

Značaj aviditeta imunoglobulina G specifičnih za dezmoglein 1 i dezmoglein 3 kod pacijenata obolelih od pemfigus vulgarisa

Uvod

Pemphigus vulgaris (PV) je retka, hronična i potencijalno smrtonosna autoimunska bolest kože i sluzokoža, uzrokovana prisustvom IgG autoantitela usmerenih protiv dezmogleina 3 (Dsg3). Kod određenog broja pacijenata prisutna su i autoantitela protiv dezmogleina 1 (Dsg1)¹.

Dezmogleini su dezmozomalni glikoproteini. Osnovna funkcija dezmozoma u koži jeste očuvanje integriteta epiderma putem mehaničkog povezivanja citoskeleta jedne ćelije sa citoskeletom susedne ćelije. Dezmoglein 1 i Dsg3 su ključni dezmozomski kadherini, sa molekulskim masama od 160 kDa, odnosno 130 kDa. Kod oba proteina, imunogeni epitopi se nalaze u vanćelijskim domenima, a njihova funkcija i struktura zavise od konformacije proteina i prisustva kalcijuma. Međutim, Dsg1 i Dsg3 se razlikuju po obrascu ekspresije u različitim slojevima epiderma i sluzokože. U epidermu, ekspresija Dsg1 raste prema površnim slojevima, dok se ekspresija Dsg3 postepeno smanjuje i potpuno je odsutna u *stratum granulosum*. Suprotno tome, u epitelu sluzokože Dsg1 ima minimalnu ekspresiju i odsutan je u bazalnom sloju, dok je Dsg3 prisutan u svim slojevima. Na taj način, Dsg1 i Dsg3 imaju komplementarne uloge u održavanju strukturnog integriteta različitih tipova epitela².

„Hipoteza o kompenzaciji dezmogleina“ ne objašnjava neslaganja između lokalizacije lezija i anti-Dsg3/1 profila: neki pacijenti sa mukokutanom PV imaju anti-Dsg3 ili anti-Dsg1 antitela, dominantno mukozni tip može imati anti-Dsg1 bez anti-Dsg3, dok dominantno kutani tip može imati povišen anti-Dsg1 i odsutna anti-Dsg3 antitela. Takođe, ova teorija ne objašnjava zašto pacijenti sa povišenim anti-Dsg1 nemaju supkornealne bule kao kod pemphigus foliaceus (PF)³.

Više od 50 antigena specifičnih za organ i nespecifičnih za organ identifikovano je kao mete autoimunskog odgovora u pemfigusu, uključujući molekule ćelijske adhezije, receptore ćelijske membrane, antigene tireogastričnih klastera, mitohondrijske proteine, kao i imunske, hematološke, neuronske i onkoantigene. Prema savremenoj multipatogenetskoj teoriji, patogeneza pemfigusa objašnjava se „hipotezom višestrukog pogotka“ (eng. *multiple hit hypothesis*), koja pretpostavlja da je formiranje bula kod svakog pacijenta rezultat sinergijskog i kumulativnog delovanja više različitih autoantitela, kako onih usmerenih protiv dezmogleina (Dsg), tako i protiv ne-Dsg antigena. Ovi raznoliki profili autoantitela aktiviraju specifične signalne puteve unutar keratinocita, što dovodi do različitih kliničkih fenotipova bolesti⁴. „Hipoteza superkompenzacije“, koju su formulisali *Sinha i Sajda*, pretpostavlja da vezivanje specifičnih autoantitela, u kombinaciji sa jedinstvenim obrascima epidermalne ekspresije različitih autoantigena, dovodi do poremećaja intracelularne signalizacije i razvoja akantolize, ali samo ukoliko ukupni efekti ovih interakcija premaše određeni patološki prag. Prema ovoj hipotezi, visoko patogena autoantitela usmerena protiv Dsg3 mogu biti dovoljna za indukciju akantolize ograničene na mukozne površine. Suprotno tome, istovremeno prisustvo visoko

patogenih anti-Dsg3 i anti-Dsg1 autoantitela smatra se neophodnim za razvoj istovremene mukozne i kutane zahvaćenosti. Pored toga, kombinacije slabo patogenih anti-Dsg3 autoantitela sa autoantitelima usmerenim protiv ne-Dsg antigena mogu doprineti nastanku mukozne ili mukokutane akantolize, putem aditivnih ili sinergističkih patomehanizama⁵.

Hashimoto i saradnici identifikovali su šest potencijalnih mehanizama patogenosti anti-desmogleinskih autoantitela, koji uključuju: (1) zavisnost od konformacije Dsg molekula indukovane kalcijumom, (2) reaktivnost prema prekursorskim (nezrelim) oblicima Dsg molekula, (3) specifičnost za određene ekstracelularne domene desmogleina (EC1–EC5), (4) uticaj supklasa imunoglobulina (IgG1–IgG4, IgA, IgE), (5) usmerenost autoantitela na aktivacioni domen p38 MAPK signalnog puta unutar Dsg molekula, (6) aviditet, odnosno funkcionalni afinitet autoantitela prema desmogleinskim antigenima⁶.

Aviditet predstavlja zbirnu snagu višestrukih bivalentnih ili multivalentnih interakcija između antitela i antigena. Aviditet antitela se kvantitativno može proceniti različitim tehnikama, pri čemu je najčešće korišćena metoda modifikovani ELISA testa⁷. Generalno se smatra da autoantitela visokog aviditeta imaju izraženiju patogenu aktivnost, s obzirom na njihovu sposobnost jačeg i stabilnijeg vezivanja za ciljane antigene, što može dovesti do pojačanog oštećenja tkiva i intenzivnijih inflamatornih odgovora. Shodno tome, ona se često povezuju sa težim kliničkim ishodima i imaju direktan doprinos u patogenezi različitih bolesti poput sistemskog *lupus erythematosus*-a (SLE), reumatoidnog artritisa, autoimunskog tireoiditisa^{8,9,10,11}.

Dok su se ranija istraživanja kod PV prvenstveno fokusirala na koncentracije antitela radi klasifikacije podtipa bolesti ili predviđanja aktivnosti bolesti, uloga aviditeta je ostala neistražena. U multicentričnoj evropskoj studiji koja je obuhvatila 84 pacijenta sa PV i 32 pacijenta sa PF, *Hébert* i saradnici su pokazali da početne vrednosti Indeksa područja pemfigusne bolesti (*eng. Pemphigus Disease Area Index – PDAI*) snažno koreliraju sa koncentracijama anti-Dsg1 antitela u serumu, dok su PDAI skorovi za sluzokožu specifično povezani sa koncentracijama anti-Dsg3 antitela¹². Kompatibilni nalazi zabeleženi su i u studiji *Zhelyazkova* i saradnika, sprovedenoj na kohorti od 31 pacijenta sa PV i 7 sa PF, u kojoj su autori identifikovali značajne korelacije između ukupnog PDAI skora i vrednosti desmogleina određenim ELISA testom. Pri tome su koncentracije anti-Dsg1 antitela pokazale jaču povezanost sa ukupnom kliničkom težinom bolesti u poređenju sa koncentracijama anti-Dsg3 antitela¹³. Slične podatke izneli su *Mohebi* i saradnici, u analizi sprovedenoj na 109 pacijenata sa PV, gde je takođe zabeležena statistički značajna pozitivna korelacija između PDAI skora i koncentracije anti-Dsg1 antitela, dok takva povezanost nije potvrđena za anti-Dsg3 antitela¹⁴.

Radna hipoteza: Aviditet anti-Dsg3 autoantitela pokazuje bolju povezanost sa težinom kliničke slike PV, procenjenom PDAI skoro, nego koncentracija anti-Dsg3 autoantitela i aviditet anti-Dsg1 autoantitela. Takođe, pacijenti u kliničkoj remisiji karakterišu se značajno nižim aviditetom anti-Dsg1 i anti-Dsg3 autoantitela u poređenju sa pacijentima sa aktivnom bolešću.

Ciljevi istraživanja:

1. Ispitati korelaciju između vrednosti aviditeta i nivoa anti-Dsg3 i anti-Dsg1 autoantitela kod pacijenata sa aktivnim PV, određenih kvantitativnim i semikvantitativnim ELISA testovima.
2. Ispitati povezanost između aviditeta anti-Dsg3 i anti-Dsg1 autoantitela i kliničke aktivnosti PV, procenjene PDAI skorom, uključujući analizu razlika u vrednostima aviditeta kod pacijenata sa blagom, umereno teškom i teškom kliničkom slikom, kao i poređenje aviditeta kod pacijenata u aktivnoj fazi bolesti i kada uđu u kliničku remisiju.
3. Uporediti vrednosti aviditeta anti-Dsg3 i anti-Dsg1 autoantitela kod pacijenata sa dominantno mukoznim, mukokutanim i dominantno kutanim kliničkim fenotipovima PV.
4. Pokazati da li postoji korelacija između aviditeta anti-Dsg3 i anti-Dsg1 autoantitela i titra pemfigusnih autoantitela određenih indirektnom imunofluorescencijom kod aktivnog PV.
5. Odrediti optimalne granične vrednosti aviditeta anti-Dsg3 i anti-Dsg1 autoantitela koje razlikuju pacijente sa blagom od pacijenata sa umereno teškom i teškom bolešću, kao i pacijente u remisiji od onih sa aktivnom bolešću.

Materijal i metode

Tip studije: kohortna studija.

Mesto i period istraživanja: pacijenti dijagnostikovani i lečeni na Klinici za dermatovenerologiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (UKCS) u periodu od 1. januara 2018. do 31. decembra 2025. Laboratorijska (imunološka) dijagnostika biće sprovedena u Odeljenju za visokospecijalizovanu *in vitro* dijagnostiku imunoloških i alergoloških oboljenja, Klinike za alergologiju i imunologiju, UKCS. Selekcija ispitanika: kriterijumi za uključivanje ispitanika u studiju: (1) pacijenti starosti ≥ 18 godina; (2) klinička slika kompatibilna sa dijagnozom PV, uključujući prisustvo bula i/ili erozija koje zahvataju kožu i/ili sluzokožu; (3) pozitivan nalaz direktne imunofluorescence (DIF) perilezijske kože ili sluzokože, koji podrazumeva prisustvo intercelularnih depozita imunoglobulina G (IgG) i/ili komplementne komponente C3c unutar epiderma; (4) histopatološki nalaz kompatibilan sa dijagnozom PV, sa suprabazalnom akantolizom na uzorcima biopsija leziona kože ili sluzokože; (5) novodijagnostikovani pacijenti koji nisu prethodno lečeni sistemskom imunosupresivnom terapijom za PV (glukokortikosteroidi, imunosupresivi, biološki lekovi).

Pravni i etički preduslovi: Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 2013. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta UKCS (broj odobrenja: 524/9).

Instrumenti merenja

Pacijenti koji ispunjavaju kriterijume za studiju će biti podeljeni u tri klinička fenotipa, na osnovu distribucije bula i erozija: dominantno mukozni (lezije samo na sluzokoži), mukokutani (lezije na koži i sluzokoži) i dominantno kutani (lezije samo na koži). Aktivnost bolesti će se proceniti PDAI

skorom, pri čemu će se koristiti zbir kožnih i sluzokožnih skorova. Bolest se klasifikuje kao blaga (PDAI ≤ 15), umereno teška (>15 and ≤ 45) i teška (≥ 45). Serumi koji se prikupljaju u fazi aktivne bolesti za rutinsku serološku dijagnostiku (indirektna imunofluorescencija i semikvantitativni ELISA test za detekciju anti-Dsg3 i anti-Dsg1 autoantitela) se čuvaju zamrznuti na -80°C za buduće analize, koje uključuju kvantitativni ELISA test i modifikovani ELISA test sa ureom za određivanje aviditeta.

Isto testiranje sprovodi se i na uzorcima iste grupe pacijenata kada uđu u kliničku remisiju, koja se definiše odsustvom aktivnih lezija, bez obzira na terapijski status.

Kvantitativna detekcija IgG autoantitela protiv Dsg1 i Dsg3 će se odrediti komercijalno dostupnim ELISA setovima (EUROIMMUN, Lübeck, Germany), dok će se procena aviditeta IgG autoantitela protiv Dsg1 i Dsg3 odrediti modifikovanom ELISA metodom zasnovanom na već pomenutim komercijalnim testovima uz dodatni korak denaturacije haotropnim agensom (5M urea).

Statistička analiza

U studiji će se koristiti deskriptivne i inferencijalne statističke metode za analizu kliničkih i seroloških podataka. Deskriptivna analiza obuhvatiće frekvencije, mere centralne tendencije i disperzije. Za poređenje grupa koristiće se ANOVA za parametarske i *Kruskal–Wallis* ili *Mann–Whitney* test za neparametarske podatke. Korelacije između PDAI skora i seroloških parametara procenjivaće se odgovarajućim testovima korelacije. Longitudinalne promene analiziraće se t-testom za uparene uzorke ili *Wilcoxon* testom, u zavisnosti od raspodele podataka. ROC (*Receiver Operating Characteristic*) analiza biće primenjena za određivanje optimalnih graničnih vrednosti koncentracija i aviditeta. Radi procene jačine povezanosti između seroloških markera i kliničkih ishoda, biće izračunati odnosi šansi (*Odds Ratios* – OR) sa 95% intervalima poverenja (*Confidence Intervals* – CI). Rezultati će biti prikazani tabelarno i grafički, uz nivo značajnosti $p < 0.05$. Analize će biti rađene u IBM SPSS Statistics verzije 31.0.

Veličina uzorka: dovoljan broj jedinica posmatranja za primarni cilj, koji je bio ispitivanje povezanosti između aviditeta anti-Dsg3 i anti-Dsg1 autoantitela i kliničke težine bolesti određene PDAI skorom, za dvosmerno testiranje, nivo značajnosti 0.05, snagu studije od 80% i očekivanu vrednost koeficijenta korelacije od 0.368 je iznosio 56 ispitanika¹⁵.

PROCENA KANDIDATA O POTENCIJALNOM NAUČNOM DOPRINOSU

Pemphigus vulgaris predstavlja tešku, potencionalno smrtonosnu, hroničnu autoimunsku bolest kože i sluzokoža, sa delimično razjašnjenom patogenezom. Iako je dugo smatrano da ključnu ulogu imaju IgG autoantitela usmerena protiv Dsg3, a kod pojedinih pacijenata i protiv Dsg1, sve više dokaza ukazuje da njihov profil ne objašnjava u potpunosti kliničku sliku, težinu bolesti ni distribuciju lezija. U tom kontekstu, aviditet autoantitela, kao funkcionalna mera jačine vezivanja antitela za svoj antigen dobija na značaju. Iako se već pokazao kao dijagnostički i prognostički parametar u bolestima poput *lupus erythematosus systemicus*, reumatoidnog artritisa i autoimunskih tireopatija, njegova uloga u *pemphigus vulgaris* do sada nije bila ispitivana.

Naučna opravdanost rada proističe iz potrebe da se utvrdi da li aviditet anti-Dsg3 i anti-Dsg1 antitela pokazuje bolju povezanost sa kliničkom aktivnošću bolesti nego njihova koncentracija, kao i da li može predstavljati pouzdan biomarker za praćenje toka i prognozu bolesti.

Originalni naučni doprinos ogleda se u tome što se u ovom sistematskom ispitivanju po prvi put ispituje aviditet anti-Dsg1 i anti-Dsg3 antitela kod pacijenata sa PV, primenom modifikovane ELISA metode sa ureom.

Ovim pristupom prelazi se sa proste kvantifikacije na funkcionalnu karakteristiku autoantitela, što može doprineti preciznijoj dijagnostici, individualizaciji terapije i efikasnijem praćenju odgovora na lečenje kod pacijenata sa *pemphigus vulgaris-om*.

Literatura

1. Murrell DF, Peña S, Joly P, et al. Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol*. 2020; 82:575-85.
2. Schmitt T, Waschke J. Autoantibody-Specific Signalling in Pemphigus. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8:701809.
3. Sielski L, Baker J, DePasquale MC, et al. Desmoglein compensation hypothesis fidelity assessment in Pemphigus. *Front Immunol*. 2022; 13:969278.
4. Ahmed AR, Carrozzo M, Caux F, et al. Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology. *Exp Dermatol*. 2016; 25:839-46.
5. Sinha AA, Sajda T. The Evolving Story of Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: Development of the "Super Compensation Hypothesis". *Front Med (Lausanne)*. 2018; 14:5:218.
6. Hashimoto T, Ishii N, Demitsu T. Response to the letter to the editor by Muro et al. *Acta Derm Venereol*. 2015; 95:873-4.
7. Correa VA, Rodrigues TS, Portilho AI, et al. Modified ELISA for antibody avidity evaluation: The need for standardization. *Biomed J*. 2021; 44:433-438.
8. Zeng Y, Lin Y, Wang X, et al. Assessment of a high-avidity IgG ANAs for the diagnosis and activity prediction of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2020; 39:2619-29.
9. Gajic-Veljic M, Lekic B, Nikolic M, et al. Level and avidity of antineutrophil cytoplasmic antibodies specific to lactoferrin are useful biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2022; 41:709-720.
10. Suwannalai P, van de Stadt LA, Radner H, et al. Avidity maturation of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64:1323-8.
11. Savvateeva E, Sokolova V, Yukina M, et al. Microarray-Based Avidity Assay for Assessment of Thyroid Autoantibodies. *Diagnostics (Basel)*. 2025; 15:341.
12. Hébert V, Boulard C, Houivet E, et al. Large International Validation of ABSIS and PDAI Pemphigus Severity Scores. *J Invest Dermatol*. 2019; 139:31-7.
13. Zhelyazkova ZH, Abadjieva TI, Gardjeva PA, et al. Desmoglein autoantibodies and disease severity in pemphigus patients - correlations and discrepancies. *Folia Med (Plovdiv)*. 2023; 65:969-74.
14. Mohebi F, Tavakolpour S, Teimourpour A, et al. Estimated cut-off values for pemphigus severity classification according to pemphigus disease area index (PDAI), autoimmune bullous skin disorder intensity score (ABSIS), and anti-desmoglein 1 autoantibodies. *BMC Dermatol*. 2020; 20:13.
15. Zhou Y, Wang Y, Wang M, et al. Factors associated with persistent anti-desmoglein positivity after remission in pemphigus vulgaris: a prospective registry-based cohort study. *Front Immunol*. 2025 May 13; 16:1557556.