

Фотоферез – новый метод лечения вульгарной пузырчатки

А.В. Кильдюшевский, В.А. Молочков, О.В. Карзанов
Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им М.Ф. Владимирского (МОНИКИ). Москва

Акантолитическая пузырчатка - тяжелое, потенциально смертельное заболевание, которое проявляется как в ограниченной, так и в генерализованной формах.

Патогенез вульгарной пузырчатки (ВП) связан с аутоагрессией к антигену десмоглеину-3 - представителю семейства кадгеринов и к нормальному компоненту клеточной мембраны кератиноцитов человека с молекулярным весом 130 кДа [3, 17]. При этом акантолиз является конечным результатом плазмин-индуцированного протеолиза, возникающего в результате связывания антигена с соответствующими антителами на клеточных мембранах кератиноцитов. Протеолиз сопровождается продукцией и освобождением активатора пламиногена и последующим превращением его в плазмин в пределах пораженного эпидермиса [18]. Предрасполагающими факторами развития этого заболевания служат наличие генетических особенностей, связанных с HLA гаплотипами: A10, A26, Bw28, DR4, которые ассоциированы с ВП [17].

Клиническое течение ВП во многом зависит от эффективности ее терапии. В истории ее лечения выделяют 3 этапа: достероидный (до 1962 г), кортикостероидный (с 1962 по 1982 гг) и этап применения кортикостероидов с адьювантами (метотрексатом, азатиоприном, циклофосфаном, препаратами золота, циклоспорином, плазмаферезом и т.д.) [6].

Пузырчатка по степени тяжести делится на:

- легкую, захватывающую небольшие поверхности кожи;
- умеренную, поражающую довольно обширные поверхности кожи и слизистые оболочки;
- тяжелую, при которой наряду с распространенными поражениями кожи и слизистых оболочек имеются сопутствующие заболевания (инфекции, гипопроотеинемия и др.) [6].

Летальный исход при ВП наступает вследствие нарушения сердечной деятельности (инфаркт миокарда, инсульт), развития инфекций, сепсиса, и т.д. [1].

При острой стадии заболевания больным назначают высокие дозы кортикостероидных гормонов, применение которых значительно снизило смертность и увеличило продолжительность ремиссии [6]. В последнее время все чаще описывают случаи резистентности пузырчатки к кортикостероидным гормонам. Кроме того, многие исследователи считают, что осложнения и побочные действия как кортикостероидов, так и кортикостероидов с адьювантами, являются основной причиной смерти больных пузырчаткой.

В связи с отсутствием на сегодняшний день методов лечения ВП, способных не только сохранять жизнь больного, но и обеспечивать возможность поддержания дерматоза в преморбидной стадии, мы обратили внимание на новый экстракорпоральный метод лечения - фотоферез (ФФ), который находит все большее применение при целом ряде аутоиммунных заболеваний, в том числе и в качестве адьювантной терапии ВП [5, 7, 8, 10].

Фотоферез или экстракорпоральная фотохимиотерапия - метод, который с успехом применяется с конца 80-х годов в терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний. Его действие основано на сочетании лейкофереза с облучением предварительно сенсibilизированных 8-метоксипсораленом лимфоцитов ультрафиолетовым светом - А (УФА). Действие ФФ на организм до конца не изучено, предполагается, что метоксипсорален при активации ультрафиолетовым излучением ковалентно связывает пиримидиновые основания ДНК и некоторые молекулы клеточной мембраны. Клетки, подвергнутые подобному воздействию, не способны к воспроизводству и элиминируются естественным путем из кровеносного русла в течение 1-2 недель. Так как только от 10 до 15% циркулирующих мононуклеаров подвергаются облучению УФА в процессе одного сеанса фотофереза, механизм его действия определяется не только уменьшением количества лимфоцитов. Предполагается, что реинфузированные клетки стимулируют аутогенный супрессивный ответ на Т-клетках того же клона, не подвергшихся воздействию ФФ [20]. Vowels B.R. et al. (1992) обнаружили увеличение продукции фактора некроза опухоли моноцитами, взятыми от пациентов со склеродермией и Т-клеточной злокачественной лимфомой кожи после ФФ [19]. Кильдюшевский А.В. и Голенков А.К. с соавторами (1995) впервые сообщали об индукции апоптоза у больных хроническим лимфолейкозом и множественной миеломой в результате проведения ФФ [2]. Avinger M. et al. (1997) подтвердили, что в культуре фотоактивированных лимфоцитов, взятых от пациентов со склеродермией усиливаются процессы индуцированного апоптоза [4].

Попытки применения ФФ в комплексной терапии ВП предпринимались на протяжении всего периода его использования в клинической практике. Однако исследования проводились на небольших группах больных, в связи с чем, оценить эффективность этого метода при пузырчатке было трудно. Rook A.H. et al. (1991) применили ФФ четырем больным ВП, получавшим также кортикостероидную и цитостатическую терапию. Клиническое

улучшение было отмечено у всех больных, однако, несмотря на то, что лечение продолжалось несколько месяцев, титр сывороточных антител к антигену межклеточной склеивающей субстанции шиповатого слоя эпидермиса через 6 месяцев снизился только в 1 из 3 случаев [15]. Gollnick H.P.M. et al. (1993) при лечении больного ВП добились выраженного клинического эффекта после нескольких сеансов ФФ, однако эффективность терапии трудно было оценить в связи с тем, что состояние больного начало улучшаться еще на фоне применения азатиоприна и преднизолона [8]. По данным Liang G. et al. (1992) эффект от ФФ у больного, ранее безуспешно лечившегося кортикостероидными гормонами в сочетании с цитостатиками, наступил после 7 курсов, проводившихся с интервалом в 2 недели [10].

Таким образом, оценить эффективность ФФ на основании данных литературы представляется весьма проблематичным, в связи с тем, что все больные получали кортикостероидные и иммуносупрессивные препараты, а клинический ответ у них был отсрочен на несколько месяцев.

Целью настоящей работы явилось изучение эффективности ФФ в комплексной терапии ВП. Эффективность лечения оценивали по динамике клинической картины, иммунологических показателей, результатам реакции прямой иммунофлюоресценции биоптатов клинически не пораженной кожи, а также данным клинических и биохимических анализов крови.

Материал и методы

Группа больных для изучения эффективности ФФ в комплексном лечении ВП включала 43 больных. Диагноз устанавливали на основании клинических, цитологических, гистологических и иммуногистохимических критериев: наличие дряблых пузырей с тонкой покрывкой и серозным содержимым, положительный симптом Никольского, обнаружение акантолитических клеток в мазках отпечатках с поверхности эрозивных элементов, интраэпидермальная локализация пузырей, фиксация иммуноглобулина класса G в межклеточной склеивающей субстанции шиповатого слоя эпидермиса в криостатных срезах клинически непораженной кожи.

Фотоферез был проведен 15 больным: 5 мужчин и 10 женщин в возрасте от 34 до 72 лет (средний возраст 51 год). Длительность заболевания составляла от 2 месяцев до 8 лет (в среднем 1,2 года). Семеро больных с давностью за-

болевания более 2 лет характеризовались торпидно протекающим патологическим процессом, резистентностью к проводимой гормональной и химиотерапии, частыми обострениями. Восемью больным диагноз был установлен впервые; у 1-го из них заболевание прогрессировало, несмотря на применение высоких доз кортикостероидных гормонов (преднизолон по 200 мг/сут.) в сочетании с иммуносупрессивной терапией.

Группа контроля состояла из 28 больных, получавших стандартное лечение кортикостероидными препаратами (преднизолон в максимальной дозе 100 мг/сут.). В их числе 6 мужчин и 22 женщины в возрасте от 28 до 78 лет (средний возраст 56 лет). Давность заболевания варьировала от 1 месяца до 12 лет (в среднем 1,5 года). В этой группе 8 больных с давностью заболевания более 2 лет были устойчивые к проводимому лечению. 12 больных имели впервые установленный диагноз.

Методика фотофереза

За 1,5-2 часа до процедуры больной принимал 8-methoxypsoralen (оксорален - ультра) в дозе 0,6 мг/кг. Затем больные подвергались прерывистой процедуре лейкофереза, в течение которой выделяли приблизительно 200-250 мл обогащенной лейкоцитами крови, содержащей в среднем $2,4-3,6 \times 10^9$ мононуклеарных клеток. Во избежание перекрытия спектральных полос излучения УФ света белками плазмы, ее удаляли дополнительным центрифугированием. Оставшиеся клетки ресуспендировали в 200,0 мл физиологического раствора NaCl. Подготовленная к реинфузии лейковзвесь имела гематокрит от 2 до 5%. Перед реинфузией ее пропускали через стерильную одноразовую акриловую систему с внутренним просветом в 1 мм, и подвергали облучению ультрафиолетовым светом А ($\lambda=360-420$ нм) в течение 30 мин. Мощность излучения составляла 2 Дж/см². Полная процедура требует приблизительно 2 часа. Курс лечения состоял из 4-х процедур, проводимых через день.

Процедуру фотофереза все больные ВП переносили без осложнений и выраженных побочных явлений, лишь у 4 больных отмечено побочное действие оксоралена - ультра в виде быстро проходящей тошноты.

Результаты

Результаты лечения представлены в таблице 1. В среднем на 3-4 день после начала ФФ у всех пациентов (включая и тех, у кого предыдущее лечение было не эффектив-

Таблица 1. Динамика клинических показателей в процессе лечения у больных вульгарной пузырчаткой

Методы лечения	Уменьшение экссудации эрозий (дни)	Отрицательный симптом Никольского (дни)	Полная эпителизация эрозий (дни)
Кортикостероидные гормоны + фотоферез (n=15)	3-4	4-6	7-10
Кортикостероидные гормоны (n=28)	4-7	6-14	10-20

ным) улучшалось общее самочувствие, прекращалась или значительно уменьшалась эксудация эрозивных поверхностей, прекратилось появление свежих высыпаний. В группе контроля подобные явления наблюдались в среднем на 4-7 день после начала лечения.

В сроки от 4 до 6 дней после первого сеанса ФФ у всех больных симптом Никольского был отрицательный. В контрольной группе аналогичный эффект наблюдался только на 6-14 день. Эпителизация эрозий у всех больных, лечившихся с применением ФФ, наступала между 7 и 10 днями. В группе контроля этот показатель находился между 10 и 20 днями.

Реакция прямой иммунофлюоресценции производилась за 1-3 дня до начала ФФ и на 3-4 день после его последнего сеанса (10-12 день от начала), а также через 4-6 месяцев после процедуры (у 5 пациентов). Результаты приведены на рисунке 1.

До проведения процедуры у 2 больных интенсивность свечения IgG в межклеточной склеивающей субстанции (МСС) шиповатого слоя эпидермиса определялось на 3

балла, у 5 на 2 балла и у 8 на 1 балл. На 3-4 день после последнего сеанса - интенсивность свечения IgG в МСС на 3 балла не отмечена ни у одного больного, на 2 балла у одного больного с упорным течением процесса, на 1 балл у 6. У 8 пациентов после лечения определялась следовая реакция IgG в зоне МСС. В группе контроля в сроки от 11 до 14 дней после начала лечения кортикостероидами интенсивность свечения не изменялась.

Исследование иммунного статуса производили за 1-3 дня до процедуры и через 3-4 дня после последнего сеанса. Каких-нибудь характерных для ВП сдвигов в зависимости от давности заболевания, начавшегося обострения, проводимой ранее терапии, отметить не удалось. Наблюдался дисбаланс иммунологических показателей и некоторое снижение супрессорной функции Т-лимфоцитов (таблица 2).

После проведения ФФ в целом отмечалась тенденция к нормализации основных показателей клеточного иммунитета и иммуноглобулинов сыворотки крови. Так, показатели, отражающие экспрессию антигенов CD3, CD4, CD8 у большинства больных приобрели значения, соответствующие норме (рисунок 2).

Если до лечения экспрессия CD3 и CD8 была в пределах нормы только у 5 больных (33%), то после ФФ - у 10 (66%); CD4 у 6 больных (40%), после ФФ - у 10 (66%). В связи с этим, иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8) нормализовался у 13 человек (86%).

На фоне проведения ФФ, также отмечено значительное снижение уровня IgG сыворотки крови. Если до ФФ он был повышен у 13 человек (86%), то после проведения процедуры у 11 человек (73%) отмечался нормальный уровень IgG сыворотки крови.

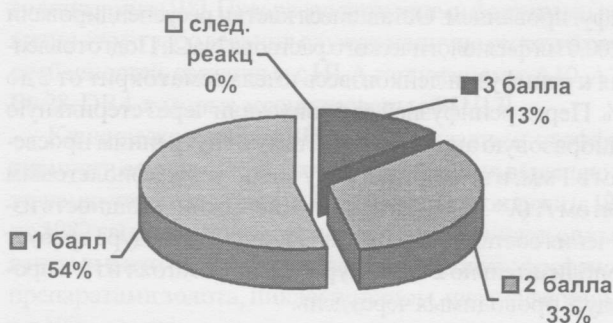
Полученные данные свидетельствуют о том, что у всех больных после проведения курса ФФ было достигнуто заметное улучшение со стороны кожного процесса уже в течение первой недели или в сроки близкие к этому. Такого быстрого и заметного улучшения в группе контроля (при лечении только кортикостероидными гормонами) отмечено не было. Это свидетельствует о высокой клинической эффективности предложенной нами методики ФФ в лечении резистентных к кортикостероидной и цитостатической терапии больных ВП. Фотоферез позволяет купировать обострение кожного процесса, не повышая дозу кортикостероидных и цитостатических препаратов. В связи с этим, представляется целесообразным применение нового экстракорпорального метода в комплексном лечении ВП.

В качестве примера приводим клиническое наблюдение:

Больной В (1938г.р.) поступил в кожную клинику МОНИКИ 20.10.99 с жалобами на высыпание на коже туловища, верхних и нижних конечностей, волосистой части головы, ранимость кожных покровов.

Из анамнеза: страдает ВП с 1991г. С 1994г находился на поддерживающей дозе преднизолона 5мг/сут. В январе 1998г самовольно прекратил прием поддерживающей дозы. Через 5-6 месяцев развилось сильное обострение. Лечился стационарно, отмечалось упорное течение процесса, резистентное к кортикостероидным препаратам, получал 120 мг преднизолона, метотрексат 25мг/в/м 1 раз

Интенсивность свечения IgG в межклеточной склеивающей субстанции эпидермиса (в баллах) до фотофереза у больных ВП (%)



Интенсивность свечения IgG в межклеточной склеивающей субстанции эпидермиса (в баллах) после фотофереза у больных ВП (%)

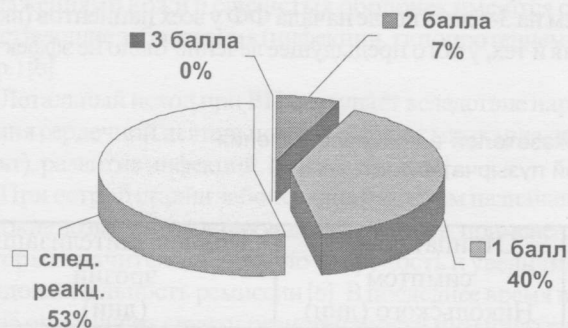


Рис. 1. Интенсивность свечения IgG в межклеточной склеивающей субстанции эпидермиса в процессе проведения фотофереза у больных вульгарной пузырчаткой.

Таблица 2. Динамика иммунологических показателей до и после фотофереза у 15 больных вульгарной пузырчаткой ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (n=20)	До ФФ (n=15)	После ФФ (n=15)	P до и после ФФ
CD3(%)	67,5 $\pm$ 7,5	63,5 $\pm$ 13,3	58,2 $\pm$ 8,53	>0,05
CD4(%)	40,5 $\pm$ 5,5	37,4 $\pm$ 11,87	35,48 $\pm$ 6,64	>0,05
CD8(%)	27,5 $\pm$ 2,5	23,39 $\pm$ 9,26	26,67 $\pm$ 5,11	>0,05
CD95(%)	41,5 $\pm$ 18,5	38,66 $\pm$ 3,76	26,59 $\pm$ 16	>0,05
CD4/CD8	1,8 $\pm$ 0,6	1,91 $\pm$ 0,41	1,37 $\pm$ 0,4	>0,05
IgG(МЕ/мл)	145 $\pm$ 5	174,9 $\pm$ 8,38	144,5 $\pm$ 31,22	>0,05

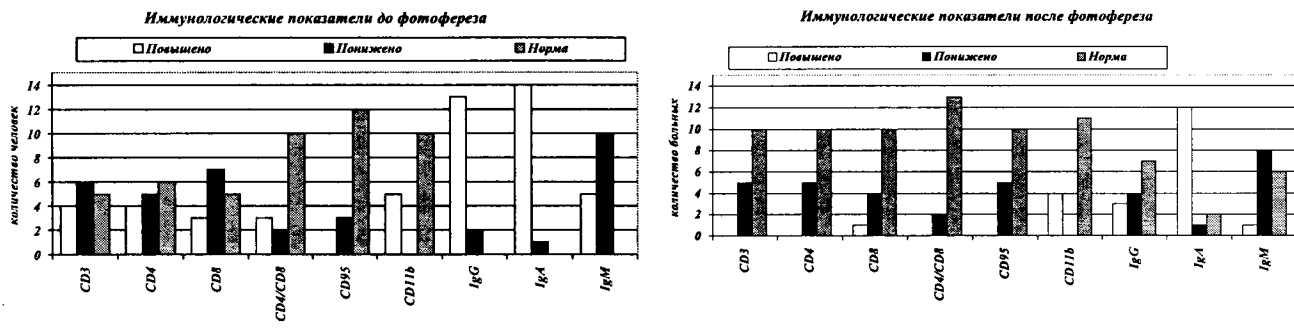


Рис. 2. Динамика иммунологических показателей в процессе фотофереза у больных вульгарной пузырчаткой.

в 5 дней (3 курса), плазмаферез (5 процедур). В течение последующих 1,5 лет неоднократно развивалось обострение, в связи с этим 7 раз проходил стационарное лечение с применением высоких доз преднизолона в сочетании с метотрексатом. Поддерживающую дозу преднизолона не удавалось снизить ниже 30-35 мг в сут. Настоящее обострение развилось на поддерживающей дозе преднизолона 30 мг/сут., после перенесенного ОРВИ.

Объективно: На коже волосистой части головы, груди, спины, живота множественные пятна бурого цвета с чешуйко-корками на поверхности размером от 2,5 см до 6 см в диаметре, единичные эрозии покрытые серозно-геморрагическими корками размером от 2,5 см до 4 см в диаметре. Симптом Никольского краевой - положительный, с клинически не пораженной кожи - отрицательный.

При обследовании: фиксация иммуноглобулина класса G в межклеточной склеивающей субстанции шиповатого слоя эпидермиса на 2 балла; Дисциркуляторная энцефалопатия, ангиопатия сетчатки. Сахарный диабет 2-го типа (стероидный) в стадии компенсации.

Проведенное лечение: преднизолон 30 мг/сут, аспаркам 1 таблетка в день, оротат калия 1 таб/3р в день, глицерам 1 таблетка в день, ретаболил 1,0 в/м 1 раз в мес., фотоферез 4 процедуры.

На 3-4 день после проведения первого сеанса фотофереза прекратилась экссудация с поверхности высыпаний, констатирован отрицательный краевой симптом Никольского. Через 12 дней после начала лечения произошла полная эпителизация эрозий, в реакции прямой иммунофлюоресценции отмечено уменьшение интенсивности свече-

ния иммуноглобулина класса G в МСС эпидермиса до следовой реакции. На 17 день от начала лечения больному была снижена доза преднизолона до 25 мг/сут. За прошедшие 1,5 года рецидивов заболевания не отмечено, больной находится на поддерживающей дозе преднизолона 12,5 мг/сут.

Механизм положительного действия ФФ при аутоиммунных заболеваниях в настоящее время до конца не выяснен. Описанный нами ранее механизм действия ФФ у больных хроническим лимфолейкозом через индукцию апоптоза [2] не нашел своего подтверждения у больных ВП, так как у большинства пациентов количество клеток, экспрессирующих CD95 антиген в процессе лечения, существенно не изменялось (таблица 2). Очевидно это связано с тем, что процессы апоптотического регулирования при этом заболевании не подвержены патологическим изменениям. Клиническая эффективность ФФ коррелирует с восстановлением соотношения хелперной и супрессорной функций Т-лимфоцитов, уменьшением уровня IgG в сыворотке крови и отложений его в межклеточной склеивающей субстанции эпидермиса.

Следует отметить, что если методы лечения пузырчатки, основанные на применении иммуносупрессивных препаратов, достаточно хорошо изучены, то метод экстракорпорального фотохимического воздействия на иммунокомпетентные клетки требует дальнейшего более углубленного изучения, как перспективное направление в лечении тяжелых аутоиммунных процессов в дерматологической клинике.

Литература

1. Беренбейн Б.А. Руководство по кожным и венерическим болезням в 4-х томах под ред. Ю.К. Скрипкина и В.И. Мордовцева, Т.2, М., 1996
2. Кильдюшевский А.В., Шабалин В.Н., Голенков А.К., Барышников А.Ю., и соавт. Опыт применения экстракорпоральной фотохимиотерапии при лечении хронического лимфолейкоза. Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии. Тезисы докладов Российской Конференции. С.-Петербург, 1995, стр. 396-397.
3. Anhalt G.J. Pemphigus vulgaris, foliaceus and paraneoplastic. In: Fine J.D. (ed.) Bullous Diseases.- New York, Igaki-Shoin. 1993, P.52-74.
4. Aringer M, Graninger W.B., Smolen J.S., et al: Photopheresis treatment enhances CD95 (fas) expression in circulating lymphocytes of patients with systemic sclerosis and induces apoptosis. *Br J Rheumatol*, 1997, 36: pp1276-1282,
5. Bystryj N.C., Steinman M.N. The adjuvant therapy of pemphigus. *Arch Dermatol* 1996;132: pp203-211.
6. Carson P.J., Hameed A., Ahmed A.R. Influence of treatment on the clinical course of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 1996, 34: pp 645-652.
7. Edelson R.L., Perez M., Heald P., Berger C. Extracorporeal photochemotherapy. *Biol Ther Cancer Updates* 1994;4: pp 1-12.
8. Gollnick H.P.M., Owsianowski M., Taube K.M., et al. Unresponsive severe generalized pemphigus vulgaris successfully controlled by extracorporeal photopheresis. *J Am Acad Dermatol*, 1993, 28: p121
9. Jolles S., Hughes J., Whittaker S. Dermatologic use of high dose intravenous immunoglobulin. *Arch Dermatol*, 1998, 134: pp 80-86.
10. Liang G., Nahass G., Kerdel FA. Pemphigus vulgaris treated with photopheresis. *J Am Acad Dermatol*, 1992, 26: p 779.
11. Owsianowski M., Garbe C., Ramaker J., et al: Therapeutic experiences with extracorporeal photopheresis. Technical procedure, follow-up and clinical outcome in 31 skin diseases [German]. *Hautarzt*, 1996, 47: pp114-123
12. Prussick R., Plott R.T., Stanley J.R. Recurrence of pemphigus vulgaris associated with interleukin 2 therapy. *Arch Dermatol* 1994; 130: 890-3.
13. Pye R.J., Bullous eruptions. In Champion RH, Burton JL, Ebling FJG (eds): *Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology*, ed 5. Oxford, Blackwell Scientific, 1992, pp 1638-1665
14. Rook A.H., Jegasothy B.V., Heald P., et al. Extracorporeal photochemotherapy for drug-resistant pemphigus vulgaris. *Ann Intern Med*, 1990, 112:pp303-305,
15. Rook A.H.: Photopheresis in the treatment of autoimmune disease: Experience with pemphigus vulgaris and systemic sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, 636:p209
16. Schoen H., Foedinger D., Derfler K., et al. Immunoapheresis in paraneoplastic pemphigus. *Arch Dermatol*, 1998, 134:p706-709
17. Stanley J.R., Yaar M., Hawley-Nelson P. et al. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J. Clin. Invest.*, 1982, - Vol.70. P.281-288
18. Stanley J.R., Koulu L., Klaus-Kovtun V. et al. A monoclonal antibody to the desmosomal glycoprotein desmoglein - 1 binds the same polipeptide as human autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J. Immunol.*, 1986, Vol. 136, p1227-30
19. Vowels B.R., Cassin M., Boufal M.H., et al: Extracorporeal photochemotherapy induces the production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes: Implications for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*, 1992, 98: pp 686-692
20. Wolfe J.T., Lessin S.R., Singh A.H., et al: Review of immunomodulation by photopheresis: Treatment of cutaneous T-cell lymphoma, autoimmune disease, and allograft rejection. *Artif Organs* 1994, 18: pp888-897