

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО МГМСУ

им. А.И. Евдокимова Минздрава России

д.м.н., профессор

 Н.И. Крихели

«02» декабря 2019 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**о научно-практической значимости диссертационной работы
Абрамовой Татьяны Валерьевны на тему: «Пузырчатка:
иммунопатогенез, диагностика и патогенетическая терапия
(клинико–экспериментальное исследование)», представленной на
соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности
14.01.10 - Кожные и венерические болезни.**

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Абрамовой Т.В. посвящена изучению механизмов развития пузырчатки и разработке патогенетически обоснованного метода терапии. Пузырчатка - тяжелый аутоиммунный буллезный дерматоз кожи и/или слизистых оболочек, патогенетическую роль в развитии которого играют аутоантитела (IgG), вызывающие разрушение десмосом и развитие акантолиза, развивается преимущественно в молодом и трудоспособном возрасте. Тяжесть заболевания, изменение внешности, ограничения в профессиональной деятельности (часто переход на инвалидность), необходимость длительного приема иммуносупрессивных препаратов значительно изменяют качество жизни больных.

Изучение клиники, патогенеза, совершенствование диагностики и терапии пузырчатки является одной из актуальных проблем современной

дерматовенерологии и основой для создания принципиально новых эффективных методов профилактики и лечения, в том числе развития и реализации перспективного направления медицинской науки - персонализированной терапии.

Несмотря на большое количество публикаций, посвященных исследованию аутоантител и антигенов, концепция патогенеза и развития акантолиза при пузырчатке изучена недостаточно. В последние годы показано, что в механизмах развития акантолиза принимает участие активация внутриклеточных, в том числе апоптотических сигнальных путей, вызывающая изменение свойств кератиновых фибрилл клетки, связанных с десмосомами. К тому же, процессы распознавания патогенов структурами врожденного иммунитета (паттерн-распознающими рецепторами) остаются малоизученными. Одними из наиболее значимых представителей семейства сигнальных паттерн-распознающих рецепторов, присутствующих в коже, являются толл-подобные рецепторы, которые при активации поврежденными молекулярными структурами организма формируют молекулярный каскад передачи сигнала к ядру клетки, что приводит к транскрипции генов провоспалительных цитокинов, инициирующих развитие адаптивного иммунитета. Исследований по изучению роли толл-подобных рецепторов в патогенезе пузырчатки не проводилось.

Для оценки степени тяжести аутоиммунных буллезных дерматозов за последние 20 лет предложены различные индексы. Но к настоящему времени индекса оценки тяжести пузырчатки, признанного мировым сообществом, не существует. Это создает определенные трудности при подборе и оценке эффективности лечебных мероприятий, проведении сравнительного анализа рандомизированных клинических исследований, при разработке новых методов терапии.

В последние годы, благодаря научно-техническому прогрессу, в дерматовенерологическую практику внедрены современные технологии, благодаря чему достигнуты значительные успехи в диагностике больных с

пузырчаткой. Однако результаты исследований уровня пемфигусных аутоантител у больных пузырчаткой разными авторами носят противоречивый характер.

Несмотря на увеличение продолжительности жизни больных пузырчаткой после введения в схему лечения глюкокортикостероидных препаратов, у пациентов наблюдается большое число нежелательных явлений вследствие длительной иммуносупрессивной терапии. Внедрение в клиническую практику патогенетических методов лечения, направленных на элиминацию специфических антител у больных пузырчаткой, будет способствовать повышению эффективности терапии при стероидорезистентных и тяжелых формах заболевания. Данные обстоятельства требуют дальнейших исследований в изучении патогенеза пузырчатки, в том числе на иммунологическом и молекулярно-генетическом уровне, разработке новых подходов к патогенетической терапии больных, что позволит улучшить качество оказания медицинской помощи данной категории больных.

Все вышеописанное позволяет заключить, что проблема, выбранная автором исследования, является актуальной, и решению именно этих вопросов посвящена рецензируемая диссертация.

Связь диссертации с планами соответствующих областей науки

Диссертационная работа Абрамовой Т.В. «Пузырчатка: иммунопатогенез, диагностика и патогенетическая терапия (клинико-экспериментальное исследование)» соответствует специальности 14.01.10 - Кожные и венерические болезни. Работа выполнена в соответствии с планами научных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научная новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа представляет большой научный интерес в связи с тем, что в ней получены новые данные, позволяющие расширить концепцию патогенеза пузырчатки. На основании тщательного анализа данных клинического обследования больных пузырчаткой, результатов определения нуклеотидной последовательности гена *PERP* в крови больных пузырчаткой методом секвенирования по Сенгеру, исследования экспрессии структурного белка десмосом *PERP* в коже больных пузырчаткой методом реакции непрямой иммуофлюоресценции с использованием *ex vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, впервые получены данные, свидетельствующие о роли гена *PERP* при данном заболевании, и продемонстрирована роль структурного белка десмосом *PERP* в патогенезе пузырчатки. В результате анализа белок кодирующей нуклеотидной последовательности гена *PERP* у больных пузырчаткой в третьем экзоне гена *PERP* обнаружены два однонуклеотидных полиморфизма (SNP, Single nucleotide polymorphism): rs648802 (C611G) (несинонимичный) и rs648396 (T675C) (синонимичный). При изучении частоты встречаемости полиморфизма гена *PERP* у больных пузырчаткой установлено, что гетерозиготные генотипы *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396) в 3-м экзоне гена *PERP* встречаются чаще, чем в контрольной группе. Продемонстрирована связь между распределением аллельных вариантов, генотипов полиморфизма rs648802/rs648396 3-го экзона гена *PERP* и степенью тяжести, а также клинической картиной пузырчатки. В коже больных пузырчаткой выявлено снижение экспрессии структурного белка десмосом *PERP*; доказано снижение экспрессии белка *PERP* при увеличении тяжести заболевания.

В результате проведенных исследований методом полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов в режиме реального времени в коже больных пузырчаткой обнаружена повышенная экспрессия гена толл-подобного

рецептора 7 типа. Выявлена корреляционная связь между уровнем антител к десмоглеину 1 типа и уровнем экспрессии гена *TLR7/PANK*.

При сравнительном анализе клинических индексов (индекса площади поражения при пузырчатке - PDAI, Pemphigus Disease Area Index; оценки тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи - ABSIS, Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score; индекса активности вульгарной пузырчатки - PVAS, Pemphigus Vulgaris Activity Score), используемых для оценки тяжести больных пузырчаткой определено, что наиболее информативным для дифференцировки больных по степени тяжести является индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI).

Выявлена связь между уровнями антител к десмоглеинам 1 и 3 типов и клиническими формами, а так же степенями тяжести, определяемыми с использованием индекса площади поражения при пузырчатке (PDAI).

На основании проведенных исследований автором разработан подход к патогенетической терапии больных с использованием селективного иммуносорбента, что послужит основой для создания нового метода терапии больных пузырчаткой. Так же автором доказана эффективность селективной иммуносорбции в экспериментах на лабораторных животных; при изучении оптической плотности суммарных антител (IgG), выделенных из пула сывороток больных, и титра антидесмоглеиновых антител в крови больных пузырчаткой до и после прохождения через иммуносорбент.

Работа выполнена на современном методическом уровне, с использованием большого количества материала. Каждый из этапов работы строго соответствовал поставленным задачам, которые были успешно решены диссертантом. Выполнение исследований на репрезентативной выборке подтверждает достоверность полученных автором результатов.

Анализ полученных результатов и выводов диссертационной работы Абрамовой Т.В. показывает, что они отличаются новизной и достоверностью. Положения, выносимые на защиту, сформулированы в результате логической и аналитической работы.

Научная новизна технических решений подтверждена патентами на изобретения: Патент на изобретение 2613718 от 21.03.2017г. «Способ моделирования пузырьчатки у мышей методом введения иммуноглобулинов класса G»; Патент на изобретение 2622005 от 08.06.2017г. «Способ получения селективного иммуносорбента для удаления антител-IgG к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови больных пузырьчаткой»; Патент на изобретение 2627652 от 09.08.2017г. «Применение селективного иммуносорбента для удаления антител к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови у больных пузырьчаткой».

Практическая значимость полученных в диссертации результатов

Практическая значимость диссертационной работы Абрамовой Т.В. заключается в том, что результаты исследований позволяют улучшить диагностику пузырьчатки и качество оказываемой медицинской помощи больным.

В диссертационной работе успешно решена проблема определения степени тяжести пузырьчатки с использованием индекса определения площади поражения при пузырьчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index) и на основании изучения уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типов методом иммуноферментного анализа. Определены показатели легкой, средней и тяжелой степени тяжести у больных пузырьчаткой.

В качестве дополнительного критерия для дифференциальной диагностики пузырьчатки автором предложено использовать метод иммуноферментного анализа с определением антител к десмоглеинам 1 и 3 типов, что позволит диагностировать тяжелый буллезный дерматоз на ранних стадиях и назначать своевременно адекватную терапию.

Также автором обоснована важность и целесообразность экстракорпоральной терапии с использованием селективного иммуносорбента в патогенетическом лечении больных пузырьчаткой. Разработаны опытные образцы иммуносорбента для селективной сорбции

антител к десмоглеину 3 типа из крови больных вульгарной пузырчаткой. Эффективность образцов иммуносорбентов доказана *in vivo* (на экспериментальной модели пузырчатки, созданной с использованием неонатальных мышях инбредной линии BALB/c путем внутрибрюшинного введения препаратов IgG, выделенных из пула сывороток больных пузырчаткой) и *in vitro* (оценена эффективность сорбции аутоантител к десмоглеину 3 типа из суммарных иммуноглобулинов класса G, выделенных из пула сывороток крови; а также образцов крови больных пузырчаткой). Разработка метода селективной иммуносорбции пемфигусных антител явится основой для создания нового метода терапии больных пузырчаткой.

Значение полученных автором результатов диссертационного исследования для практики подтверждается актами внедрения в практическую деятельность ГБУ Рязанской области БУ «Областной клинический кожно-венерологический диспансер», ДЗ БУЗ Вологодской области «Вологодский областной кожно-венерологический диспансер», БУ «Республиканский кожно-венерологический диспансер» Минздрава Чувашии, ГБУЗ Астраханской области «Областной кожно-венерологический диспансер».

Практическая значимость проведенных исследований также заключается в том, что представленные в диссертационном исследовании научные положения и результаты обобщены и представлены соискателем в виде учебных пособий: «Дифференциальная диагностика буллезных дерматозов»: учебное пособие / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова, Л.Ф. Знаменская и др. // ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования». – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015. – 56 с.; «Пузырчатка»: учебное пособие / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // ГБОУ ДПО «РМАПО». – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015. – 54 с.

Таким образом, по совокупности проведенных исследований, диссертационная работа имеет все признаки практической значимости.

Личный вклад автора

Диссертация является результатом самостоятельной работы автора. Диссертантом проанализирована научная литература, на основании чего сформулирована проблема, обоснована степень её разработанности, в соответствии с чем определены цель и задачи исследования, методологический подход к решению поставленных задач. Автором лично обследовано 132 больных пузырчаткой и 100 здоровых лиц, сформирована база данных. Проведены оценка степени тяжести больных пузырчаткой с использованием клинических индексов тяжести пузырчатки (ABSIS, PDAI, PVAS, DIDS), сбор материалов для выполнения цитологического, патоморфологического, иммунологических, генетических исследований. Автором проведен детальный анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, на основании которых подготовлен обзор литературы, проведена систематизация, интерпретация и статистический анализ собственных клинико-лабораторных и экспериментальных данных, сформулированы выводы, научная новизна и практическая значимость проведенных исследований.

Таким образом, вклад Абрамовой Т.В. является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах проведения исследования и анализе его результатов.

Полнота изложения диссертации в работах, опубликованных автором

Содержание работы соискателя Абрамовой Т.В. полностью раскрыты в 50 печатных работах, из которых 21 - опубликована в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки РФ. Материалы диссертации, доложенные на международных конференциях, в том числе на Всемирном конгрессе дерматовенерологов, получили положительную оценку.

Оценка структуры и содержания диссертационной работы

Представленная диссертационная работа Абрамовой Т.В. оформлена традиционно на 270 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», 3 глав, посвященных результатам клинических и лабораторных исследований, проведенных при обследовании больных пузырчаткой, экспериментальных исследований; заключения, выводов, списка литературы и приложения, иллюстрирована 36 таблицами и 48 рисунками.

Во введении полностью раскрыта актуальность проблемы, новизна и практическая значимость работы. Обзор литературы выполнен на высоком профессиональном уровне, хорошо структурирован, достаточно полно освещены представления о патогенетических механизмах пузырчатки, направлениях терапии с привлечением литературных источников последних лет.

В разделе «Материалы и методы» подробно охарактеризованы современные методы исследований, использованные в работе. Выбранные методы соответствуют задачам, поставленным в исследовании Абрамовой Т.В. Работа отличается большим разнообразием использованных автором методов исследования. В том числе, проводились: подсчет клинических индексов тяжести пузырчатки (PDAI, ABSIS, PVAS, DIDS), иммунологические (иммуноферментный анализ для определения антител к десмоглеинам 1 и 3 типов); молекулярно-генетические исследования (метод секвенирования по Сенгеру); исследования методом полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов в режиме реального времени; использовался метод аффинной хроматографии; а также проводились морфологическое и иммуногистохимическое исследования (реакция непрямой иммунофлюоресценции с антителами к IgA, IgM, IgG, PERP с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа).

Статистические анализы результатов, используемые в работе, проведены корректно, с привлечением разнообразных методов, в зависимости от данных, подлежащих обработке. В работе применены параметрические и непараметрические критерии достоверности адекватно характеру распределения переменных показателей, уместно использован корреляционный анализ. Это позволило автору работы наиболее полно интерпретировать полученные данные.

В главе «Результаты клинических исследований больных пузырчаткой» дана подробная характеристика больных пузырчаткой, включенных в исследование. Представлены результаты изучения диагностической значимости клинических индексов (индекса площади поражения при пузырчатке - PDAI, балльной оценки тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи - ABSIS, индекса активности вульгарной пузырчатки – PVAS) в оценке тяжести пузырчатки. Показатели индексов рассчитывались в соответствии с методикой подсчета каждого из индексов. Отражена корреляция индексов PDAI, ABSIS, PVAS и DIDS у больных пузырчаткой

В четвертой главе, посвященной результатам лабораторных исследований при обследовании больных пузырчаткой, описаны результаты цитологического, морфологического, иммунофлюоресцентного методов исследования, которые использовались при обследовании больных пузырчаткой. Особое место в главе занимают результаты, полученные при изучении белок-кодирующей последовательности экзонов гена PERP у больных пузырчаткой, оценена взаимосвязь полиморфизмов гена PERP с особенностями ее течения. С учетом результатов проведенной работы изложены результаты определения экспрессии белка PERP в коже больных пузырчаткой. На основании анализа экспрессии в коже больных пузырчаткой толл-подобного рецептора 7 типа методом ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени установлена его роль в патогенезе пузырчатки. Так же следует отметить описанные автором результаты изучения уровня

циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных пузырчаткой. Проанализирован уровень антител у больных с разными клиническими формами, а также с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести заболевания, определяющейся с использованием индекса площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index).

Все полученные результаты обсуждаются автором в контексте уже имеющихся научных представлений, проводится подробный анализ полученных данных, на основе которых сделаны заключения, значимые для развития современных научных представлений.

В главе «Результаты экспериментальных исследований», описаны серии экспериментальных работ, проведенные автором автора. Обращает внимание профессионализм при планировании и проведении экспериментов. Работы по созданию модели пузырчатки на лабораторных животных (неонатальных мышях инбредной линии BALB/c) выполнены с использованием достаточного количества серий экспериментов. Для разработки экспериментальной модели пузырчатки автором решены задачи по стандартизации условий воспроизведения клинических, морфологических, иммуногистохимических процессов, характерных для пузырчатки; определены дозы препаратов суммарных IgG и время, необходимое для развития признаков заболевания у животных.

Подробно представлены технологии, использованные при создании иммуносорбента для селективного удаления аутоантител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой. Полученные результаты по разработке и оценке *in vitro* и *in vivo* эффективности экспериментального способа элиминации антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой подтверждены несколькими методами, что не вызывает сомнений в высокой степени достоверности полученных результатов. Изложение экспериментального материала тщательно детализировано, представлено должным образом, наглядно, с использованием большого количества рисунков и таблиц.

В заключительной части работы автор анализирует полученные результаты и обобщает изложенный материал.

Выводы работы обоснованы, четко сформулированы и соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации изложены лаконично, четко и направлены на практическое внедрение полученных результатов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Внедрение практических рекомендаций в клиническую практику врачей-дерматовенерологов позволит улучшить диагностику буллезных дерматозов на ранних стадиях и своевременно назначать адекватную терапию, а определение степени тяжести у больных пузырчаткой – персонализировать терапию, и, тем самым, повысить качество оказываемой медицинской помощи.

Заключение

Таким образом, диссертация Абрамовой Татьяны Валерьевны «Пузырчатка: иммунопатогенез, диагностика и патогенетическая терапия (клинико–экспериментальное исследование)», выполненная при научном консультировании член-корреспондента РАН, д.м.н., профессора Кубанова Алексея Алексеевича, представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная проблема – разработан подход в патогенетической терапии больных пузырчаткой, что имеет важное значение для дерматовенерологии.

Диссертационная работа Абрамовой Т.В. «Пузырчатка: иммунопатогенез, диагностика и патогенетическая терапия (клинико–экспериментальное исследование)» по научной новизне, практической значимости полученных результатов и объему выполненных исследований полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении

ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации "О порядке присуждения ученых степеней" от 24 сентября 2013 г. №842 (с изменениями в редакциях постановлений Правительства от 02.08.2016г № 748, от 01.10.2018г. №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор Абрамова Татьяна Валерьевна заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.10. – Кожные и венерические болезни.

Диссертация и настоящий отзыв обсуждены и утверждены на заседании сотрудников кафедры кожных и венерических болезней ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, протокол № 2/7 от «29» 11 2019г.

Заведующий кафедрой кожных и венерических болезней
ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова
Минздрава России,
д.м.н., профессор



Перламутров Юрий Николаевич

14.01.10 – кожные и венерические болезни

Подпись Ю.Н. Перламутрова заверяю:

Ученый секретарь
ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова
Минздрава России,
д.м.н., профессор



Васюк Юрий Александрович

