

Методы выявления терапевтических мишеней при истинной акантолитической пузырчатке

А.В. Миченко, Л.Ф. Знаменская, А.Н. Львов, С.В. Ротанов, И.А. Волков, О.Р. Катунина

Methods for revealing therapeutic targets in case of true acantholytic pemphigus

A.V. MICHENKO, L.F. ZNAMENSKAYA, A.N. LVOV, S.V. ROTANOV, I.A. VOLKOV, O.R. KATUNINA

об авторах:

А.В. Миченко — старший научный сотрудник отдела дерматологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Л.Ф. Знаменская — к.м.н., заведующая отделом дерматологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

А.Н. Львов — д.м.н., профессор, заместитель директора по научно-клинической работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

С.В. Ротанов — д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

И.А. Волков — к.м.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

О.Р. Катунина — к.м.н., заведующая патоморфологической лабораторией Лабораторного центра ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Представлен обзор современных подходов к изучению патогенеза истинной акантолитической пузырчатки, потенциально позволяющих выявлять новые мишени для терапевтического воздействия. Обсуждаются методы, применяющиеся впервые при изучении данного летального дерматоза, а также развитие ранее применявшихся методов, сохраняющих свою актуальность при изучении истинной акантолитической пузырчатки.

Ключевые слова: **истинная акантолитическая пузырчатка, аутоантигены, акантолиз, аутоантитела, патогенез, модели заболевания.**

The authors present a review of current approaches to studying the pathogenesis of true acantholytic pemphigus that may reveal new targets for therapeutic treatment. They discuss methods used for the first time to study this lethal dermatosis, and the development of previously used methods that are still important for studying true acantholytic pemphigus.

Key words: **true acantholytic pemphigus, autoimmune antigens, acantholysis, autoantibodies, pathogenesis, disease models.**

■ Истинная акантолитическая пузырчатка (ИАП) — группа аутоиммунных буллезных заболеваний кожи и/или слизистых оболочек, неотъемлемым, но не патогномичным признаком которых является акантолиз, обусловленный формированием антител к компонентам межклеточной склеивающей субстанции эпидермиса. Несмотря на очень низкий показатель заболеваемости (от 0,08 до 1,6 на 100 000 населения в год), заболевание приводит к смерти больного в течение года в 4,8—54% случаев. Несмотря на существенный прогресс, достигнутый в лече-

нии ИАП в течение последних десятилетий, у ряда больных отмечается резистентность к традиционной иммуносупрессивной терапии, а длительный прием этих препаратов сопряжен с развитием тяжелых осложнений, приводящих к смерти пациентов. В связи с вышесказанным актуальным является поиск новых молекулярно-биологических мишеней для создания лекарственных средств, позволяющих снизить суммарную дозу кортикостероидов либо отказаться от их назначения. Удовлетворить эту потребность клинической дерматологии могут фундаментальные ис-

следования, направленные на изучение патогенеза ИАП, в том числе с применением новых лабораторных методов. С этой целью приведен обзор наиболее перспективных направлений и методов исследования патогенеза ИАП, потенциально способных выявить новые мишени для терапевтического воздействия.

Изучение аутоантигенов при пузырчатке

После обнаружения IgG-аутоантител у больных вульгарной [1] и листовидной [2] пузырчаткой проводились многочисленные исследования по выявлению антигенов, служащих мишенью для пемфигусных антител [3]. Для этих целей использовали сыворотку крови больных, выделенную фракцию иммуноглобулинов класса G и **методом иммунопреципитации и иммуноблоттинга** оценивали их способность связываться с протеинами эпидермиса или культуры кератиноцитов, а также с мочой и слюной. Отдельные аутоантигены позволили выявить методы, обладающие низкой чувствительностью, в частности, флюорография с метаболически мечеными белками кератиноцитов, предварительно адсорбированными сывороткой крови человека [4]. Однако более чувствительный, хотя и менее специфичный метод иммуноблоттинга позволил выявить десятки белков кератиноцитов, к которым образуются аутоантитела при пузырчатке [5]. В свою очередь, при помощи более чувствительного метода иммунопреципитации были определены антигены, как общие для вульгарной и листовидной пузырчатки, так и уникальные для каждого заболевания.

В экспериментах с применением метода **радиоиммунопреципитации** была выявлена преципитация аутоантител ацетилхолиновыми рецепторами кератиноцитов [6], что положило начало изучению роли никотиновых и мускариновых рецепторов в патогенезе пузырчатки. В настоящее время известно, что оба типа рецепторов синергично регулируют адгезию клеток: при их блокировании наблюдается дезорганизация десмосом в результате фосфорилирования кадгеринов десмосом, в то время как применение холинергических агонистов предотвращает разрушение связи между клетками благодаря активации протеиновых фосфатаз и стимуляции экспрессии генов кадгеринов.

Связывание пемфигусных антител с $\alpha 9$ -субъединицей ацетилхолиновых рецепторов подтверждалось также в экспериментах с **блокированием иммунофлюоресценции**, когда предварительная обработка препаратов пищевода обезьян сывороткой больных предотвращала иммунофлюоресценцию после нанесения кроличьих антител к $\alpha 9$ -субъединице ацетилхолиновых рецепторов [7].

Применение **протеомных технологий** позволило выявить связывание пемфигусных антител с $\alpha 10$ -субъединицей ацетилхолиновых рецепторов, которая

может быть частью пентамерного $\alpha 9\alpha 10$ никотинового ацетилхолинового рецептора [5]. В протеомных исследованиях также обнаружили связывание аутоантител при пузырчатке с M1, M2, M4 и M5 подтипами мускариновых ацетилхолиновых рецепторов [8, 9]. Кроме того, антитела, элюированные из полосы с молекулярной массой 75 кД, фиксирующиеся в межклеточных пространствах эпидермиса и вызывающие акантолиз в монослое кератиноцитов, были подвергнуты тестированию с использованием библиотеки белков кератиноцитов, в результате чего был выявлен новый тип ацетилхолиновых рецепторов, названный пемфаксином [10].

Совсем недавно было описано выявление аутоантител к пилосебоцейным комплексам и к окружающим их сосудам и нервным волокнам у больных эндемической листовидной пузырчаткой [11].

Таким образом, в настоящее время благодаря применению широкого спектра методов было описано более пятидесяти аутоантигенов, к которым формируются аутоантитела при пузырчатке [5], что согласуется с гипотезой «множественного удара» [12].

Изучение аутоантител при пузырчатке

Поскольку развитие фармацевтической индустрии позволяет рассматривать антитела как мишень для терапевтического воздействия и создавать препараты, прицельно воздействующие на иммуноглобулины [13], патогенные аутоантитела при ИАП могли бы стать мишенью для терапевтического воздействия, в связи с чем их изучение представляет особый интерес.

Для выделения патогенных аутоантител с целью их дальнейшего изучения использовались различные технологии. Первые попытки синтеза патогенных аутоантител связаны с использованием **мышинных и человеческих гетерогридом**, синтезирующих патогенные и непатогенные пемфигусные антитела [14—16]. Однако эта техника оказалась несовершенной с точки зрения определения спектра аутоантител, поскольку клеточные линии часто со временем теряли человеческие хромосомы [17]. Также предпринимались попытки синтезировать патогенные антитела к десмоглеину на **модели пузырчатки у мышей, провоцируемой путем их активной иммунизации**, при которой спленоциты мышей, не имеющих десмоглеин-3, пассивно переносились RAG-2-дефицитным мышам, экспрессирующим десмоглеин-3, что приводило к синтезу патогенных и непатогенных антител [18]. Хотя некоторые мышинные антитела обладали патогенными свойствами в отношении человеческого десмоглеина-3, их нельзя использовать для разработки направленных методов лечения, поскольку они являются мышинными аллоантителами к мышинным десмоглеинам и неизвестно, насколько результаты исследования этих антител применимы к человеческим аутоантителам к десмоглеину у больных пузырчаткой.

В последние годы в исследованиях патогенных аутоантител при пузырчатке нашел применение **метод фагового дисплея**, позволяющий характеризовать их патогенные свойства и генетические особенности.

В 2009 г. J. Stanley и соавт. методом полимеразной цепной реакции клонировали вариабельную область тяжелой и легкой цепи периферических В-клеток и ввели их в вектор, входящий в состав фаговой частицы. В результате авторы получили фаговые частицы, содержащие кДНК, кодирующую патогенные аутоантитела, экспрессирующиеся на поверхности этих частиц. Библиотека фагов, полученных от больных вульгарной и листовидной пузырчаткой, для выделения клонов была отсортирована на панели, содержащей десмоглеины 1-го и 3-го типов. Последовательность кДНК каждого клона была секвенирована. Патогенные свойства моноклональных антител каждого полученного уникального клона оценивали либо путем введения в культуру кожи здорового человека, либо с использованием модели новорожденных мышей. В результате была выявлена выраженная рестрикция генов тяжелой цепи аутоантител, связывающих десмоглеин у больных и вульгарной, и листовидной пузырчаткой. Полученные моноклональные антитела предлагается использовать для скрининга пептидных библиотек с целью поиска белков, блокирующих связывание аутоантител с аутоантигенами [19].

Изучение механизмов потери связи между кератиноцитами при пузырчатке

В настоящее время известно, что в процессе нарушения межклеточных связей при пузырчатке участвует ряд механизмов, включающих активацию клеточных цитотоксических реакций, протеолитических ферментов, синтез провоспалительных и проапоптотических цитокинов, однако наиболее обоснованным представляется действие пемфигусных аутоантител.

В последние годы в ряде исследований был подтвержден факт активации внутриклеточных сигнальных путей при присоединении пемфигусных аутоантител к поверхности кератиноцита. Также было показано, что активация внутриклеточных сигнальных путей необходима для развития акантолиза. Так, в **экспериментах с пассивным переносом пемфигусных IgG новорожденным мышам и использованием химических ингибиторов** удалось подтвердить активацию ряда сигнальных эффекторов, способствующую развитию симптомов пузырчатки, в том числе рецептора эпидермального фактора роста, Muc, p38, PLC/PKC и Src [20—24]. Следует отметить, что основным методом исследования сигнальных путей является **иммуногистохимическое окрашивание препаратов кожи** с последующим микроскопическим исследованием. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что

подавление специфических сигнальных путей может стать новым перспективным направлением лечения истинной акантолитической пузырчатки [25].

Это предположение нашло поддержку в недавно проведенном исследовании киназы фокальной адгезии (КФА) — растворимой нерецепторной тирозинкиназы, экспрессирующейся почти всеми тканями и типами клеток и участвующей в ремоделировании цитоскелета, а также в образовании и дезорганизации структур, обеспечивающих адгезию клеток [26]. В эпидермисе и волосяных фолликулах мышей КФА локализуется преимущественно в области мембраны клеток. На модели пузырчатки у мышей M. Gil и соавт. (2012) продемонстрировали, что введение пемфигусных IgG приводит к повышению фосфорилирования КФА в области 397 и 925 тирозиновых остатков в базальном слое эпидермиса. При предварительном введении мышам ингибитора КФА акантолиз в базальном слое эпидермиса отсутствовал. Более того, наблюдалось уменьшение фосфорилирования КФА (Y397/925) при введении ингибиторов изоформ рецептора эпидермального фактора роста, Src, mTOR и пан-каспаз перед введением пемфигусных IgG. Кроме того, предварительное введение мышам ингибитора КФА перед инъекцией пемфигусных IgG предотвращало изменение экспрессии Bax и Bcl-2, также как и повышение активности каспазы-9 и -3, индуцируемой пемфигусными IgG. Наконец ингибиторы КФА уменьшали экспрессию фосфорилированных Src и mTOR в базальном слое эпидермиса. Таким образом, подтверждено участие фосфорилированной КФА (Y397/925) в развитии пузырчатки с вовлечением изоформ рецептора эпидермального фактора роста, Src и mTOR, что делает КФА потенциальной мишенью для терапевтического вмешательства при пузырчатке [27]. Результаты проведенного исследования согласуются с недавно предложенной С.А. Грандо концепцией апоптолиза как механизма потери связи клетками эпидермиса при пемфигусе, объединяющего активацию сигнальных путей пемфигусными антителами и активацию апоптотических сигнальных путей [5].

Кроме того, следует отметить недавно проведенное исследование по **валидации новой модели акантолитической пузырчатки у мышей**, получаемой путем пассивного переноса антител от больных пемфигусом взрослым 8-недельным мышам [28]. Данная модель была создана прицельно для изучения сигнальных путей при пемфигусе на модели заболевания у мышей, и ее преимуществом является заверченный морфогенез структур кожи в отличие от новорожденных мышей, позволяющий получать сопоставимые ультраструктурные, биохимические характеристики и параметры передачи сигналов внутри клеток с такими же в культуре кожи больных пузырчаткой. Данная модель может использоваться для изучения переда-

чи сигналов внутри клеток с участием десмоглеина-3, а также для изучения новых лекарственных средств.

Изучение иммунорегуляторных механизмов при пузырчатке

Для изучения клеточных механизмов регуляции аутоиммунных реакций у больных пузырчаткой проводятся как сравнительные исследования свойств иммунных клеток у больных пузырчаткой и здоровых добровольцев, так и исследования с применением различных моделей заболевания у мышей.

В настоящее время известно, что потеря толерантности к собственным антигенам (десмоглеину-3) одновременно В- и Т-лимфоцитами является необходимым условием для индукции достаточного образования IgG к десмоглеину-3 [29]. Однако механизмы потери толерантности к аутоантигенам в настоящее время изучены недостаточно. Несмотря на то что цитотоксические Т-клетки, сенсibilизированные в отношении антигенов кератиноцитов, выявляются у больных пузырчаткой [30], сенсibilизированные к десмоглеину-3 Т-хелперы (Th) 1-го и 2-го типов, а также В-клетки обнаруживаются и у здоровых добровольцев, что подтверждается образованием аутореактивных антител к десмоглеину-3 у здоровых родственников больных пузырчаткой [31, 32]. При этом у здоровых носителей аллелей HLA II класса, ассоциированных с развитием пузырчатки, отмечается преобладание Th1, сенсibilизированных к десмоглеину-3, а у больных пузырчаткой — Th2, сенсibilизированных к десмоглеину-3 [33]. Аналогично, Th1 и Th2, сенсibilизированные к десмоглеину-1, обнаруживаются у больных пузырчаткой и здоровых добровольцев [34]. Поэтому предполагается, что в реализации аутоиммунных реакций при пузырчатке, как и при ряде других дерматозов, одну из ключевых ролей играют супрессорные (регуляторные) лимфоциты (Treg), по-видимому, активно подавляющие аутоиммунные реакции у носителей аутореактивных Т-лимфоцитов. Возможно, что основным этапом инициации акантолитической пузырчатки является дисбаланс между аутореактивными Th и Treg [35]. Это предположение подтверждается обнаружением снижения уровня Treg в крови больных пузырчаткой [36]. Однако присутствие Treg в очагах поражения у больных акантолитической пузырчаткой может свидетельствовать о перераспределении этих клеток с накоплением их в коже и регионарных лимфатических узлах [37]. Для уточнения роли каждой из клеток в патогенезе ИАП необходимы дальнейшие исследования взаимодействия Treg, Th1, Th2 и Th17.

Для понимания механизмов взаимодействия регуляторных и эффекторных клеток иммунной системы и механизмов индукции синтеза аутоантител большое значение имеют экспериментальные исследования по созданию моделей ИАП у лабораторных животных.

Впервые модель акантолитической пузырчатки у мышей была предложена в 1982 г. G. Anhalt и соавт. [38], наблюдавшими формирование пузырей и эрозий у новорожденных лабораторных мышей инбредной линии BALB/c после пассивного переноса антител от больных вульгарной пузырчаткой. При этом гистологические, ультраструктурные признаки и результаты иммунофлюоресцентного окрашивания препаратов кожи мышей полностью повторяли таковые у больных ИАП, а титры циркулирующих антител коррелировали со степенью тяжести клинической картины. Такую модель называют **моделью «пассивного» заболевания**, поскольку ее развитие у мышей связано с пассивным переносом антител. Эти эксперименты позволили определить ключевую роль IgG в патогенезе пузырчатки, однако в настоящее время для изучения клеточных механизмов ведутся работы по созданию **модели «активного» заболевания**, т. е. индукции пемфигуса у мышей без переноса антител больных пузырчаткой.

Поскольку непосредственная иммунизация мышей рекомбинантным десмоглеином-3 не приводит к развитию акантолиза в коже, несмотря на явный синтез антител [39—41], исследователи использовали различные подходы для развития аутоиммунной реакции с формированием развернутой клинической картины пузырчатки. Так, была получена модель активного заболевания у мышей после трансплантации Rag2^{-/-} иммунодефицитным мышам, экспрессирующим десмоглеин-3, клеток селезенки, продуцирующих антитела к десмоглеину-3, от иммунизированных рекомбинантным десмоглеином нокаутных Dsg3^{-/-} мышей [42] либо от наивных Dsg3^{-/-} мышей [43]. Почти у 20% этих мышей отмечалось развитие акантолиза и эрозий на слизистой оболочке полости рта. Несмотря на то что процесс потери связи между кератиноцитами в коже мышей и в коже больных различается, эта модель пузырчатки может использоваться для изучения регуляции адаптивного иммунного ответа на десмоглеин-3.

Также была создана **модель трансгенных мышей** (Dsg3H1-TCR Tg), у которых рецепторы Т-клеток приобрели способность распознавать определенные пептидные участки десмоглеина. Для этого Dsg3H1-TCR Tg мышь скрестили с иммунодефицитной (Rag2^{-/-}) мышью для получения мыши, у которой все Т-клетки были бы специфичны в отношении десмоглеина. Клетки костного мозга этой мыши перенесли нокаутной мыши (Dsg3^{-/-}), не экспрессирующей десмоглеин, после чего трансгенные Т-клетки, специфичные в отношении десмоглеина-3, выявлялись в периферических лимфоидных органах. Следует отметить, что пришлось прибегнуть к этой сложной схеме создания модели заболевания, поскольку при перенесении данных клеток дикому типу мышей клетки разрушались в тимусе и не выявлялись в периферических лимфо-

идных органах. Эта модель позволяет изучать механизмы центральной и периферической толерантности к физиологическим эпидермальным аутоантигенам и патогенез аутоиммунных реакций [44].

Таким образом, в настоящее время применяются новые методы исследования патогенеза ИАП, созда-

ются более совершенные модели заболевания, позволяющие выявлять разнообразные потенциальные терапевтические мишени, что стимулирует дальнейшие исследования данной проблемы и может способствовать формированию перспективных подходов к лечению этого летального дерматоза. ■

Литература

1. Beutner E., Jordon R. Demonstration of skin antibodies in sera of Pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964; 117: 505—510.
2. Beutner E.H., Prigenzi L.S., Hale W. et al. Immunofluorescent studies of autoantibodies to intercellular areas of epithelia in Brazilian Pemphigus foliaceus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968; 127: 81—86.
3. Shu S.Y., Beutner E.H. Isolation and characterization of antigens reactive with Pemphigus antibodies. *J Invest Dermatol* 1973; 61: 270—276.
4. Stanley J.R., Yaar M., Hawley-Nelson P. et al. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J Clin Invest* 1982; 70: 281—288.
5. Grando S.A. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. *Autoimmunity* 2012; 45 (1): 7—35.
6. Nguyen V.T., Lee T.X., Ndoye A. et al. The pathophysiological significance of non-desmoglein targets of Pemphigus autoimmunity. Pemphigus vulgaris and foliaceus patients develop antibodies against keratinocyte cholinergic receptors. *Arch Dermatol* 1998; 134: 971—980.
7. Nguyen V.T., Ndoye A., Grando S.A. Novel human $\alpha 9$ acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 2000; 157: 1377—1391.
8. Kalantari M., Molina D.M., Farhadieh M. et al. Partial evaluation of Pemphigus vulgaris autoantibody profile using the protein array technology. *J Invest Dermatol* 2010; 130 (Suppl. 1): S21.
9. Patel M., Furstenberg G., Hazelton J. et al. Development of protein microarrays to investigate autoantibody profiles in Pemphigus vulgaris (abstr. #111). *J Invest Dermatol* 2010; 130 (Suppl. 1): s19.
10. Nguyen V.T., Ndoye A., Grando S.A. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin — a novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem* 2000; 275: 29466—29476.
11. Abreu Velez A.M., Yi H., Gao W. et al. Antibodies to pilosebaceous units along their neurovascular supply routes in a new variant of endemic Pemphigus foliaceus in Colombia, South America. *Eur J Dermatol* 2011; 21 (3): 371—375.
12. Grando S.A. Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in Pemphigus. *Dermatology* 2000; 201: 290—295.
13. D'Amato G., Liccardi G., Noschese P. et al. Anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) in the treatment of atopic asthma and allergic respiratory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004; 3 (3): 227—229.
14. Bhol K.C., Ahmed A.R. Production of non-pathogenic human monoclonal antibodies to desmoglein 3 from pemphigus vulgaris patient. *Autoimmunity* 2002; 35: 87—91.
15. Qian Y., Clarke S.H., Diaz L.A. Dissecting the autoreactive B cell repertoire in pemphigus vulgaris patients. *J Invest Dermatol* 2006; 126 (Suppl 4): 10 (abstract).
16. Yeh S.W., Cavacini L.A., Bhol K.C., Lin M.S., Kumar M., Duval M. et al. Pathogenic human monoclonal antibody against desmoglein 3. *Clin Immunol* 2006; 120: 68—75.
17. Siegel D.L. Research and clinical applications of antibody phage display in transfusion medicine. *Transfus Med Rev* 2001; 15: 35—52.
18. Amagai M., Tsunoda K., Suzuki H. et al. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest* 2000; 105: 625—631.
19. Stanley J.R., Ishii K., Siegel D.L. Update on the cloning of monoclonal anti-desmoglein antibodies from human pemphigus patients: implications for targeted therapy. *Vet Dermatol* 2009 October; 20 (5—6): 327—330.
20. Berkowitz P., Hu P., Warren S. et al. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *PNAS* 2006; 103: 12855—12860.
21. Chernyavsky A.I., Arredondo J., Kitajima Y. et al. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *J Biol Chem* 2007; 282: 13804—13812.
22. Pretel M., Espana A., Marquina M. et al. An imbalance in Akt/mTOR is involved in the apoptotic and acantholytic processes in a mouse model of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol*. 2009; 18: 771—780.
23. Sanchez-Carpintero I., Espana A., Pelacho B. et al. In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *Br J Dermatol* 2004; 151: 565—570.
24. Williamson L., Raess N.A., Caldelari R. et al. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J* 2006; 25: 3298—3309.
25. Getsios S., Waschke J., Borradori L. et al. From cell signaling to novel therapeutic concepts: international pemphigus meeting on advances in pemphigus research and therapy. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1764—1768.
26. Tomar A., Schlaepfer D.D. Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 2009 Oct; 21 (5): 676—683.
27. Gil M.P., Modol T., Espana A. et al. Inhibition of FAK prevents blister formation in the neonatal mouse model of pemphigus vulgaris *Experimental Dermatology* 2012; 21: 254—259.
28. Schulze K., Galichet A., Sayar B.S. An adult passive transfer mouse model to study desmoglein 3 signaling in pemphigus vulgaris *J Invest Dermatol* 2012 February; 132 (2): 346—355.
29. Tsunoda K., Ota T., Suzuki H. et al. Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental Pemphigus vulgaris. *Eur J Immunol* 2002; 32: 627—633.
30. Grando S.A., Glukhenky T., Drannik G.N. et al. Autoreactive cytotoxic T lymphocytes in Pemphigus and Pemphigoid. *Autoimmunity* 1989; 3: 247—260.
31. Brandsen R., Frusic-Zlotkin M., Lyubimov H. Circulating Pemphigus IgG in families of patients with Pemphigus: Comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 44—52.
32. Torzecka J.D., Narbutt J., Sysa-Jedrzejowska A. Detection of Pemphigus autoantibodies by IIF and ELISA tests in patients with Pemphigus vulgaris and foliaceus and in healthy relatives. *Med Sci Monit* 2003; 9: CR528—CR533.
33. Veldman C., Stauber A., Wassmuth R. et al. Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with Pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. *J Immunol* 2003; 170: 635—642.
34. Gebhard K.L., Veldman C.M., Wassmuth R. et al. Ex vivo analysis of desmoglein 1-responsive T-helper (Th) 1 and Th2 cells in patients with Pemphigus foliaceus and healthy individuals. *Exp Dermatol* 2005; 14: 586—592.
35. Hertl M., Eming R., Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J Clin Invest* 2006; 116: 1159—1166.

36. Sugiyama H., Matsue H., Nagasaka A. CD4 и CD25 high regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with Pemphigus vulgaris. *Dermatology* 2007; 214: 210—220.
37. Arakawa M., Dainichi T., Yasumoto S. Lesional Th17 cells in Pemphigus vulgaris and Pemphigus foliaceus. *J Dermatol Sci* 2009; 53: 228—231.
38. Anhalt G.J., Labib R.S., Voorhees J.J. et al. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med.* 1982; 306 (20): 1189—1196.
39. Kaithamana S., Fan J.L., Memar O. et al. Relevance of differential immunogenicity of human and mouse recombinant desmoglein-3 for the induction of acantholytic autoantibodies in mice. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 16—23.
40. Angelini G., Bonamonte D., Lin M.S. et al. Characterization of polyclonal antibodies raised against a linear peptide determinant of desmoglein-3. *J Exp Ther Oncol* 2005; 5: 1—7.
41. Nishimura H., Strominger J.L. Involvement of a tissue-specific autoantibody in skin disorders of murine systemic lupus erythematosus and autoinflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 3292—3297.
42. Amagai M., Tsunoda K., Suzuki H. et al. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for Pemphigus. *J Clin Invest* 2000; 105: 625—631.
43. Aoki-Ota M., Tsunoda K., Ota T. et al. A mouse model of Pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. *Br J Dermatol* 2004; 151: 346—354.
44. Takahashi H., Kouno M., Nagao K. et al. Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. *J Clin Invest* 2011; 121 (9): 3677—88.