

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента Уфимцевой Марины Анатольевны 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 диссертационного исследования

Фундаментальные и прикладные исследования в сфере медицины, в том числе и дерматовенерологии, направленные на разработку и внедрение в практику новых лечебных технологий на основе био- и генной инженерии, являются необходимыми для современной науки. Актуальные направления научных исследований в дерматовенерологии определены с позиций изучения неизвестных аспектов патогенеза, поиска новых терапевтических мишеней и разработки на этой основе способов ранней диагностики и патогенетической терапии больных тяжелыми дерматозами. К таким заболеваниям относится пузырчатка - аутоиммунное буллезное заболевание кожи и/или слизистых оболочек. Роль генетической предрасположенности в развитии пузырчатки на настоящий момент можно считать доказанной. Однако, имеющиеся данные указывают на возможное влияние полиморфизмов генов, кодирующих белки структурных компонентов десмосом, толл-подобные рецепторы и другие регуляторные молекулы, что, ввиду недостатка зарубежных и российских исследований, обуславливает особую значимость работы.

Проблемы совершенствования диагностики, определения степени тяжести пузырчатки имеют важное значение при подборе адекватной

персонализированной терапии больным тяжелым аутоиммунным дерматозом.

Основными методами терапии больных пузырчаткой, используемыми в настоящее время, являются иммуносупрессивные препараты. В то же время, длительная терапия большими дозами системных глюкокортикостероидов приводит к тяжелым побочным явлениям, в связи с чем разрабатываются новые патогенетически обоснованные методы и средства лечения больных акантолитической пузырчаткой, которые являются дополнением к базисной иммуносупрессивной терапии. Имеющиеся методы экстракорпоральной терапии являются неселективными, что усугубляет иммуносупрессию у больных пузырчаткой.

В диссертационной работе Абрамовой Т.В. изучены молекулярно-биологические механизмы развития пузырчатки на основании исследования рецепторов врожденного иммунитета, структурных компонентов десмосом. Кроме того, на основании проведенных исследований Абрамовой Т.В. разработан патогенетически обоснованный подход к терапии пузырчатки, основанный на селективной сорбции аутоантител.

В свете вышеизложенного, актуальность диссертационной работы Абрамовой Т.В. является несомненной.

Степень обоснованности и достоверности результатов проведенных исследований, научных положений, выводов и рекомендаций

Степень обоснованности научных положений и достоверности результатов проведенных исследований, научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации, определяется дизайном исследования, адекватным поставленной цели и решаемым задачам, наличием репрезентативной выборки больных пузырчаткой (132 больных пузырчаткой, составляющих основную группу), 100 здоровых лиц (контрольная группа) и лабораторных животных (99

новорожденных мышей линии BALB/c), которые использовались для получения экспериментальной модели пузырчатки и оценки эффективности селективного иммуносорбента; использованием современных методов исследования (клинических, морфологических, иммуногистохимических, молекулярно-генетических) и корректными методами статистической обработки данных, соответствующими критериям доказательной медицины, а также результатами аналитической оценки научных трудов российских и зарубежных ученых. В ходе работы диссертантом использовано 340 литературных источников, включающих опубликованные отечественные и зарубежные монографии, статьи из периодических изданий, которые послужили основой для обобщения накопленных знаний в исследуемой области и отправной точкой для выявления актуальных задач и выработки методологии их решения.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием современных высокоинформативных методов статистического компьютерного анализа. В связи с этим, сформулированные выводы диссертационного исследования являются доказанными, логичными и обоснованными.

Выносимые на защиту положения хорошо аргументированы, отражают содержание диссертации и полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

Научная новизна и практическая значимость

В диссертационной работе содержатся новые научные данные, значимые для развития фундаментальных представлений о молекулярно-генетических механизмах развития пузырчатки. Обоснована новая концепция о роли гена рецептора врожденного иммунитета - толл подобного рецептора 7 типа, структурного белка десмосом PEP (p53 apoptosis effector related to PMP-22) в патогенезе пузырчатки.

Установлены молекулярно-генетические предикторы развития пузырчатки, доказано увеличение частоты встречаемости гетерозиготных генотипов *C/G* (полиморфизм rs648802) и *T/C* (полиморфизм rs648396) в 3-м экзоне гена *PERP* у больных пузырчаткой. Впервые установлена взаимосвязь между однонуклеотидными полиморфизмами rs648802/rs648396 гена *PERP* и степенью тяжести пузырчатки.

Новизна работы также заключена в определении роли структурного белка десмосом *PERP* в нарушении межклеточной адгезии. При анализе результатов иммуногистохимического исследования биоптатов кожи больных пузырчаткой с использованием антител к *PERP* выявлено снижение экспрессии структурного белка десмосом *PERP* в коже больных пузырчаткой, а так же зависимость уровня экспрессии белка *PERP* от степени тяжести заболевания.

В коже больных пузырчаткой диссертантом обнаружена повышенная экспрессия гена, кодирующего толл-подобный рецептор 7 типа. Анализ результатов обследования больных пузырчаткой позволил автору выявить корреляционную связь между уровнем антител к десмоглеину 1 типа и уровнем экспрессии гена *TLR7*, что позволило диссертанту сделать вывод о роли рецептора врожденного иммунитета - *TLR7* в увеличении выработки аутоантител, участвующих в патогенезе пузырчатки.

В работе доказана связь уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типов со степенью тяжести пузырчатки, определяемой с использованием индекса площади поражения при пузырчатке - PDAI (Pemphigus Disease Area Index).

Кроме новых фактов, значимых для развития фундаментальных научных знаний, автором работы получены результаты, имеющие значение для практического применения.

В диссертационной работе изучена диагностическая значимость клинических индексов для оценки тяжести пузырчатки: 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). Определена высокая значимость индекса площади поражения при пузырчатке (PDAI) для определения степени тяжести пузырчатки, что позволило автору рекомендовать использованию данного индекса при диагностике тяжести акантолитической пузырчатки.

В серии экспериментов создана модель пузырчатки на лабораторных животных (новорожденных мышах) путем внутрибрюшинного введения препаратов суммарных антител класса G, полученных из пула сывороток больных пузырчаткой.

Разработан подход к патогенетической терапии больных пузырчаткой, основанный на селективной сорбции аутоантител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой, что позволит улучшить результаты лечения больных с данным дерматозом и уменьшить сроки их пребывания в стационаре. Автором представлены результаты исследований по оценке эффективности созданного иммуносорбента *in vitro* (методом иммуноферментного анализа с определением антител к десмоглеину 3 типа) и *in vivo* (на экспериментальной модели пузырчатки с использованием лабораторных животных - мышей инбредной линии BALB). Разработанные способы создания иммуносорбента и удаления антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой защищены автором патентами на изобретения Российской Федерации.

Степень обоснованности практических выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, подтверждается практическим использованием результатов исследования в клинической практике областных и республиканских кожно-венерологических диспансеров.

Результаты и выводы диссертационного исследования успешно внедрены обучение врачей-дерматовенерологов на циклах повышения квалификации кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, ГБОУ ВПО «Воронежский государственный

медицинский университет им. Н.Н.Бурденко» Минздрава России, кафедры дерматовенерологии с курсом косметологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России

Оценка структуры, содержания и оформления работы

Диссертационная работа Т.В. Абрамовой изложена на 270 страницах машинописного текста, оформлена в классическом стиле, состоит из введения, пяти глав, включающих обзор литературы, материал и методы исследования, описание собственных исследований с обсуждением полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Изложенный в диссертации материал соответствует поставленной цели и задачам исследования. Диссертация носит законченный характер, хорошо иллюстрирована, содержит 36 таблиц и 48 рисунков. Авторские научные положения обоснованы и четко сформулированы.

Основные положения диссертации опубликованы в 50 научных работах, в том числе 21 публикация - в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 2 учебных пособия. Кроме того, при проведении научных исследований автором получено три патента на изобретения.

В разделе «ВВЕДЕНИЕ» четко сформулирована и обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована цель исследования, обозначены задачи, указаны научная новизна, практическая значимость работы, методология и положения, выносимые на защиту.

В первой главе, посвященной литературному обзору, отображены эпидемиология, значение генетической предрасположенности в развитии пузырчатки, современные взгляды на патогенетические механизмы, клиническая картина, методы диагностики и терапии пузырчатки. Также в

данной главе описана история экспериментального моделирования пузырчатки.

Во второй главе дана общая характеристика 132 больных аутоиммунным дерматозом, которых находились на стационарном лечении в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России. Больные пузырчаткой разделены на группы в зависимости от клинической формы заболевания. Проведение экспериментальной части работы осуществлялось на 99 неонатальных мышцах линии BALB/c. Для разработки селективного иммуносорбента для элиминации антител к десмоглеину 3 типа у больных пузырчаткой использованы крупнозернистая агарозная матрица Affi-Gel-15 и рекомбинантный десмоглеин 3 типа (Dsg3), экспрессированный в клетках грибов Yeast. Детально описаны методы исследований, которые наглядно проиллюстрированы с помощью таблицы, и их подробное описание позволяет повторить используемые в работе методики другими исследовательскими коллективами. Показаны способы статистической обработки полученных результатов. Статистические методы использованы грамотно, выборка проверялась на нормальность распределения, использование параметрических и непараметрических критериев достоверности зависело от характера выборки.

Третья глава посвящена результатам собственных клинических исследований больных пузырчаткой. Подробно освещена клиническая характеристика больных пузырчаткой. Особое место уделено результатам сравнительного изучения диагностической значимости клинических индексов в оценке тяжести пузырчатки. Проведенный автором сравнительный анализ диагностической значимости клинических индексов (индекса площади поражения при пузырчатке - PDAI, балльной оценки тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи - ABSIS, индекса активности вульгарной пузырчатки - PVAS) для оценки степени тяжести больных пузырчаткой выявил, что наиболее информативным показателем является индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI)

В четвертой главе представлены результаты лабораторных исследований, используемых при обследовании больных пузырчаткой. Описаны результаты морфологического, иммунофлюоресцентного (с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии) методов исследования; изучения уровня циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных пузырчаткой методом иммуноферментного анализа. Детально изложены результаты определения полиморфизмов в 3-м экзоне гена *PERP*, в том числе в зависимости от степени тяжести, клинической формы заболевания, возраста больных. Подробно освещены результаты изучения экспрессии структурного белка десмосом *PERP* в коже больных пузырчаткой при иммунофлюоресцентном исследовании (выявлена зависимость экспрессии белка *PERP* от тяжести и длительности течения заболевания, снижение экспрессии данного белка у больных пузырчаткой в сравнении со здоровыми лицами). Автором представлены данные, полученные при исследовании экспрессии толл-подобного рецептора 7 типа в коже больных пузырчаткой методом полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов в режиме реального времени.

В пятой главе подробно описаны результаты экспериментальных исследований по созданию модели пузырчатки на лабораторных животных и разработке иммуносорбента для селективного связывания и удаления аутоантител - IgG к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой. При анализе эффективности иммуносорбента *in vitro* и *in vivo* автором доказаны высокие сорбционные характеристики созданного селективного иммуносорбента, полученного путем ковалентного связывания крупнозернистой агарозной матрицы с человеческим рекомбинантным десмоглеином 3 типа.

Заключение диссертации отображает краткое содержание проделанной автором работы. В данном разделе подведены итоги проведенных

исследований, из которых логично и четко сформулированы подходы к патогенетической терапии больных пузырчаткой.

Выводы диссертационной работы вытекают из результатов проделанной работы, конкретны и полностью соответствуют поставленным целям. Выводы имеют важное значение для практической дерматовенерологии.

Данная работа представляет собой исследование, выполненное на высоком уровне, которое отличает хороший стиль изложения и четкость формулируемых выводов.

В автореферате отражены основные положения диссертации, он написан четко и ясно, иллюстрирован таблицами и рисунками.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Абрамовой Татьяны Валерьевны «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 самостоятельной законченной научно-исследовательской работой, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение большой научной проблемы – выявлены новые молекулярно-генетические механизмы развития пузырчатки, а также научно обоснован и разработан подход к патогенетической терапии больных тяжелым аутоиммунным дерматозом, что позволит существенно улучшить качество оказываемой медицинской помощи.

Представленная диссертационная работа по актуальности, научной новизне, методическому уровню и практической значимости полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, утвержденного

постановлением Правительства Российской Федерации "О порядке присуждения ученых степеней" от 24 сентября 2013г. № 842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.10. – кожные и венерические болезни.

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук, доцент,
Заведующий кафедрой дерматовенерологии
и безопасности жизнедеятельности
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Марина Анатольевна Уфимцева

Адрес: 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3
E-mail: usma@usma.ru
Тел. +7(343)214-86-71
Веб-сайт: www.usma.ru

Подпись доктора медицинских наук, доцента Уфимцевой М.А. заверяю.



Подпись: *Уфимцевой М.А.*
Начальник управления кадровой политики
и правового обеспечения
ФГБОУ ВО «Уфимский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
С.В. Чупракова

24.12.2019