

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора кафедры кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) Теплюк Наталии Павловны на диссертационную работу Абрамовой Татьяны Валерьевны «Пузырчатка: иммунопатогенез, диагностика и патогенетическая терапия (клинико–экспериментальное исследование)», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.10. – кожные и венерические болезни.

Актуальность темы исследования

Пузырчатка – аутоиммунное буллезное заболевание кожи и слизистых оболочек, обусловленное формированием антител к компонентам межклеточной склеивающей субстанции эпидермиса. Заболевание развивается преимущественно в трудоспособном возрасте и отличается тяжелым течением с угрозой для жизни больного.

Вопросы патогенеза пузырчатки в настоящее время активно изучаются. Однако исследования, направленные на изучение механизмов нарушения межклеточных связей, приводящих к развитию акантолиза у больных пузырчаткой, по-прежнему являются приоритетными в научном мире. Известно, что процессе акантолиза происходит разрушение межклеточных контактов кератиноцитов - десмосом, что приводит к формированию внутриэпидермальных пузырей. Участие белка PERP («p53 apoptosis effector related to PMP-22» – апоптотический эффектор белка p53, относящийся к периферическим миелиновым белкам-22) в формировании десмосом подтверждено на экспериментальных моделях, однако участие белка PERP в процессах, связанных с патогенезом пузырчатки, не исследовано. Изучение экспрессии гена *PERP* и его продукта белка PERP представляет собой большой научный интерес. Предполагается, что определение процессов, приводящих к

развитию акантолиза и потере межклеточных контактов вследствие разрушения десмосом, может лечь в основу разработки новых методов терапии больных пузырчаткой.

Процессы распознавания патогенов структурами врожденного иммунитета (паттерн-распознающими рецепторами) остаются малоизученными. Представляется перспективным исследование системы толл-подобных рецепторов (TLR) с анализом всех ее компонентов (изменение способности распознавать лиганды; определение влияния экспрессии и полиморфизма TLR на предрасположенность к различным, в том числе аутоиммунным, онкологическим заболеваниям; оценка экспрессии молекул, участвующих в трансдукции сигнала, факторов транскрипции и т.д.). Особый интерес представляет изучение индивидуальных путей, в которых используются сигнальные молекулы для каждого TLR, так как это должно расширить представления о реакциях организма на различные лиганды TLR. Подобные исследования позволят установить молекулярно-биологические дефекты нарушений в системе врожденного иммунитета, оценить их роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний и выявить мишени для терапевтического воздействия.

Основным методом лечения больных пузырчаткой является длительная терапия системными глюкокортикостероидными препаратами. Внедрение кортикостероидов в терапию больных акантолитической пузырчаткой позволило снизить показатели смертности. Однако длительное лечение иммуносупрессивными препаратами приводит к развитию тяжелых побочных эффектов и нежелательных явлений. В настоящее время имеется отечественный и зарубежный опыт применения экстракорпоральных методов (плазмафереза, экстракорпоральной фотохимиотерапии, иммуносорбции) в терапии больных аутоиммунными заболеваниями. Однако применение этих методов терапии требует одновременного назначения системных глюкокортикостероидов, к тому же неселективные методы экстракорпоральной терапии приводят к удалению жизненно необходимых иммуноглобулинов и иммунных комплексов. Перспективным является использование селективной иммуносорбции – метода

экстракорпоральной терапии, основанного на связывании и элиминации определенных веществ, участвующих в патогенезе пузырчатки.

Таким образом, изучение патогенеза пузырчатки и разработка новых методов терапии, позволяющих снизить дозы системных глюкокортикостероидных препаратов и уменьшить выраженность связанных с гормональной терапией нежелательных явлений, остаются крайне актуальными. Решению этих сложных вопросов посвящена рецензируемая диссертация.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе решаемые автором задачи полностью соответствуют поставленной им целям. Основные положения, выводы и практические рекомендации выполненной работы четко аргументированы, сформулированы кратко и полностью соответствуют теме исследования, статистически обоснованы и доказаны. Большим достоинством рассматриваемой диссертационной работы является единый комплексный подход к изучаемой проблеме, что, несомненно, будет способствовать повышению качества оказываемой медицинской помощи больным с потенциально летальным аутоиммунным дерматозом.

Работа выполнена на достаточном объеме клинического материала (132 больных пузырчаткой, 100 здоровых лиц, при проведении экспериментальных работ - 99 лабораторных животных), высоком методическом уровне с использованием современных и высокоинформативных методов лабораторных и инструментальных исследований (иммуоферментный анализ, иммуногистохимические, молекулярно-генетические методы исследования). Диссертантом проведено обследование 132 больных пузырчаткой с использованием клинических индексов для определения степени тяжести (индекса площади поражения при пузырчатке (PDAI), оценки тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи (ABSIS), индекса активности вульгарной пузырчатки (PVAS), n=528); лабораторных методов исследования: полуколичественное определение антител к десмоглеинам 1 и 3 типов в крови

119 больных пузырчаткой методом иммуноферментного анализа (n=238), исследование белок-кодирующей последовательности ДНК гена *PERP* у 49 больных пузырчаткой и 68 здоровых лиц методом секвенирования (n=117); количественное определение экспрессии структурного белка десмосом *PERP* в различных участках кожи (пузырь, участок кожи, прилегающий к пузырю, и видимо здоровая кожа) у 30 больных пузырчаткой и 10 здоровых лиц методом реакции непрямой иммунофлюоресценции (ИРИФ) с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа (n=51); определение экспрессии гена толл-подобного рецептора 7 типа (*TLR7*) в коже 38 больных пузырчаткой и 24 здоровых лиц методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (n=62); качественное определение фиксации иммуноглобулинов класса А, М, G в видимо непораженной коже 111 больных пузырчаткой в реакции непрямой иммунофлюоресценции с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа (n=333). Для разработки экспериментальной модели пузырчатки и оценки эффективности разработанного селективного иммуносорбента проведены: клиническое наблюдение 99 лабораторных животных; исследования аутопсийного материала (кожи) 99 мышей при патоморфологическом исследовании (n=99) и методом реакции непрямой иммунофлюоресценции с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа (n=99).

Полученные результаты оценки степени тяжести пузырчатки с использованием клинического индекса площади поражения при пузырчатке, определения уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типов, подтвержденные анализом данных клинико-лабораторного обследования 132 больных пузырчаткой, были успешно внедрены в практическую работу кожно-венерологических диспансеров, что подтверждается справками о внедрении в ДЗ БУЗ Вологодской области «Вологодский областной кожно-венерологический диспансер», ГБУ Рязанской области БУ «Областной клинический кожно-венерологический диспансер», ГБУЗ Астраханской области «Областной кожно-венерологический диспансер».

Статистическая обработка данных исследования полностью отвечает современным требованиям, что определяет достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций, сформулированных с представленной диссертации.

Выносимые на защиту научные положения, выводы, практические рекомендации закономерно вытекают из представленного материала, полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

Научная новизна и практическая значимость диссертации

Автором на достаточном клиническом материале показана, что клинические индексы: индекс площади поражения при пузырчатке, PDAI, Pemphigus Disease Area Index), балльная оценка тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи (ABSIS, Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score), индекс активности вульгарной пузырчатки (PVAS, Pemphigus Vulgaris Activity Score)) объективно отражают степень тяжести пузырчатки. Наиболее достоверным для использования является индекс клинический индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index), позволяющий дифференцировать больных в зависимости от степени тяжести заболевания.

Диссертантом изучены уровни циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных с разными клиническими формами пузырчатки и выявлена их взаимосвязь с тяжестью дерматоза, что имеет важное научное значение

Впервые выявлены молекулярно-генетические предикторы развития пузырчатки: гетерозиготных генотипов *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396tc) в 3-м экзоне гена *PERP*.

С использованием адекватных и информативных методов статистического анализа изучена экспрессия белка PERP в коже больных пузырчаткой, проведен сравнительный анализ с контрольной группой. Автором доказано снижение экспрессии структурного белка десмосом PERP в коже больных пузырчаткой, что позволило диссертанту обоснованно установить роль белка PERP в патогенезе пузырчатки.

Значимость для науки заключается в оценке экспрессии гена, кодирующего толл-подобный рецептор 7 типа в коже больных пузырчаткой, на основании чего автор делает заключение о повышении транскрипционной активности генома больных пузырчаткой и активации сигнальных путей, в которых принимает участие кодируемый геном *TLR7* белок.

Впервые созданы экспериментальные образцы твердофазного иммуносорбента для селективного удаления антител к десмоглеину 3 типа у больных пузырчаткой путем ковалентного связывания рекомбинантного десмоглеина 3 типа, полученного методом генной инженерии, с крупнозернистой агарозной матрицей. В серии экспериментов (*in vitro* и *in vivo*) автором доказана эффективность сорбции с использованием разработанного иммуносорбента. Для проведения экспериментальных работ в серии исследований получена модель пузырчатки на неонатальных мышах инбредной линии BALB/c путем введения препаратов IgG, полученных от больных пузырчаткой, что было подтверждено развитием у лабораторных животных признаков пузырчатки, определяемых клиническими, патоморфологическими и иммуногистохимическими методами исследования. В работе разработаны подходы к патогенетической терапии больных пузырчаткой, основанные на селективной сорбции антител к десмоглеину 3 типа, позволяющие проводить очистку крови больных пузырчаткой методом аффинной хроматографии, что позволит снизить дозы системных иммуносупрессивных препаратов и уменьшить риски развития инфекционных осложнений у больных пузырчаткой. Внедрение результатов работы в практическое здравоохранение позволит улучшить качество оказываемой медицинской помощи больным пузырчаткой.

Новизна исследования подтверждена патентами на изобретения Российской Федерации: патент № 2613718 «Способ моделирования пузырчатки у мышей методом введения иммуноглобулинов класса G», патент № 2622005 «Способ получения селективного иммуносорбента для удаления антител-IgG к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови больных пузырчаткой», патент №2627652 «Применение селективного иммуносорбента для удаления антител к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови у больных пузырчаткой».

Автором представлены и внедрены в клиническую практику рекомендации по использованию индекса площади поражения при пузырчатке (PDAI, Pemphigus Disease Area Index), метода иммуноферментного анализа с определением уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типа для оценки тяжести пузырчатки, что позволило совершенствовать диагностику.

Основные положения и выводы диссертационной работы развивают и дополняют теоретические положения о молекулярно-генетических механизмах развития пузырчатки, новых направлениях патогенетической терапии данного дерматоза, разработанных отечественными и зарубежными учеными, что открывает перспективы дальнейшего использования экстракорпоральных методов терапии с использованием селективных иммуносорбентов у больных с аутоиммунными заболеваниями.

Практическая значимость полученных автором результатов заключается в том, что представленные в диссертационном исследовании результаты обобщены и представлены автором в виде учебных пособий "Пузырчатка", "Дифференциальная диагностика буллезных дерматозов". Результаты и выводы диссертационной работы успешно внедрены в учебный процесс при обучении врачей-дерматовенерологов на циклах повышения квалификации кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ДПО Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России, ВПО ГБОУ ВПО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России.

Оценка структуры, содержания и оформления диссертации

Работа основана на анализе данных, полученных при обследовании 132 больных пузырчаткой, находившихся на лечении в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России.

Диссертационная работа построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, выводов и практических рекомендаций, списка литературы, приложения. Объем, включая рисунки и таблицы, составляет 270

машинописных страниц. Список литературы состоит из 340 источников, в том числе 102 отечественных и 238 иностранных авторов. Диссертация иллюстрирована 36 таблицами и 48 рисунками.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, отражена степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, изложена новизна и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, исходя из современных представлений о патогенезе, клинике, диагностике и лечении пузырчатки.

Первая глава посвящена литературному обзору. Она состоит из 8 подглав, в которых представлена подробная информация об этиологии, роли генетической предрасположенности, толл-подобных рецепторов в развитии пузырчатки, иммунопатогенезе, в том числе об аутоантителах, антигенах, патофизиологии акантолиза, клинической картине с описанием клинических индексов, используемых в оценке тяжести пузырчатки, диагностике, а также подробно освещены современные методы терапии больных пузырчаткой. Детально представлены исследования по экспериментальному моделированию пузырчатки. Приведенные данные современной научной литературы систематизированы и логически отражают актуальность проведенного исследования.

Во второй главе (материалы и методы исследования) для достижения цели и решения поставленных задач определен клинический материал исследования (группы больных пузырчаткой и лабораторных животных), приводятся критерии включения и исключения пациентов из исследования. Подробно описаны используемые методы и методологии исследования, показаны способы статистической обработки. Примененные в работе методы статистической обработки позволяют считать полученные диссертантом результаты исследований достоверными.

Третья глава посвящена результатам оценке результатов клинического обследования больных пузырчаткой. Подробно представлена характеристика групп пациентов, 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 клинического состояния больных пузырчаткой.

В четвертой главе автором приведены результаты лабораторных исследований, используемых при обследовании больных пузырчаткой: гистологических, иммунофлюоресцентных (с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа, с антителами к IgA, IgM, IgG, PERP) методов исследования. Также описаны результаты иммуноферментного анализа с определением уровня циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных с разными клиническими формами пузырчатки, с учетом степени тяжести заболевания; исследования методом полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов в режиме реального времени экспрессии толл-подобного рецептора 7 типа в коже больных пузырчаткой. В главе дана характеристика белок-кодирующей последовательности экзонов гена *PERP* у больных пузырчаткой и оценена возможная взаимосвязь полиморфизмов гена с клиническими особенностями заболевания; представлен анализ определения экспрессии белка PERP в коже больных пузырчаткой.

Пятую главу автор посвятил экспериментальным исследованиям по созданию модели пузырчатки на лабораторных животных - неонатальных мышцах линии BALB/c. Представлены результаты *in vitro* и *in vivo* по оценке эффективности селективного иммуносорбента для связывания и удаления IgG к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой.

Заключение диссертации отражает краткое содержание проделанной работы, включает обобщение результатов проведенного исследования, что помогает сформировать окончательное представление о диссертационной работе.

Выводы конкретны, соответствуют результатам и поставленным задачам исследования. Практические рекомендации логично вытекают из анализа полученных результатов исследования.

Автореферат соответствует основным положениям рукописи диссертации, написан четко и ясно, иллюстрирован таблицами и рисункам.

Область диссертационного исследования Абрамовой Т.В. соответствует паспорту специальности 14.01.10 Кожные и венерические болезни и областям исследований: п. №1 - Различные аспекты патогенеза кожных болезней (клинические, патоморфологические, генетические, иммунологические, серологические исследования); п. №3 - Современные клинические проявления кожных болезней, их роль в комплексной диагностике. Клинико-лабораторные параллели при кожных болезнях. Совершенствование диагностики дерматозов с использованием клинических, лабораторных и других методов исследования; п. №4 - Совершенствование лечения кожных заболеваний на основе последних исследований по их этиологии.

Автором по теме диссертации опубликовано 50 работ, из них 21 - в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации. Также автором оформлено 2 учебных пособия, получено 3 патента на изобретения. В публикациях полностью отображены результаты диссертационного исследования.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Абрамовой Т.В. «Пузырчатка: иммунопатогенез, диагностика и патогенетическая терапия (клинико-экспериментальное исследование)», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.10 - кожные и венерические болезни, является законченным научно-квалификационным трудом, в котором на основании проведенных автором исследований осуществлено решение актуальной научной проблемы - разработана научная концепция использования селективного твердофазного иммуносорбента для удаления аутоантител, значимых в патогенезе пузырчатки, что позволит уменьшить нежелательные явления вследствие длительной иммуносупрессивной

