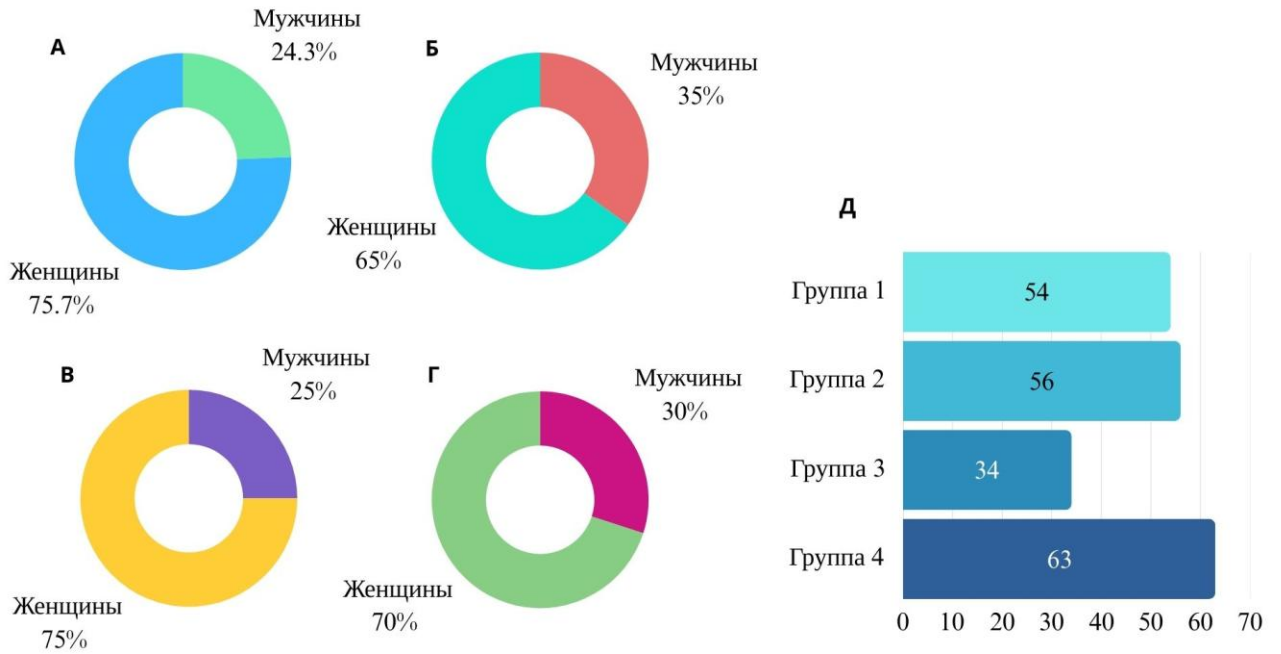


Рисунок 4 – Дизайн исследования



Примечание: А – процентное соотношение мужчин и женщин среди пациентов с АП в активной стадии заболевания. Б – процентное соотношение мужчин и женщин среди пациентов с АП в стойкой ремиссии. В – процентное соотношение мужчин и женщин среди пациентов контрольной группы условно здоровых добровольцев. Г – процентное соотношение мужчин и женщин среди пациентов контрольной группы пациентов с иными буллезными дерматозами в активной стадии. Д – средний возраст пациентов с АП и групп контроля.

Рисунок 5 – Эпидемиологические данные пациентов с АП и групп контроля

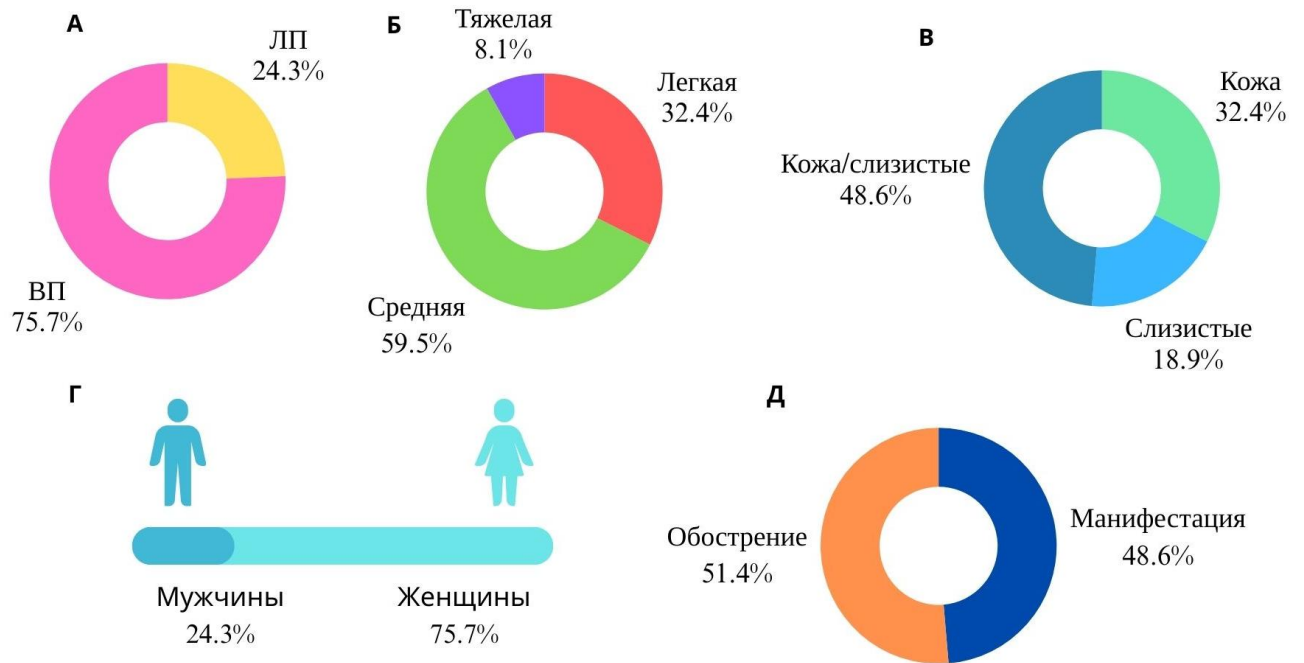
Группа №1 включала 37 пациентов с впервые выявленным или ранее установленным диагнозом «Аутоиммунная пузырчатка» в активной стадии заболевания (Таблица 2). Из них 9 мужчин (24,3%) и 28 женщин (75,7%). Средний возраст пациентов с АП составил  $54 \pm 13,93$  года (Рисунок 5). Группа включала 28 (75,7%) пациентов с диагнозом вульгарная пузырчатка и 9 (24,3%) с листовидной пузырчаткой, у 19 (51,4%) из которых наблюдался рецидив ранее диагностированной АП, а у 18 (48,6%) манифестация заболевания. У 12 (32,4%) пациентов высыпания наблюдались только на коже, у 18 (48,6%) наблюдалось поражение как кожи, так и слизистых оболочек, у 7 (18,9%) высыпания были локализованы только на слизистых. Среди пациентов у 12 (32,4%) была установлена легкая степень тяжести, у 22 (59,5%) – средняя,

и у 3 (8,1%) – тяжелая степень тяжести (Рисунок 6). Среди пациентов у 8 (21,62%) наблюдались признаки стероидной резистентности, которая устанавливалась на основании следующих критериев: (1) отсутствие положительной динамики в виде заживления уже существующих высыпаний, а также появление новых и увеличение старых элементов на фоне монотерапии ГКС в относительно высоких дозах (трехнедельное лечение системными ГКС в дозе 1,5 мг/кг); (2) частые рецидивы на фоне терапии ГКС, имеющие упорное течение (Таблица 2). Забор проб для исследования в группе №1 осуществлялся дважды: забор первой пробы происходил при поступлении в стационар, и у 18 (48.65%) пациентов производился до начала патогенетической терапии ГКС (0 мг), 19 пациентов (51.35%) на момент поступления уже получали терапию ГКС в дозе  $24,6 \pm 16,7$  мг (забор образца производился до повышения дозы системных ГКС); для второй пробы забор материала происходил на третьей неделе патогенетической терапии ГКС в дозе  $81,5 \pm 8,16$  мг.

Оценка степени тяжести заболевания проводилась с помощью индекса площади поражения при пузырчатке PDAI (Pemphigus Disease Area Index - индекс площади поражения при пузырчатке), где легкая степень тяжести определяется значением до 15 баллов, средняя — в диапазоне от 15 до 45 баллов, а тяжелая — свыше 45 баллов.

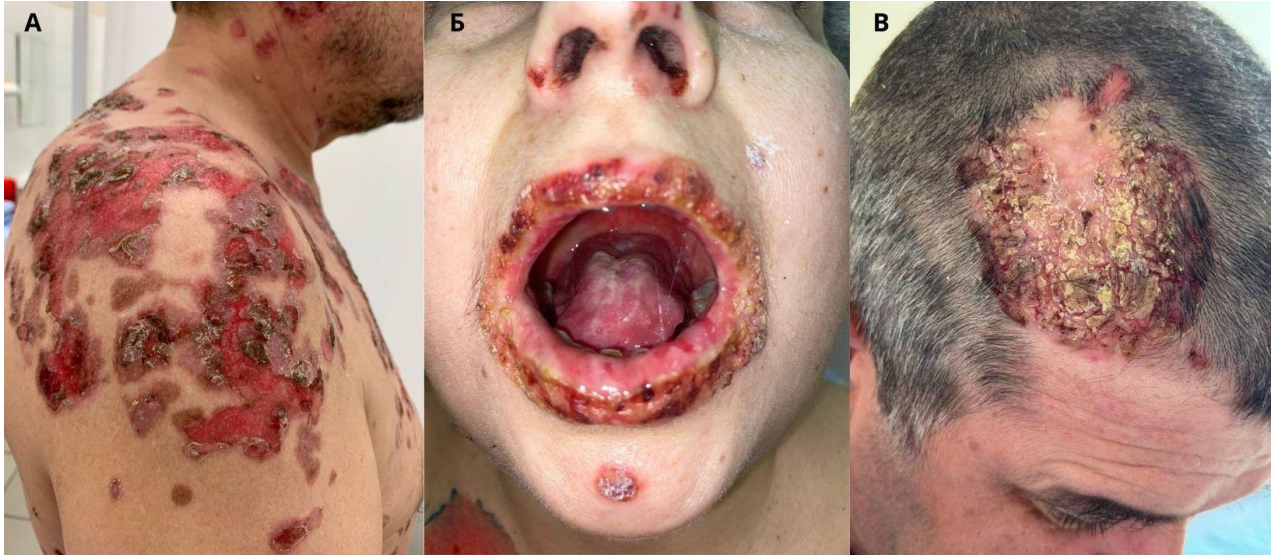
Диагноз устанавливался на основе жалоб, анамнеза пациентов, характерной клинической картины, положительного результата на наличие антител в сыворотке крови к десмоглеинам 1 и/или 3, а также гистологических признаков (обнаружение в биоптатах интраэпидермального супрабазального акантолиза с формированием щелевидных полостей, содержащих акантолитические клетки), и положительных результатов прямой иммунофлюоресценции (отложение IgG и компонента C3 комплемента на уровне межклеточных соединений шиповатого слоя эпидермиса). После подтверждения диагноза пациенты находились на стационарном лечении в дерматовенерологическом отделении клиники кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова УКБ № 2 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Клинические особенности высыпаний у пациентов данной группы представлены на Рисунке 7. В данной группе 5 пациентов также наблюдались повторно по достижению ими стадии ремиссии АП; 11 пациентов выразили желание прекратить свое участие в исследовании на этапе 3 недели нахождения на стационарном лечении и забора повторной пробы биоматериала.



Примечание: А – процентное соотношение пациентов с вульгарной и листовидной формой АП в активной стадии заболевания. Б – процентное соотношение легкой, средней и тяжелой степеней тяжести течения АП. В – процентное соотношение пациентов с поражением только кожи, кожи и слизистых, только слизистых. Г – процентное соотношение мужчин и женщин среди пациентов с АП в активной стадии заболевания. Д – процентное соотношение пациентов с манифестацией и обострением АП.

Рисунок 6 – Эпидемиологические данные пациентов группы №1 с аутоиммунной пузырчаткой в активной стадии заболевания



Примечание: А, Б – проявления вульгарной пузырчатки, В – проявление листовидной пузырчатки.

Рисунок 7 – Клиническая характеристика пациентов группы №1

Таблица 2 – Клинические данные пациентов группы №1

№	Пол	Возраст	Диагноз	Активность	Длительность заболевания (в годах)	Локализация высыпаний	Принимаемый ГКС (МНН)	Доза ГКС (мг) при поступлении	РДАІ при поступлении	Доза ГКС (мг) на 3 неделе	РДАІ на 3 неделе	Степень тяжести	Признаки стероидной резистентности
1	М	53	ВП	АМ	1,1	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	66	80	38	тяжелая	нет
2	М	52	ЛП	АМ	3	Кожа	Преднизолон	0	22	80	16	средняя	нет
3	М	36	ВП	АМ	1	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	81	100	64	тяжелая	нет
4	Ж	45	ВП	АО	3,4	Кожа/ слизистые	Преднизолон	15	37	80	27	средняя	да
5	Ж	64	ЛП	АМ	0,1	Кожа	Преднизолон	0	19	80	16	средняя	нет
6	Ж	56	ВП	АМ	0,8	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	30	80	22	средняя	нет
7	Ж	30	ЛП	АМ	1	Кожа	Преднизолон	0	22	80	11	средняя	нет
8	М	38	ВП	АМ	0,1	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	17	80	10	средняя	нет

Продолжение Таблицы 2

9	Ж	52	ВП	АМ	0,2	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	91	100	67	тяжелая	нет
10	М	38	ЛП	АМ	0,4	Кожа	Преднизолон	0	19	80	10	средняя	нет
11	Ж	55	ВП	АО	1,2	Слизистые	Преднизолон	17,5	8	80	8	легкая	да
12	Ж	55	ВП	АО	1,1	Слизистые	Преднизолон	17,5	30	80	28	средняя	да
13	Ж	36	ВП	АО	0,8	Слизистые	Преднизолон	17,5	22	80	15	средняя	да
14	Ж	37	ВП	АМ	0,7	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	19	80	14	средняя	нет
15	Ж	77	ВП	АМ	0,7	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	34	80	24	средняя	нет
16	Ж	50	ВП	АО	0,9	Кожа/ слизистые	Преднизолон	20	4	60	2	легкая	нет
17	Ж	60	ВП	АО	1	Слизистые	Преднизолон	25	17	//	//	средняя	нет
18	Ж	56	ВП	АО	5	Кожа/ слизистые	Преднизолон	15	35	100	54	средняя	да
19	Ж	83	ВП	АМ	0,2	Слизистые	Преднизолон	0	12	//	//	легкая	нет
20	Ж	60	ВП	АМ	0,1	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	12	80	9	легкая	нет
21	Ж	44	ВП	АО	6	Кожа/ слизистые	Метилпреднизолон	12,5	15	70	12	средняя	да

Продолжение Таблицы 2

22	Ж	58	ВП	АМ	4	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	26	80	16	средняя	нет
23	Ж	44	ВП	АО	4	Кожа	Преднизолон	10	7	80	6	легкая	нет
24	Ж	80	ВП	АО	16	Кожа	Метилпреднизолон	5	11	//	//	легкая	нет
25	Ж	50	ВП	АМ	0,5	Слизистые	Преднизолон	0	9	80	7	легкая	да
26	М	61	ЛП	АО	0,5	Кожа	Преднизолон	15	13	//	//	легкая	нет
27	М	33	ЛП	АО	0,7	Кожа	Преднизолон	60	5	80	3	легкая	нет
28	М	61	ВП	АМ	2	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	36	80	26	средняя	нет
29	Ж	62	ВП	АМ	0,4	Кожа/ слизистые	Преднизолон	0	21	//	//	средняя	нет
30	Ж	59	ВП	АО	0,7	Кожа/ слизистые	Преднизолон	45	15	//	//	средняя	нет
31	Ж	69	ЛП	АМ	0,1	Кожа	Преднизолон	0	18	//	//	средняя	нет
32	Ж	52	ВП	АО	0,6	Кожа	Преднизолон	60	20	80	15	средняя	да
33	М	47	ЛП	АО	0,9	Кожа	Преднизолон	30	16	80	10	средняя	нет
34	Ж	76	ВП	АО	9	Кожа/ слизистые	Преднизолон	12,5	7	//	//	легкая	нет
35	Ж	40	ЛП	АО	3	Кожа	Преднизолон	50	7	//	//	легкая	нет

## Продолжение Таблицы 2

36	Ж	82	ВП	АО	0,5	Кожа/ слизистые	Преднизолон	25	26	//	//	средняя	нет
37	Ж	49	ВП	АО	0,7	Слизистые	Преднизолон	15	3	//	//	легкая	нет

Примечание 1: ВП – вульгарная пузырчатка; ЛП – листовидная пузырчатка; АО-активный процесс, обострение ранее диагностированной АП; АМ-активный процесс, манифестация, диагноз установлен впервые; ГКС – системные глюкокортикостероиды (преднизолон или другие глюкокортикостероидные препараты в соответствии с преднизолоновым эквивалентом); МНН — международное непатентованное название.

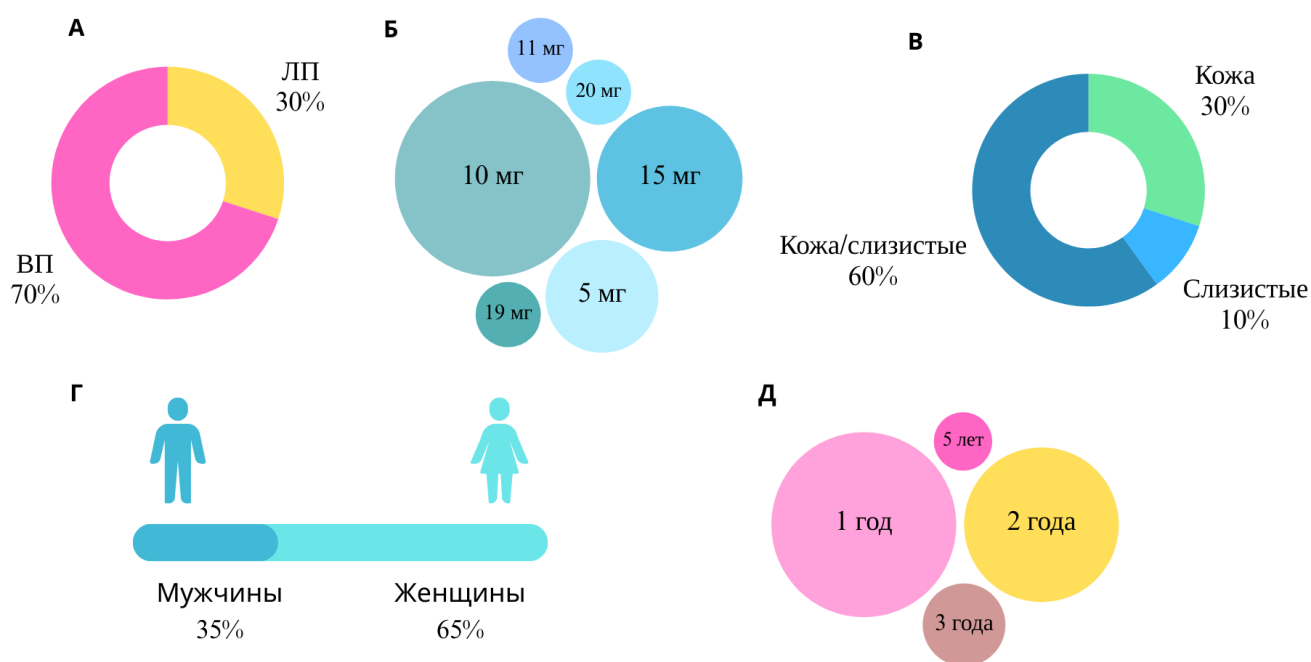
Примечание 2: У пациентов, не получающих терапию ГКС (0 мг), был произведен забор материала до начала терапии ГКС (пациенты с впервые выявленным диагнозом, либо пациенты с ранее установленным диагнозом, по каким-либо причинам прекратившие прием ГКС).

Примечание 3: Степень тяжести указывается на основании индекса PDAI, где легкая степень (1) соответствует показателям до 15 баллов, средняя степень (2) - от 15 до 45 баллов, тяжелая степень (3) - более 45 баллов.

Примечание 4: Критерии для оценки наличия стероидной резистентности включали (1) отсутствие положительной динамики в виде заживления уже существующих высыпаний, а также появление новых и увеличение старых элементов на фоне монотерапии ГКС в относительно высоких дозах (трёхнедельное лечение системными ГКС в дозе 1,5 мг/кг); (2) частые рецидивы на фоне терапии ГКС, имеющие упорное течение.

Примечание 5: Знаком «//» обозначены пациенты, которые выразили желание прекратить участие в исследовании.

Группа №2 включала 20 пациентов с АП в стадии ремиссии, продолжающейся более 1 года, и получающих поддерживающую дозу системных ГКС. (Таблица 3). Из них 7 мужчин (35%) и 13 женщин (65%). Средний возраст пациентов составил  $56 \pm 12,81$  года (Рисунок 5). В группу вошли 14 (70%) пациентов с диагнозом вульгарная пузырчатка и 6 (30%) с листовидной пузырчаткой. Поддерживающая доза ГКС составляла  $12,53 \pm 5,09$  мг. Средняя продолжительность ремиссии составила  $1,7 \pm 1,01$  лет. В период обострения заболевания у 6 (30%) пациентов высыпания наблюдались только на коже, у 12 (60%) наблюдалось вовлечение в патологический процесс как кожи, так и слизистых оболочек, и у 2 (10%) высыпания были локализованы только в области слизистых оболочек. (Рисунок 8).



Примечание: А – процентное соотношение пациентов с вульгарной и листовидной формой АП в ремиссии заболевания. Б – пузырьковая диаграмма поддерживающей дозы системных глюкокортикостероидов в мг у пациентов в ремиссии. В – процентное соотношение пациентов с поражением только кожи, кожи и слизистых, только слизистых (во время обострения). Г – процентное соотношение мужчин и женщин среди пациентов с АП в ремиссии. Д – пузырьковая диаграмма продолжительности ремиссии у пациентов в группе №2 в годах.

Рисунок 8 – Эпидемиологические данные пациентов группы №2 с аутоиммунной пузырчаткой в стадии ремиссии

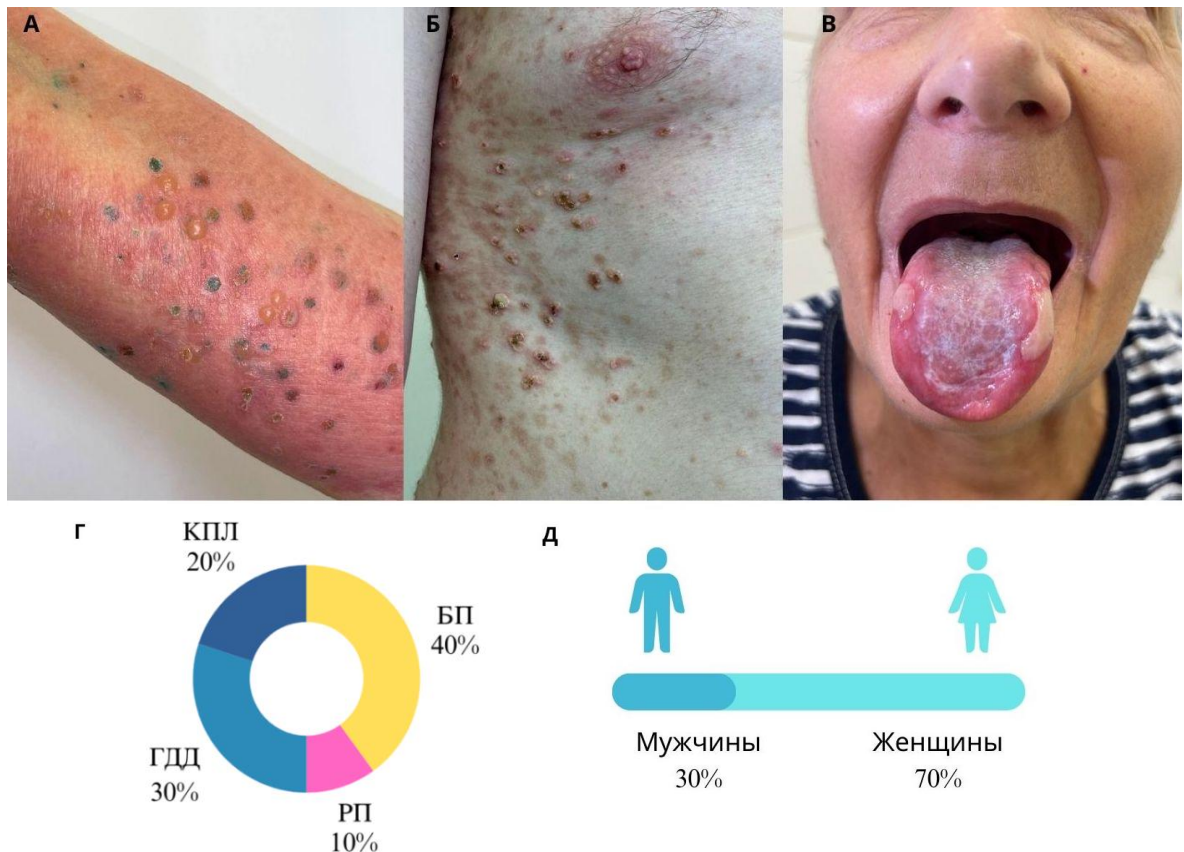
Таблица 3 – Клинические данные пациентов группы №2

№	Пол	Возраст	Диагноз	Длительность ремиссии (в годах)	Локализация сыпи в период обострения	Поддерживающая доза ГКС, мг
1	Ж	57	ВП	2	Слизистые	10
2	Ж	49	ВП	2	Кожа/слизистые	10
3	М	65	ВП	2	Кожа/слизистые	10
4	М	50	ВП	2	Кожа/слизистые	10
5	М	40	ВП	1	Слизистые	20
6	Ж	59	ВП	2	Кожа/слизистые	10
7	Ж	63	ЛП	2	Кожа	10
8	Ж	52	ЛП	2	Кожа	11,25
9	Ж	69	ЛП	3	Кожа	5
10	М	40	ВП	1,5	Кожа/слизистые	15
11	М	64	ВП	1	Кожа/слизистые	15
12	Ж	66	ВП	1	Кожа/слизистые	10
13	М	54	ЛП	1	Кожа	10
14	Ж	31	ЛП	1	Кожа	15
15	Ж	52	ВП	1	Кожа/слизистые	15
16	М	39	ВП	1	Кожа/слизистые	19
17	Ж	73	ВП	1	Кожа/слизистые	15
18	Ж	65	ВП	1	Кожа/слизистые	10
19	Ж	55	ЛП	5	Кожа	5
20	Ж	83	ВП	3	Кожа/слизистые	5

Примечание: ВП – вульгарная пузырчатка; ЛП – листовидная пузырчатка;  
ГКС – глюкокортикостероид

Группа №3 – контрольная группа из 20 условно здоровых участников, 15 женщин (75%) и 5 мужчин (25%); средний возраст составил  $34 \pm 11,5$  лет (Рисунок 5).

Группа №4 – контрольная группа пациентов с иными буллезными дерматозами в активной стадии заболевания. В группу были включены 10 пациентов: 4 с диагнозом буллезный пемфигоид Левера (40%), 2 – с эрозивно-язвенной формой красного плоского лишая (20%), 2 – с диагнозом герпетиформный дерматит Дюринга (30%), и 1 с диагнозом рубцующий пемфигоид (10%) (Рисунок 9); 7 женщин (70%) и 3 мужчин (30%), средний возраст составил  $65 \pm 18,58$  лет (Рисунок 5). Забор материала для исследования производился до начала патогенетической терапии ГКС.



Примечание: А, Б – проявления герпетиформного дерматита Дюринга, В – проявление с эрозивно-язвенной формы красного плоского лишая. Г – процентное соотношение пациентов группы №4, КПЛ – эрозивно-язвенная форма красного плоского лишая, ГДД – герпетиформный дерматит Дюринга, БП – буллезный пемфигоид Лавера, РП – рубцующий пемфигоид. Д – процентное соотношение мужчин и женщин среди пациентов группы №4.

Рисунок 9 – Клиническая и эпидемиологическая характеристика пациентов группы №4

Критерии включения пациентов в исследование: лица обоих полов с ранее или впервые установленным диагнозом «Вульгарная пузырьчатка» или «Листовидная пузырьчатка»; возраст пациентов от 18 лет; добровольное желание пациента и наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании; согласие на обработку персональных данных.

Критерии включения в группу контроля условно-здоровых участников: лица обоих полов; возраст от 18 лет; желание добровольца и наличие

подписанного информированного согласия на участие в исследовании; согласие на обработку персональных данных.

Критерии включения в группу контроля с иными буллезными дерматозами: лица обоих полов с ранее или впервые установленным диагнозом «Буллезный пемфигоид Левера», «Герпетиформный дерматит Дюринга», «Красный плоский лишай слизистой оболочки полости рта и губ, эрозивно-язвенная или буллезная форма», «Рубцующий пемфигоид» в активной стадии заболевания; возраст от 18 лет; желание добровольца и наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании; согласие на обработку персональных данных.

Критерии невключения пациентов: несоответствие критериям включения; беременность и период лактации; наличие тяжёлых сопутствующих или других аутоиммунных заболеваний в анамнезе; отказ пациента от участия в исследовании.

Критерии невключения в группу контроля условно-здоровых участников: несоответствие критериям включения; наличие тяжёлых сопутствующих или других аутоиммунных заболеваний в анамнезе; нежелание участвовать в исследовании.

Критерии невключения пациентов в группу контроля с иными буллезными дерматозами: несоответствие критериям включения; беременность и период лактации; наличие тяжёлых сопутствующих или других аутоиммунных заболеваний в анамнезе; отказ пациента от участия в исследовании.

Критерии исключения пациентов с АП, участников условно-здоровой группы контроля и участников группы контроля с другими буллезными дерматозами: желание прекратить участие в исследовании.

### 2.3. Методы исследования

Для оценки уровня относительной экспрессии микроРНК у пациентов с АП и групп контроля первым этапом был проведен литературный поиск для выбора исследуемых микроРНК и методики их выделения и оценки относительного уровня экспрессии.

Анализ литературных источников показал, что в исследованиях, посвященных микроРНК при АП было изучено более 120 микроРНК в различных биологических субстратах, но отсутствует консенсус в отношении диагностически значимых для заболевания микроРНК. Однако, основываясь на имеющихся экспериментальных данных, как наиболее перспективные для дальнейших исследований и специфичными для данного заболевания были выбраны пять микроРНК: miR-338-3p, miR-424-5p, miR-584-5p, miR-155-5p, miR-326 (Таблица 1).

Для количественного определения относительных и абсолютных уровней микроРНК в биологических образцах наиболее точным и чувствительным методом является полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) [124]. Однако в современных исследованиях наблюдается значительная вариабельность в модификациях метода ПЦР и способах детекции результатов. Открытыми остаются вопросы оптимального выбора биологического субстрата для анализа (плазма крови, мононуклеарные клетки, экзосомы, биоптаты кожи) и определения наиболее подходящего внутреннего контроля для нормализации экспрессии микроРНК (Таблица 1).

В качестве субстрата для оценки относительного уровня экспрессии микроРНК в данном исследовании были выбраны мононуклеарные клетки периферической крови (лимфоциты, моноциты, дендритные клетки), поскольку данные клетки играют ключевую роль в иммунном ответе и развитии воспалительного процесса [104]. Для анализа экспрессии микроРНК использовался метод stem-loop ПЦР-РВ, который был выбран как точный и

специфичный за счет использования шпильковых праймеров, обеспечивающих селективное связывание с 3'-концом зрелой микроРНК и исключающих амплификацию ее предшественников, что позволяет достоверно определить даже низкие уровни микроРНК. Кроме того, stem-loop ПЦР-РВ является экономически более доступной методикой по сравнению с альтернативными методами, и не требует сложных биоинформатических расчетов, что делает его более применимой к рутинной исследовательской практике [94, 130].

### **2.3.1. Описание медицинского вмешательства**

Все пациенты в активной стадии заболевания проходили лечение в стационаре клиники кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова Института клинической медицины Н.В. Склифосовского УКБ № 2 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), где производился забор биоматериала перед началом терапии и в ходе обследования на 3 неделе нахождения в стационаре. У пациентов в стадии ремиссии забор образцов происходил амбулаторно в день посещения врача. Контрольная группа также формировалась в амбулаторных условиях, и забор материала проводился во время посещения клиники. Все пациенты подписали информированное добровольное согласие перед включением в исследование.

У всех пациентов осуществлялся забор периферической венозной крови в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА К2 с аэрозольным покрытием. Процедура забора проводилась в условиях процедурного кабинета. После забора крови исследуемый материал транспортировался при температуре +4°C в лабораторию при кафедре молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

(Пироговский Университет). Выделение моноклеарных клеток периферической крови проводилось в течение 5 часов после забора образца.

### **2.3.2. Методика выделения, детекции и анализа уровня относительной экспрессии микроРНК**

После взятия образцов крови в течение 5 часов после забора проводили выделение МКПК методом центрифугирования в градиенте плотности Фиколл (1,077 г/см<sup>3</sup>) («ПанЭко», Россия). Для этого цельную кровь предварительно разбавляли фосфатно-солевым буфером в соотношении 1:1, затем наслаивали на 2 мл раствора Фиколла и центрифугировали при 1600 об/мин в течение 30 минут. В результате в пробирке формировались четко выраженные слои: верхний – плазма, под ним тонкое интерфазное кольцо, содержащее моноклеарные клетки (лимфоциты, моноциты, дендритные клетки), затем слой Фиколла и в нижней части – осадок других клеточных фракций (эритроцитов и т.д.).

Интерфазный слой, содержащий МКПК, аккуратно отбирали пипеткой со срезанным носиком, перенося в чистую пробирку, после чего клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером путем центрифугирования при 800 об/мин в течение 10 минут. Затем супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в небольшом объеме буфера. Полученные МКПК помещали в криопробирки и хранили при -80°C до последующего анализа.

Выделение микроРНК из МКПК осуществляли с применением набора реагентов «Лира» (Биолабмикс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя (Рисунок 10). Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) использовали технологию «StemLoop», а обратную транскрипцию выполняли с помощью набора «ОТ-1» (Синтол, Россия). Подбор праймеров осуществлялся с помощью базы данных miRBase (<https://mirbase.org/>), а также

miRNA Design Tool (<http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool/>) и Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Таблица 4).

Реакцию проводили отдельно для miR-338-3p, miR-424-5p, miR-584-5p, miR-155-5p, miR-326 и U6 (малая ядерная РНК), применяя специфические RT-праймеры (Синтол, Россия). Реакционная смесь включала 10 мкл 2,5× реакционной смеси, 1 мкл специфического праймера для обратной транскрипции, 1 мкл фермента MMLV, 3 мкл воды без нуклеаз и 10 мкл раствора РНК. Программа реакции состояла из инкубации при 37°C в течение 30 минут, инактивации фермента при 95°C в течение 5 минут и последующего охлаждения.

Оценку экспрессии микроРНК выполняли в триплетах методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), используя набор «2,5× Реакционная смесь для ПЦР-РВ с SYBR Green I» (Синтол, Россия) в общем объеме 25 мкл. Смесь для ПЦР включала 10 мкл 2,5× реакционной смеси с SYBR Green I, 1 мкл смеси праймеров (10 пмоль/мкл) в 5-кратном разведении, 0,5 мкл MgCl<sub>2</sub> (25 мМ), 1 мкл кДНК в 5-кратном разведении и 12,5 мкл ddH<sub>2</sub>O. Программа амплификации состояла из начальной денатурации (95°C, 10 мин), 40 циклов (95°C – 30 сек, 60°C – 20 сек, 72°C – 1 мин) и финального этапа (95°C – 5 мин). Реакцию проводили на приборе Bio-Rad iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc, США).

Оценку уровня экспрессии микроРНК проводили путем ее сравнения с экспрессией малой ядерной РНК U6, используемой в качестве контроля благодаря ее стабильному уровню экспрессии. Интенсивность флуоресцентного сигнала выражалась в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ). Результатом ПЦР-РВ являлось значение порогового цикла (Ct) - количество циклов амплификации, необходимых для превышения флуоресцентным сигналом порогового уровня. Данный показатель находился в обратной зависимости от концентрации целевой нуклеиновой кислоты: чем ниже Ct, тем выше уровень экспрессии микроРНК в образце.

В ходе проводимых ПЦР-РВ с образцами пациентов, экспериментально было установлено, что оптимальными для получения пиков плавления и кривых

плавления с не менее 1000 относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) в ПЦР-РВ для подобранных последовательностей прямых и обратных праймеров (Таблица 4), а также исследуемой кДНК, служит разведение кДНК и синтезированных праймеров в 5 раз.

Для микроРНК miR-584-5p, miR-155-5p, miR-326 при трехкратном повторении ПЦР-РВ на 5 образцах пациентов из группы №1, а также 5 образцах из группы №3 репрезентативных данных получено не было, оптимальных пиков плавления и кривых плавления не наблюдалось (пики до 300 ОЕФ). Таким образом, miR-584-5p, miR-155-5p, miR-326 были в дальнейшем выведены из исследования по причине отсутствия достоверных данных об экспрессии.

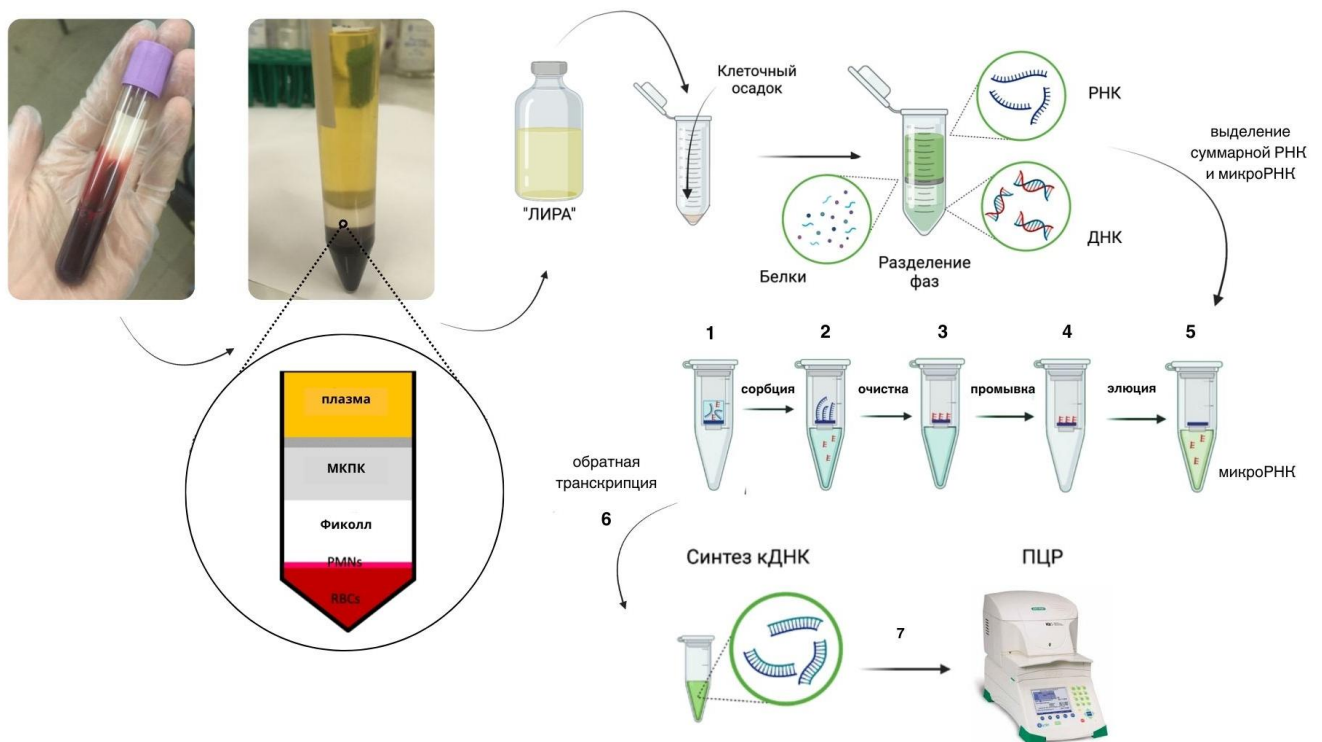


Рисунок 10 – Процесс выделения микроРНК из мононуклеарных клеток периферической крови

Таблица 4 – Нуклеотидные последовательности праймеров

Праймер	Нуклеотидная последовательность
Праймеры для обратной транскрипции	
RT-oligo-miR-338-3p	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CTGGATACGACAGGTCG-3'
RT-oligo-miR-424-5p	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CTGGATACGACGTCGTC-3'
RT-oligo- miR-584-5p	5'- GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CCAGAGCCAAC CTCAGT-3'
RT-oligo-miR-155-5p	5'- GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CCAGAGCCAAC AACCCC-3'
RT-oligo-miR-326	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CTGGATACGACTGAATC-3'
RT-oligo-U6	5'- GTCGTGTCTGAGGCTGACTGAGACCTATTCGCA CCTGACACGACGGCCATGC-3'
Амплификационные праймеры	
Forward - miR-338-3p	5'-TACGTTGTTTTAGTGACTACGACCT-3'
Reverse - miR-338-3p	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'
Forward - miR-424-5p	5'-CCAAGTTTTGTACTTAACGACGAC-3'
Reverse - miR-424-5p	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'
Forward - miR-584-5p	5'-GTGTTATGGTTTGCCTGGG-3'
Reverse - miR-584-5p	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
Forward - miR-155-5p	5'-GGGGTTAATGCTAATCGTGATA-3'
Reverse - miR-155-5p	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

## Продолжение Таблицы 4

Forward - miR-326	5'-AACACGCCTCATCTGTCTGTTG-3'
Reverse - miR-326	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTC-3'
Forward - U6	5'-GGCCGCATACAGAGAAGATTA-3'
Reverse - U6	5'-CTGAGGCTGACTGAGACCT-3'

### 2.3.3. Методы статистической обработки данных

Анализ полученных данных осуществлялся с использованием прикладных программ Microsoft Excel, GraphPad Prism 10.1.1 и Jamovi 2.3.28. Относительный уровень экспрессии микроРНК рассчитывали по стандартной методике  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [101]. Нормальность распределения выборок определялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Статистическая значимость различий между данными независимых групп оценивалась с применением U-критерия Манна–Уитни и критерия Краскела-Уоллиса, а между зависимыми группами с помощью T-критерия Вилкоксона. Корреляционный анализ выполнялся с использованием коэффициентов Спирмена. Для определения диагностической значимости относительных уровней экспрессии использовался ROC-анализ, пороговые значения устанавливали на основе индекса Юдена.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. Относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой и групп контроля

Результаты экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p МКПК пациентов с АП в активной стадии заболевания (группа №1), пациентов с АП в ремиссии (группа №2), а также контрольных групп условно здоровых добровольцев (группа №3) и пациентов с иными буллезными дерматозами в активной стадии (группа №4) представлены в Таблицах 5-14.

Таблица 5 – Относительный уровень экспрессии miR-338-3p в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов группы №1 до начала терапии системными глюкокортикостероидами

Номер пациента	miR-338-3p Ct	U6 Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	8,46	19,40	-10,94	-4,17	18,017
2	11,02	20,86	-9,84	-3,07	8,405
3	11,20	22,4	-11,20	-4,43	21,574
4	12,49	21,88	-9,40	-2,63	6,174
5	10,67	19,9	-9,23	-2,46	5,507
6	10,54	20,75	-10,22	-3,45	10,900
7	12,77	22,63	-9,86	-3,09	8,493
8	12,42	21,91	-9,49	-2,72	6,594
9	8,65	20,31	-11,66	-4,89	29,574
10	13,33	22,63	-9,30	-2,53	5,781
11	14,005	23,76	-9,75	-2,98	7,897
12	12,8	23,50	-10,70	-3,93	15,255
13	14,1	24,65	-10,55	-3,78	13,749
14	13,625	22,75	-9,13	-2,36	5,120

## Продолжение Таблицы 5

15	9,74	20,80	-11,06	-4,29	19,579
16	14,35	22,80	-8,45	-1,68	3,207
17	10,8	20,28	-9,48	-2,71	6,549
18	12,25	23,25	-11,00	-4,23	18,782
19	15,815	24,79	-8,98	-2,21	4,615
20	16,325	25,55	-9,23	-2,46	5,488
21	11,02	21,36	-10,34	-3,57	11,886
22	7,315	18,00	-10,68	-3,91	15,045
23	12,77	21,88	-9,11	-2,34	5,067
24	10,97	19,90	-8,93	-2,16	4,473
25	8,27	17,25	-8,98	-2,21	4,631
26	7,77	17,13	-9,36	-2,59	6,005
27	6,415	15,41	-8,99	-2,22	4,663
28	8,335	19,01	-10,67	-3,90	14,941
29	17,54	27,89	-10,35	-3,58	11,969
30	15,35	23,90	-8,55	-1,78	3,437
31	17,4	26,35	-8,95	-2,18	4,535
32	8	17,70	-9,70	-2,93	7,628
33	13,84	23,30	-9,46	-2,69	6,459
34	15,65	24,78	-9,13	-2,36	5,138
35	7,9	16,90	-9,00	-2,23	4,695
36	14,815	25,67	-10,85	-4,08	16,927
37	11,05	19,80	-8,75	-1,98	3,948

Таблица 6 – Относительный уровень экспрессии miR-424-5p в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов группы №1 до начала терапии системными глюкокортикостероидами

Номер пациента	miR-424-5p Ct	U6 Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	9,57	19,67	-10,11	-2,74	6,663
2	12,34	21,86	-9,53	-2,16	4,458
3	10,64	22,00	-11,36	-3,99	15,848
4	12,57	22,38	-9,82	-2,45	5,450
5	9,67	20,40	-10,74	-3,37	10,312
6	11,20	21,75	-10,56	-3,19	9,102
7	12,93	23,63	-10,70	-3,33	10,030
8	11,31	21,91	-10,60	-3,23	9,358
9	9,05	20,17	-11,12	-3,75	13,466
10	13,33	23,63	-10,31	-2,94	7,654
11	13,28	23,71	-10,43	-3,06	8,318
12	11,16	21,68	-10,53	-3,16	8,915
13	15,18	25,15	-9,98	-2,61	6,089
14	13,49	23,75	-10,27	-2,90	7,445
15	10,52	22,30	-11,78	-4,41	21,277
16	13,17	23,28	-10,12	-2,75	6,710
17	11,44	20,78	-9,35	-1,98	3,935
18	12,37	23,25	-10,89	-3,52	11,442
19	14,57	25,29	-10,72	-3,35	10,205
20	16,07	26,55	-10,49	-3,12	8,671
21	11,52	22,86	-11,34	-3,97	15,684
22	8,315	19,00	-10,68	-3,31	9,926
23	12,77	22,88	-10,11	-2,74	6,686
24	10,67	20,90	-10,23	-2,86	7,266
25	8,27	18,25	-9,98	-2,61	6,110
26	7,77	18,13	-10,36	-2,99	7,924
27	6,415	16,41	-9,99	-2,62	6,153

## Продолжение Таблицы 6

28	8,335	19,01	-10,67	-3,30	9,858
29	18,04	28,89	-10,85	-3,48	11,168
30	15,35	24,90	-9,55	-2,18	4,535
31	17,4	27,35	-9,95	-2,58	5,985
32	8,14	18,20	-10,06	-2,69	6,459
33	13,84	24,30	-10,46	-3,09	8,522
34	15,65	25,78	-10,13	-2,76	6,780
35	7,9	18,40	-10,50	-3,13	8,762
36	17,82	26,82	-9,00	-1,63	3,098
37	10,55	21,30	-10,75	-3,38	8,667

Таблица 7 – Относительный уровень экспрессии miR-338-3p в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов группы №1 на третьей неделе терапии системными глюкокортикостероидами

Номер пациента	miR-338-3p Ct	U6 Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	10,30	20,27	-9,97	-3,20	9,198
2	12,25	21,13	-8,88	-2,11	4,321
3	10,635	20,88	-10,24	-3,47	11,090
4	13,45	22,00	-8,55	-1,78	3,437
5	10,43	18,24	-7,81	-1,04	2,051
6	11,25	20,42	-9,17	-2,40	5,283
7	11,84	21,01	-9,17	-2,40	5,283
8	12,595	21,06	-8,47	-1,70	3,241
9	8,55	20,00	-11,45	-4,68	25,656
10	13,35	21,89	-8,54	-1,77	3,413
11	13,985	23,65	-9,67	-2,90	7,445
12	12,695	23,55	-10,86	-4,09	16,986
13	13,45	23,90	-10,45	-3,68	12,828

## Продолжение Таблицы 7

14	13,05	21,81	-8,76	-1,99	3,976
15	10,91	21,91	-11,00	-4,23	18,782
16	15,3	23,42	-8,12	-1,35	2,543
17	-	-	-	-	-
18	10,455	21,80	-11,35	-4,58	23,855
19	-	-	-	-	-
20	17,62	25,40	-7,78	-1,01	2,016
21	11,8	22,23	-10,43	-3,66	12,652
22	8,135	17,38	-9,24	-2,47	5,545
23	13,45	22,00	-8,55	-1,78	3,437
24	-	-	-	-	-
25	11,75	20,42	-8,67	-1,90	3,735
26	-	-	-	-	-
27	8,495	16,56	-8,07	-1,30	2,456
28	9,05	19,25	-10,20	-3,43	10,787
29	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-
32	9,75	18,31	-8,56	-1,79	3,461
33	14,55	22,91	-8,36	-1,59	3,013
34	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-

Таблица 8 – Относительный уровень экспрессии miR-424-5p в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов группы №1 на третьей неделе терапии системными глюкокортикостероидами

Номер пациента	miR-424-5p Ct	U6 Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	10,79	20,30	-9,51	-2,14	4,411
2	11,60	21,00	-9,40	-2,03	4,088
3	12,00	22,90	-10,90	-3,53	11,561
4	11,90	22,15	-10,25	-2,88	7,368
5	8,00	19,20	-11,20	-3,83	14,234
6	11,10	20,90	-9,80	-2,43	5,394
7	14,10	24,45	-10,35	-2,98	7,897
8	12,00	22,15	-10,15	-2,78	6,874
9	10,10	21,70	-11,60	-4,23	18,782
10	14,20	24,65	-10,45	-3,08	8,463
11	14,75	25,90	-11,15	-3,78	13,749
12	11,50	22,80	-11,30	-3,93	15,255
13	14,20	24,20	-10,00	-2,63	6,196
14	12,40	23,00	-10,60	-3,23	9,391
15	9,65	21,40	-11,75	-4,38	20,840
16	13,85	23,00	-9,15	-1,78	3,437
17	-	-	-	-	-
18	11,45	23,10	-11,65	-4,28	19,444
19	-	-	-	-	-
20	17,15	27,15	-10,00	-2,63	6,196
21	10,45	21,70	-11,25	-3,88	14,736
22	9,1	19,80	-10,70	-3,33	10,065
23	11,35	22,15	-10,80	-3,43	10,787
24	-	-	-	-	-
25	9,6	19,75	-10,15	-2,78	6,874
26	-	-	-	-	-
27	7,15	17,00	-9,85	-2,48	5,584

Продолжение Таблицы 8

28	8,55	19,45	-10,90	-3,53	11,561
29	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-
32	9,15	19,00	-9,85	-2,48	5,584
33	13,65	24,20	-10,55	-3,18	9,071
34	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-

Таблица 9 – Относительный уровень экспрессии miR-338-3p в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов группы №2

Номер пациента	miR-338-3p Ct	U6 Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	13,85	22,05	-8,20	-1,43	2,703
2	12,03	21,0	-9,00	-2,23	4,679
3	13,47	23,0	-9,52	-2,75	6,710
4	13,81	21,8	-7,99	-1,22	2,323
5	15,60	22,8	-7,21	-0,44	1,358
6	15,56	23,3	-7,77	-1,00	2,002
7	11,90	19,6	-7,72	-0,95	1,934
8	17,41	25,4	-8,00	-1,23	2,348
9	16,32	24,8	-8,48	-1,71	3,274
10	19,77	26,4	-6,64	0,13	0,911
11	11,62	19,1	-7,43	-0,66	1,581
12	13,92	22,3	-8,41	-1,64	3,109
13	16,47	24,3	-7,87	-1,10	2,138
14	19,77	26,4	-6,64	0,13	0,911

## Продолжение Таблицы 9

15	16,68	22,4	-5,73	1,04	0,487
16	14,47	21,6	-7,09	-0,32	1,245
17	19,77	26,4	-6,64	0,13	0,911
18	13,97	21,1	-7,09	-0,32	1,245
19	14,04	21,4	-7,36	-0,59	1,501
20	14,47	21,6	-7,09	-0,32	1,245

Таблица 10 – Относительный уровень экспрессии miR-424-5p в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов группы №2

Номер пациента	miR-424-5p Ct	U6 Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	13,05	22,05	-9,00	-1,63	3,105
2	10,03	20,5	-10,50	-3,13	8,732
3	12,42	23,0	-10,57	-3,20	9,166
4	13,06	21,8	-8,74	-1,37	2,578
5	14,35	22,8	-8,46	-1,09	2,131
6	15,55	22,4	-6,86	0,51	0,703
7	14,56	23,3	-8,77	-1,40	2,641
8	10,80	19,6	-8,82	-1,45	2,734
9	16,28	25,4	-9,13	-1,76	3,390
10	15,33	24,8	-9,47	-2,10	4,276
11	18,39	26,4	-8,01	-0,64	1,560
12	13,52	21,6	-8,04	-0,67	1,587
13	10,62	19,1	-8,43	-1,06	2,087
14	12,67	22,3	-9,66	-2,29	4,878
15	15,47	24,3	-8,87	-1,50	2,821
16	14,97	22,6	-7,59	-0,22	1,162
17	18,27	25,4	-7,14	0,23	0,850
18	14,47	21,6	-7,09	0,28	0,821

Продолжение Таблицы 10

19	15,04	23,1	-8,01	-0,64	1,560
20	13,97	22,1	-8,09	-0,72	1,643

Таблица 11 – Относительный уровень экспрессии miR-338-3p в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов группы №3

Номер пациента	miR-338-3p Ct	U6 Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	24,02	30,6	-6,54	0,23	0,850
2	24,62	31,2	-6,63	0,14	0,905
3	25,78	29,4	-3,61	3,16	0,112
4	22,50	30,6	-8,06	-1,29	2,439
5	17,39	26,0	-8,60	-1,83	3,558
6	19,93	28,5	-8,55	-1,78	3,437
7	18,65	26,4	-7,73	-0,96	1,940
8	19,15	25,9	-6,73	0,04	0,970
9	26,28	30,6	-4,28	2,49	0,178
10	22,84	31,1	-8,27	-1,50	2,831
11	23,79	30,0	-6,25	0,52	0,696
12	21,77	29,2	-7,47	-0,70	1,626
13	21,34	27,6	-6,27	0,50	0,708
14	23,36	31,0	-7,63	-0,86	1,817
15	26,34	32,4	-6,06	0,71	0,612
16	25,52	31,9	-6,35	0,42	0,748
17	22,12	30,2	-8,13	-1,36	2,560
18	23,78	30,8	-7,00	-0,23	1,170
19	26,78	31,1	-4,28	2,49	0,178
20	23,66	30,6	-6,99	-0,22	1,162

Таблица 12 – Относительный уровень экспрессии miR-424-5p в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов группы №3

Номер пациента	miR-424-5p Ct	U6 Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	23,52	30,6	-7,04	0,33	0,793
2	24,12	31,2	-7,13	0,24	0,845
3	24,78	29,4	-4,61	2,76	0,148
4	22,00	30,6	-8,56	-1,19	2,276
5	16,64	26,0	-9,35	-1,98	3,948
6	19,43	28,5	-9,05	-1,68	3,207
7	18,15	26,4	-8,23	-0,86	1,810
8	18,65	25,9	-7,23	0,14	0,905
9	25,78	30,6	-4,78	2,59	0,166
10	22,09	31,1	-9,02	-1,65	3,141
11	23,29	30,0	-6,75	0,62	0,649
12	21,27	29,2	-7,97	-0,60	1,517
13	20,84	27,6	-6,77	0,60	0,660
14	22,86	31,0	-8,13	-0,76	1,695
15	25,84	32,4	-6,56	0,81	0,571
16	24,52	31,9	-7,35	0,02	0,987
17	21,62	30,2	-8,63	-1,26	2,389
18	23,28	30,8	-7,50	-0,13	1,091
19	25,78	31,1	-5,28	2,09	0,234
20	23,16	30,6	-7,49	-0,12	1,084

Таблица 13 – Относительный уровень экспрессии miR-338-3p в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов группы №4

Номер пациента	miR-338-3p Ct	U6 Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	24,39	30,46	-6,08	0,69	0,618
2	14,90	20,9	-5,99	0,78	0,583
3	17,89	26,5	-8,60	-1,83	3,558
4	25,83	31,9	-6,08	0,69	0,618
5	24,52	31,4	-6,85	-0,08	1,058
6	25,39	30,3	-4,94	1,83	0,281
7	20,46	28,0	-7,53	-0,76	1,689
8	8,84	16,9	-8,09	-1,32	2,490
9	13,47	22,6	-9,12	-2,35	5,085
10	11,90	21,0	-9,09	-2,32	4,980

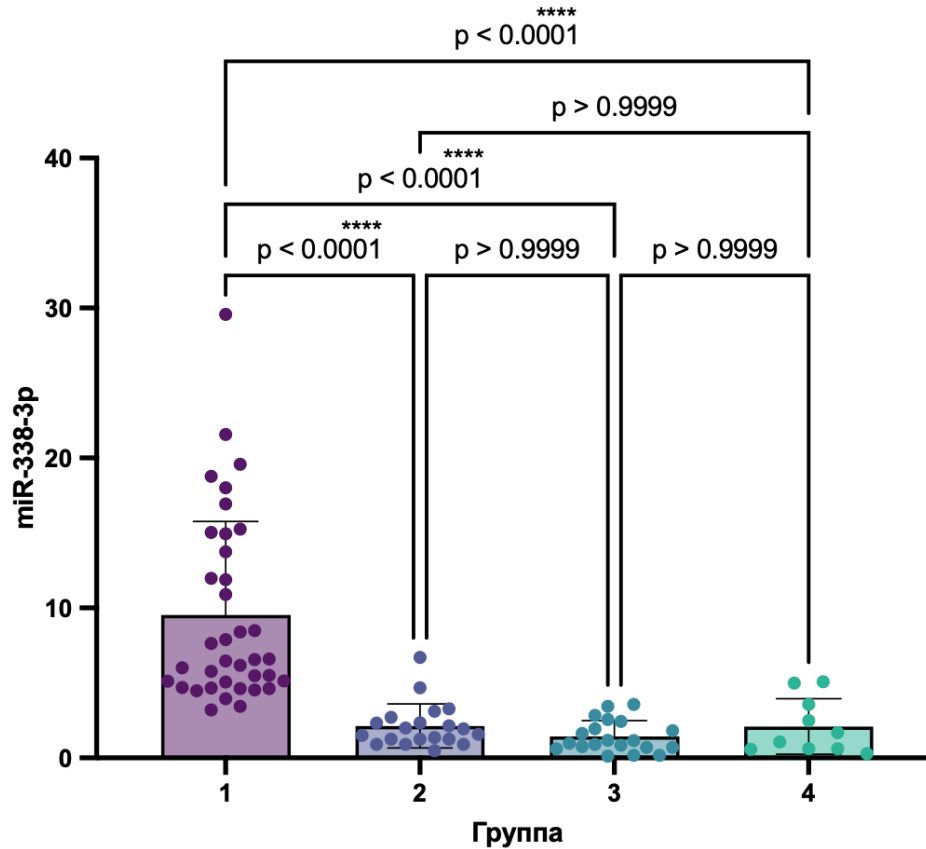
Таблица 14 – Относительный уровень экспрессии miR-424-5p в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов группы №4

Номер пациента	miR-424-5p Ct	U6 Ct	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	23,56	30,46	-6,91	0,46	0,725
2	14,12	20,9	-6,77	0,60	0,660
3	16,55	26,5	-9,94	-2,57	5,923
4	23,93	31,9	-7,98	-0,61	1,522
5	23,52	31,4	-7,85	-0,48	1,396
6	24,39	30,3	-5,94	1,43	0,370
7	18,74	28,0	-9,25	-1,88	3,684
8	7,94	16,9	-8,99	-1,62	3,066
9	10,75	21,0	-10,23	-2,86	7,266
10	17,25	24,1	-6,84	0,53	0,691

### 3.2. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой и групп контроля

Средний уровень экспрессии miR-338-3p значительно варьировал в зависимости от группы. Так у пациентов с АП в активной стадии заболевания (группа №1) он составил 9.53 (SD ± 6.24), тогда как в группе пациентов в стадии ремиссии (группа №2) в среднем составлял 2.13 (SD ± 1.47). В группе условно здоровых участников (группа №3) данный показатель был минимальным — 1.42 (SD ± 1.06), а в группе пациентов с иными буллезными дерматозами (группа №4) составлял 2.10 (SD ± 1.85) (Таблица 15).

Для оценки различий уровней экспрессии miR-338-3p между группами использовался непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, поскольку распределение данных не соответствовало критериям нормальности (тест Шапиро–Уилка  $p < 0.05$ ). Статистический анализ показал наличие значимых различий между группами ( $H=57.40$ ;  $p < 0.0001$ ), что свидетельствует о вариабельности уровней экспрессии miR-338-3p. Для выявления парных различий между группами был проведен post-hoc тест Данна, в результате которого было установлено, что уровень экспрессии miR-338-3p в группе №1 значимо отличается от групп № 2, 3 и 4 ( $p < 0.0001$ ). Таким образом, по сравнению с группой №2 уровень экспрессии miR-338-3p в группе №1 был выше в 2,18 раза (на 118%), по сравнению с группой №3 – в 3,13 раза (на 213%), а по сравнению с группой №4 – в 2,44 раза (на 144%). Между группами 2 и 3, 2 и 4, а также 3 и 4 статистически значимых различий не наблюдалось ( $p > 0.9999$ ) (Рисунок 11).



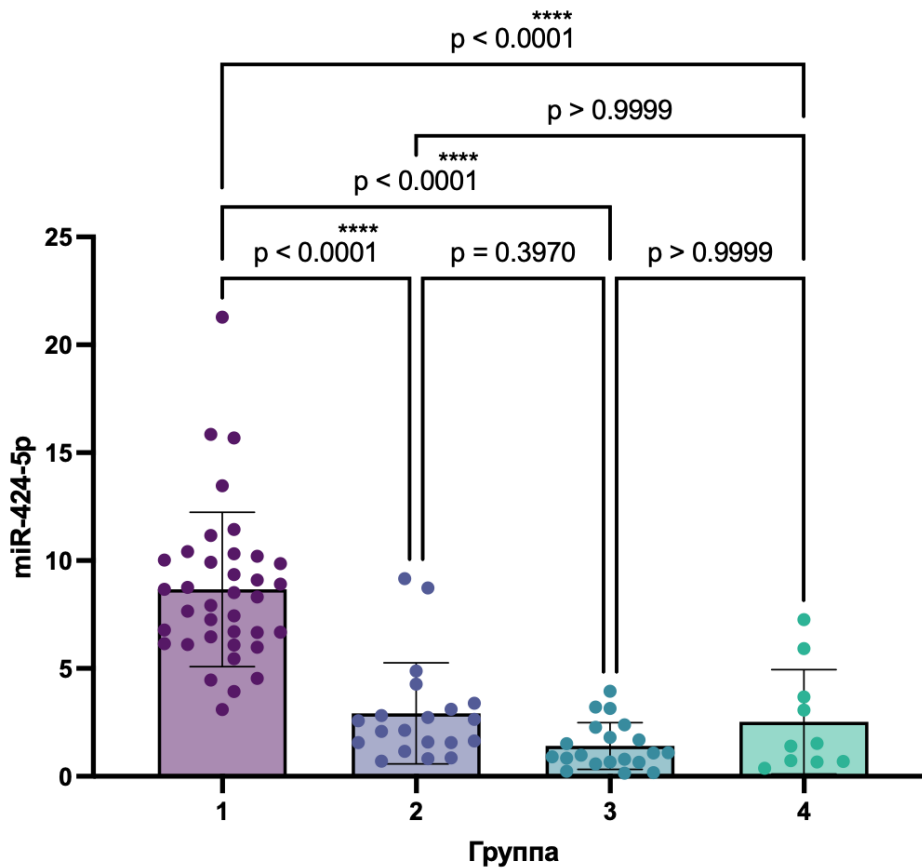
Примечание: 1 – пациенты с аутоиммунной пузырчаткой в активной стадии заболевания; 2 – пациенты с аутоиммунной пузырчаткой в стадии ремиссии; 3 – контрольная группа условно здоровых участников; 4 – контрольная группа пациентов с иными буллезными дерматозами в активной стадии заболевания

Рисунок 11 – Относительный уровень экспрессии miR-338-3p

Аналогичная тенденция наблюдалась и для miR-424-5p: в группе пациентов с АП в активной стадии заболевания ее средний уровень экспрессии составил 8.67 (SD ± 3.58), тогда как в стадии ремиссии снижался до 2.92 (SD ± 2.34); в группе условно здоровых участников уровень экспрессии miR-424-5p составлял 1.41 (SD ± 1.08), а в группе пациентов с иными буллезными дерматозами — 2.53 (SD ± 2.42). Установлено значимое различие уровней экспрессии между четырьмя группами (H=56.32;  $p < 0.0001$ ) (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса). При последующем множественном сравнении (post-hoc тест Данна) установлено, что уровень экспрессии в группе №1 был достоверно выше, чем в группах 2, 3 и 4

( $p < 0.0001$ ). Таким образом, по сравнению с группой №2 уровень экспрессии miR-424-5p в группе №1 был выше в 1,95 раза (на 95%), по сравнению с группой №3 – в 3,40 раза (на 240%), а по сравнению с группой №4 – в 2,46 раза (на 146%). В то же время между группами 2, 3 и 4 значимых различий не наблюдалось ( $p > 0.05$ ) (Рисунок 12).

Таким образом, исследование уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой выявило значимое повышение уровня экспрессии данных микроРНК по сравнению с контрольными группами.



Примечание: 1 – пациенты с аутоиммунной пузырчаткой в активной стадии заболевания; 2 – пациенты с аутоиммунной пузырчаткой в стадии ремиссии; 3 – контрольная группа условно здоровых участников; 4 – контрольная группа пациентов с иными буллезными дерматозами в активной стадии заболевания

Рисунок 12 – Относительный уровень экспрессии miR-424-5p

При сравнении уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p статистически значимых различий выявлено не было ( $U = 620$ ;  $p = 0.4896$ ). Медианные значения экспрессии составили 6.55 для miR-338-3p ( $n = 37$ ) и 8.32 для miR-424-5p ( $n = 37$ ), а разница медиан по методу Ходжеса–Леманна составила 0.6900. Таким образом, несмотря на некоторое увеличение средних и медианных значений экспрессии miR-424-5p по сравнению с miR-338-3p, различия не достигают уровня статистической значимости (Рисунок 13).

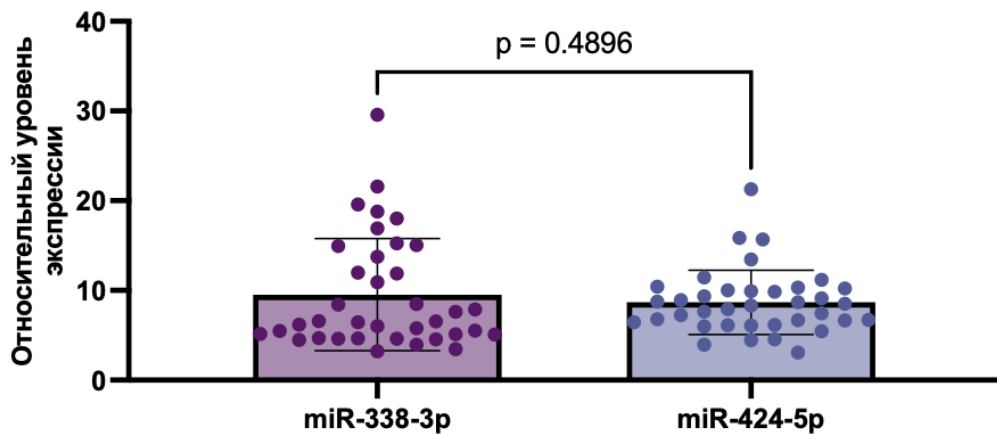


Рисунок 13 – Сравнение относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p

Таблица 15 – Описательная статистика относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в исследуемых группах

	Группа	Среднее	SD	Min	Max	Me	p*
miR-338-3p	1	9.53	6.24	3.207	29.57	6.55	<0.001
	2	2.13	1.47	0.487	6.71	1.76	0.002
	3	1.42	1.06	0.112	3.56	1.07	0.062
	4	2.10	1.85	0.281	6.08	1.37	0.047

Продолжение Таблицы 15

miR-424-5p	1	8.67	3.58	3.098	21.28	8.32	0.001
	2	2.92	2.34	0.703	9.17	2.32	<0.001
	3	1.41	1.08	0.148	3.95	1.04	0.036
	4	2.53	2.42	0.370	7.27	1.46	0.036
*критерий Шапиро-Уилка							

### **3.3. Анализ относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в зависимости от клинических данных**

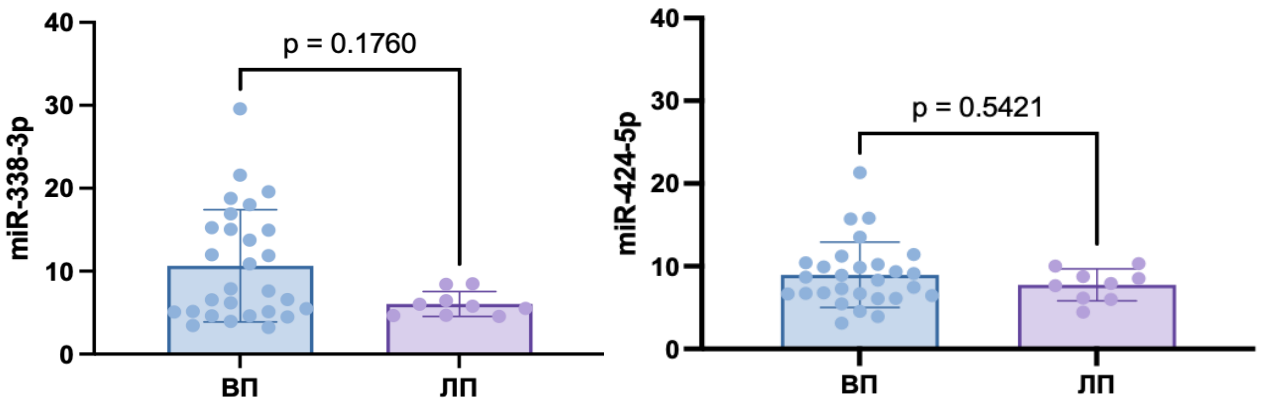
#### **3.3.1. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от клинической формы аутоиммунной пузырчатки**

В среднем, значения экспрессии при ВП имеют более высокие показатели по сравнению с ЛП, так средний уровень экспрессии miR-338-3p у пациентов с ВП составил 10.65 (SD  $\pm$  6.78), тогда как у пациентов с ЛП – 6.06 (SD  $\pm$  1.50), а для miR-424-5p уровень относительной экспрессии у пациентов с ВП составил 8.96 (SD  $\pm$  3.95), и 7.76 (SD  $\pm$  1.93) для пациентов с ЛП (Таблица 16).

Для оценки различий уровней экспрессии между группами использовался непараметрический U-критерий Манна–Уитни (тест Шапиро-Уилка  $p < 0.05$ ). Медианное значение экспрессии miR-338-3p составило 7.762 в группе ВП ( $n = 28$ ) и 5.781 в группе ЛП ( $n = 9$ ). Разница медиан по методу Ходжеса–Леманна составила -2.087, статистический анализ не выявил значимых различий между группами ( $U = 87$ ,  $p = 0.1760$ ) (Рисунок 14).

По результатам статистической оценки различий уровней экспрессии miR-424-5p между группами пациентов с ВП и ЛП также использовался непараметрический U-критерий Манна–Уитни (тест Шапиро–Уилка  $p < 0.05$ ). Медианное значение экспрессии miR-424-5p составило 8.495 в группе ВП ( $n = 28$ ) и 7.924 в группе ЛП ( $n = 9$ ). Разница медиан по методу Ходжеса–Леманна составила  $-0.6117$ . Статистический анализ не выявил значимых различий между группами ( $U = 108, p = 0.5421$ ) (Рисунок 14).

Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии достоверных различий уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от формы АП.



Примечание: ВП – вульгарная пузырьчатка; ЛП – листовидная пузырьчатка

Рисунок 14 – Относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группах пациентов с вульгарной и листовидной пузырьчаткой в активной стадии заболевания

Таблица 16 – Описательная статистика относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группах пациентов с вульгарной и листовидной формой аутоиммунной пузырчатки

	Группа	N	Среднее	SD	Min	Max	Me	p*
miR-338-3p	ВП	28	10.65	6.78	3.21	29.57	7.76	0.005
	ЛП	9	6.06	1.50	4.54	8.49	5.78	0.090
miR-424-5p	ВП	28	8.96	3.95	3.10	21.28	8.49	0.0015
	ЛП	9	7.76	1.93	4.46	10.31	7.92	0.789
* критерий Шапиро-Уилка								

### 3.3.2. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от локализации патологического процесса

Если разделять пациентов из группы с АП в зависимости от локализации высыпаний, то средний уровень относительной экспрессии miR-338-3p был выше в группе пациентов с АП при локализации высыпаний на коже и слизистых (12.46; SD  $\pm$  7.40) по сравнению с пациентами, у которых высыпания были локализованы только на коже (5.98; SD  $\pm$  1.48), или только слизистых оболочках (8.09; SD  $\pm$  4.60) (Таблица 17).

Однако, статистический анализ различий в уровнях экспрессии miR-338-3p с использованием критерия Краскела–Уоллиса показал отсутствие значимых различий (H = 5.884, p = 0.0528). Дополнительный post-hoc анализ методом Данна также не выявил достоверных различий между группами. Различие между

группами «Кожа/слизистые» и «Кожа» (разница рангов = 9.417,  $p = 0.0587$ ) было близко к статистически значимому, но не достигло порога значимости ( $\alpha = 0.05$ ). Разница между группами «Кожа/слизистые» и «Слизистые» (разница рангов = 6.762,  $p = 0.4824$ ), а также между группами «Кожа» и «Слизистые» (разница рангов = -2.655,  $p > 0.9999$ ) также не была статистически значимой (Рисунок 15).

Для miR-424-5p согласно полученным данным (критерий Краскела–Уоллиса), различия между группами также не достигли статистической значимости ( $H = 2.548$ ,  $p = 0.2797$ ). Дополнительно проведен post-hoc анализ Данна для попарных сравнений между группами. Различия в уровне экспрессии между группами «Кожа/слизистые» и «Кожа» ( $p = 0.4000$ ), «Кожа/слизистые» и «Слизистые» ( $p = 0.9318$ ), а также «Кожа» и «Слизистые» ( $p > 0.9999$ ) не были статистически значимыми. Наибольшая разница средних рангов наблюдалась при сравнении групп «Кожа/слизистые» и «Кожа» (разность средних рангов 6.056), но она также не достигала уровня значимости.

Таким образом, согласно полученных данным можно сделать вывод об отсутствии значимых различий уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от локализации поражений, что может свидетельствовать об относительно равномерном распределении данного показателя вне зависимости от области локализации патологического процесса.

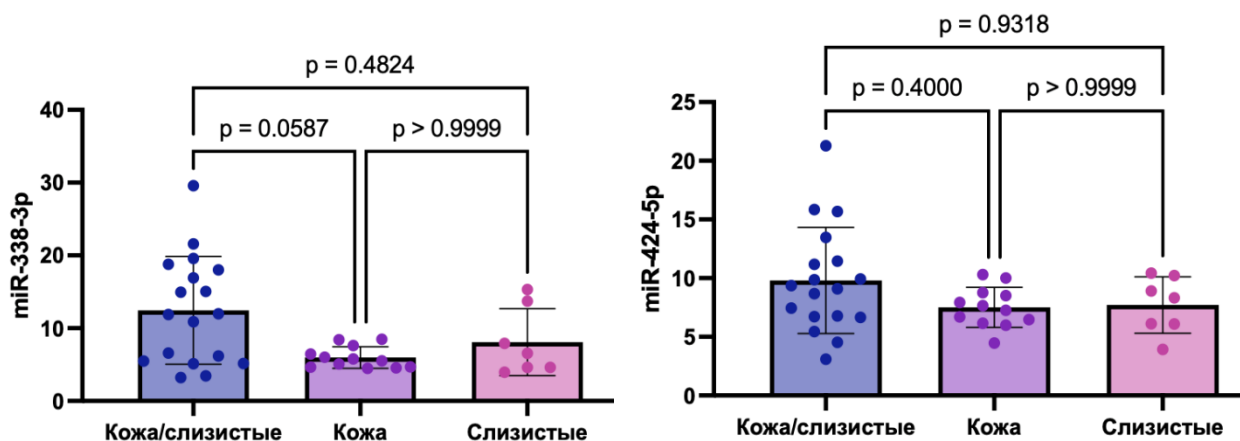


Рисунок 15 – Относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группах пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с локализацией патологического процесса на коже и слизистых, только коже, и только слизистых

Таблица 17 – Описательная статистика относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группах пациентов с аутоиммунной пузырчаткой при локализации высыпаний в области кожи и слизистых, только кожи и только слизистых

	Группа	N	Среднее	SD	Min	Max	Me	p*
miR-338-3p	Кожа/слизистые	18	12.46	7.40	3.21	29.57	11.93	0.199
	Кожа	12	5.98	1.48	4.47	8.49	5.64	0.059
	Слизистые	7	8.09	4.60	3.95	15.26	6.55	0.082
miR-424-5p	Кожа/слизистые	18	9.80	4.53	3.10	21.28	9.23	0.228
	Кожа	12	7.52	1.71	4.46	10.31	7.46	0.963
	Слизистые	7	7.71	2.41	3.93	10.42	8.32	0.530

\* критерий Шапиро-Уилка

### 3.3.3. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от приема глюкокортикостероидов до начала стационарного лечения

Для оценки влияния приема системных ГКС на уровень экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p были сформированы две группы пациентов: первая – пациенты, не получавшие ГКС (доза = 0 мг), вторая – пациенты, уже начавшие терапию ГКС (средняя доза в группе составила  $24.6 \pm 16.7$  мг) (Таблица 18).

Проверка на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка показала отклонение от нормального распределения в обеих группах, в связи с этим для межгруппового сравнения использовался непараметрический критерий Манна–Уитни.

Средний уровень экспрессии miR-338-3p в группе пациентов, не получавших системных ГКС, составил 11.15 ( $n = 18$ ), а в группе, где пациенты находились на терапии ГКС - уровень экспрессии составил 8.0 ( $n = 19$ ). Различия в уровнях экспрессии miR-338-3p между группами не достигли статистической значимости ( $U = 123$ ,  $p = 0.1505$ ). Разница между медианами составила -2.275, а оценка Ходжеса–Леманна составила -1.549, что свидетельствует о тенденции к снижению уровня miR-338-3p у пациентов, получающих ГКС, однако данное различие не является статистически значимым (Рисунок 16).

Средний уровень экспрессии miR-424-5p в группе пациентов, не принимающих системные ГКС составил 9.86 ( $n = 18$ ), тогда как в группе пациентов получающих ГКС, данный показатель был ниже и составил 7.53 ( $n = 19$ ). По результатам анализа различия между группами являлись статистически значимыми ( $U = 103$ ,  $p = 0.0392$ ). Разница между медианами составила -2.828, оценка Ходжеса–Леманна составила -2.013, 95% доверительный интервал различий – от -3.746 до -0.1785 (Рисунок 16).

Таким образом, по результатам анализа установлено отсутствие статистически значимого различия в уровнях экспрессии miR-338-3p между пациентами, не получавшими ГКС, и пациентами, находящимися на терапии ГКС. В то же время, установлена статистически значимая умеренная разница между уровнем экспрессии miR-424-5p в группе пациентов, получавших ГКС, по сравнению с пациентами, не получавшими терапию системными ГКС ( $p = 0,0392$ ): наблюдался более низкий уровень экспрессии miR-424-5p в группе пациентов принимающих системные ГКС, что, с одной стороны, может свидетельствовать о потенциальном влиянии ГКС на регуляцию экспрессии данной микроРНК, а с другой не исключает влияния множества сопутствующих факторов, таких как индивидуальные особенности пациентов, длительность заболевания, и другие неизвестные переменные, которые могут оказывать влияние на полученные результаты, что требует дальнейшего изучения для выяснения механизмов данного эффекта и его клинического значения.

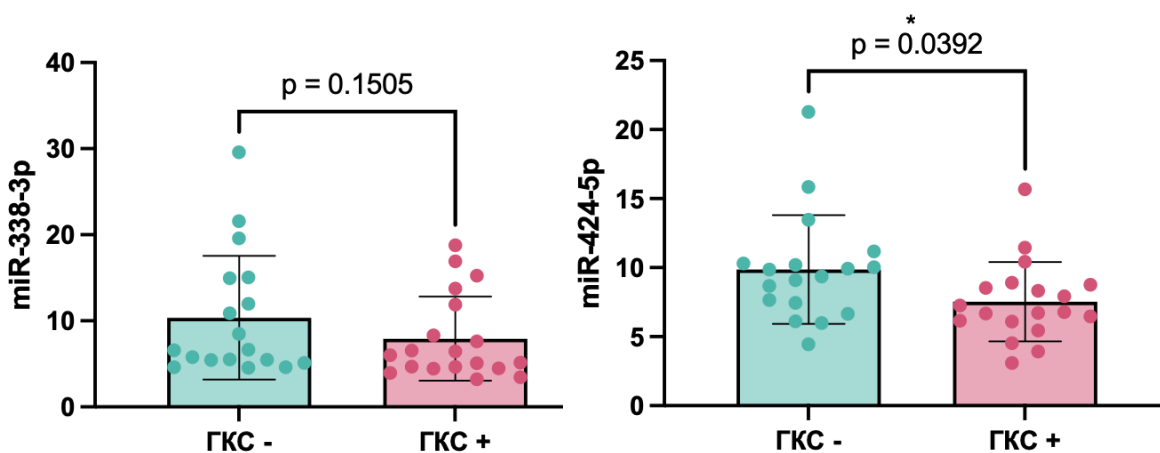


Рисунок 16 – Относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой при поступлении не получавшей системные глюкокортикостероиды, и в группе пациентов, находящихся на терапии системными глюкокортикостероидами в момент обострения

Таблица 18 – Описательная статистика относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группах пациентов аутоиммунной пузырчаткой при поступлении не получавшими системные глюкокортикостероиды, и пациентами, находящимися на терапии системными глюкокортикостероидами в момент обострения

	Группа	N	Среднее	SD	Min	Max	Медиана	p*
miR-338-3p	ГКС –	18	11.15	7.24	4.54	29.6	8.45	0.010
	ГКС +	19	8.00	4.83	3.21	18.8	6.17	0.002
miR-424-5p	ГКС –	18	9.86	3.93	4.46	21.3	9.61	0.020
	ГКС +	19	7.53	2.87	3.10	15.7	6.78	0.130
* критерий Шапиро-Уилка								

### 3.3.4. Корреляционный анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от длительности заболевания и приема глюкокортикостероидов до начала стационарного лечения

Для оценки возможной зависимости уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p от длительности заболевания был проведён корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (тест Шапиро–Уилка  $p < 0.05$ ). В результате анализа было показано, что уровень экспрессии miR-338-3p не имеет статистически значимой корреляции с длительностью заболевания ( $r = 0.1401$ , 95% ДИ:  $-0.2022$ – $0.4519$ ,  $p = 0.4082$ ). Аналогично, не выявлено значимой корреляции между уровнем экспрессии

miR-424-5p и длительностью заболевания ( $r = -0.005118$ , 95% ДИ:  $-0.3374-0.3283$ ,  $p = 0.9760$ ). Таким образом, на уровне всей выборки не было установлено значимой связи между длительностью заболевания и экспрессией изучаемых микроРНК. Однако, для дальнейшего изучения влияния системной терапии ГКС на возможную связь между длительностью заболевания и уровнем экспрессии микроРНК, выборка была разделена на две группы: пациенты, принимающие системные ГКС на момент поступления в стационар, и пациенты, не принимающие системные ГКС (Таблица 18).

В группе пациентов, при поступлении не получавших ГКС (0 мг), была выявлена умеренная статистически значимая положительная корреляция между длительностью заболевания и уровнем экспрессии miR-338-3p ( $r = 0.5187$ , 95% ДИ:  $0.05352-0.7989$ ,  $p = 0.0274$ ). В то же время в группе пациентов, к моменту госпитализации и забора пробы уже получавших терапию системными ГКС (средняя доза в группе составила  $24.6 \pm 16.7$  мг), подобная корреляция отсутствовала ( $r = 0.004409$ , 95% ДИ:  $-0.4622-0.4691$ ,  $p = 0.9857$ ). Таким образом, можно предположить, что длительность заболевания может оказывать влияние на уровень экспрессии miR-338-3p только при условии, что пациент ранее не получал терапию системными ГКС (Рисунок 17).

В отличие от miR-338-3p, уровень экспрессии miR-424-5p не показал значимой корреляции с длительностью заболевания ни в группе пациентов, принимающих ГКС ( $r = 0.4030$ , 95% ДИ:  $-0.07709-0.7314$ ,  $p = 0.0871$ ), ни в группе без терапии ГКС ( $r = -0.07589$ , 95% ДИ:  $-0.5349-0.4178$ ,  $p = 0.7647$ ). Эти результаты свидетельствуют о том, что уровень экспрессии miR-424-5p, вероятно, не зависит от длительности заболевания, независимо от факта приема системных ГКС (Рисунок 18).

Таким образом, проведённый корреляционный анализ не выявил значимой связи между уровнем экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p и длительностью заболевания в общей выборке пациентов. Однако при разделении пациентов на группы в зависимости от приёма ГКС была обнаружена умеренная положительная корреляция между длительностью заболевания и уровнем

экспрессии miR-338-3p у пациентов, которые на момент забора пробы никогда не получали терапию системными ГКС, что может указывать на возможное влияние длительности заболевания на уровень данной микроРНК в условиях отсутствия терапии ГКС. В отношении miR-424-5p не было выявлено значимых корреляционных связей, что может свидетельствовать о более сложном механизме регуляции данной микроРНК, не зависящем от длительности заболевания и терапии ГКС.

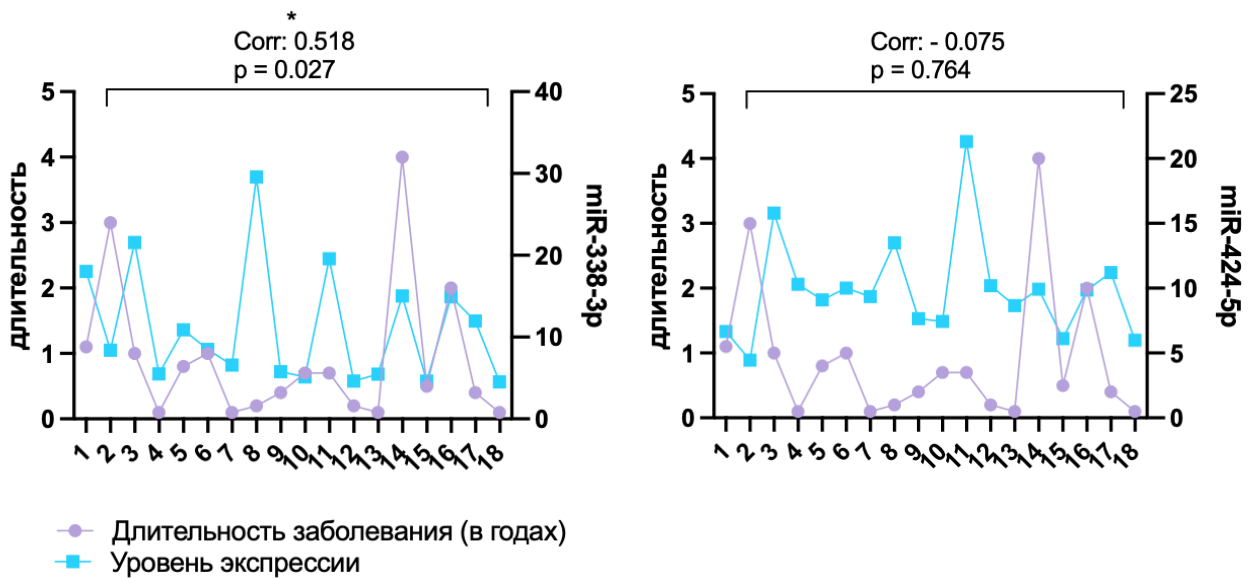


Рисунок 17 – Связь между длительностью заболевания и относительными уровнями экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой, не получающих терапию системными глюкокортикостероидами

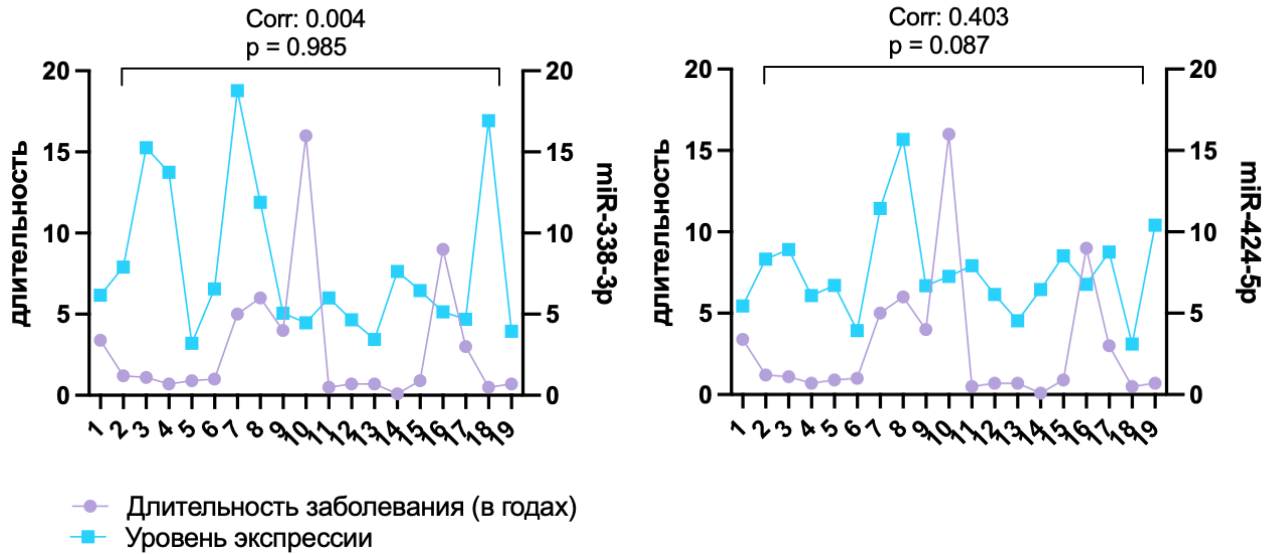


Рисунок 18 – Связь между длительностью заболевания и относительными уровнями экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой, получающих поддерживающую терапию системными глюкокортикостероидами

#### 3.4. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в процессе терапии системными глюкокортикостероидами

Для оценки изменений уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в ходе терапии системными ГКС был проведен анализ образцов, полученных у пациентов на первой и на третьей неделе нахождения на стационарном лечении. Забор пробы на первой неделе производился при поступлении в стационар, при этом у 18 пациентов забор образцов крови осуществлялся до начала патогенетической терапии ГКС (0 мг), 19 пациентов на момент поступления уже получали терапию ГКС в дозе  $24,6 \pm 16,7$  мг, поэтому забор образца производился до коррекции и повышения дозы системных ГКС.

На первой неделе средний уровень экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p составил 9.53 (SD  $\pm$  6.24) и 8.67 (SD  $\pm$  3.58) соответственно, на третьей неделе для miR-338-3p средний уровень экспрессии составил 7.94 (SD  $\pm$  6.80), для miR-424-5p – 9.92 (SD  $\pm$  4.92) (Таблица 19).

Тест Шапиро–Уилка показал отсутствие нормального распределения данных ( $p < 0.0001$  для miR-338-3p и  $p = 0.0020$  для miR-424-5p на первой неделе;  $p = 0.0001$  и  $p = 0.0476$  на третьей неделе соответственно), в связи с чем для статистической обработки применялся критерий Вилкоксона для зависимых выборок.

При сравнении уровня экспрессии miR-338-3p на первой и на третьей неделе терапии системными ГКС выявлено статистически значимое снижение данного показателя ( $W = -283.0$ ,  $p = 0.0001$ ). Медиана уровня экспрессии на первой неделе составила 6.55 ( $n = 37$ ), тогда как на третьей неделе – 4.80 ( $n = 26$ ). Таким образом, уровень экспрессии miR-338-3p снизился в 1.36 раза (или на 26.7%). Медиана разницы составила -2.974, что свидетельствует о снижении экспрессии к третьей неделе (Рисунок 19-22).

Корреляционный анализ Спирмена показал, что изменения между измерениями внутри пар были статистически значимыми ( $r_s = 0.8697$ ,  $p < 0.0001$ )

В отношении miR-424-5p статистически значимых различий между первой и третьей неделями терапии выявлено не было ( $W = 45.0$ ,  $p = 0.5822$ ). Медиана уровня экспрессии на первой неделе составила 8.318 ( $n = 37$ ), а на третьей неделе – 8.767 ( $n = 26$ ). Разница между медианами составила 0.1230, наблюдалось снижение в 0.95 раза или -5.4%, что не является значимым изменением. Несмотря на это, корреляционный анализ Спирмена показал высокую степень согласованности данных ( $r_s = 0.7181$ ,  $p < 0.0001$ ) (Рисунок 19-22).

Таким образом, уровень экспрессии miR-338-3p достоверно снижается к третьей неделе терапии в 1.36 раза (на 26.7%), тогда как уровень экспрессии miR-424-5p остается неизменным.

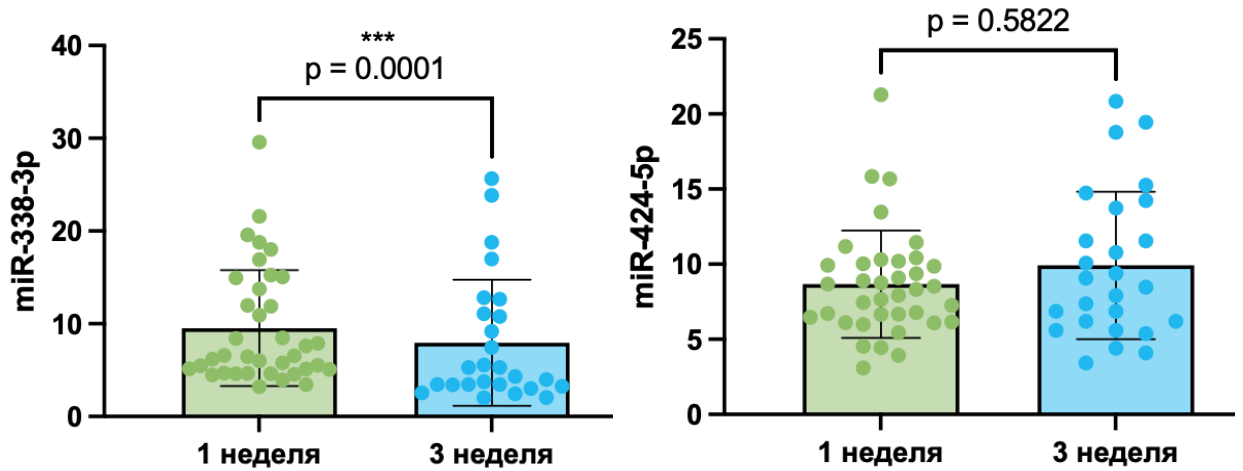
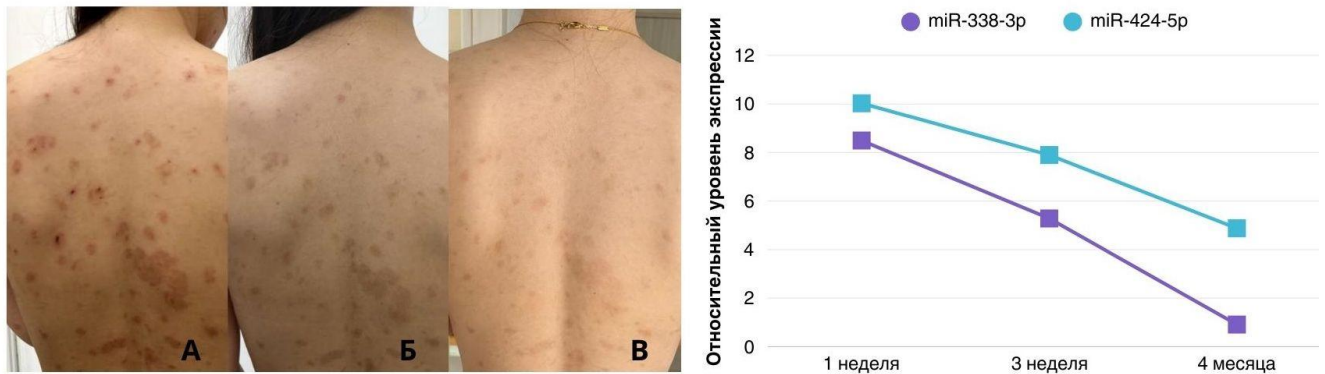


Рисунок 19 – Относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группах пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в активной стадии на первой и третьей неделе нахождения на стационарном лечении и терапии глюкокортикостероидами

Таблица 19 – Описательная статистика относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в активной стадии на первой и третьей неделе нахождения на стационарном лечении и терапии глюкокортикостероидами

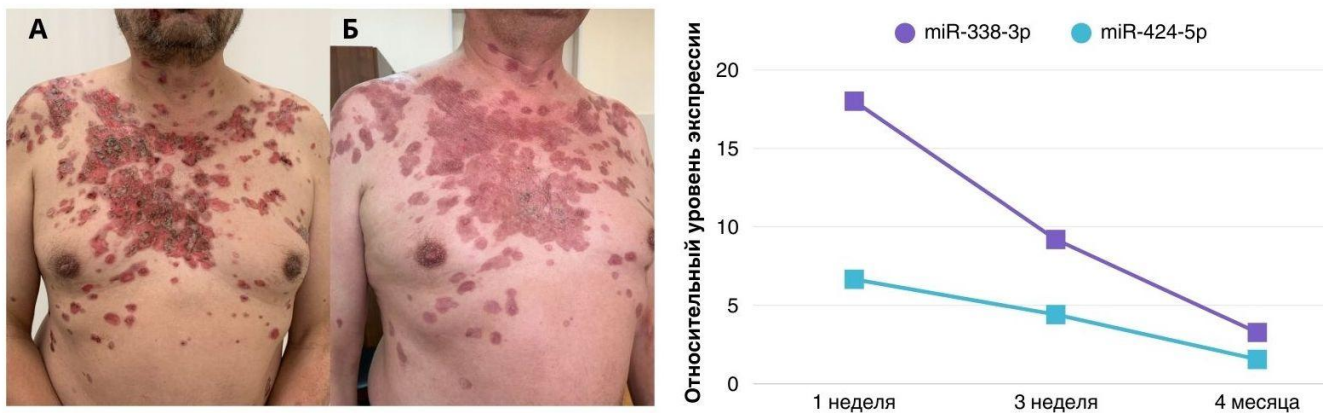
	Группа	N	Среднее	SD	Min	Max	Me	p*
miR-338-3p	1 неделя	37	9.53	6.24	3.21	29.6	6.55	<0.001
	3 неделя	26	7.94	6.80	2.02	25.7	4.80	<0.001
miR-424-5p	1 неделя	37	8.67	3.58	3.10	21.3	8.32	0.002
	3 неделя	26	9.92	4.92	3.44	20.8	8.77	0.048

\* критерий Шапиро-Уилка



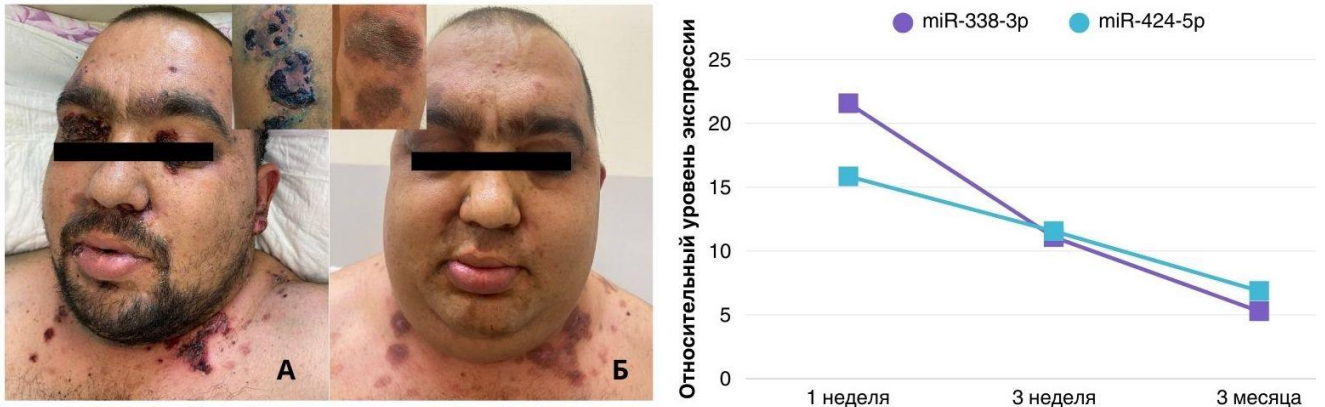
Примечание: А – 1 неделя; Б – 3 неделя; В – 4 месяца.

Рисунок 20 – Больная N., 30 лет. Диагноз: листовидная пузырчатка.  
Динамика изменения относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p на 1 неделе до начала терапии системными ГКС (0 мг), на 3 неделе после начала терапии системными ГКС (80 мг), через 4 месяца от начала терапии системными ГКС (20 мг)



Примечание: А – 1 неделя; Б – 4 месяца

Рисунок 21 – Больной N., 53 года. Диагноз: вульгарная пузырчатка.  
Динамика изменения относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p на 1 неделе до начала терапии системными ГКС (0 мг), на 3 неделе после начала терапии системными ГКС (80 мг), через 4 месяца от начала терапии системными ГКС (20 мг)



Примечание: А – 1 неделя; Б – 3 месяца

Рисунок 22 – Больной N., 36 лет. Диагноз: вульгарная пузырчатка.  
Динамика изменения относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p на 1 неделе до начала терапии системными ГКС (0 мг), на 3 неделе после начала терапии системными ГКС (100 мг), через 3 месяца от начала терапии системными ГКС (40 мг)

### 3.5. Корреляционный анализ относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой и оценкой тяжести заболевания по индексу площади поражения при пузырчатке

Для оценки связи между уровнем экспрессии miR-338-3p, miR-424-5p и тяжестью заболевания, выраженной через индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI), был проведён корреляционный анализ (Таблица 2).

Предварительно производилась оценка на нормальность распределения данных с использованием теста Шапиро-Уилка. Для всех исследуемых групп уровень экспрессии микроРНК и индекс PDAI не соответствовали критериям нормального распределения (Шапиро–Уилк  $W = 0.8331$ ,  $p < 0.0001$ ;

$W = 0.7588$ ,  $p < 0.0001$ ), в связи с чем для анализа взаимосвязи применялся непараметрический коэффициент корреляции Спирмана.

Согласно проведенному корреляционному анализу между уровнем экспрессии miR-338-3p и индексом площади поражения при пузырчатке была выявлена статистически значимая положительная связь между уровнем экспрессии miR-338-3p и индексом PDAI ( $r = 0.8280$ , 95% ДИ: 0.6835 – 0.9101,  $p < 0.0001$ ), что свидетельствует о выраженной прямой зависимости между повышением уровня miR-338-3p и тяжестью аутоиммунной пузырчатки. Высокое значение коэффициента корреляции указывает на сильную связь между переменными, что может свидетельствовать о потенциальной роли miR-338-3p в патогенезе аутоиммунной пузырчатки (Рисунок 23).

В отличие от miR-338-3p, для miR-424-5p корреляционный анализ не выявил статистически значимой связи с индексом PDAI ( $r = 0.2166$ , 95%, ДИ: -0.1254 – 0.5125,  $p = 0.1980$ ). Несмотря на положительное значение коэффициента корреляции, его величина низка, а доверительный интервал пересекает нулевое значение, что указывает на отсутствие существенной связи между уровнем экспрессии miR-424-5p и тяжестью поражения при аутоиммунной пузырчатке (Рисунок 24).

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что miR-338-3p имеет значимую корреляцию с индексом площади поражения, в то время как miR-424-5p не демонстрирует достоверной ассоциации с данным клиническим показателем (Рисунок 27).

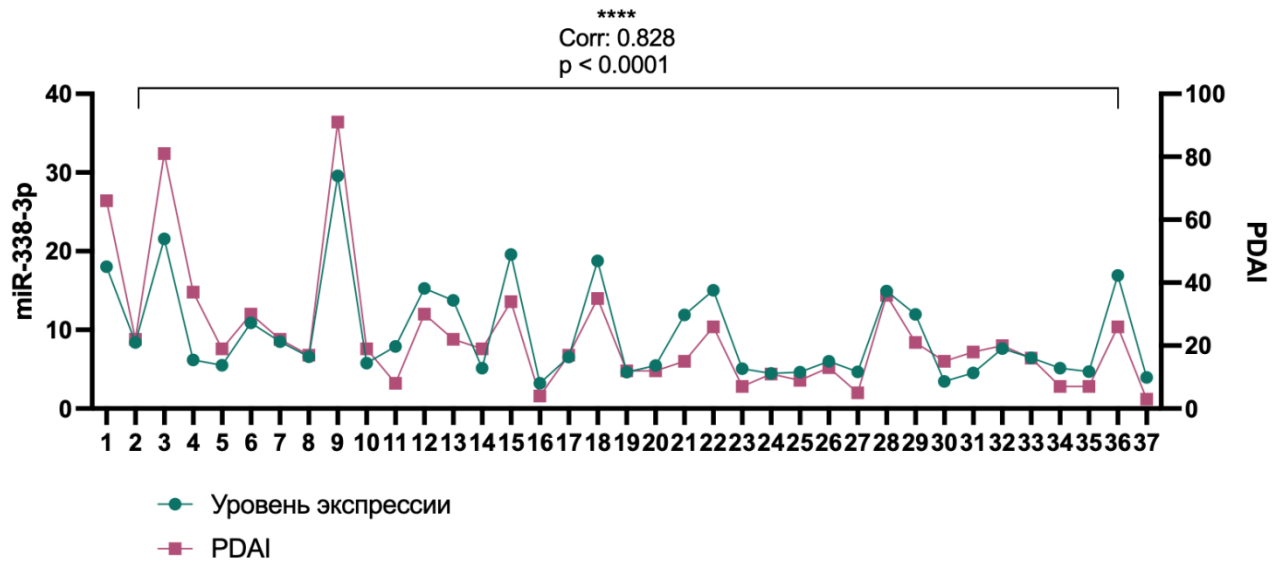


Рисунок 23 – Связь между относительным уровнем экспрессии miR-338-3p и величиной значения индекса PDAI

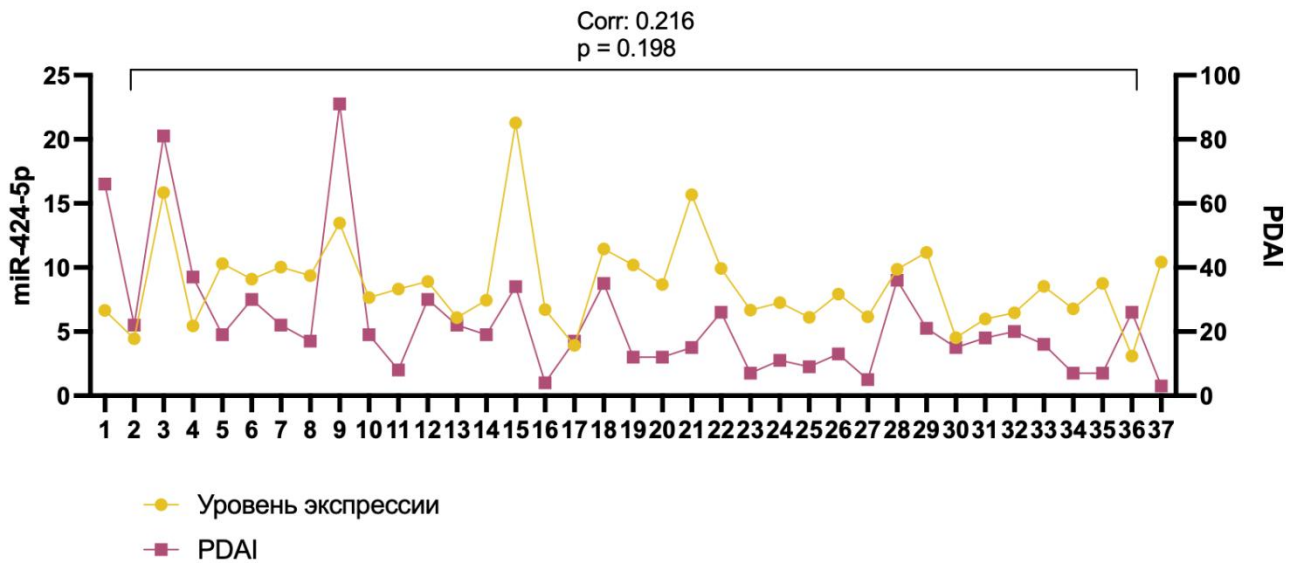


Рисунок 24 – Связь между относительным уровнем экспрессии miR-424-5p и величиной значения индекса PDAI

Далее был проведен корреляционный анализ с целью оценки взаимосвязи индекса PDAI с уровнем экспрессии микроРНК miR-338-3p и miR-424-5p у

пациентов на третьей неделе от начала терапии в стационаре для оценки степени воспроизводимости полученных данных и сохранения выявленной корреляции.

В результате было установлено, что для miR-338-3p сохраняется статистически значимая положительная корреляция с индексом PDAI ( $r = 0.6493$ , 95% ДИ: 0.3393–0.8321,  $p = 0.0003$ ). Полученные данные подтверждают, что на данном этапе терапии уровень экспрессии miR-338-3p продолжает отражать тяжесть патологического процесса, что согласуется с полученными ранее данными при поступлении пациентов (Рисунок 25).

В отношении miR-424-5p также была выявлена положительная умеренная корреляция с индексом PDAI ( $r = 0.4129$ , 95% ДИ: 0.01833–0.6962,  $p = 0.0360$ ). Важно отметить, что до начала терапии данной зависимости не наблюдалось, однако после трёх недель проводимой терапии она становится статистически значимой. Данная тенденция может свидетельствовать о том, что динамика экспрессии miR-424-5p отражает процессы, происходящие в ответ на терапию, и возможно, участвует в механизмах регуляции воспалительного ответа (Рисунок 26).

Таким образом, из полученных результатов можно сделать вывод, что в процессе проводимой терапии системными ГКС miR-338-3p остаётся маркером тяжести заболевания, тогда как miR-424-5p демонстрирует новую зависимость, которая могла сформироваться под влиянием проводимого лечения.

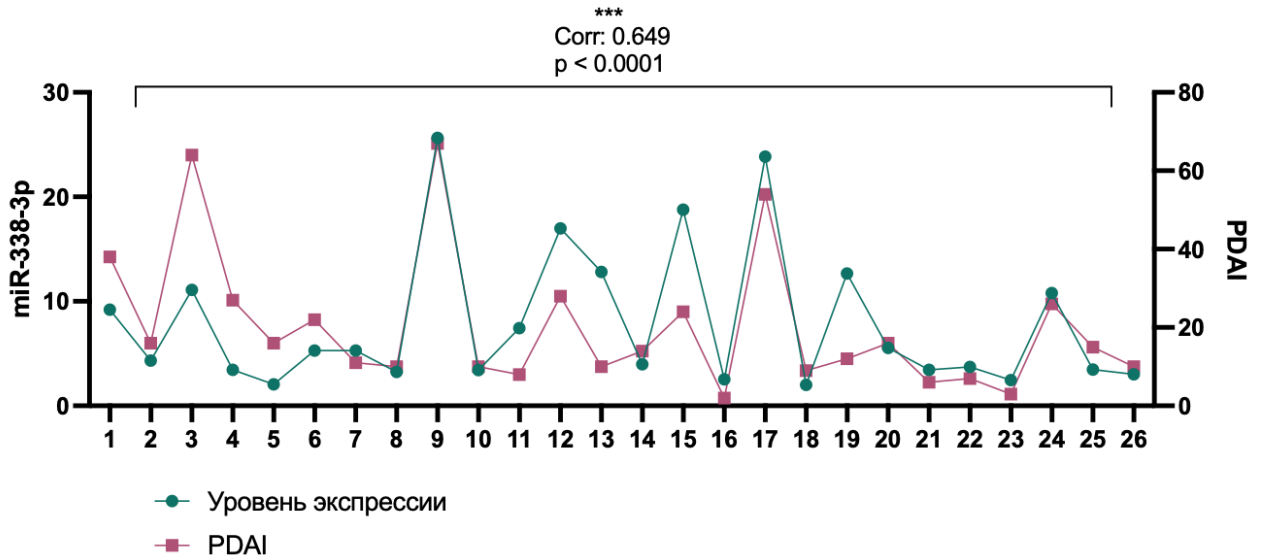


Рисунок 25 – Связь между относительным уровнем экспрессии miR-338-3p и величиной значения индекса PDAI после начала терапии системными глюкокортикостероидами

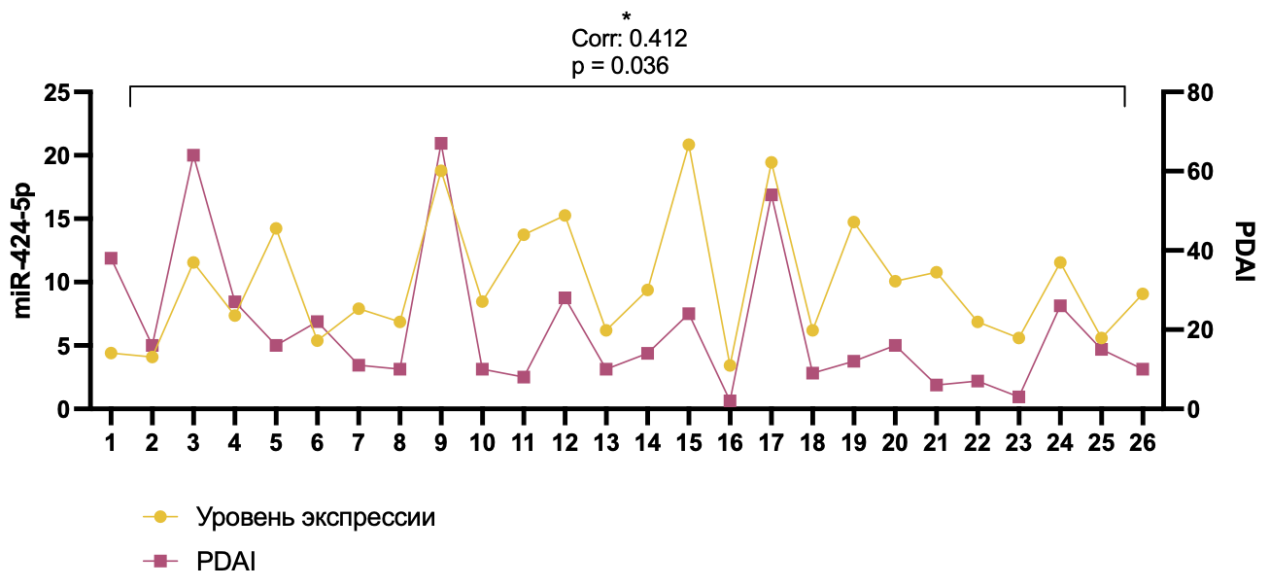
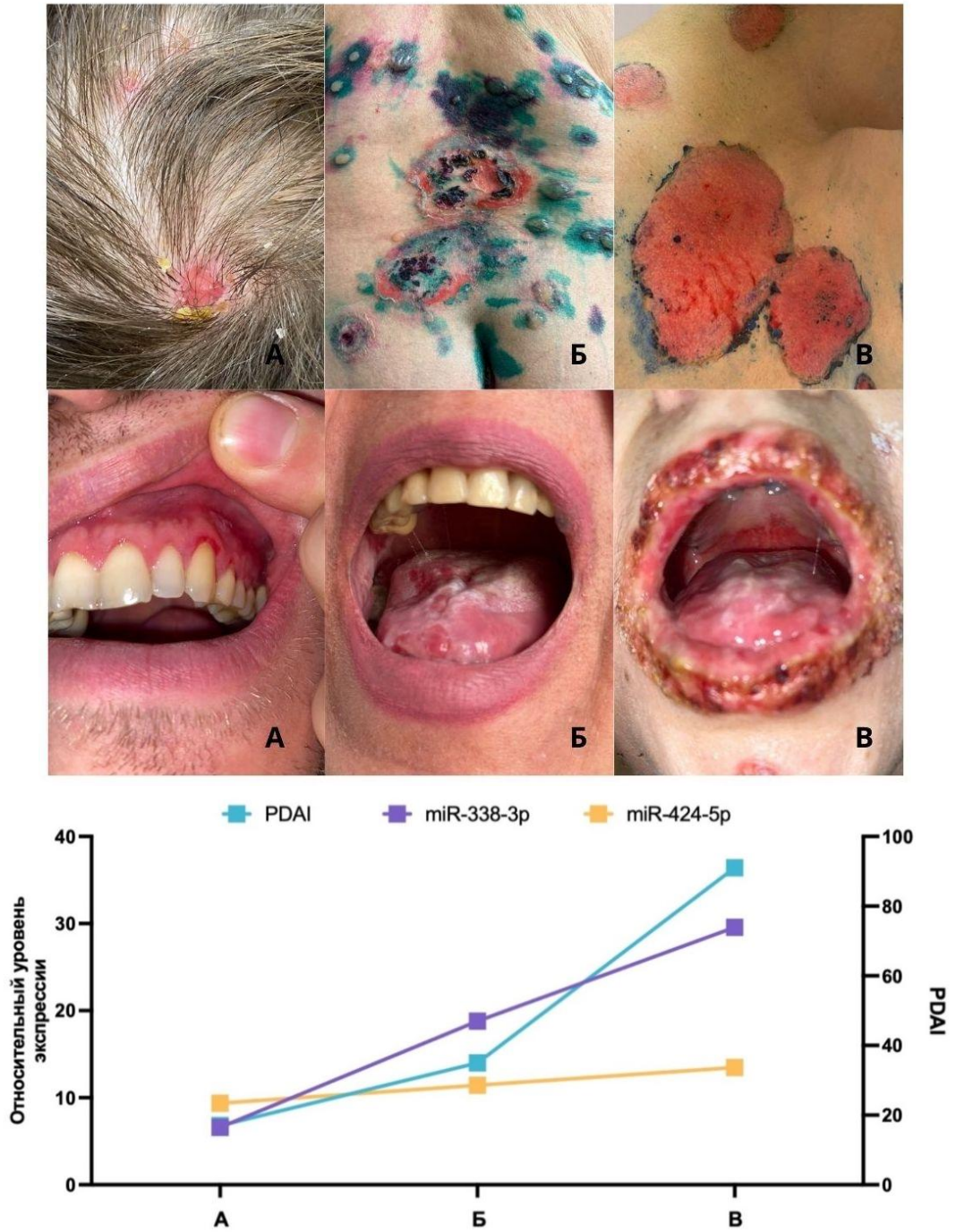


Рисунок 26 – Связь между относительным уровнем экспрессии miR-424-5p и величиной значения индекса PDAI после начала терапии системными глюкокортикостероидами



Примечание: А – Больной N., 38 лет. Диагноз: вульгарная пузырчатка, PDAI 17;  
 Б – Больная N., 56 лет. Диагноз: вульгарная пузырчатка, PDAI 35; В – Больная N., 52 года.  
 Диагноз: вульгарная пузырчатка, PDAI 91

Рисунок 27 – Связь между относительными уровнями экспрессии miR-338-3p, miR-424-5p и величиной значения индекса PDAI

### 3.6. Анализ относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от степени тяжести аутоиммунной пузырчатки

Для оценки различий в уровнях экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p между группами пациентов с различной степенью тяжести пузырчатки (лёгкая, средняя и тяжёлая), пациенты были разделены на три группы в соответствии с балльной шкалой PDAI: лёгкая форма ( $\leq 15$  баллов), средняя форма (15-45 баллов) и тяжёлая форма ( $> 45$  баллов) (Таблица 2).

Для каждой из групп была проведена оценка нормальности распределения данных с помощью теста Шапиро-Уилка. Для miR-338-3p значения  $W$  составили 0.8854 ( $p = 0.1029$ ) для легкой степени, 0.9175 ( $p = 0.0675$ ) для средней степени и 0.9530 ( $p = 0.5829$ ) для тяжелой степени, что свидетельствует о прохождении теста нормальности (при  $\alpha = 0.05$ ). Аналогичным образом, для miR-424-5p группы с легкой и тяжелой степенью тяжести прошли тест на нормальность, тогда как группа пациентов со средней степенью тяжести показала нарушение данного предположения ( $p = 0.0157$ ). Несмотря на положительный результат теста на нормальность в ряде групп, существенно различающиеся размеры выборок (12, 22 и 3 пациента) требуют применения непараметрических методов, поскольку малый размер выборки, а в частности наличие группы всего из трех пациентов, снижает надежность параметрических оценок и может привести к искажению результатов дисперсионного анализа (Таблица 20).

Для оценки различий в уровне экспрессии miR-338-3p между тремя степенями тяжести применялся критерий Краскела-Уоллиса, по результатам которого были выявлены статистически значимые различия ( $H = 18.36$ ;  $p = 0.0001$ ). Последующее множественное сравнение с помощью post-hoc теста Данна показало, что медианы уровней экспрессии в группах пациентов с легкой и средней степенью тяжести существенно различаются (разница средних рангов =  $-12.84$ ,  $p = 0.0028$ ), а также наблюдаются значимые различия между легкой и тяжелой степенью (разница средних рангов =  $-26.08$ ,  $p = 0.0006$ ). При этом

различие между средней и тяжелой степенью не достигло статистической значимости (разница средних рангов =  $-13.24$ ,  $p = 0.1405$ ) (Рисунок 28).

Аналогичный анализ для miR-424-5p не выявил статистически значимых различий между группами ( $N = 1.86$ ;  $p = 0.3939$ ). При последующих парных сравнениях с помощью post-hoc теста Данна различия между легкой и средней (разница средних рангов =  $-1.098$ ,  $p > 0.9999$ ), легкой и тяжелой (разница средних рангов =  $-9.417$ ,  $p = 0.5332$ ) и средней и тяжелой степенью (разница средних рангов =  $-8.318$ ,  $p = 0.6354$ ) не оказались статистически значимыми (Рисунок 28).

Таким образом, по результатам анализа было установлено, что уровень экспрессии miR-338-3p существенно различается в зависимости от степени тяжести аутоиммунной пузырчатки, что позволяет считать его потенциальным биомаркером активности заболевания. В то же время изменения в уровне экспрессии miR-424-5p не показали статистически значимых различий между группами, что указывает на меньшую информативность данной микроРНК в контексте оценки тяжести заболевания.

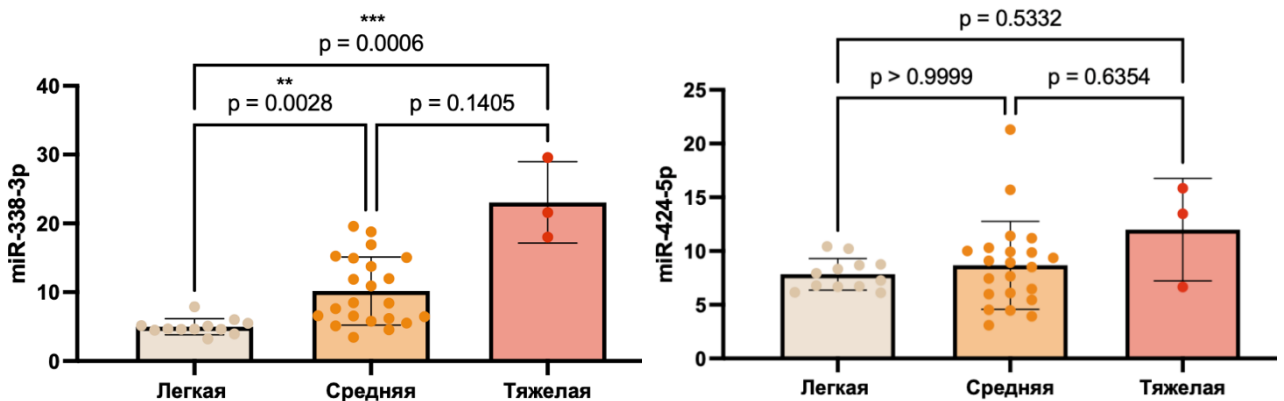


Рисунок 28 – Относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группах пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в активной стадии с легкой, средней, и тяжелой степенью тяжести заболевания

Таблица 20 – Описательная статистика относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группах пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с легкой, средней, и тяжелой степенью тяжести заболевания

	Степень тяжести	N	Среднее	SD	Min	Max	Me	p*
miR-338-3p	Легкая	12	4.99	1.16	3.21	7.90	4.68	0.103
	Средняя	22	10.17	4.94	3.44	19.58	8.45	0.067
	Тяжелая	3	23.05	5.92	18.0	29.57	21.57	0.583
miR-424-5p	Легкая	12	7.83	1.47	6.11	10.42	7.60	0.217
	Средняя	22	8.67	4.08	3.10	21.28	8.72	0.016
	Тяжелая	3	11.99	4.77	6.66	15.85	13.47	0.482
* критерий Шапиро-Уилка								

### 3.7. Оценка диагностической значимости относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p при аутоиммунной пузырчатке

#### 3.7.1. Оценка значимости относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p для диагностики аутоиммунной пузырчатки

В целях оценки значимости относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p для диагностики АП был проведён ROC-анализ на

выборке, включающей 50 контрольных субъектов из Групп №2, 3 и 4, а также 37 пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в активной стадии заболевания из Группы №1.

При статистическом анализе miR-338-3p полученная площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0.9711 (95% ДИ: 0.9415–1.000), что свидетельствует о высокой диагностической значимости miR-338-3p в качестве биомаркера для различения пациентов в активной стадии АП ( $p < 0.0001$ ).

Для определения ключевых точек оптимального порогового значения относительного уровня экспрессии miR-338-3p был рассчитан индекс Юдена. В результате анализа было показано, что при пороговом значении  $> 3.753$  достигается максимальное соотношение: чувствительность равна 94.59% (95% ДИ: 82.30–99.04%) и специфичность — 92.00% (95% ДИ: 81.16–96.85%). Индекс Юдена для данной точки составил 0.865. Таким образом, при уровне экспрессии miR-338-3p равном или превышающем 3.753, прогнозируется высокий риск аутоиммунной пузырчатки, при этом чувствительность метода составляет 94.59%, а специфичность – 92.00%, что подчеркивает высокую диагностическую ценность. Отношение правдоподобия (Likelihood Ratio) при этом составляет 11.82, что дополнительно подтверждает высокую диагностическую значимость miR-338-3p (Рисунок 29).

Для miR-424-5p площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0.9581 (95% ДИ: 0.9183–0.9979;  $p < 0.0001$ ), наибольший баланс между чувствительностью и специфичностью наблюдается при пороговом значении  $> 4.367$ , где чувствительность составляет 94.59% (95% ДИ: 82.30–99.04%), а специфичность – 90.00% (95% ДИ: 78.64–95.65%). Индекс Юдена для данной точки составил 0.845. При этом отношение правдоподобия (Likelihood Ratio) достигает 9.459 также подтверждает, что при значениях miR-424-5p выше 4.367 риск наличия АП существенно возрастает (Рисунок 29).

Таким образом, на основании проведенного ROC-анализа можно сделать вывод, что оптимальным пороговым значением для использования miR-338-3p и miR-424-5p в диагностике аутоиммунной пузырчатки является значение больше

или равное 3.753 и 4.367 соответственно. При превышении данного порога прогнозируется высокий риск заболевания, что дополнительно подтверждается высокими показателями чувствительности и специфичности, а также отношением правдоподобия. Таким образом, по результатам ROC-анализа было продемонстрировано, что относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p обладают высоким потенциалом для различения пациентов с аутоиммунной пузырчаткой от здоровых субъектов, что делает его перспективным диагностическим биомаркером в клинической практике.

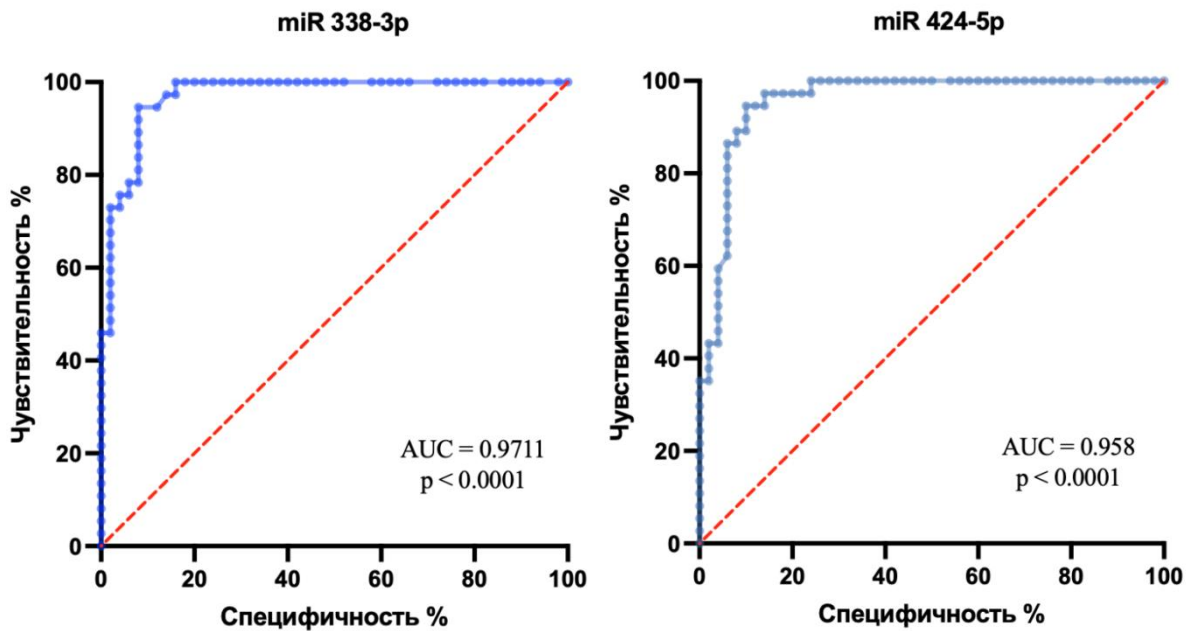


Рисунок 29 – ROC-анализ чувствительности и специфичности относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p

### 3.7.2. Оценка значимости относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p для определения степени тяжести аутоиммунной пузырчатки

Для определения пороговых значений уровня экспрессии miR-338-3p, позволяющих разграничить степени тяжести АП, был проведён ROC-анализ с расчётом площади под кривой (AUC) и индекса Юдена.

Анализ ROC-кривой для сравнения пациентов с лёгкой (PDAI  $\leq 15$ ) и средней (PDAI 15–45) степенью тяжести заболевания (Таблица 20) продемонстрировал, что площадь под кривой составила AUC = 0.8750 ( $p = 0.0004$ ), что свидетельствует о высокой диагностической ценности miR-338-3p для разграничения двух данных степеней тяжести, при этом оптимальное пороговое значение уровня экспрессии miR-338-3p, определённое на основании индекса Юдена, составило 5.313, при котором показатели чувствительности и специфичности составили 86.36% (95% ДИ: 66.67–95.25%) и 75.00% (95% ДИ: 46.77–91.11%) соответственно, отношение правдоподобия (Likelihood Ratio) составило 3.455. Индекс Юдена для данной точки составил 0.909. Таким образом, уровень относительной экспрессии miR-338-3p равный или превышающий значение 5.313 может рассматриваться в качестве порога для дифференциации лёгкой и средней степени тяжести АП (Рисунок 30).

Для сравнения пациентов с средней (PDAI 15–45) и тяжёлой (PDAI  $>45$ ) степенью тяжести был проведён аналогичный ROC-анализ. Значение AUC составило 0.9697 ( $p = 0.0095$ ), что свидетельствует о высокой точности данного показателя. Оптимальный порог уровня экспрессии miR-338-3p, определённый по индексу Юдена, составил 17.47, обеспечивая 100% чувствительность (95% ДИ: 43.85–100.0%) и 90.91% специфичность (95% ДИ: 66.67–95.25%), с отношением правдоподобия (Likelihood Ratio) 11.00. Индекс Юдена для данной точки составил 0.909. Данный порог можно рассматривать как наиболее точный для разграничения средней и тяжёлой степени АП (Рисунок 30).

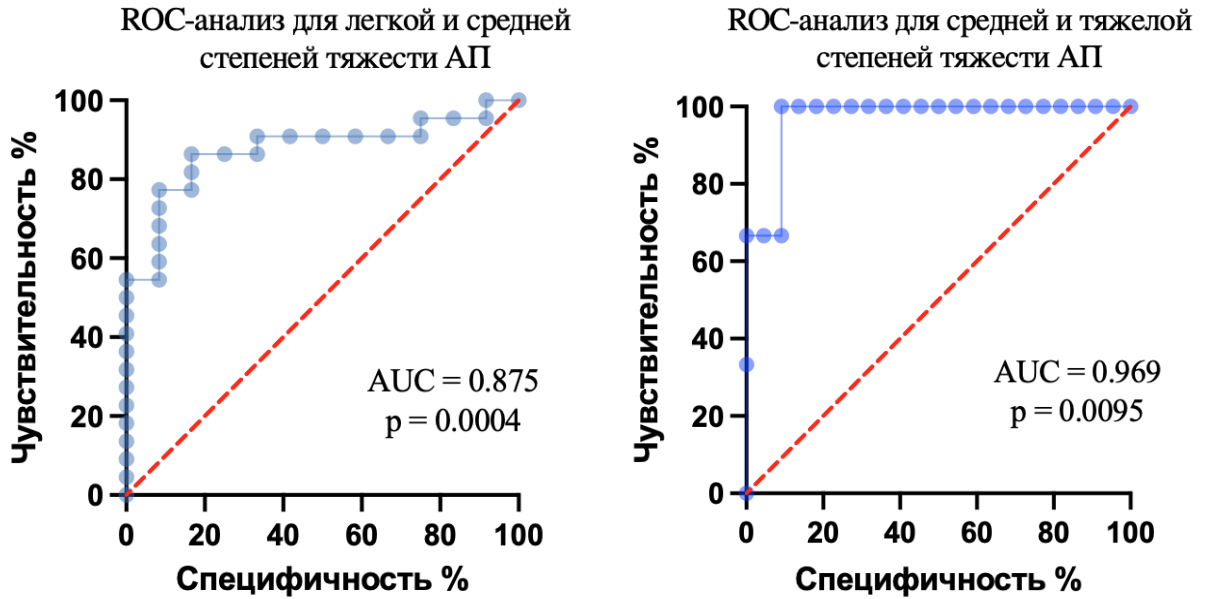


Рисунок 30 – ROC-анализ чувствительности и специфичности относительного уровня экспрессии miR-338-3p для разграничения пациентов с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести аутоиммунной пузырчатки

Для определения пороговых значений уровня экспрессии miR-424-5p также был проведён ROC-анализ с расчётом площади под кривой (AUC) и индекса Юдена. Для дифференцировки пациентов с легкой и средней степенью тяжести заболевания площадь под кривой (AUC) составила 0.5341 (95% ДИ: 0.3382–0.7300,  $p = 0.7457$ ). Оптимальная точка отсечения была определена на уровне 7.353, при которой чувствительность составила 63.64% (95% ДИ: 42.95%–80.27%), а специфичность – 50.00% (95% ДИ: 25.38%–74.62%). Индекс Юдена для данной точки составил 0.136 (Рисунок 31).

При сравнении пациентов со средней и тяжелой степенью заболевания площадь под кривой (AUC) составила 0.7424 (95% ДИ: 0.4165–1.000,  $p = 0.1809$ ). Оптимальная точка отсечения была установлена на уровне 12.43, при которой чувствительность составила 66.67% (95% ДИ: 11.85%–98.29%), а специфичность – 90.91% (95% ДИ: 72.19%–98.38%). Индекс Юдена для данной точки составил 0.576 (Рисунок 31). Полученные результаты свидетельствуют о низкой диагностической значимости данного показателя для разграничения

легкой и средней степени заболевания, но демонстрируют более высокую специфичность при выявлении тяжелой формы заболевания.

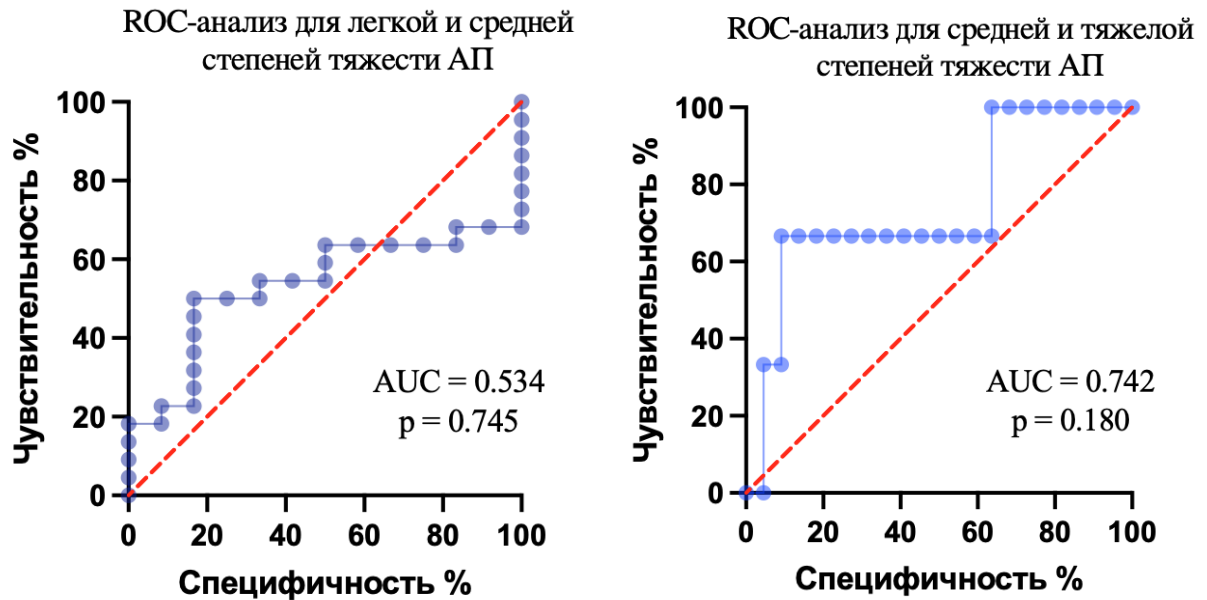


Рисунок 31 – ROC-анализ чувствительности и специфичности относительного уровня экспрессии miR-424-5p для разграничения пациентов с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести аутоиммунной пузырчатки

Таким образом, на основании проведённого ROC-анализа были установлены следующие пороговые значения уровня экспрессии miR-338-3p для разграничения степеней тяжести аутоиммунной пузырчатки:

1. Лёгкая степень тяжести: 3.753 – 5.313
2. Средняя степень тяжести: 5.313 – 17.47
3. Тяжёлая степень тяжести: > 17.47

Полученные результаты подтверждают диагностическую значимость miR-338-3p для стратификации пациентов с АП по степени тяжести заболевания. В то же время, miR-424-5p характеризуется низкой специфичностью, что ограничивает её диагностическую значимость. Возможное применение данного маркера может заключаться в дифференциации тяжёлой и средней степени

тяжести заболевания, однако достоверность такого подхода требует дополнительной валидации.

### **3.8. Анализ особенностей относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов со стероидной резистентностью при аутоиммунной пузырчатке**

При анализе анамнестических данных пациентов с АП в активной стадии заболевания (Группа №1) у части пациентов были выявлены признаки стероидной резистентности, которая устанавливалась на основании следующих критериев: (1) отсутствие положительной динамики в виде заживления уже существующих высыпаний, а также появление новых и увеличение старых элементов на фоне монотерапии ГКС в относительно высоких дозах (трёхнедельное лечение системными ГКС в дозе 1,5 мг/кг); (2) частые рецидивы на фоне терапии ГКС, имеющие упорное течение (Таблица 2). Таким образом, для оценки особенностей экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с признаками стероидной резистентности была проведена стратификация пациентов Группы №1 на две подгруппы: 8 пациентов с признаками стероидной резистентности и 29 пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию (Таблица 21).

Таблица 21 – Описательная статистика относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в активной стадии с признаками стероидной резистентности и без признаков стероидной резистентности

	СР	N	Среднее	SD	Min	Max	Me	p*
miR-338-3p	нет	29	9.20	6.59	3.21	29.6	6.00	<0.001
	да	8	10.75	4.95	4.63	18.8	9.89	0.670
miR-424-5p	нет	29	8.70	3.66	3.10	21.3	8.52	0.004
	да	8	8.56	3.49	5.45	15.7	7.39	0.079

Примечание: СР – пациенты с признаками стероидной резистентности  
\* критерий Шапиро-Уилка

### **3.8.1. Анализ различий относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в зависимости от наличия стероидной резистентности**

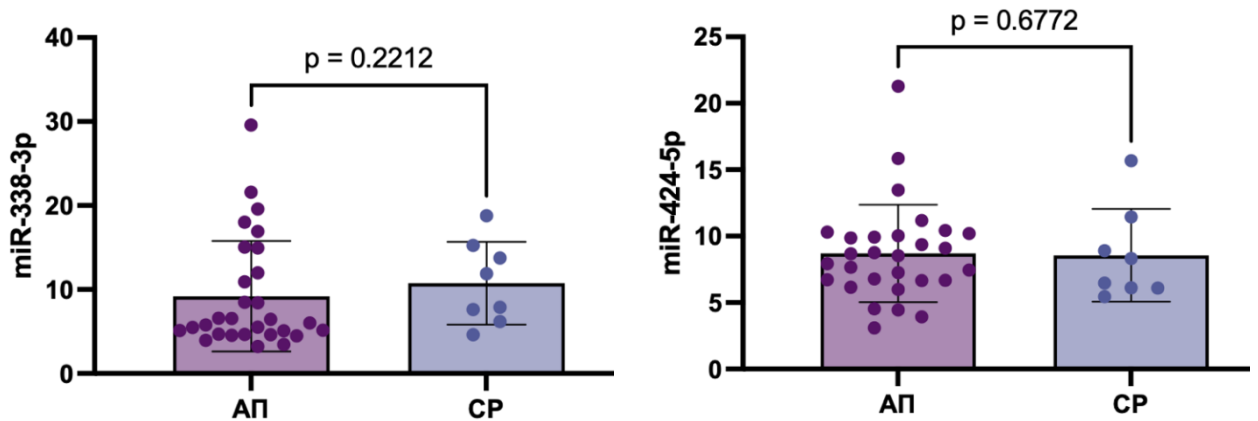
Для оценки различий в уровне экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с АП в зависимости от наличия СР был проведен сравнительный статистический анализ. В результате оценки нормальности распределения было показано, что уровень экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p не соответствует нормальному распределению для ряда групп (Таблица 21), поэтому для статистического сравнения использовался непараметрический критерий Манна–Уитни.

Средний уровень относительной экспрессии в группе пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию ГКС для miR-338-3p составлял 9.20 (SD  $\pm$  6.59), и 8.70 (SD  $\pm$  3.66) для miR-424-5p. В группе пациентов с признаками СР средний уровень относительной экспрессии для miR-338-3p и miR-424-5p составил 10.75 (SD  $\pm$  4.59) и 8.56 (SD  $\pm$  3.49) соответственно.

В группе пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию ГКС (n = 29), медианный уровень экспрессии miR-338-3p составил 6.005, тогда как у пациентов с признаками СР (n = 8) данный показатель был выше и составил 9.892. Однако статистический анализ не выявил значимых различий между группами (U = 82, p = 0.2212) (Рисунок 32).

В группе пациентов чувствительных к ГКС (n = 29) медианный уровень экспрессии miR-424-5p составил 8.522, тогда как у пациентов с СР (n = 8) он оказался несколько ниже 7.388, однако статистически значимых различий выявлено не было (U = 104, p = 0.6772) (Рисунок 32).

Таким образом, по результатам анализа статистически значимых различий в уровне экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с АП в зависимости от наличия стероидной резистентности выявлено не было, несмотря на наблюдаемые тенденции, в частности, к повышению уровня miR-338-3p в группе с СР.



Примечание: AP - группа пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с положительным клиническим ответом на проводимую терапию системными глюкокортикостероидами; CR - группа пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с признаками стероидной резистентности.

Рисунок 32 – Относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группах пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с положительным клиническим ответом на проводимую терапию системными глюкокортикостероидами и группе пациентов с признаками стероидной резистентности

### 3.8.2. Сравнительный анализ динамики снижения относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в зависимости от стероидной резистентности

Для оценки изменений уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в ходе терапии системными ГКС в зависимости от наличия CR проводился анализ образцов, полученных у пациентов на первой и на третьей неделе нахождения на стационарном лечении. Забор пробы на первой неделе производился при поступлении в стационар, среди пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию (n=29) у 17 забор крови осуществлялся до начала патогенетической терапии ГКС (0 мг), а 12 на момент поступления уже

получали терапию ГКС в дозе  $26,04 \pm 17,23$  мг, поэтому забор образца производился до коррекции и повышения дозы системных ГКС. Среди группы пациентов с признаками стероидной резистентности ( $n=8$ ) забор образцов крови осуществлялся до начала патогенетической терапии ГКС (0 мг) у 1 пациента, и 7 на момент поступления получали терапию ГКС в дозе  $22,14 \pm 16,79$  мг.

На первой неделе у пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию средний уровень экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p составил  $9.20$  ( $SD \pm 6.59$ ) и  $8.70$  ( $SD \pm 3.66$ ) соответственно, на третьей неделе для miR-338-3p средний уровень экспрессии составил  $6.78$  ( $SD \pm 6.38$ ), для miR-424-5p –  $9.37$  ( $SD \pm 4.81$ ) (Таблица 22). В группе пациентов с признаками стероидной резистентности средний уровень экспрессии на первой неделе составил  $10.75$  ( $SD \pm 4.95$ ) для miR-338-3p и  $8.56$  ( $SD \pm 3.49$ ) для miR-424-5p, на третьей неделе для miR-338-3p средний уровень экспрессии составил  $10.55$  ( $SD \pm 7.42$ ), для miR-424-5p –  $11.15$  ( $SD \pm 5.26$ ) (Таблица 23).

Для сопоставимости результатов все статистический анализ выполнялся с использованием непараметрических методов (критерий Вилкоксона), поскольку в ряде выборок наблюдалось ненормальное (критерий Шапиро–Уилка,  $p < 0.0001$ ).

При сравнении динамики уровня экспрессии miR-338-3p у пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию на первой и третьей неделе медиана уровня экспрессии составила  $6.005$  ( $n = 29$ ) и  $4.148$  ( $n = 18$ ) соответственно, что эквивалентно снижению в 1.45 раза (30.9%). Анализ с применением критерия Вилкоксона подтвердил статистическую значимость наблюдаемой динамики уровня экспрессии ( $W = -171$ ,  $p < 0.0001$ ), корреляционный анализ Спирмена показал высокую степень согласованности изменений ( $r_s = 0.8776$ ,  $p < 0.0001$ ).

Для miR-424-5p медианное значение уровня экспрессии на первой неделе составило  $8.522$ , на третьей неделе –  $8.767$ , что соответствует увеличению в 1.05 раза (5.4%), однако статистическая значимость отсутствует

( $W = -21$ ,  $p = 0.6705$ ). Корреляционный анализ Спирмена также показал значимую согласованность данных ( $r_s = 0.7393$ ,  $p = 0.0002$ ) (Рисунок 33).

У пациентов с признаками стероидной резистентности для miR-338-3p медианные значения составили 9.892 на первой неделе и 10.05 на третьей ( $n = 8$  для обеих временных точек), то есть наблюдается увеличение в 1.016 раз (1.6%). Статистический анализ с использованием критерия Вилкоксона не выявил значимых изменений ( $W = -6$ ,  $p = 0.7422$ ). Корреляционный анализ Спирмена подтвердил значимость согласованности данных ( $r_s = 0.9286$ ,  $p = 0.0011$ ). В то же время, уровень экспрессии miR-424-5p на первой неделе составил 7.388 и к третьей неделе увеличился до 10.56, что соответствует увеличению на 1.43 раза (43%), однако статистическая значимость различий отсутствовала ( $W = 22$ ,  $p = 0.1484$ ). Корреляционный анализ Спирмена также показал значимость данных ( $r_s = 0.7143$ ,  $p = 0.0288$ ) (Рисунок 34).

Таким образом, динамика экспрессии микроРНК у пациентов, у пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию характеризуется значимым снижением уровня miR-338-3p, в то время как изменение уровня miR-424-5p остается незначительным. В группе пациентов с признаками стероидной резистентности отсутствует снижение уровня экспрессии как miR-338-3p, так и miR-424-5p, что свидетельствует о сохранении высоких показателей данных микроРНК в динамике лечения.

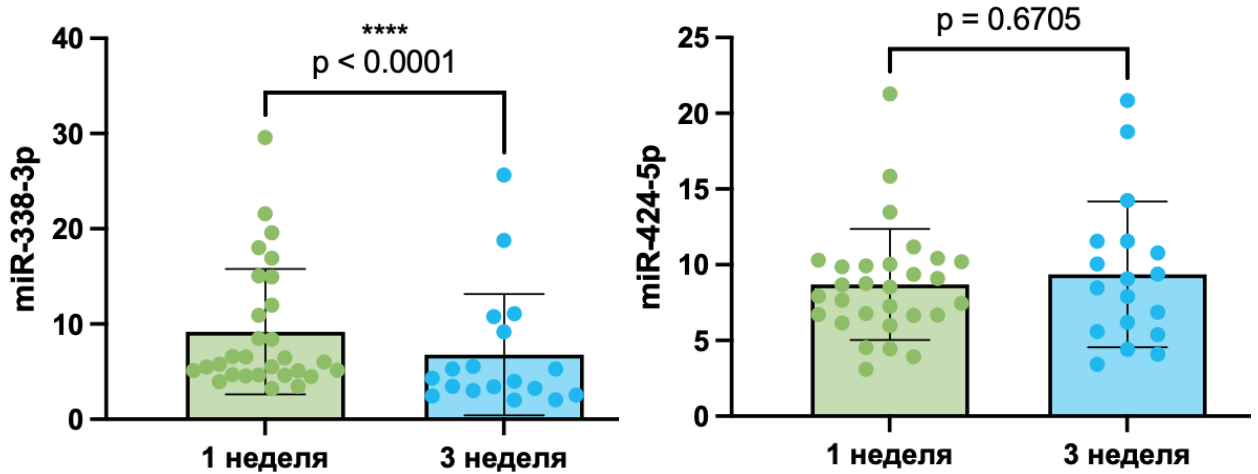


Рисунок 33 – Относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с положительным клиническим ответом на проводимую терапию системными глюкокортикостероидами на первой и третьей неделе нахождения на стационарном лечении

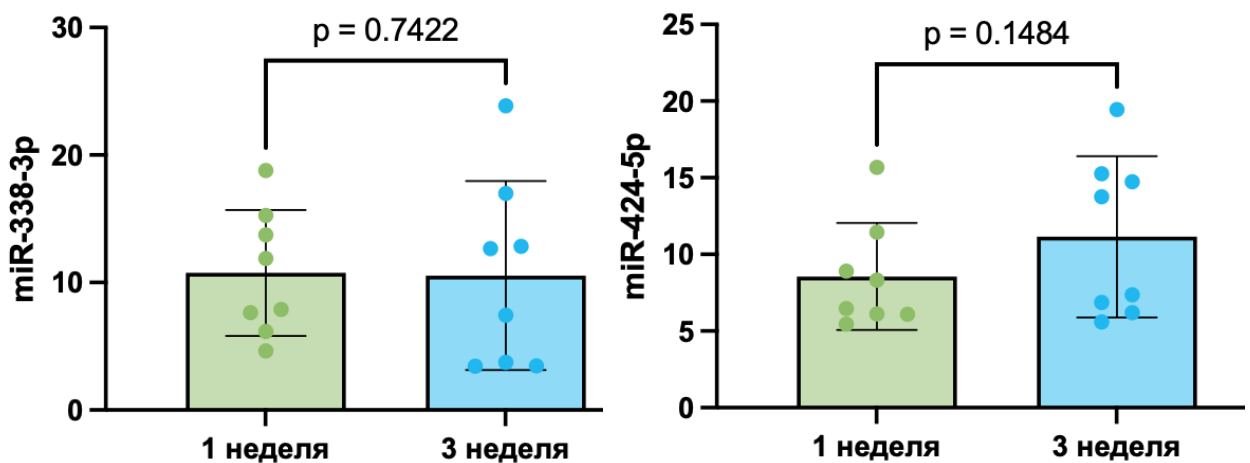


Рисунок 34 – Относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с признаками стероидной резистентности на первой и третьей неделе нахождения на стационарном лечении и терапии системными глюкокортикостероидами

Таблица 22 – Описательная статистика относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с положительным клиническим ответом на проводимую терапию системными глюкокортикостероидами на первой и третьей неделе нахождения на стационарном лечении

	Группа	N	Среднее	SD	Min	Max	Me	p*
miR-338-3p	1 неделя	29	9.20	6.59	3.21	29.6	6.00	<0.001
	3 неделя	18	6.78	6.38	2.02	25.7	4.15	<0.001
miR-424-5p	1 неделя	29	8.70	3.66	3.10	21.3	8.52	0.004
	3 неделя	18	9.37	4.81	3.44	20.8	8.77	0.079
* критерий Шапиро-Уилка								

Таблица 23 – Описательная статистика относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с признаками стероидной резистентности на первой и третьей неделе нахождения на стационарном лечении и терапии системными глюкокортикостероидами

	Группа	N	Среднее	SD	Min	Max	Me	p*
miR-338-3p	1 неделя	8	10.75	4.95	4.63	18.8	9.89	0.670
	3 неделя	8	10.55	7.42	3.44	23.9	10.05	0.238
miR-424-5p	1 неделя	8	8.56	3.49	5.45	15.7	7.39	0.079
	3 неделя	8	11.15	5.26	5.58	19.4	10.56	0.159
* критерий Шапиро-Уилка								

### **3.8.3. Корреляционный анализ связи индекса PDAI с относительным уровнем экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в зависимости от стероидной резистентности**

Для оценки взаимосвязи между уровнем экспрессии miR-338-3p, miR-424-5p и тяжестью заболевания, оцененной по индексу PDAI у пациентов с различным ответом на терапию системными ГКС был проведён корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции Спирмана. Проверка распределения данных с применением критерия Шапиро–Уилка показала их отклонение от нормального распределения, что обусловило выбор непараметрического метода корреляционного анализа.

У пациентов с наблюдаемым клиническим ответом на терапию ГКС выявлена статистически значимая сильная положительная корреляция между уровнем экспрессии miR-338-3p и индексом PDAI как до начала лечения ( $r = 0,8783$ , 95% ДИ: 0,7497 – 0,9429,  $p < 0,0001$ ), так и на третьей неделе терапии ( $r = 0,8336$ , 95% ДИ: 0,5907 – 0,9380,  $p < 0,0001$ ). Высокие значения коэффициента корреляции указывают на тесную взаимосвязь между повышенным уровнем miR-338-3p и выраженностью проявлений АП, что сохраняется на фоне проводимого лечения. Для miR-424-5p в данной группе пациентов статистически значимой связи с индексом PDAI как до начала терапии ( $r = 0,3007$ ,  $p = 0,1130$ ), так и на третьей неделе ( $r = 0,4572$ ,  $p = 0,0564$ ) выявлено не было (Рисунок 35, 36). Несмотря на тенденцию к увеличению коэффициента корреляции, доверительный интервал включает нулевое значение, что не позволяет утверждать о наличии достоверной ассоциации.

В группе пациентов с признаками стероидной резистентности корреляционный анализ не выявил статистически значимой связи между уровнем экспрессии miR-338-3p и индексом PDAI как до терапии ( $r = 0,3571$ ,  $p = 0,3894$ ), так и после трёх недель терапии ( $r = 0,3810$ ,  $p = 0,3599$ ).

Для miR-424-5p у пациентов со стероидной резистентностью как до начала терапии ( $r = -0,1905$ ,  $p = 0,6646$ ), так и на 3 неделе ( $r = 0,7143$ ,  $p = 0,0576$ ) также не выявлено статистически значимой связи с индексом PDAI (Рисунок 37, 38).

Таким образом, полученные данные демонстрируют выраженную взаимосвязь между уровнем экспрессии miR-338-3p и тяжестью заболевания у пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию ГКС, тогда как у пациентов со стероидной резистентностью такая корреляция отсутствует. Для miR-424-5p как для пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию ГКС, так и с признаками стероидной резистентности не было установлено корреляции уровня экспрессии с индексом PDAI.

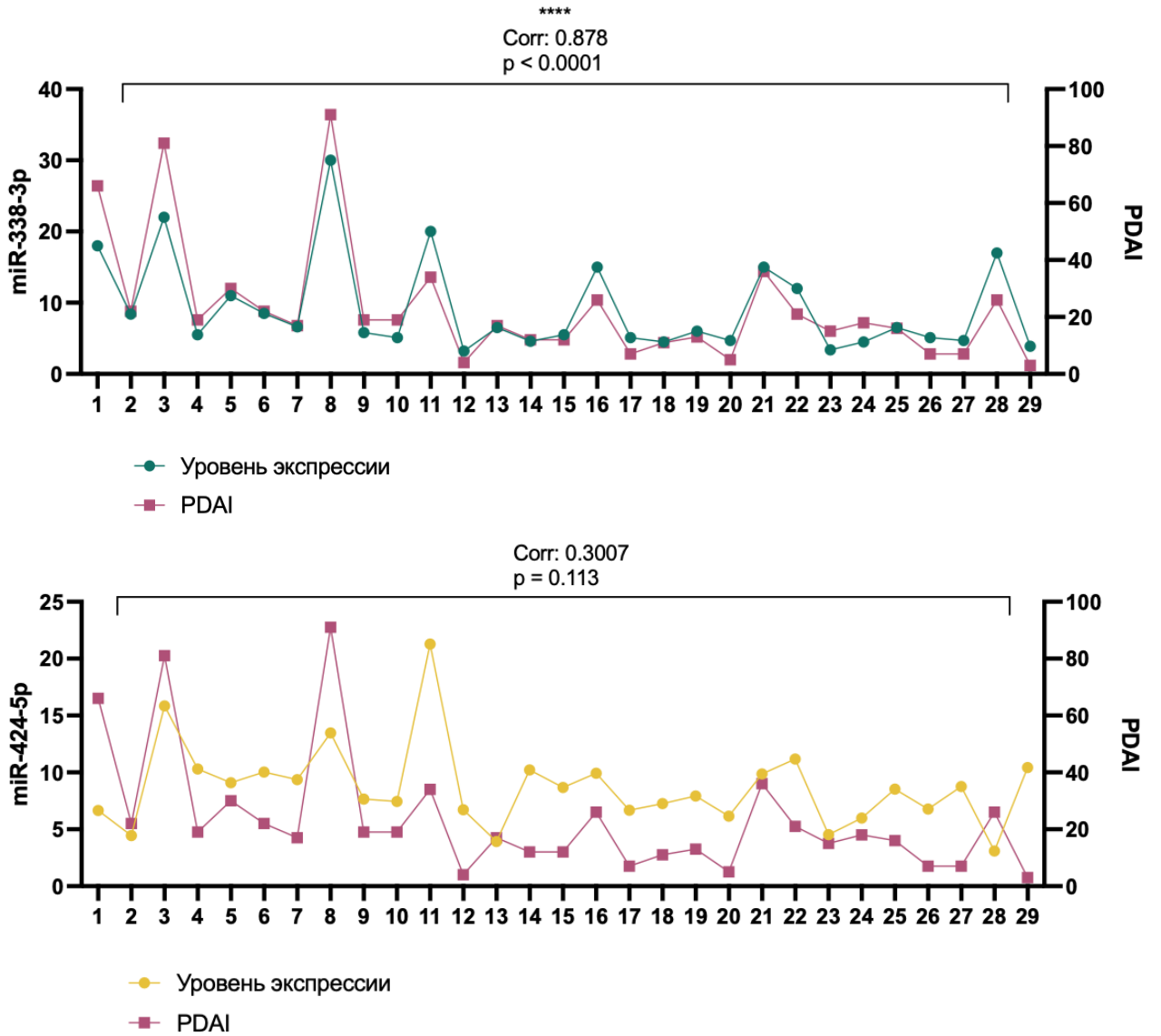


Рисунок 35 – Связь между относительными уровнями экспрессии miR-338-3p, miR-424-5p и величиной значения индекса PDAI в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с положительным клиническим ответом на проводимую терапию системными глюкокортикостероидами на первой неделе нахождения на стационарном лечении

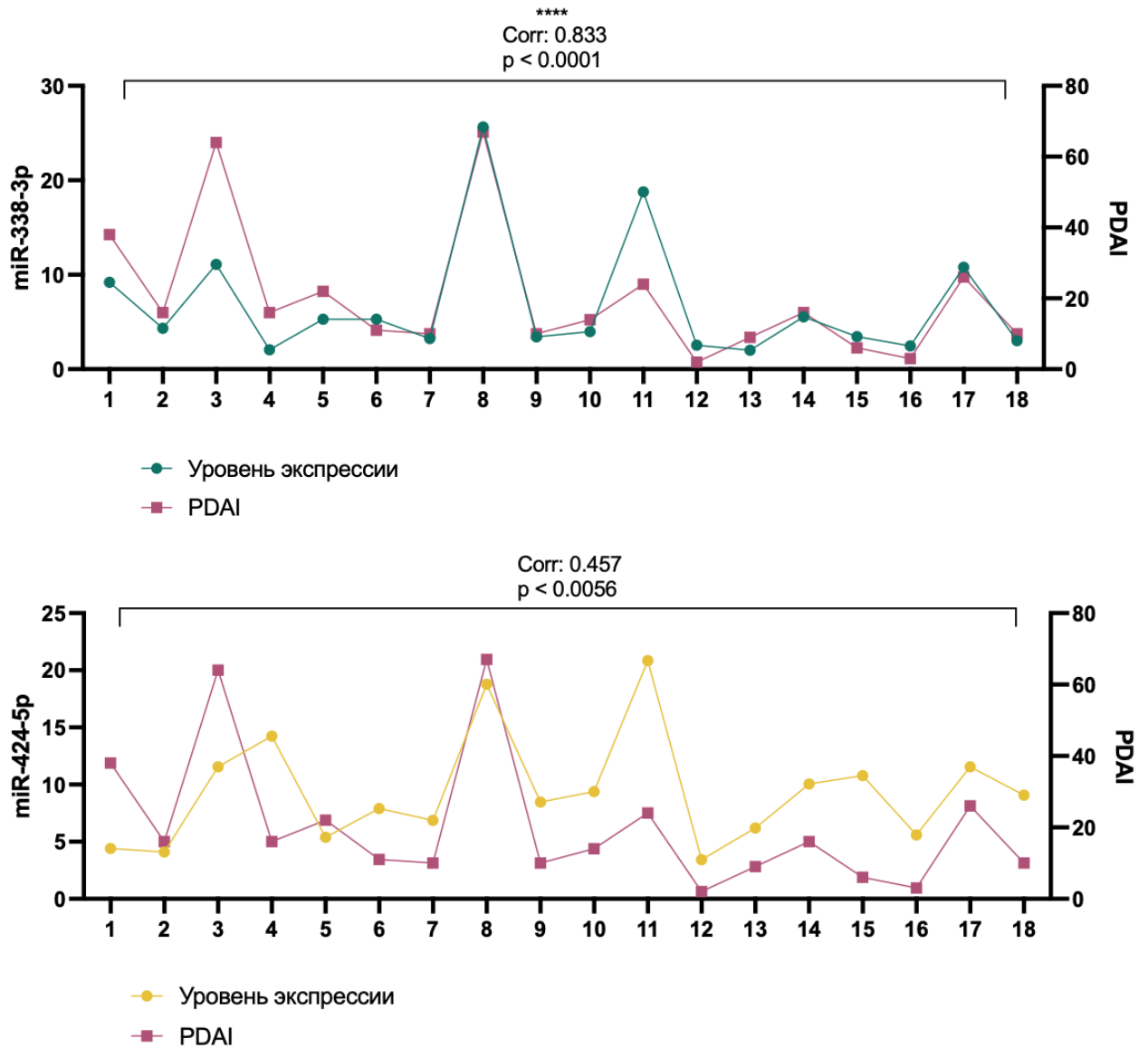


Рисунок 36 – Связь между относительными уровнями экспрессии miR-338-3p, miR-424-5p и величиной значения индекса PDAI в группе пациентов с аутоиммунной пузырчаткой с положительным клиническим ответом на проводимую терапию системными глюкокортикостероидами на третьей неделе нахождения на стационарном лечении

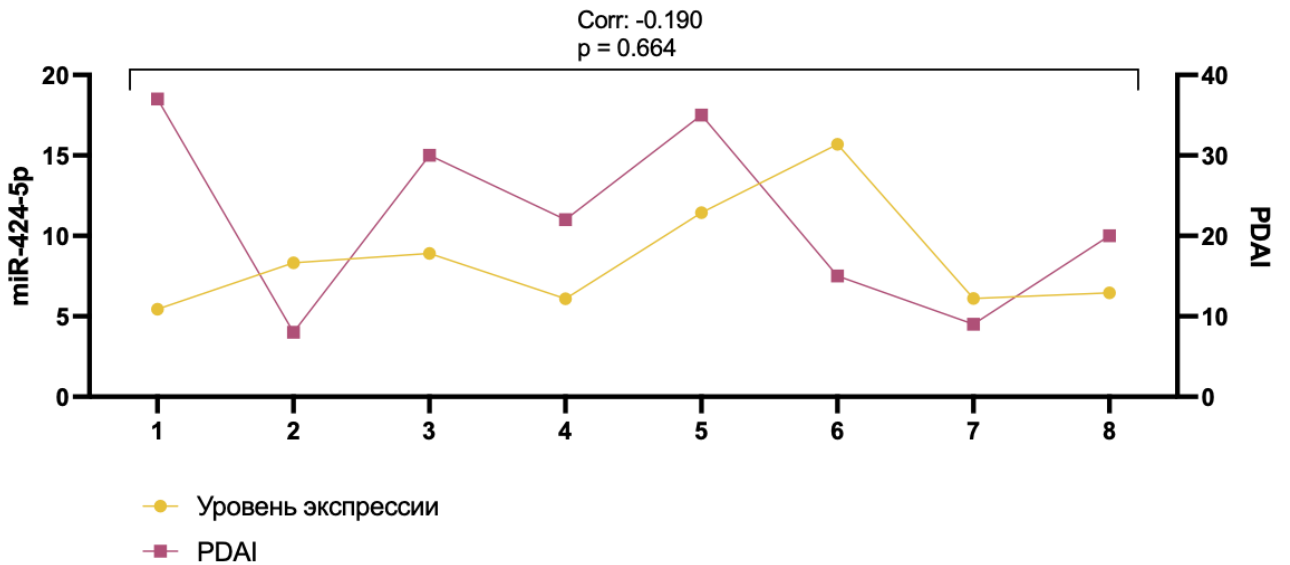
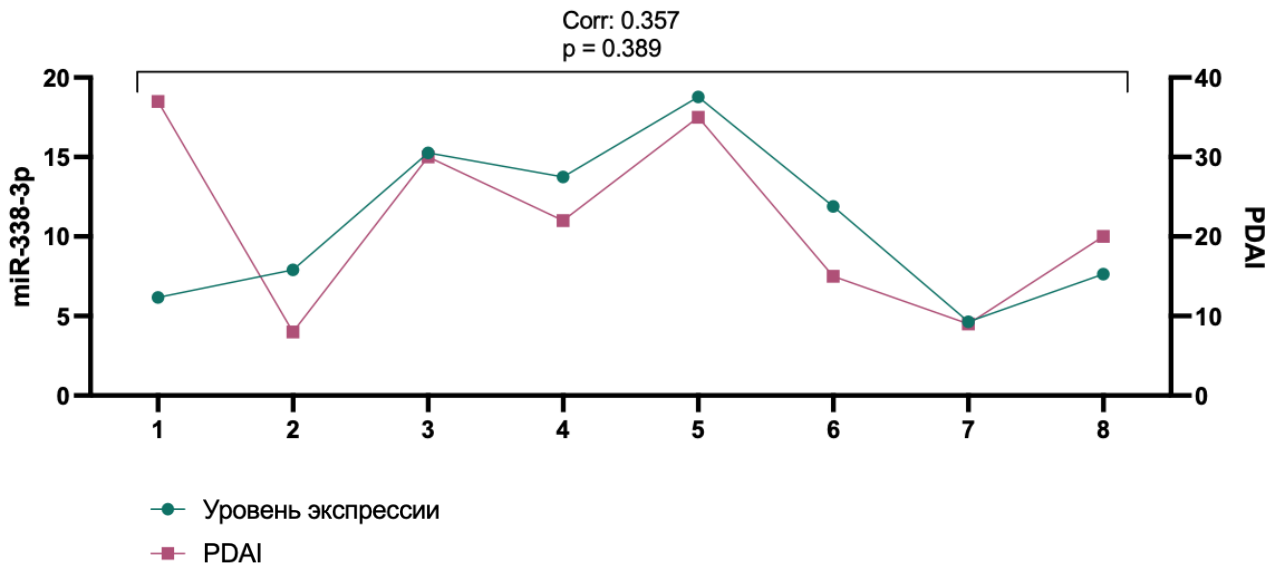


Рисунок 37 – Связь между относительными уровнями экспрессии miR-338-3p, miR-424-5p и величиной значения индекса PDAI в группе пациентов с признаками стероидной резистентности на первой неделе нахождения на стационарном лечении

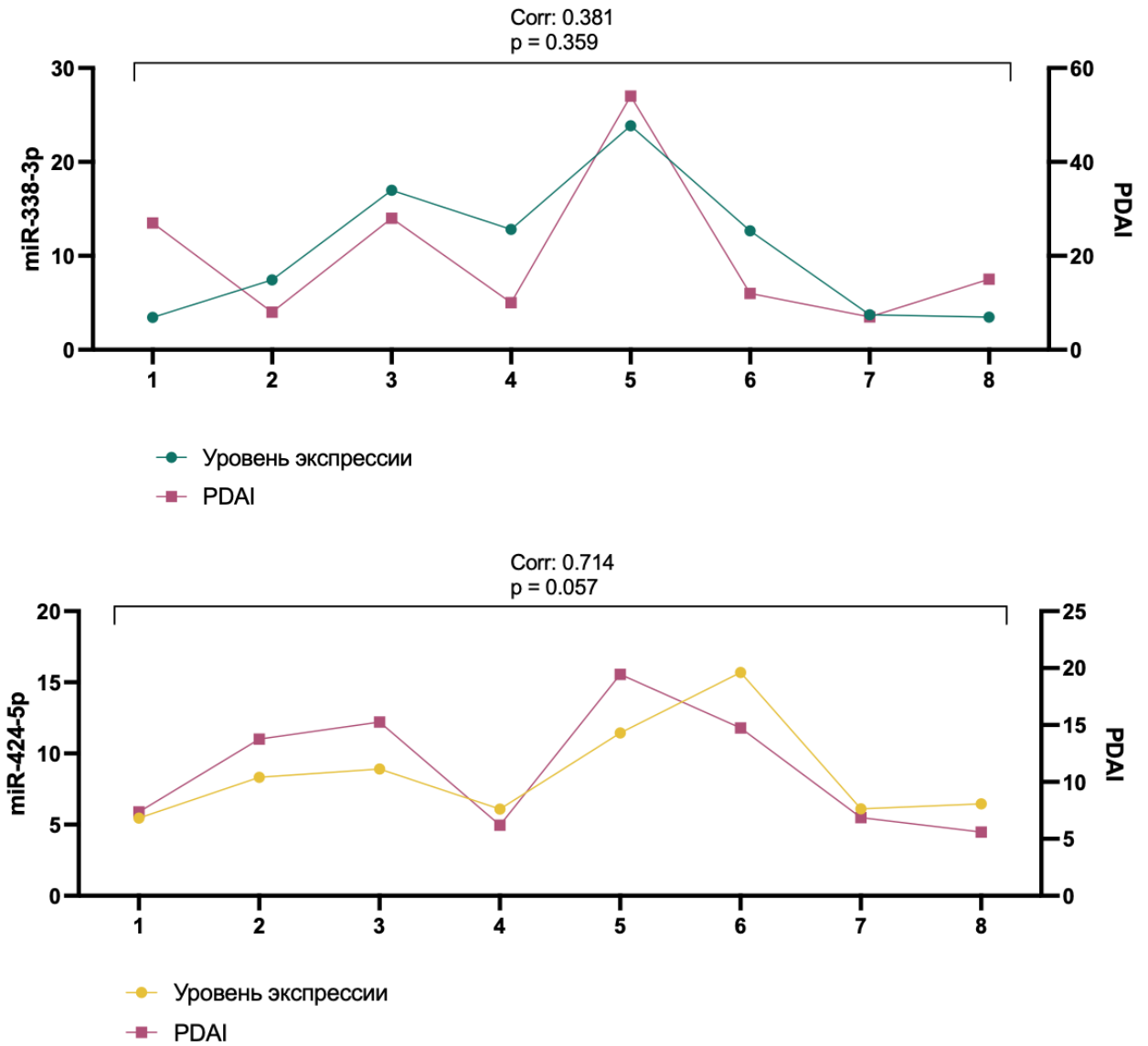
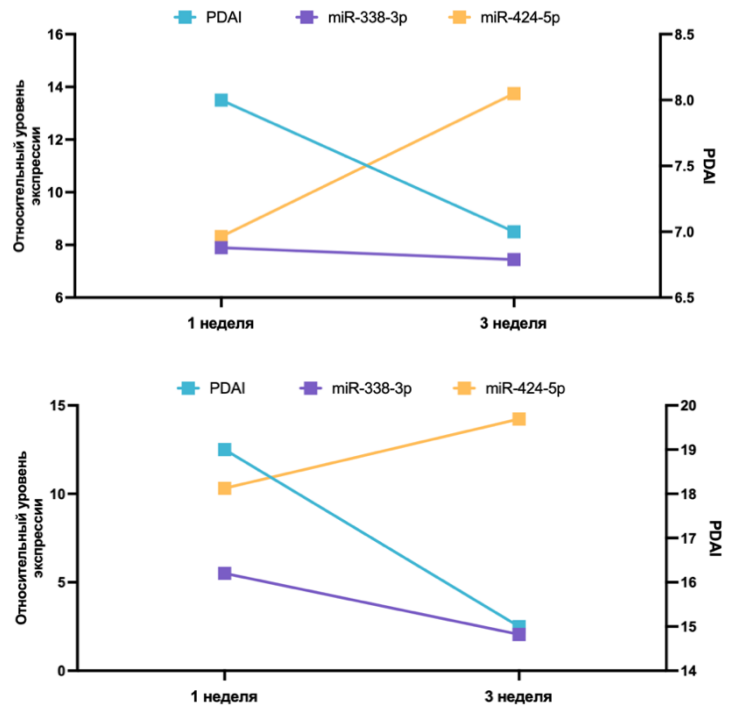


Рисунок 38 – Связь между относительными уровнями экспрессии miR-338-3p, miR-424-5p и величиной значения индекса PDAI в группе пациентов с признаками стероидной резистентности на третьей неделе нахождения на стационарном лечении



Примечание: А – Больная N., 55 лет с признаками стероидной резистентности. Диагноз: вульгарная пузырчатка, PDAI 8; Б – Больная N., 60 лет с положительным клиническим ответом на проводимую терапию системными ГКС. Диагноз: вульгарная пузырчатка, PDAI 19

Рисунок 39 – Связь между относительными уровнями экспрессии miR-338-3p, miR-424-5p и величиной значения индекса PDAI у пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию и с признаками стероидной резистентности на первой и третьей неделе нахождения на стационарном лечении

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аутоиммунная пузырчатка представляет собой группу хронических, потенциально жизнеугрожающих буллезных дерматозов, обусловленных продукцией аутоантител к десмосомальным белкам, что приводит к потере межклеточной адгезии и формированию внутриэпидермальных пузырей [12, 13, 34, 91, 140]. Несмотря на значительный прогресс в изучении заболевания, диагностика и оценка тяжести АП остаются сложными задачами, поскольку существующие лабораторные методы, такие как ИФА, прямая и непрямая РИФ, имеют ряд ограничений [1]. В данном исследовании был проведен анализ диагностической и прогностической значимости экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в зависимости от различных клинических и терапевтических условий.

При анализе уровней относительной экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p было установлено значительное повышение экспрессии miR-338-3p в группе с активной АП: в 2,18 раза (на 118%) по сравнению с пациентами с АП в стадии ремиссии, в 3,13 раза (на 213%) по сравнению с условно здоровыми добровольцами и в 2,44 раза (на 144%) по сравнению с пациентами с иными буллезными дерматозами в активной стадии. Аналогичные тенденции наблюдались для miR-424-5p: в 1,95 раза (на 95%) относительно пациентов с АП в стадии ремиссии, в 3,40 раза (на 240%) относительно контрольной группы условно здоровых добровольцев, и в 2,46 раза (на 146%) относительно пациентов с иными буллезными дерматозами в активной стадии, при отсутствии значимых различий между контрольными группами ( $p > 0.05$ ). При ROC-анализе установлена высокая диагностическая значимость как для miR-338-3p, так и для miR-424-5p: при пороговом значении  $> 3.753$  чувствительность составила 94.59% (95% ДИ: 82.30–99.04%), специфичность — 92.00% (AUC = 0.9711,  $p < 0.0001$ ), для miR-424-5p при пороге  $> 4.367$  — 94.59% и 90.00% соответственно (AUC = 0.9581,  $p < 0.0001$ ), что позволяет с высокой

точностью диагностировать АП и особенно ценно для дифференциальной диагностики и выявления клинически атипичных форм, включая АП с изолированным поражением слизистых оболочек. Не было установлено статистически значимых различий уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в зависимости от формы заболевания, локализации патологического процесса, приема системных ГКС, длительности патологического процесса. В то же время, установлено статистически значимая умеренная разница между уровнем экспрессии miR-424-5p в группе пациентов, получавших ГКС, по сравнению с пациентами, не получавшими терапию системными ГКС ( $p = 0.0392$ ): наблюдался более низкий уровень экспрессии miR-424-5p в группе пациентов принимающих системные ГКС, что, с одной стороны, может свидетельствовать о потенциальном влиянии ГКС на регуляцию экспрессии данной микроРНК, а с другой не исключает влияния множества сопутствующих факторов, таких как индивидуальные особенности пациентов, длительность заболевания, или иные факторы, которые могут оказывать влияние на полученные результаты, что требует дальнейшего изучения для выяснения механизмов данного эффекта и его клинического значения. Также, при разделении пациентов на группы в зависимости от приёма ГКС была обнаружена умеренная положительная корреляция между длительностью заболевания и уровнем экспрессии miR-338-3p у пациентов, которые на момент забора пробы никогда не получали терапию системными ГКС, что может указывать на возможное влияние длительности заболевания на уровень экспрессии данной микроРНК и отражать степень десмосомальной деградации в ответ на длительное воздействие аутоантител и апоптоз кератиноцитов в условиях отсутствия терапии ГКС [59, 119].

Диагностический потенциал miR-338-3p и miR-424-5p выходит за рамки простой констатации наличия АП. В рамках исследования также были проанализированы уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p на фоне терапии системными ГКС в динамике, с анализом экспрессии в две временные точки — на 1-й неделе (до начала терапии) и на 3-й неделе (в процессе терапии системными ГКС), а также проанализирована взаимосвязь уровня экспрессии и степени

тяжести заболевания, оцененной по индексу PDAI. По результатам анализа было установлено, что уровень экспрессии miR-338-3p существенно различается в зависимости от степени тяжести АП, что позволяет считать его потенциальным биомаркером активности заболевания ( $H = 18.36$ ;  $p = 0.0001$ ). В то же время изменение уровня экспрессии miR-424-5p не показало статистически значимых различий между группами, что указывает на меньшую информативность данной микроРНК в контексте оценки тяжести заболевания ( $H = 1.86$ ;  $p = 0.3939$ ). Корреляционный анализ выявил сильную статистически значимую положительную связь уровня экспрессии miR-338-3p с индексом PDAI ( $r = 0.8280$ ,  $p < 0.0001$  до терапии ГКС), сохраняющуюся даже на фоне проводимой терапии ГКС ( $r = 0.6493$ ,  $p = 0.0003$ ), что свидетельствует о выраженной прямой зависимости между повышением уровня miR-338-3p и тяжестью АП, что позволяет использовать её для объективной оценки тяжести заболевания. При определении пороговых значений уровня экспрессии miR-338-3p, позволяющих разграничить степени тяжести АП, с помощью ROC анализа были установлены следующие пороговые значения и интервалы: лёгкая степень тяжести соответствует диапазону уровня экспрессии 3.753 – 5.313; средняя степень тяжести эквивалентна интервалу 5.313 – 17.47; при значении уровня экспрессии  $> 17.47$  можно говорить о тяжёлой степени тяжести АП. В отличие от miR-338-3p, для miR-424-5p корреляционный анализ не выявил статистически значимой связи с индексом PDAI ( $r = 0.2166$ ;  $p = 0.1980$ ), однако, была установлена умеренная корреляция с PDAI на фоне проводимой терапии ГКС на третьей неделе ( $r = 0.4129$ ,  $p = 0.0360$ ). Данная тенденция может свидетельствовать о том, что динамика экспрессии miR-424-5p отражает процессы, происходящие в ответ на терапию, и возможно, участвует в механизмах регуляции воспалительного ответа. Таким образом, полученные результаты подтверждают диагностическую значимость miR-338-3p для стратификации пациентов с АП по степени тяжести заболевания. В то же время, miR-424-5p характеризуется низкой специфичностью, что ограничивает её диагностическую значимость для оценки степени тяжести. При сравнении уровня экспрессии

miR-338-3p на первой и на третьей неделе терапии системными ГКС выявлено статистически значимое снижение данного показателя ( $W = -283.0$ ,  $p = 0.0001$ ) в 1.36 раза (на 26.7%), тогда как уровень экспрессии miR-424-5p оставался неизменным и статистически значимых различий между уровнем экспрессии на первой и третьей неделе терапии выявлено не было ( $W = 45.0$ ,  $p = 0.5822$ ).

Полученные результаты согласуются с результатами, представленными в литературе, например, в работах Lin N. et al. (2018) [156] и Xu M. et al. (2020) [86], где также было установлено повышение уровня экспрессии miR-338-3p при АП, и авторы выдвигают гипотезу о её потенциальной диагностической значимости и связи с активностью заболевания [86, 156]. Наиболее обращает на себя внимание работа Lin, N et al. (2018), в которой оценивался уровень относительной экспрессии miR-338-3p в трех группах: у пациентов в активной стадии АП, пациентов с буллезным пемфигоидом Левера, а также в контрольной группе здоровых добровольцев, и помимо повышения уровня экспрессии данной микроРНК в группе пациентов с АП в активной стадии заболевания, было установлено, что уровень экспрессии miR-338-3p постепенно снижается в процессе эффективной терапии системными ГКС, а также коррелирует со степенью тяжести АП оцененной по индексу PDAI [156]. Полученные выводы не противоречат полученным в данной работе результатам, однако к недостаткам дизайна работы Lin, N et al. (2018) можно отнести меньшую выборку в группах пациентов, а также отсутствие стандартизированной временной точки забора повторной пробы у пациентов в активной стадии для оценки изменения уровня экспрессии miR-338-3p во время проводимой патогенетической терапии (забор проб производился в диапазоне 2-6 недель от начала терапии) [156]. Ранее опубликованные исследования, посвящённые изучению экспрессии miR-424-5p при АП, также подтверждают её гиперэкспрессию у пациентов в активной стадии заболевания по сравнению с группой здоровых добровольцев [81, 87]. Тем не менее, в доступной литературе отсутствуют данные о динамике изменений уровня экспрессии miR-424-5p в ходе терапии, а также не проводился анализ корреляции с индексом PDAI и не определялись пороговые значения экспрессии, обладающие

диагностической значимостью [81, 87]. Следует отметить, что в ранее опубликованных работах, посвящённых изучению уровней экспрессии микроРНК при АП не проводилось анализа данных на подобного объема выборке пациентов, включающей как пациентов с ВП, так и с ЛП, находящихся как в активной стадии, так и в стадии ремиссии. Также не изучалась экспрессия микроРНК в зависимости от клинической формы заболевания, длительности патологического процесса, его локализации, в зависимости от терапии системными ГКС, а также в процессе проводимой терапии.

Настоящее исследование является первым, в котором уровень экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p был проанализирован в зависимости от наличия у пациентов признаков стероидной резистентности. По результатам анализа было установлено, что статистически значимых различий при сравнении уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в группе АП с положительным клиническим ответом на проводимую терапию ГКС и группой пациентов с признаками СР выявлено не было, несмотря на наблюдаемые тенденции, в частности, к повышению уровня miR-338-3p в группе со СР. Однако, при оценке изменений уровней экспрессии микроРНК в динамике, у пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию наблюдалось значительное снижение уровня miR-338-3p в 1.45 раза (30.9%) ( $W = -171, p < 0.0001$ ), в то время как изменение уровня miR-424-5p остается незначительным ( $W = -21, p = 0.6705$ ). При этом в группе пациентов с признаками СР отсутствует снижение уровня экспрессии как miR-338-3p ( $W = -6, p = 0.7422$ ), так и miR-424-5p ( $W = 22, p = 0.1484$ ), что свидетельствует о сохранении высоких показателей данных микроРНК в динамике лечения. Также стоит отметить, что, не смотря на отсутствие статистически значимых различий между уровнем экспрессии miR-424-5p ( $W = 22, p = 0.1484$ ) у пациентов с признаками СР на первой и третьей неделе, уровень экспрессии miR-424-5p увеличился в 1.43 раза (43%). Таким образом, наблюдается тенденция к увеличению уровня экспрессии miR-424-5p у пациентов с признаками СР при отсутствии ответа на проводимую терапию, наблюдаемое отсутствие статистически выраженной корреляции может быть

обусловлено малой выборкой группы. Также полученные данные демонстрируют выраженную взаимосвязь между уровнем экспрессии miR-338-3p и тяжестью заболевания у пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию ГКС ( $r = 0.8783$ ,  $p < 0.0001$ ), тогда как у пациентов со стероидной резистентностью такая корреляция отсутствует ( $r = 0.3571$ ,  $p = 0.3894$ ). Для miR-424-5p как для пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию ГКС ( $r = 0.3007$ ,  $p = 0.1130$ ), так и с признаками стероидной резистентности ( $r = -0.1905$ ,  $p = 0.6646$ ) не было установлено корреляции уровня экспрессии с индексом PDAI.

Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают высокую диагностическую и прогностическую значимость miR-338-3p и miR-424-5p при АП. Полученные данные подтверждают перспективность использования miR-338-3p и miR-424-5p не только в качестве диагностических маркеров АП, но и в качестве инструмента мониторинга течения заболевания и активности патологического процесса, а также стратификации пациентов по степени тяжести и прогнозированию эффективности проводимой терапии. Оценка уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p может стать дополнением к существующим диагностическим методикам, особенно в отношении АП с изолированным поражением слизистых оболочек. Выявленная корреляция уровней микроРНК с PDAI подчеркивает их потенциальную ценность в создании более объективных шкал оценки тяжести заболевания. Кроме того, согласно последним исследованиям, дисбаланс Th1/Th2-клеток при АП может быть связан со сверхэкспрессией miR-338-3p и miR-424-5p и их влияния на сигнальные пути MAPK, а также активацию Т-клеток путем регуляции мРНК *RNF114* и *TRADD*, таким образом, учитывая их вовлеченность в патогенез заболевания, дальнейшее изучение микроРНК и механизмов взаимодействия и влияния на ключевые иммунные пути при АП, могут способствовать разработке новых стратегий не только диагностики, но и персонализированной терапии пациентов с АП [85, 156].

На основании полученных данных предложен алгоритм ведения пациентов на основе анализа относительных уровней экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в МКПК, представленный в Приложении А.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно последним исследованиям, микроРНК занимают ключевую позицию в регуляции иммунного ответа, демонстрируя высокую стабильность *in vivo* и возможность точного количественного определения, что делает их перспективными кандидатами в качестве диагностических биомаркеров различных патологических состояний [129, 162]. Настоящее исследование представляет собой первую в России работу, в которой была проанализирована диагностическая значимость miR-338-3p и miR-424-5p при АП. Также важно отметить, что данное исследование является первой работой по данной тематике с подобного объема выборкой, в которой относительные уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p были изучены в зависимости от таких факторов как форма АП (ВП или ЛП), длительность заболевания, прием системных ГКС, локализация патологического процесса, степень тяжести (оцененной по индексу тяжести пузырчатки PDAI), а также СР, что ранее в подобных работах не изучалось. Установлено, что у пациентов с АП в активной стадии заболевания уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p существенно повышены и могут быть использованы в качестве анализа, дополняющего традиционные методы диагностики. Оценка относительного уровня экспрессии может быть использована как самостоятельное исследование, так и совместно с ИФА в качестве скринингового обследования для более точной лабораторной диагностики и минимизации риска диагностических ошибок в виде ложноотрицательных или ложноположительных результатов. Оптимальным пороговым значением для использования miR-338-3p и miR-424-5p в диагностике АП является значение для miR-338-3p  $\geq 3.753$  и для miR-424-5p  $\geq 4.367$ , при превышении данного порога прогнозируется высокий риск АП, чувствительность и специфичность составляют 94.59% и 92.00% для miR-338-3p, 94.59% и 90.00% для miR-424-5p соответственно. Однако, в отличие от ИФА, результаты относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p полученные с

помощью ПЦР-РВ могут быть использованы для определения тяжести заболевания и эффективности проводимой терапии. В результате пролонгированного наблюдения за пациентами с определением уровня экспрессии miR-338-3p через три недели от начала патогенетической терапии установлено постепенное снижение уровня экспрессии данной микроРНК в среднем в 1.36 раз (26.7%) среди общей когорты пациентов в активной стадии АП, и в 1.45 раз (30.9%) в группе пациентов с положительным клиническим ответом на проводимую терапию, тогда как стабильный или возрастающий уровень miR-338-3p в совокупности с тенденцией к повышению относительного уровня экспрессии miR-424-5p в процессе патогенетической терапии, ассоциирован с риском развития СР. Также, у пациентов с АП имеется положительная корреляция между уровнем экспрессии miR-338-3p и степенью тяжести АП: лёгкая степень (3.753–5.313), средняя степень (5.313–17.47), тяжёлая степень (>17.47). Таким образом, можно рассматривать miR-338-3p и miR-424-5p как перспективные биомаркеры для диагностики АП, а также как объективный инструмент оценки терапевтического ответа для своевременной модуляции терапевтических алгоритмов, что важно для контроля активного течения заболевания и предотвращения побочных эффектов системных ГКС [49].

## ВЫВОДЫ

1. У пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в активной стадии заболевания уровни экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p существенно повышены ( $\geq 3.753$  и  $\geq 4.367$  соответственно) ( $p < 0.0001$ ); чувствительность и специфичность метода составляет 94.59% и 92.00% для miR-338-3p, 94.59% и 90.00% для miR-424-5p соответственно. В среднем данные показатели в 2.58 (158.33%) раза выше по сравнению с уровнем экспрессии у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой в стадии ремиссии, условно здоровых субъектов, а также пациентов с иными буллезными дерматозами ( $p < 0.0001$ ).

2. На основании выявленной корреляции между уровнем экспрессии miR-338-3p с клинико-диагностическим индексом оценки тяжести аутоиммунной пузырчатки PDAI (Pemphigus Disease Area Index) разработана шкала классификации тяжести аутоиммунной пузырчатки: лёгкая степень (3.753–5.313) ( $p < 0.0001$ ), средняя степень (5.313–17.47) ( $p = 0.0004$ ), тяжёлая степень ( $>17.47$ ) ( $p = 0.0095$ ).

3. Снижение уровня miR-338-3p в 1.45 (30.9%) раза и более при оценке уровня относительной экспрессии через 21 день от начала проводимой терапии системными глюкокортикостероидами (преднизолон или другие глюкокортикостероидные препараты в соответствии с преднизолоновым эквивалентом) коррелирует с клиническим улучшением и положительным ответом на патогенетическую терапию ( $p < 0.0001$ ); оценка уровня экспрессии miR-424-5p не продемонстрировала подобной тенденции и не может использоваться для оценки динамики на проводимое лечение ( $p = 0.6705$ ).

4. Тенденция к возрастанию или стабильный уровень экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в процессе патогенетической терапии системными глюкокортикостероидами (преднизолон или другие глюкокортикостероидные препараты в соответствии с преднизолоновым эквивалентом) ассоциированы с риском развития стероидной резистентности.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При подозрении на диагноз «Аутоиммунная пузырчатка», а также при отсутствии иных доступным методов диагностики в качестве скринингового метода для выявления диагноза и дифференциальной диагностики рекомендуется использовать оценку относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p в мононуклеарных клетках периферической крови методом ПЦР-РВ. При превышении порога для miR-338-3p  $\geq 3.753$  и для miR-424-5p  $\geq 4.367$  прогнозируется высокий риск АП и рекомендовано проведение стандартных методов диагностики (ИФА, прямая и непрямая РИФ, гистологическое исследование) в качестве подтверждающих для постановки диагноза.

2. Повторная оценка уровней 338-3p и miR-424-5p в мононуклеарных клетках периферической крови рекомендована не ранее 21 дня от начала терапии системными глюкокортикостероидами для оценки эффективности проводимой терапии, при снижении уровня miR-338-3p от исходного в среднем в 1.45 (30.9%) и более можно прогнозировать положительный ответ на терапию; после достижения отчетливого терапевтического эффекта (прекращение появления новых пузырей, активная эпителизация эрозий) можно приступить ко второму этапу терапии больных пузырчаткой, который заключается в постепенном медленном, в течение нескольких месяцев снижении дозы преднизолона до 20–30 мг в сутки. В то же время, при стабильном или возрастающем уровне miR-338-3p в совокупности с тенденцией к возрастанию относительного уровня экспрессии miR-424-5p существует риск развития стероидной резистентности, рекомендована коррекция терапевтической тактики и присоединение адъювантной терапии (азатиоприн, метотрексат, циклоспорин, применение внутривенных иммуноглобулинов, плазмаферез).

3. При постановке ПЦР-РВ рекомендуется проводить оценку уровня экспрессии микроРНК в мононуклеарных клетках периферической крови путем ее

сравнения с экспрессией малой ядерной РНК U6, а также использовать для постановки реакции кДНК и синтезированные праймеры в разведении в 5 раз.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АП – аутоиммунная пузырчатка

ВП – вульгарная пузырчатка

ГКС – глюкокортикостероиды

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛП – листовидная пузырчатка

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота (РНК)

ОТ – обратная транскрипция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РИФ – реакция иммунофлюоресценции

СР – стероидная резистентность

ABSIS – Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score, бальная оценка тяжести аутоиммунных буллезных заболеваний кожи

AGO – белок Argonaute

ASK1 – апоптоз сигнал-регулирующая киназа 1

ATF6 – активирующий фактор транскрипции 6

CHOP – С/ЕВР-гомологичный белок

CREB – сАМР-респонсивный элемент-связывающий белок

Dicer – РНКаза III Dicer

DGCR8 – белок DiGeorge синдром-критический регион 8

Drosha – РНКаза III Drosha

Dsg – десмоглеин

Dsg1 – десмоглеин 1-го типа

Dsg3 – десмоглеин 3-го типа

DUSP – фосфатаза двойной специфичности

ELISA – иммуноферментный анализ

ER – эндоплазматический ретикулум  
FURIN – пропротеин-конвертаза фурин  
HSP27 – белок теплового шока 27  
IFN $\gamma$  – интерферон- $\gamma$   
IL – интерлейкин  
IRE1 – инозитол-реквизинг киназа 1  
MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа  
МКК6/7 – митоген-активируемая киназа 6/7  
МК2 – MAPK-активированная протеинкиназа 2  
miR – сокращение, используемое для обозначения конкретных зрелых микроРНК  
miRNA – микроРНК  
NF $\kappa$ B – ядерный фактор каппа-лайт-цепи-энхансера активированных В-клеток  
NPM1 – нуклеофосмин  
p38 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа p38  
PARN – поли-(А)-специфичная рибонуклеаза  
PDAI – Pemphigus Disease Area Index, индекс площади поражения при пузырчатке  
PERK – протеинкиназа R-подобная ER киназа  
PGA – Physician's Global Assessment, шкала общей оценки врача  
Pol II – РНК-полимераза II  
pre-miRNA – предшественник микроРНК  
pri-miRNA – первичные транскрипты микроРНК  
PVAS – Pemphigus Vulgaris Activity Score, индекс активности вульгарной пузырчатки  
RISC – РНК-индуцируемый комплекс выключения гена  
TCR – Т-клеточный рецептор  
Th – Т-хелперные клетки  
TRADD – белок домена смерти, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли типа 1  
TRBP – TAR-связывающий белок РНК  
Tr1 – регуляторные Т-клетки 1-го типа

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аутоиммунная пузырчатка: новые подходы к диагностике и оценке тяжести заболевания / Н. П. Теплюк, Ю. В. Колесова, Д. В. Мак [и др.] // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2023. – Т. 26, № 5. – С. 515–526. – DOI: 10.17816/dv492306.
2. Баулина, Н. М. МикроРНК: роль в развитии аутоиммунного воспаления / Н. М. Баулина, О. Г. Кулакова, О. О. Фаворова // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 23–36.
3. Биохимические аспекты стероидной резистентности при аутоиммунной пузырчатке / А. С. Духанин, Н. П. Теплюк, А. А. Лепехова, О. В. Земскова // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2014. – Т. 17, № 3. – С. 25–31. – DOI: 10.17816/dv36873.
4. Гареев, И. Ф. Циркулирующие микроРНК как биомаркеры: какие перспективы? / И. Ф. Гареев, О. А. Бейлерли // Профилактическая медицина. – 2018. – Т. 21, № 6. – С. 142–150. – DOI: 10.17116/profmed201821061142.
5. Давиденко, Е. Б. Триггерные факторы и аутоиммунная пузырчатка / Е. Б. Давиденко, Н. В. Махнева // Клиническая дерматология и венерология. – 2012. – Т. 10, № 6. – С. 16–23.
6. Диагностическая значимость и патогенетические аспекты исследования микроРНК при аутоиммунной пузырчатке / Н. П. Теплюк, Д. В. Мак, Т. А. Федотчева, Н. Л. Шимановский. — Текст: непосредственный // XVII Научно-практическая конференция дерматовенерологов и косметологов с международным участием «Санкт-Петербургские дерматологические чтения» : материалы конференции, Санкт-Петербург, 26 октября 2023 г. / под ред. А. В. Самцова, Е. В. Соколовского. — Санкт-Петербург : Издательство Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье», 2023. — С. 112 - 114.

7. Диагностическая значимость микроРНК miR-338-3p при аутоиммунной пузырчатке / Н. П. Теплюк, Д. В. Мак, Н. Л. Шимановский, Т. А. Федотчева. — Текст: непосредственный // Рахмановские чтения: XLI научно-практическая конференция с международным участием «От болезни к здоровой коже» : материалы конференции, Москва, 17 мая 2024 г. — Москва : Издательство Сеченовского Университета, 2024. — С. 19 - 22. — УДК 616.5(082). — ББК 55.83(94.3).

8. Диагностическая значимость оценки уровня экспрессии miR-338-3p у пациентов с аутоиммунной пузырчаткой / Н. П. Теплюк, Д. В. Мак, Д. Н. Ульченко, Т. А. Федотчева. — Текст: непосредственный // XVIII Научно-практическая конференция дерматовенерологов и косметологов «Санкт-Петербургские дерматологические чтения» : материалы конференции, Санкт-Петербург, 24–25 октября 2024 г. / под ред. А. В. Самцова, Е. В. Соколовского. — Санкт-Петербург : Издательство Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье», 2024. — С. 119 - 120.

9. Диагностическая значимость оценки уровня экспрессии микроРНК при аутоиммунной пузырчатке / Н. П. Теплюк, Н. Л. Шимановский, Т. А. Федотчева [и др.] // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2025. – Т. 28, № 2. – С. 200–211. – DOI: 10.17816/dv642566.

10. Запорожченко, И.А. МикроРНК плазмы крови в норме и при раке легкого: пробоподготовка, профилирование экспрессии, биоинформатический анализ и верификация потенциальных маркеров : специальность 03.01.03 «Молекулярная биология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Запорожченко Иван Андреевич ; ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук. - Новосибирск, 2018. - 171 с.

11. К вопросу о классификации буллезных дерматозов / С. Б. Ткаченко, Н. П. Теплюк, А. С. Алленова, А. А. Лепехова // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015. – Т. 18, № 2. – С. 11–14.

12. Клинические рекомендации. Пузырчатка / А. А. Кубанов, Н. В. Махнева, О. А. Притуло [и др.]. – Москва : Российское общество дерматовенерологов и косметологов, 2024. – 37 с.

13. Колесова, Ю.В. Особенности компонентов микробиома кожи у больных аутоиммунной пузырчаткой : специальность 3.1.23 «Дерматовенерология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Колесова Юлия Владимировна ; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2024. – 109 с.

14. Кубанов, А. А. Дифференциальная диагностика пузырных дерматозов / А. А. Кубанов, Л. Ф. Знаменская, Т. В. Абрамова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2016. – № 6. – С. 43–56. – DOI: 10.25208/0042-4609-2016-92-6-43-56

15. Кубанов, А. А. Применение клинико-диагностических индексов в оценке тяжести пузырчатки (сравнительный анализ) / А. А. Кубанов, Т. В. Абрамова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2016. – Т. 92, № 3. – С. 36–45. – DOI: 10.25208/0042-4609-2016-92-3-36-45.

16. Лепехова, А. А. Оценка эффективности комбинированной терапии плазмаферезом и человеческим иммуноглобулином больных стероидрезистентной формой пузырчатки на основании исследования цитокинового и хемокинового профиля / А. А. Лепехова // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2024. – Т. 27, № 6. – С. 673–686. – DOI: 10.17816/dv636920.

17. Махнева, Н. В. Аутоиммунная пузырчатка: от истоков развития до наших дней / Н. В. Махнева, Н. П. Теплюк, Л. В. Белецкая. – Москва : Изд. Решения, 2016. – 308 с. – ISBN 978-5-4483-2067-5. – Текст : непосредственный

18. Махнева, Н. В. О проблеме диагностики и дифференциальной диагностики аутоиммунной пузырчатки / Н. В. Махнева, Е. Б. Давиденко,

Л. В. Белецкая // Альманах клинической медицины. – 2014. – № 34. – С. 9–14. – DOI: 10.18786/2072-0505-2014-34-9-14.

19. Олисова, О. Ю. Иллюстрированное руководство по дерматологии для подготовки врачей к аккредитации / О. Ю. Олисова, Н. П. Теплюк. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. – 256 с. – ISBN 978-5-9704-7891-2. – Текст : непосредственный

20. Ошибка в диагностике вульгарной пузырчатки: клинический случай / И. В. Хамаганова, Е. Н. Маляренко, Е. В. Денисова [и др.] // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2017. – Т. 20, № 1. – С. 30–33. – DOI: 10.18821/1560-9588-2017-20-1-30-33.

21. Оценка уровня экспрессии miR-338-3p в диагностике аутоиммунной пузырчатки / Н. П. Теплюк, Д. В. Мак, Ю. В. Колесова [и др.] // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2024. – Т. 27, № 4. – С. 448–462. – DOI: 10.17816/dv633413.

22. Петрова, С. Ю. Трудности дифференциальной диагностики пузырных дерматозов. Эритематозная пузырчатка: случай из клинической практики / С. Ю. Петрова, В. М. Бержец, О. В. Радикова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2017. – № 4. – С. 31–36. – DOI: 10.14427/jipai.2017.4.31.

23. Поиск объекта для оценки влияния стероидных гормонов на уровень экспрессии микроРНК-155 / А. В. Голоунина, О. А. Земляная, М. Е. Успенская [и др.]. — Текст: непосредственный // VI Съезд фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций, новые люди — новые лекарства» : материалы съезда, Москва, 22 ноября 2023 г. — Москва : Издательство «Фолиум», 2023. — С. 41. — DOI: 10.30906/ekf-2023-86s-41.

24. Самцов, А. В. К вопросу о классификации пузырчатки / А. В. Самцов, Е. В. Соколовский, Н. П. Теплюк // Вестник дерматологии и венерологии. – 2021. – Т. 97, № 2. – С. 9–15. – DOI: 10.25208/vdv1216

25. Современные методы дифференциальной диагностики истинной (аутоиммунной) пузырчатки и буллезного пемфигоида / С. Б. Ткаченко,

Н. П. Теплюк, М. Т. Миннибаев [и др.] // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015. – Т. 18, № 3. – С. 17–22.

26. Теплюк, Н. П. Клинические аспекты стероидной резистентности при аутоиммунной пузырчатке / Н. П. Теплюк, А. А. Лепехова // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2014. – Т. 17, № 2. – С. 13–16.

27. Теплюк, Н. П. Современные подходы к комплексной терапии истинной акантолитической пузырчатки / Н. П. Теплюк, Д. А. Теплюк, Х. Х. Шарафетдинов // Клиническая дерматология и венерология. – 2011. – № 4. – С. 37–41.

28. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных пузырчаткой / Н. В. Махнева, Л. Ф. Знаменская, В. В. Чикин, А. А. Минаева. – Москва, 2015. – 24 с.

29. A cross-sectional study of direct immunofluorescence in the diagnosis of immunobullous dermatoses / A. C. Buch, H. Kumar, N. Panicker [et al.] // Indian J. Dermatol. – 2014. – Vol. 59, № 4. – P. 364–368. – DOI: 10.4103/0019-5154.135488.

30. Adcock, I. M. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance / I. M. Adcock, P. J. Barnes // Chest. – 2008. – Vol. 134, № 2. – P. 394–401. – DOI: 10.1378/chest.08-0440.

31. Advances in multiplexed techniques for the detection and quantification of microRNAs / T. Jet, G. Gines, Y. Rondelez, V. Taly // Chemical Society Reviews. – 2021. – Vol. 50, № 6. – P. 4141–4161. – DOI: 10.1039/d0cs00609b.

32. Alevizos, I. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases / I. Alevizos, G. G. Illei // Nature Reviews Rheumatology. – 2010. – Vol. 6, № 7. – P. 391–398. – DOI: 10.1038/nrrheum.2010.81.

33. Analysis of glucocorticoid receptor and microRNAs expression in pathological renal tissues / A. Angelousi, G. Liapis, M. Gazouli [et al.] // Molecular Medicine Reports. – 2023. – Vol. 28. – P. 169. – DOI: 10.3892/mmr.2023.13056.

34. An Updated Review of Pemphigus Diseases / A. M. Malik, S. Tupchong, S. Huang [et al.] // Medicina (Kaunas). – 2021. – Vol. 57, № 10. – P. 1080. – DOI: 10.3390/medicina57101080.

35. Apoptolysis: a less understood concept in the pathogenesis of Pemphigus Vulgaris / P. Ramani, R. Ravikumar, D. Pandiar [et al.] // *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Biology*. – 2022. – Vol. 27, № 5–6. – P. 322–328. – DOI: 10.1007/s10495-022-01726-z.
36. Ardekani, A. M. The Role of MicroRNAs in Human Diseases / A. M. Ardekani, M. M. Naeini // *Avicenna J. Med. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 2, № 4. – P. 161–179.
37. Assessing quality of life in patients with autoimmune bullous diseases using the Persian version of treatment of autoimmune bullous disease quality of life questionnaire finds similar effects in women as men / A. Behkar, G. Garmaroud, M. Nasimi [et al.] // *Int. J. Women's Dermatol.* – 2022. – Vol. 8, № 1. – P. e004. – DOI: 10.1097/JW9.0000000000000004.
38. Association of human leukocyte antigen class II alleles with pemphigus vulgaris in a Turkish population / M. Tunca, U. Musabak, R. I. Sagkan [et al.] // *J. Dermatol.* – 2010. – Vol. 37, № 3. – P. 246–250.
39. Attenuation of dexamethasone-induced cell death in multiple myeloma is mediated by miR-125b expression / M. Murray, S. A. Rushworth, L. Zaitseva [et al.] // *Cell Cycle*. – 2013. – Vol. 12, № 13. – P. 2144–2153. – DOI: 10.4161/cc.25251.
40. Autoimmune pemphigus: Latest advances and emerging therapies / Y. L. Lim, G. Bohelay, S. Hanakawa [et al.] // *Front. Molecular Biosci.* – 2022. – Vol. 8. – P. 808536. – DOI: 10.3389/fmolb.2021.808536.
41. Barnes, P. J. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases / P. J. Barnes, I. M. Adcock // *Lancet (London, England)*. – 2009. – Vol. 373, № 9678. – P. 1905–1917. – DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60326-3.
42. Bawazeer, A. Detection of miRNAs / A. Bawazeer, D. C. Prince // *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. – 2023. – Vol. 2630. – P. 1–11. – DOI: 10.1007/978-1-0716-2982-6\_1.
43. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of pemphigus vulgaris 2017 / K. E. Harman, D. Brown, L. S. Exton [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2017. – Vol. 177, № 5. – P. 1170–1201.

44. Bystryn, J. C. Pemphigus / J. C. Bystryn, J. L. Rudolph // *Lancet* (London, England). – 2005. – Vol. 366, № 9479. – P. 61–73. – DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66829-8.
45. Calculation of cut-off values based on the Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) and Pemphigus Disease Area Index (PDAI) pemphigus scoring systems for defining moderate, significant and extensive types of pemphigus / C. Boulard, S. Duvert Lehembre, C. Picard-Dahan [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2016. – Vol. 175, № 1. – P. 142–149.
46. Cannell, I. G. How do microRNAs regulate gene expression? / I. G. Cannell, Y. W. Kong, M. Bushell // *Biochemical Society Transactions.* – 2008. – Vol. 36, Pt 6. – P. 1224–1231. – DOI: 10.1042/BST0361224.
47. Case of pemphigus foliaceus misdiagnosed as a single condition of erythrodermic psoriasis and modified by brodalumab / M. Morishima-Koyano, Y. Nobeyama, M. Fukasawa-Momose [et al.] // *J. Dermatol.* – 2020. – Vol. 47, № 5. – P. e201–e202. – DOI: 10.1111/1346-8138.15295.
48. Chinese version of the treatment of autoimmune bullous disease quality of life questionnaire: Reliability and validity / G. Chen, B. Yang, Z. Zhang [et al.] // *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* – 2018. – Vol. 84, № 4. – P. 431–436. – DOI: 10.4103/ijdv1.IJDVL\_538\_16.
49. Cholera, M. Management of Pemphigus Vulgaris / M. Cholera, N. Chainani-Wu // *Advances in Therapy.* – 2016. – Vol. 33, № 6. – P. 910–958. – DOI: 10.1007/s12325-016-0343-4.
50. Clinical presentation and diagnostic delay in pemphigus vulgaris: A prospective study from Turkey / Ö. Daltaban, A. Özçentik, A. Karakaş [et al.] // *J. Oral Pathol. Med.* – 2020. – Vol. 49, № 7. – P. 681–686. – DOI: 10.1111/jop.13052.
51. Comprehensive overview of microRNA function in rheumatoid arthritis / X. Peng, Q. Wang, W. Li [et al.] // *Bone Res.* – 2023. – Vol. 11. – P. 8. – DOI: 10.1038/s41413-023-00244-1.

52. Comprehensive review on the pathophysiology, clinical variants and management of pemphigus (Review) / V. V. Costan, C. Popa, M. F. Hâncu [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2021. – Vol. 22, № 5. – P. 1335. – DOI: 10.3892/etm.2021.10770.

53. Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus / D. F. Murrell, S. Dick, A. R. Ahmed [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2008. – Vol. 58, № 6. – P. 1043–1046. – DOI: 10.1016/j.jaad.2008.01.012.

54. Crosstalk between Signaling Pathways in Pemphigus: A Role for Endoplasmic Reticulum Stress in p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation? / G. A. Cipolla, J. K. Park, R. M. Lavker, M. L. Petzl-Erler // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1022. – DOI: 10.3389/fimmu.2017.01022.

55. Dai, R. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases / R. Dai, S. A. Ahmed // *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* – 2011. – Vol. 157, № 4. – P. 163–179. – DOI: 10.1016/j.trsl.2011.01.007.

56. Davis, T. E. Glucocorticoids suppress T cell function by up-regulating microRNA-98 / T. E. Davis, K. Kis-Toth, A. Szanto, G. C. Tsokos // *Arthritis Rheum.* – 2013. – Vol. 65, № 7. – P. 1882–1890. – DOI: 10.1002/art.37966.

57. Delavarian, Z. Evaluation of desmoglein 1 and 3 autoantibodies in pemphigus vulgaris: Correlation with disease severity / Z. Delavarian, P. Layegh, A. Pakfetrat [et al.] // *J. Clin. Exp. Dentistry.* – 2020. – Vol. 12, № 5. – P. e440–e445. – DOI: 10.4317/jced.56289.

58. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens / A. I. Chernyavsky, J. Arredondo, Y. Kitajima [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 13804–13812. – DOI: 10.1074/jbc.M611365200.

59. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization / P. Berkowitz, P. Hu, Z. Liu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 25. – P. 23778–23784. – DOI: 10.1074/jbc.M501365200.

60. 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 / A. Belloni-Fortina, D. Faggion, B. Pigozzi [et al.] // *Clinical & Developmental Immunology*. – 2009. – Vol. 2009. – P. 187864. – DOI: 10.1155/2009/187864.

61. Development of a quality-of-life instrument for autoimmune bullous disease: The autoimmune bullous disease quality of life questionnaire / D. F. Sebaratnam, A. M. Hanna, S. N. Chee [et al.] // *JAMA Dermatol.* – 2013. – Vol. 149, № 10. – P. 1186–1191. – DOI: 10.1001/jamadermatol.2013.4972.

62. Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts / D. F. Murrell, S. Peña, P. Joly [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2020. – Vol. 82, № 3. – P. 575–585.e1. – DOI: 10.1016/j.jaad.2018.02.021.

63. Diagnostic delay in autoimmune oral diseases / M. Petruzzi, F. Vella, N. Squicciarini [et al.] // *Oral Diseases*. – 2022. – DOI: 10.1111/odi.14480.

64. Direct characterization of human T cells in pemphigus vulgaris reveals elevated autoantigen-specific Th2 activity in association with active disease / C. Rizzo, M. Fotino, Y. Zhang [et al.] // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2005. – Vol. 30, № 5. – P. 535–540. – DOI: 10.1111/j.1365-2230.2005.01836.x.

65. Dsg1 and Dsg3 composition of desmosomes across human epidermis and alterations in pemphigus vulgaris patient skin / T. Schmitt, J. Pircher, L. Steinert [et al.] // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 884241. – DOI: 10.3389/fimmu.2022.884241.

66. Dynamic and Modularized MicroRNA Regulation and Its Implication in Human Cancers / J. Shu, B. V. R. e. Silva, T. Gao [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 13356. – DOI: 10.1038/s41598-017-13470-5.

67. Dysregulation of microRNAs in autoimmune diseases: Pathogenesis, biomarkers and potential therapeutic targets / H. Long, X. Wang, Y. Chen [et al.] // *Cancer Letters*. – 2018. – Vol. 428. – P. 90–103. – DOI: 10.1016/j.canlet.2018.04.016.

68. Egu, D. T. Mechanisms causing acantholysis in pemphigus—lessons from human skin / D. T. Egu, T. Schmitt, J. Waschke // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 884067. – DOI: 10.3389/fimmu.2022.884067.
69. Endogenous c-Myc is essential for p53-induced apoptosis in response to DNA damage in vivo / T. Pheesse, K. Myant, A. Cole [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2014. – Vol. 21. – P. 956–966. – DOI: 10.1038/cdd.2014.15.
70. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets / X. Chen, C. Shi, M. He [et al.] // *Sig. Transduct. Target Ther.* – 2023. – Vol. 8. – P. 352. – DOI: 10.1038/s41392-023-01570-w.
71. Evaluation of anti-desmoglein-1 and anti-desmoglein-3 autoantibody titers in pemphigus patients at the time of the initial diagnosis and after clinical remission / I. Russo, F. P. De Siena, A. Saponeri, M. Alaibac // *Medicine.* – 2017. – Vol. 96, № 46. – P. e8801. – DOI: 10.1097/MD.00000000000008801.
72. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study / P. Mestdagh, N. Hartmann, L. Baeriswyl [et al.] // *Nature Methods.* – 2014. – Vol. 11, № 8. – P. 809–815. – DOI: 10.1038/nmeth.3014.
73. Evaluation of storage tubes for combined analysis of circulating nucleic acids in liquid biopsies / A. Ward Gahlawat, J. Lenhardt, T. Witte [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. 704. – DOI: 10.3390/ijms20030704.
74. Gaál, Z. Role of microRNAs in Immune Regulation with Translational and Clinical Applications / Z. Gaál // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25, № 3. – P. 1942. – DOI: 10.3390/ijms25031942.
75. Glavač, D. Essential role of microRNA in skin physiology and disease / D. Glavač, M. Ravnik-Glavač // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 888. – P. 307–330. – DOI: 10.1007/978-3-319-22671-2\_16.
76. Grando, S. A. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities / S. A. Grando // *Autoimmunity.* – 2012. – Vol. 45, № 1. – P. 7–35. – DOI: 10.3109/08916934.2011.606444.

77. Ha, M. Regulation of microRNA biogenesis / M. Ha, V. Kim // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 15. – P. 509–524. – DOI: 10.1038/nrm3838.
78. Harel-Raviv, M. Pemphigus vulgaris: The potential for error. A case report / M. Harel-Raviv, H. Srolovitz, M. Gornitsky // *Spec. Care Dentist.* – 1995. – Vol. 15, № 2. – P. 61–64. – DOI: 10.1111/j.1754-4505.1995.tb00478.x.
79. Human leukocyte antigen genotypes and antibody profiles associated with familial pemphigus in Japanese / T. Yamamoto, K. Ikeda, S. Sasaoka [et al.] // *J. Dermatol.* – 2011. – Vol. 38, № 7. – P. 711–716.
80. Identification of RNF114 as a novel positive regulatory protein for T cell activation / P. Yang, Y. Lu, M. Li [et al.] // *Immunobiology.* – 2014. – Vol. 219, № 6. – P. 432–439. – DOI: 10.1016/j.imbio.2014.02.002.
81. Identification of Six microRNAs as Potential Biomarkers for Pemphigus Vulgaris: From Diagnosis to Pathogenesis / W. He, Y. Xing, C. Li [et al.] // *Diagnostics (Basel).* – 2022. – Vol. 12, № 12. – P. 3058. – DOI: 10.3390/diagnostics12123058.
82. Incidence and Mortality of Pemphigus in France / L. Jelti, N. Cordel, A. Gillibert [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2019. – Vol. 139, № 2. – P. 469–473.
83. Incidence of pemphigus vulgaris exceeds that of pemphigus foliaceus in a region where pemphigus foliaceus is endemic: analysis of a 21-year historical series / G. A. Gonçalves, M. M. Brito, A. M. Salathiel [et al.] // *An. Bras. Dermatol.* – 2011. – Vol. 86, № 6. – P. 1109–1112. – DOI: 10.1590/s0365-05962011000600007.
84. Incidence, mortality, and causes of death of patients with pemphigus in Taiwan: a nationwide population-based study / Y.-H. Huang, C.-F. Kuo, Y.-H. Chen [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2012. – Vol. 132, № 1. – P. 92–97.
85. Increased expression of microRNA-338-3p contributes to production of Dsg3 antibody in pemphigus vulgaris patients / Q. Liu, F. Cui, M. Wang [et al.] // *Molecular Medicine Reports.* – 2018. – Vol. 18, № 1. – P. 550–556. – DOI: 10.3892/mmr.2018.8934.
86. Increased expression of miR-338-3p impairs Treg-mediated immunosuppression in pemphigus vulgaris by targeting RUNX1 / M. Xu, Q. Liu, S. Li

[et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2020. – Vol. 29, № 7. – P. 623–629. – DOI: 10.1111/exd.14111.

87. Increased miR-424-5p expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with pemphigus / M. Wang, L. Liang, L. Li [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2017. – Vol. 15, № 6. – P. 3479–3484. – DOI: 10.3892/mmr.2017.6422.

88. Involvement of T(H)1/T(H)2 cytokines in the pathogenesis of autoimmune skin disease-Pemphigus vulgaris / A. Satyam, S. Khandpur, V. K. Sharma, A. Sharma // *Immunological Investigations.* – 2009. – Vol. 38, № 6. – P. 498–509. – DOI: 10.1080/08820130902943097.

89. James, K. A. Diagnosis and clinical features of pemphigus foliaceus / K. A. James, D. A. Culton, L. A. Diaz // *Dermatol. Clin.* – 2011. – Vol. 29, № 3. – P. 405–viii. – DOI: 10.1016/j.det.2011.03.012.

90. Japanese guidelines for the management of pemphigus / M. Amagai, A. Tanikawa [et al.] // *J. Dermatol.* – 2014. – Vol. 41, № 6. – P. 471–486. – DOI: 10.1111/1346-8138.12486.

91. Joly, P. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis) / P. Joly, N. Litrowski // *Clin. Dermatol.* – 2011. – Vol. 29, № 4. – P. 432–436. – DOI: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.013.

92. Kapplingattu, S. V. MiRNAs as major players in brain health and disease: current knowledge and future perspectives / S. V. Kapplingattu, S. Bhattacharya, Y. K. Adlakha // *Cell Death Discov.* – 2025. – Vol. 11. – P. 7. – DOI: 10.1038/s41420-024-02283-x.

93. Keratinocyte Binding Assay Identifies Anti-Desmosomal Pemphigus Antibodies Where Other Tests Are Negative / F. Giurdanella, A. M. Nijenhuis, G. F. H. Diercks [et al.] // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 839. – DOI: 10.3389/fimmu.2018.00839.

94. Kneisel, A. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations / A. Kneisel, M. Hertl // *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* – 2011. – Vol. 9, № 10. – P. 844–857. – DOI: 10.1111/j.1610-0387.2011.07793.x.

95. Kozomara, A. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data / A. Kozomara, S. Griffiths-Jones // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. – P. D68–D73.
96. Kramer, M. F. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs / M. F. Kramer // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* – 2011. – Chapter 15. – P. Unit15.10. – DOI: 10.1002/0471142727.mb1510s95.
97. Kridin, K. Pemphigus group: Overview, epidemiology, mortality, and comorbidities / K. Kridin // *Immunol. Res.* – 2018. – Vol. 66, № 2. – P. 255–270. – DOI: 10.1007/s12026-018-8986-7.
98. Kridin, K. The Usefulness of Indirect Immunofluorescence in Pemphigus and the Natural History of Patients With Initial False-Positive Results: A Retrospective Cohort Study / K. Kridin, R. Bergman // *Front. Med. (Lausanne).* – 2018. – Vol. 5. – P. 266. – DOI: 10.3389/fmed.2018.00266.
99. Lee, A. Y. Understanding CD4+ T cells in autoimmune bullous diseases / A. Y. Lee, T. Kim, J. H. Kim // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1161927. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.1161927.
100. Lee, S. H. Analysis of serum cytokine profile in pemphigus / S. H. Lee, W. J. Hong, S. C. Kim // *Ann. Dermatol.* – 2017. – Vol. 29, № 4. – P. 438–445. – DOI: 10.5021/ad.2017.29.4.438.
101. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods.* – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 402–408. – DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
102. Luna Buitrago, D. Insights into Online microRNA Bioinformatics Tools / D. Luna Buitrago, R. C. Lovering, A. Caporali // *Non-coding RNA.* – 2023. – Vol. 9, № 2. – P. 18. – DOI: 10.3390/ncrna9020018.
103. Manocha, A. Histopathology of pemphigus vulgaris revisited / A. Manocha, R. Tirumalae // *Am. J. Dermatopathol.* – 2021. – Vol. 43, № 6. – P. 429–437. – DOI: 10.1097/DAD.0000000000001838.
104. Measurements Methods for the Development of MicroRNA-Based Tests for Cancer Diagnosis / F. Precazzini, S. Detassis, A. S. Imperatori [et al.] // *International*

Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, № 3. – P. 1176. – DOI: 10.3390/ijms22031176.

105. MicroRNA expression profiles classify human cancers / J. Lu, G. Getz, E. Miska [et al.] // *Nature* – 2005. – Vol. 435 (7043) – P. 834–838. – DOI: 10.1038/nature03702.

106. MicroRNA signature of human blood mononuclear cells / Q. Zhang, A. Cannavicci, S.-C. Dai, [et al.] // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2019. – Vol. 462(1-2) – P. 167–172 – DOI: 10.1007/s11010-019-03619-3.

107. MicroRNAs as biological regulators in skin disorders / G. Singhvi, P. Manchanda, V. Krishna Rapalli [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2018. – Vol. 108. – P. 996–1004. – DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09.090.

108. MiRNA implication in the pathogenesis and the outcome of Tunisian endemic pemphigus foliaceus / B. Khabou, R. Fakhfakh, S. Tahri [et al.] // *Experimental Dermatology*. – 2023. – Vol. 32, № 7. – P. 1132–1142. – DOI: 10.1111/exd.14821.

109. MicroRNAs in pemphigus and pemphigoid diseases / C. Papara, D. Zillikens, C. D. Sadik, A. Baican // *Autoimmun. Rev.* – 2021. – Vol. 20, № 7. – P. 102852. – DOI: 10.1016/j.autrev.2021.102852.

110. MiRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis / C. E. Condrat, D. C. Thompson, M. G. Barbu [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 2. – P. 276. – DOI: 10.3390/cells9020276.

111. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients / E. Schmidt, C. Dährnich, A. Rosemann [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2010. – Vol. 19, № 5. – P. 458–463. – DOI: 10.1111/j.1600-0625.2010.01069.x.

112. Opportunistic infections in patients with pemphigus / Y. A. Leshem, M. Gdalevich, M. Ziv [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2014. – Vol. 71, № 2. – P. 284–292. – DOI: 10.1016/j.jaad.2014.03.020.

113. Oral Mucosal Lesions - A Study of 369 Cases / V. R. Jain, R. S. Mahajan, S. S. Rathi [et al.] // *Indian Dermatology Online Journal*. – 2023. – Vol. 14, № 2. – P. 213–220. – DOI: 10.4103/idoj.idoj\_203\_22.

114. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation / J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed, C. Peng // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2018. – Vol. 9. – P. 402. – DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.

115. Pemphigus / M. Kasperkiewicz, C. T. Ellebrecht, H. Takahashi [et al.] // *Nat. Rev. Dis. Primers*. – 2017. – Vol. 3. – P. 17026. – DOI: 10.1038/nrdp.2017.26.

116. Pemphigus disease activity measurements: pemphigus disease area index, autoimmune bullous skin disorder intensity score, and pemphigus vulgaris activity score / Z. Rahbar, M. Daneshpazhooh, M. Mirshams-Shahshahani [et al.] // *JAMA Dermatology*. – 2014. – Vol. 150, № 3. – P. 266–272. – DOI: 10.1001/jamadermatol.2013.8175.

117. Pemphigus vegetans misdiagnosed as condylomata acuminata: A case report / A. H. Siadat, R. Moeine, F. Irajy [et al.] // *Clin. Case Rep*. – 2022. – Vol. 10, № 10. – P. e6393. – DOI: 10.1002/ccr3.6393.

118. Pemphigus vulgaris in oral cavity: clinical analysis of 71 cases / T. Shamim, V. I. Varghese, P. M. Shameena, S. Sudha // *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*. – 2008. – Vol. 13, № 10. – P. E622–E626.

119. Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches / R. Pollmann, T. Schmidt, R. Eming, M. Hertl // *Clin. Rev. Allergy Immunol*. – 2018. – Vol. 54, № 1. – P. 1–25. – DOI: 10.1007/s12016-017-8662-z.

120. Pemphigus: Current and future therapeutic strategies / D. Didona, R. Maglie, R. Eming, M. Hertl // *Front. Immunol*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1418. – DOI: 10.3389/fimmu.2019.01418.

121. Peng, Y. The role of MicroRNAs in human cancer / Y. Peng, C. Croce // *Sig. Transduct. Target Ther*. – 2016. – Vol. 1. – P. 15004. – DOI: 10.1038/sigtrans.2015.4.

122. Plasma Exosomal microRNA Profile Reveals miRNA 148a-3p Downregulation in the Mucosal-Dominant Variant of Pemphigus Vulgaris / A. Valentino, S. Leuci, U. Galderisi [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 14. – P. 11493. – DOI: 10.3390/ijms241411493.
123. Pozniak, T. Circulating microRNAs in Medicine / T. Pozniak, D. Shcharbin, M. Bryszewska // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 7. – P. 3996. – DOI: 10.3390/ijms23073996.
124. Preclaro, I. A. Spongiotic pattern in pemphigus: A retrospective observational single-center study / I. A. Preclaro, Y. H. Wu // *Dermatopathol. (Basel)*. – 2022. – Vol. 9, № 2. – P. 172–182. – DOI: 10.3390/dermatopathology9020022.
125. Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany / F. Hübner, A. Recke, D. Zillikens [et al.] // *The Journal of Investigative Dermatology*. – 2016. – Vol. 136, № 12. – P. 2495–2498. – DOI: 10.1016/j.jid.2016.07.013.
126. Pritchard, C. C. MicroRNA profiling: approaches and considerations / C. C. Pritchard, H. H. Cheng, M. Tewari // *Nature Reviews Genetics*. – 2012. – Vol. 13, № 5. – P. 358–369. – DOI: 10.1038/nrg3198.
127. Prognostic and predictive value of a microRNA signature in stage II colon cancer: a microRNA expression analysis / J. X. Zhang, W. Song, Z. H. Chen [et al.] // *The Lancet Oncology*. – 2013. – Vol. 14, № 13. – P. 1295–1306. – DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70491-1.
128. Prognostic factors in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus / M. Saha, B. Bhogal, M. M. Black [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2014. – Vol. 170, № 1. – P. 116–122. – DOI: 10.1111/bjd.12630.
129. Prognostic miRNA classifier in early-stage mycosis fungoides: development and validation in a Danish nationwide study / L. M. Lindahl, S. Besenbacher, A. H. Rittig [et al.] // *Blood*. – 2018. – Vol. 131, № 7. – P. 759–770. – DOI: 10.1182/blood-2017-06-788950.
130. Prospective study of ocular manifestations of pemphigus and bullous pemphigoid identifies a high prevalence of dry eye syndrome / J. C. Tan, L. T. Tat, K.

B. Francis [et al.] // *Cornea*. – 2015. – Vol. 34, № 4. – P. 443–448. – DOI: 10.1097/ICO.0000000000000335.

131. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs / E. Varkonyi-Gasic, R. Wu, M. Wood [et al.] // *Plant Methods*. – 2007. – Vol. 3. – P. 12. – DOI: 10.1186/1746-4811-3-12.

132. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR / C. Chen, D. A. Ridzon, A. J. Broomer [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33, № 20. – P. e179. – DOI: 10.1093/nar/gni178.

133. Recent advances in microRNA detection / Y. Zhao, L. Dong, J. Zhang [et al.] // *The Analyst*. – 2018. – Vol. 143, № 8. – P. 1758–1774. – DOI: 10.1039/C7AN02001E.

134. Research advances in the detection of miRNA / J. Ye, M. Xu, X. Tian [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2019. – Vol. 9, № 4. – P. 217–226. – DOI: 10.1016/j.jpha.2019.05.004.

135. Role of miRNAs on the Pathophysiology of Cardiovascular Diseases / D. C. P. D. Silva, F. D. Carneiro, K. C. Almeida, C. Fernandes-Santos // *Arq. Bras. Cardiol.* – 2018. – Vol. 111. – P. 738–746. – DOI: 10.5935/abc.20180215.

136. Ruksha, T. G. MicroRNA in skin diseases / T. G. Ruksha, A. V. Komina, N. V. Palkina // *Eur. J. Dermatol.* – 2017. – Vol. 27, № 4. – P. 343–352. – DOI: 10.1684/ejd.2017.3024.

137. S2k guideline for the diagnosis of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid / E. Schmidt, M. Goebeler, M. Hertl [et al.] // *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* – 2015. – Vol. 13, № 7. – P. 713–727. – DOI: 10.1111/ddg.12612.

138. Saleh, M. A. Do normal Egyptians possess anti-desmoglein 3 antibodies? / M. A. Saleh, M. M. El-Bahy // *International Journal of Dermatology*. – 2015. – Vol. 54, № 10. – P. 1145–1149. – DOI: 10.1111/ijd.12662.

139. Schmidt, E. Epidemiology of Autoimmune Bullous Diseases / E. Schmidt, L. Borradori, P. Joly // *Blistering Diseases: Clinical Features, Pathogenesis, Treatment* / под ред. D. Murrell. – Berlin ; Heidelberg : Springer, 2015. – P. 251–263.

140. Schmidt, E. Pemphigus / E. Schmidt, M. Kasperkiewicz, P. Joly // *Lancet*. – 2019. – Vol. 394, № 10201. – P. 882–894. – DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31778-7.
141. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication / X. Chen, H. Liang, J. Zhang, K. Zen, C. Y. Zhang // *Trends in Cell Biology*. – 2012. – Vol. 22, № 3. – P. 125–132. – DOI: 10.1016/j.tcb.2011.12.001.
142. Serological diagnosis of autoimmune bullous skin diseases / S. Saschenbrecker, I. Karl, L. Komorowski [et al.] // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1974. – DOI: 10.3389/fimmu.2019.01974.
143. Signalling pathways in pemphigus vulgaris / X. Li, N. Ishii, C. Ohata [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2014. – Vol. 23, № 3. – P. 155–156. – DOI: 10.1111/exd.12317.
144. Slack, F. J. The Role of Non-coding RNAs in Oncology / F. J. Slack, A. M. Chinnaiyan // *Cell*. – 2019. – Vol. 179, № 5. – P. 1033–1055. – DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.017.
145. Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases / M. Weiland, X. H. Gao, L. Zhou, Q. S. Mi // *RNA Biology*. – 2012. – Vol. 9, № 6. – P. 850–859. – DOI: 10.4161/rna.20378.
146. Smith, L. K. Glucocorticoids modulate microRNA expression and processing during lymphocyte apoptosis / L. K. Smith, R. R. Shah, J. A. Cidlowski // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285, № 47. – P. 36698–36708. – DOI: 10.1074/jbc.M110.162123.
147. Stability of circulating exosomal miRNAs in healthy subjects / D. Sanz-Rubio, I. Martin-Burriel, A. Gil [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 10306. – DOI: 10.1038/s41598-018-28748-5.
148. The emerging role of T cells in pemphigus vulgaris: a systematic review / F. Araghi, S. Dadkhahfar, R. M. Robati [et al.] // *Clinical and Experimental Medicine*. – 2023. – Vol. 23, № 4. – P. 1045–1054. – DOI: 10.1007/s10238-022-00855-8.
149. The Essential Role of microRNAs in Inflammatory and Autoimmune Skin Diseases—A Review / K. Dopytalska, A. Czaplicka, E. Szymańska, I. Walecka // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 11. – P. 9130. – DOI: 10.3390/ijms24119130.

150. The RING ubiquitin E3 RNF114 interacts with A20 and modulates NF- $\kappa$ B activity and T-cell activation / M. S. Rodriguez, I. Egaña, F. Lopitz-Otsoa [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2014. – Vol. 5, № 8. – P. e1399. – DOI: 10.1038/cddis.2014.366.

151. The role of microRNAs in glucocorticoid action / S. A. Clayton, S. W. Jones, M. Kurowska-Stolarska, A. R. Clark // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – Vol. 293, № 6. – P. 1865–1874. – DOI: 10.1074/jbc.R117.000366.

152. The role of microRNAs in neurobiology and pathophysiology of the hippocampus / S. K. Rashidi, A. Kalirad, S. Rafie [et al.] // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2023. – Vol. 16. – P. 1226413. – DOI: 10.3389/fnmol.2023.1226413.

153. The role of miRNAs in T helper cell development, activation, fate decisions and tumor immunity / S. J. Xu, J. H. Chen, S. Chang, H. L. Li // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 14. – P. 1320305. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.1320305.

154. Toward reliable biomarker signatures in the age of liquid biopsies - how to standardize the small RNA-Seq workflow / D. Buschmann, A. Haberberger, B. Kirchner [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44, № 13. – P. 5995–6018. – DOI: 10.1093/nar/gkw545.

155. Treiber, T. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways / T. Treiber, N. Treiber, G. Meister // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 5–20. – DOI: 10.1038/s41580-018-0059-1.

156. Usefulness of miRNA-338-3p in the diagnosis of pemphigus and its correlation with disease severity / N. Lin, Q. Liu, M. Wang [et al.] // *PeerJ*. – 2018. – Vol. 6. – P. e5388. – DOI: 10.7717/peerj.5388.

157. Usefulness of specific anti-desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunoassay and indirect immunofluorescence in the evaluation of pemphigus activity / M. A. Barnadas, M. V. Rubiales, I. Gich, C. Gelpí // *International Journal of Dermatology*. – 2015. – Vol. 54, № 11. – P. 1261–1268. – DOI: 10.1111/ijd.12768.

158. Validation of the BIOCHIP test for the diagnosis of bullous pemphigoid, pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus / A. Yang, R. Xuan, W. Melbourne [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*. – 2020. – Vol. 34, № 1. – P. 153–160. – DOI: 10.1111/jdv.15770.

159. Wang, Z. Epigenetic Alterations in Cellular Immunity: New Insights into Autoimmune Diseases / Z. Wang, Q. Lu, Z. Wang // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2017. – Vol. 41, № 2. – P. 645–660. – DOI: 10.1159/000457944.

160. Worldwide epidemiologic factors in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid / M. Rosi-Schumacher, J. Baker, J. Waris [et al.] // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1159351. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.1159351.

161. Xuan, R. R. New biochip immunofluorescence test for the serological diagnosis of pemphigus vulgaris and foliaceus: A review of the literature / R. R. Xuan, A. Yang, D. F. Murrell // *International Journal of Women's Dermatology*. – 2018. – Vol. 4, № 2. – P. 102–108. – DOI: 10.1016/j.ijwd.2017.10.001.

162. Zhang, Y. Progress in microRNA delivery / Y. Zhang, Z. Wang, R. A. Gemeinhart // *J. Control Release*. – 2013. – Vol. 172, № 3. – P. 962–974. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.09.015.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

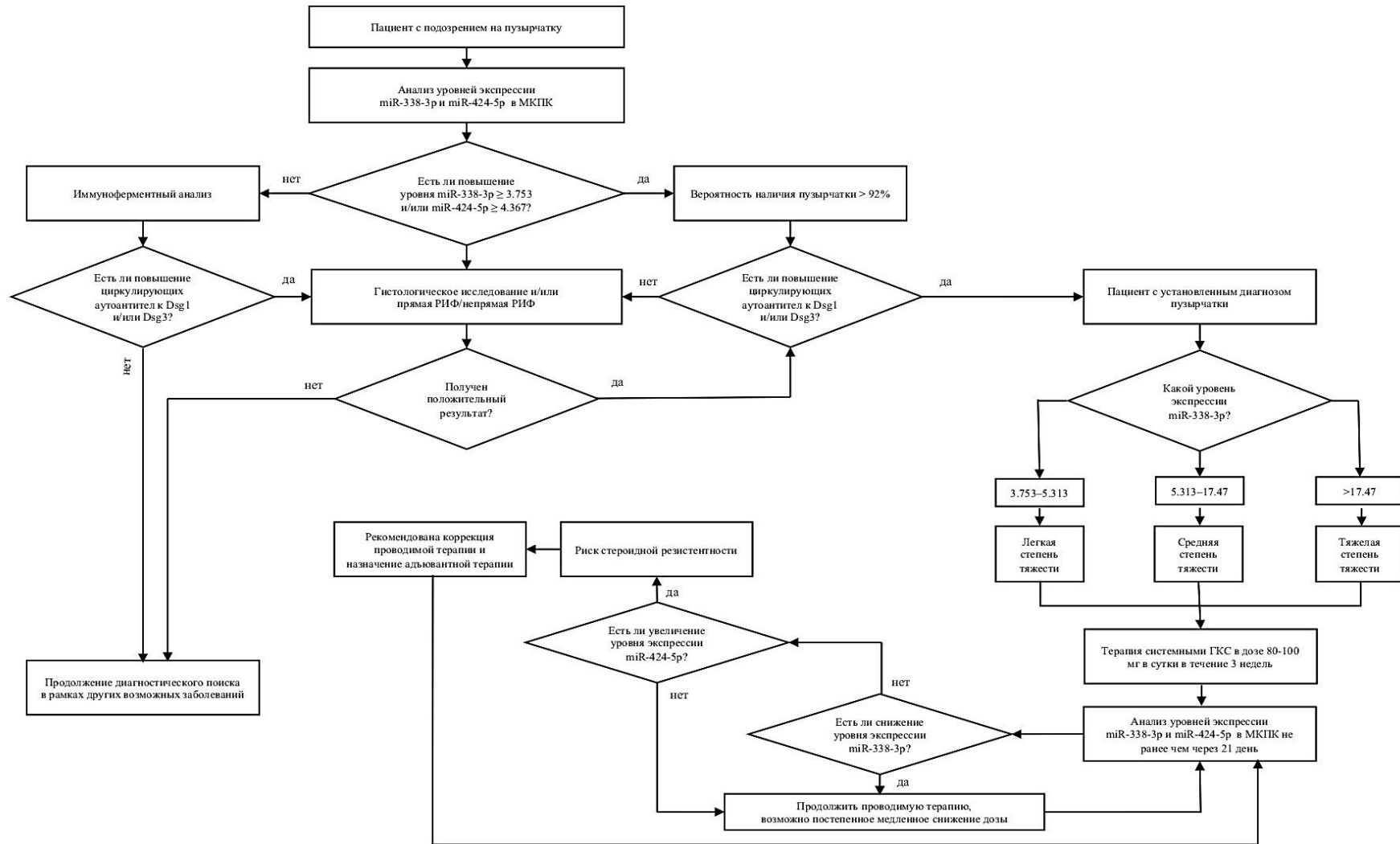


Рисунок А.1 – Алгоритм ведения пациентов на основе оценки относительного уровня экспрессии miR-338-3p и miR-424-5p.