

Кубанов А.А., Абрамова Т.В.

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ТOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 7-го ТИПА В КОЖЕ БОЛЬНЫХ ПУЗЫРЧАТКОЙ

ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, г. Москва, Россия

Пузырчатка – тяжелый буллезный дерматоз, характеризующийся поражением кожи и/или слизистых оболочек, ведущую роль в патогенезе которого отводят аутоиммунным реакциям, приводящим к акантолизу. Провоцирующими факторами развития пузырчатки чаще всего являются стрессы, инфекционные заболевания, а также применение лекарственных препаратов, вакцин, избыточная инсоляция [Давиденко Е.Б., Махнева Н.В., 2012; Esmaili N. и соавт., 2013; Ruocco V. и соавт., 2013; Yoshimura K., 2014]. Описаны случаи развития симптомов пузырчатки у лиц при медикаментозной стимуляции Toll-подобного рецептора 7-го типа (TLR7) [Schiavo A. и соавт., 2008; Bauza A. и соавт., 2009; Sebaratnam D. и соавт., 2011], что указывает на его возможную роль в патогенезе данного заболевания [Sebaratnam D. и соавт., 2011]. Однако изучение рецепторов врожденного иммунитета у больных пузырчаткой не проводилось.

Цель исследования – изучить уровень экспрессии гена *TLR7* в коже больных пузырчаткой.

**Материал и методы.** Для изучения экспрессии гена *TLR7* исследованы биоптаты кожи 38 больных пузырчаткой (биопсировали участки видимо не пораженной кожи) и 24 здоровых людей методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Суммарную РНК у больных пузырчаткой и здоровых людей выделяли с помощью набора Rneasy Mini Kit («QIAGEN», Германия) согласно протоколу производителя. Предварительно образцы кожи были подвергнуты гомогенизации на гомогенизаторе Tissue Lyser («QIAGEN», Германия) в буфере с б-меркаптоэтанолом. Осадок РНК растворяли в воде, отбирали аликвоту и определяли концентрацию водного раствора РНК на биофотометре Eppendorf (Германия). Хранили раствор РНК при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Синтез кДНК с использованием в качестве матрицы РНК, выделенной из изучаемых образцов, проводили с помощью коммерческого набора для постановки обратной транскрипции ОТ-ПЦР («Силекс», Россия). ПЦР-РВ проводили на приборе LightCycler 480 («Roche», Швейцария) с использованием линейных разрушаемых зондов, меченных флюорофором и гасителем флюоресценции (TaqMan). Для амплификации исследуемых генов использовали наборы с HS Taq-полимеразой в соответствии с инструкцией производителя. Для осуществления постановки ПЦР-РВ были подобраны специфические праймеры и зонды. Применяли оптимизированные для метода ПЦР-РВ пары праймеров QuantiTect Primer Assay («Qiagen», США). В качестве внутреннего стандарта использовали «нормировочные» гены, относительно которых производили расчет экспрессии *TLR7* (гены «домашнего хозяйства» – *housekeeping genes* –  $\beta$ -актин и *PANK*), экспрессия которых считается стабильной для человека. Последовательности праймеров

*TLR7* и генов «домашнего хозяйства» ( $\beta$ -актин и *PANK*) подбирали в программе Oligo 6,0.

При анализе результатов амплификации использовали метод прямого сравнения графиков накопления продуктов реакции ПЦР-РВ по максимуму 2-й производной, предлагаемый разработчиком программного обеспечения. Полученные данные оценивали по значению Cp (crossing point) – значению цикла реакции, характеризующему кривую графика амплификации. Количество исследуемых кДНК, полученных из РНК путем обратной транскрипции, в образцах рассчитывали путем определения пороговых циклов ПЦР-РВ. Для определения экспрессии каждого гена ПЦР-РВ проводили в трех повторностях, после чего рассчитывали среднее значение экспрессии гена. Уровень экспрессии генов *TLR7*,  $\beta$ -актин, *PANK* оценивали в условных относительных единицах (ОЕ) экспрессии с расчетом  $M$  – среднего значения;  $m$  – ошибки среднего значения. Проводили нормирование общего количества РНК в образцах, которое позволило нивелировать различия в количестве и/или качестве стартового материала, а также в условиях пробоподготовки.

**Результаты.** При расчете экспрессии гена *TLR7* по отношению к нормировочному гену  $\beta$ -актин у больных пузырчаткой был выявлен статистически значимый более высокий уровень экспрессии *TLR7* ( $249,95 \pm 21,89$  ОЕ), чем у здоровых людей ( $186,13 \pm 17,76$  ОЕ;  $p < 0,05$ ). Экспрессия *TLR7* по отношению к гену *PANK* была также статистически значимо выше у больных пузырчаткой ( $2,96 \pm 0,34$  ОЕ), чем у здоровых людей ( $1,61 \pm 0,23$  ОЕ;  $p < 0,05$ ).

В результате выполнения исследований методом ПЦР-РВ показано, что уровень экспрессии гена *TLR7* в коже больных пузырчаткой, выраженный в условных относительных единицах (по отношению к нормировочному гену  $\beta$ -актин –  $249,95 \pm 21,89$  ОЕ; по отношению к нормировочному гену *PANK* –  $2,96 \pm 0,34$  ОЕ), значительно превышал экспрессию этого гена у здоровых лиц ( $186,13 \pm 17,76$  ОЕ и  $1,61 \pm 0,23$  ОЕ соответственно;  $p < 0,05$ ).

Таким образом, полученные результаты могут свидетельствовать о повышении транскрипционной активности генома больных пузырчаткой и активации сигнальных путей *TLR7* в клетках. Высокие концентрации *TLR7* в эпителиоцитах могут приводить к нарушению эффективной работы иммунной системы, так как усиливают синтез провоспалительных цитокинов. Это приводит к увеличению выработки аутоантител и активации процессов акантолиза, что является дополнением существующих представлений о механизмах развития пузырчатки и может быть использовано для разработки новых методов терапии больных, а также диагностики пузырчатки.