

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Махневой Наталии Викторовны на диссертационную работу Абрамовой Татьяны Валерьевны на тему «Пузырчатка: иммунопатогенез, диагностика и патогенетическая терапия (клинико–экспериментальное исследование)» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.10. – кожные и венерические болезни.

Актуальность избранной темы

Докторская диссертационная работа Абрамовой Т.В. посвящена сложным и актуальным проблемам дерматовенерологии - оптимизации диагностики и совершенствованию терапии пузырчатки на основе данных комплексных иммунологических и молекулярно-генетических исследований. Пузырчатка – аутоиммунное буллезное заболевание развивается преимущественно в трудоспособном возрасте и отличается тяжелым течением. Тяжесть заболевания, ограничения в профессиональной деятельности (часто переход на инвалидность), необходимость длительного приема иммуносупрессивных препаратов значительно уменьшают качество жизни больных.

Патогенетическую роль в развитии пузырчатки играют циркулирующие аутоантитела класса G, вызывающие разрушение десмосом и развитие акантолиза. Данные об уровне антител к структурным компонентам десмосом, в частности к десмоглинам 1 и 3 типов, у больных пузырчаткой носят противоречивый характер.

В последние годы предположено участие в формировании внутриэпидермальных пузырей не только десмоглеинов, но и других структурных компонентов десмосом, обеспечивающих связь между кератиноцитами. К настоящему времени выявлено более 40 белков, с

которыми связываются аутоантитела при пузырчатке. Однако механизмы нарушения конформационных свойств (диссоциации) междесмосомных адгезионных комплексов, и, как следствие, сепарации и последующего разрыва десмосом при пузырчатке, недостаточно изучены.

Развитие медицинской науки требует разработки и внедрения новых методов диагностики и терапии больных пузырчаткой, которые позволят проводить раннюю диагностику дерматоза, имеющего большое разнообразие клинических форм, сопровождающихся поражением кожи и/или слизистых оболочек.

Для оценки тяжести заболевания, эффективности проводимой терапии, сравнения результатов научных исследований, используются клинические индексы. Несмотря на большое количество предложенных за последние десятилетия индексов оценки тяжести пузырчатки, ни один из них не является общепризнанным.

Существует достаточное количество методов лечения пузырчатки, но большинство из них носят адьювантный (заместительный) характер, которые назначаются в сочетании с основной терапией, включающей системные глюкокортикостероидные препараты. Вместе с тем, активно ведется поиск новых терапевтических мишеней, совершенствование патогенетической терапии, направленной на элиминацию пемфигусных антител, что связано с большим количеством осложнений вследствие длительной иммуносупрессивной терапии, увеличением количества стероидорезистентных тяжелых форм пузырчатки.

Решению этих сложных вопросов посвящена рецензируемая диссертационная работа, что определяет актуальность избранной темы исследования.

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

Достоверность полученных Абрамовой Т.В. результатов работы подтверждается подробным и детальным анализом большого клинического материала и обширного комплекса клинических, лабораторных, инструментальных исследований.

Основные положения проведенной работы, ее выводы и практические рекомендации полностью соответствуют теме исследования, четко определены и сформулированы.

На основании проведенной исследовательской работы автором сделано 5 выводов. Выводы диссертации Абрамовой Т.В. основаны на обширном клинико-лабораторном и экспериментальном материале, полностью отражают результаты работы и соответствуют поставленным в исследовании задачам. Работа выполнена на высоком профессиональном уровне.

Практические рекомендации логичны. Базируются на статистически достоверных данных, полученных в ходе научного исследования.

Достоверность полученных результатов и новизна диссертационной работы

Достоверность полученных Абрамовой Т.В. результатов подтверждается подробным детальным анализом большого клинического материала (132 больных пузырчаткой и 100 человек контрольной выборки, при проведении экспериментальных работ - 99 лабораторных животных) и обширного комплекса исследований (клинических, морфологических, иммунологических, в т.ч. реакция непрямой иммунофлуоресценции с использованием *ex vivo* конфокального лазерного сканирующего микроскопа, иммуноферментный анализ; молекулярно-генетических (метод секвенирования, метод полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов в режиме реального времени)).

Инструменты статистического анализа при проведении статистической обработки полученных результатов формировались дифференцированно, в

зависимости от данных, подлежащих обработке. Так, данные рутинного клинико-лабораторного исследования обрабатывались стандартными методами с расчетом средней величины, среднего квадратического отклонения и ошибки средней с определением достоверности отличий по t-критерию Стьюдента, а также непараметрическими методами математической статистики. Для сравнительной оценки количественных признаков в несвязанных группах применяли U-критерий Манна-Уитни, тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов. Оценка корреляционных связей осуществлялась с помощью метода ранговой корреляции Спирмена. Достоверность отличий между частотами аллелей и генотипов гена *PERP* оценивалась с применением четырехпольной таблицы, двустороннего критерия χ^2 и показателя отношения шансов (Odds Ratio – OR). Расчет относительной экспрессии гена *TLR7* проводился по методу $\Delta\Delta Ct$ (2(-Delta Delta C(T) (2- $\Delta\Delta Ct$)). В связи с этим, сформулированные выводы диссертационного исследования являются обоснованными.

Новизна проделанной работы заключается в выявлении молекулярно-генетических предикторов развития пузырчатки: гетерозиготных генотипов C/G (полиморфизм rs648802) и T/C (полиморфизм rs648396tc) 3го экзона гена *PERP*. Впервые установлена взаимосвязь между однонуклеотидными полиморфизмами rs648802/rs648396 гена *PERP* и степенью тяжести пузырчатки.

Автором впервые проведена количественная оценка экспрессии структурного белка десмосом *PERP* в коже больных пузырчаткой, что позволило подтвердить роль белка *PERP* в развитии акантолиза и клинических проявлений заболевания у больных пузырчаткой.

Новизна работы так же заключается в установлении повышенной экспрессии гена, кодирующего толл-подобный рецептор 7 типа в коже больных пузырчаткой, свидетельствующей об изменении транскрипционной активности генома больных пузырчаткой и активации

сигнальных путей, в которых принимает участие кодируемый геном *TLR7* белок.

Впервые диссертантом определена связь между уровнем антител к десмоглеину 1 типа и уровнем экспрессии гена *TLR7* в коже больных пузырчаткой, что свидетельствует о наличии связи между клетками иммунной системы, относящимся к адаптивному иммунитету и клетками кожи, относящимся к важным структурам врожденного иммунитета.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

В работе проанализированы результаты комплексного обследования больных пузырчаткой и разработаны подходы к патогенетической терапии, что позволит персонализировать терапию и улучшить качество оказания медицинской помощи пациентам с данным дерматозом.

Результаты исследования, позволившие автору впервые выявить молекулярно-генетические предикторы развития пузырчатки в 3-м экзоне гена *PERP* (гетерозиготные генотипы *C/G*, полиморфизм rs648802, и *T/C*, полиморфизм rs648396tc), являются концептуальной основой для совершенствования медико-генетического обследования больных пузырчаткой и лиц с подозрением на наличие заболевания.

Автором впервые изучена значимость индекса площади поражения при пузырчатке (PDAI), балльной оценки тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи (ABSIS), индекса активности вульгарной пузырчатки (PVAS). Для объективной оценки степени тяжести пузырчатки предложено использовать клинический индекс площади поражения при пузырчатке (PDAI), позволяющий дифференцировать больных с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести.

На основании изучения уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типа методом иммуноферментного анализа разработаны и внедрены прогностические критерии тяжести пузырчатки.

Автором проведен большой объем экспериментальных исследований. Созданная модель пузырчатки на лабораторных животных (новорожденных мышях линии BALB/c) может использоваться для изучения иммунных механизмов патогенеза пузырчатки, проведения тестирования новых методов терапии.

Разработаны опытные образцы иммуносорбента на основе твердофазного носителя, ковалентно связанного с рекомбинантным человеческим десмоглеином 3 типа, для селективной сорбции антител к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови больных пузырчаткой. Проанализированы результаты экспериментальных работ по оценке его эффективности *in vitro* (при изучении степени сорбции антител из суммарных IgG, выделенных из пула сывороток) , *in vivo* (на экспериментальной модели пузырчатки), а так же при определении уровня антител класса G из крови больных пузырчаткой до и после иммуносорбции.

На основании полученных данных поданы заявки и получено 3 патента на изобретения Российской Федерации: «Способ моделирования пузырчатки у мышей методом введения иммуноглобулинов класса G» (№2613718); «Способ получения селективного иммуносорбента для удаления антител-IgG к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови больных пузырчаткой» (№ 2622005); «Применение селективного иммуносорбента для удаления антител к десмоглеину 3 типа из сыворотки крови у больных пузырчаткой» (№2627652).

Оценка структуры, содержания и оформления работы

Диссертационная работа Абрамовой Т.В. построена по традиционному плану, изложена на 270 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, глав, описывающих материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Диссертация носит законченный характер,

хорошо иллюстрирована, содержит 48 рисунков и 36 таблиц. Изложенный в диссертации материал соответствует поставленной цели и задачам исследования.

Во введении обоснована актуальность проблемы, из которой логично вытекает цель и поставленные задачи исследования. Научная работа посвящена изучению молекулярно-биологических механизмов развития пузырчатки на основании исследования рецепторов врожденного иммунитета, структурных компонентов десмосом и разработке патогенетически обоснованного подхода к терапии пузырчатки. Также во введении отражены научная новизна, практическая значимость работы, внедрение результатов исследования в практику, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов работы, доклады и публикации по теме диссертации, отражен личный вклад автора в проведенное исследование. Практическая значимость работы не вызывает сомнений.

В первой главе (обзор литературы) освещены основные сведения об эпидемиологии, роли генетической предрасположенности в развитии дерматоза, современной концепции, клинической картине, современных методах диагностики и терапии пузырчатки. Часть обзора литературы посвящена исследованиям, основанным на экспериментальном моделировании заболевания. Автор, основываясь на сведениях литературы, создает теоретическую предпосылку для собственного исследования.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» автором представлены дизайн исследования, материалы и методы исследований, в том числе методологии, использованные при получении экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных (новорожденных мышах линии BALB/C) и технологии, использованные при создании иммуносорбента для селективного удаления аутоантител к Dsg3 из крови больных пузырчаткой.

Для определения степени тяжести пузырчатки рассчитывались клинические индексы тяжести пузырчатки: PDAI, ABSIS, PVAS, DIDS у 132 больных пузырчаткой (n=528).

У 119 больных пузырчаткой проводилось определение уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типов методом иммуноферментного анализа.

Для исследования белок-кодирующей последовательности ДНК гена *PERP* у 49 больных пузырчаткой и 68 здоровых лиц использовался метод секвенирования по Сенгеру.

Определение в коже 30 больных пузырчаткой и 10 здоровых лиц экспрессии структурного белка десмосом *PERP* в различных участках кожи (пузырь, участок кожи, прилегающий к пузырю, и видимо здоровая кожа) проводилось иммуногистохимическим методом (реакция непрямой иммунофлюоресценции с антителами к *PERP* с использованием *ex vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии).

Для количественного изучения экспрессии гена *TLR7* в коже 38 больных пузырчаткой и 24 здоровых лиц использовался метод полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов в режиме реального времени.

Выделение и очистка суммарных иммуноглобулинов G из сывороток крови 78 больных пузырчаткой и 100 здоровых лиц проводились методом аффинной хроматографии на колонке с белком G – сефарозой.

С целью получения селективного твердофазного иммуносорбента для удаления антител к десмоглеину 3 типа из крови больных пузырчаткой рекомбинантный *Dsg3*, полученный методом генной инженерии, иммобилизовали путем ковалентного связывания с твердофазным носителем. Для определения эффективности селективной иммуносорбции *in vivo* использовано 43 мыши инбредной линии BALB/c, которым в экспериментах вводились препараты IgG, выделенные из пула сывороток крови больных пузырчаткой, содержащие антитела к десмоглеину 3 типа; больных пузырчаткой после прохождения через иммуносорбент; здоровых

лиц. В последующем у мышей проводился клинический осмотр, был получен аутопсийный материал для патоморфологического и иммуногистохимического исследований. Для оценки эффективности сорбции антител в эксперименте *in vitro* получение препаратов суммарных IgG проводилось методом иммунохроматографической очистки при прохождении растворов через иммуносорбент.

Описание результатов клинических, лабораторных, инструментальных, экспериментальных исследований выполнено с высокой степенью детализации, оформлено наглядно, достоверность экспериментальных результатов подтверждена в сериях независимых экспериментов.

В третьей главе "Результаты собственных клинических исследований больных пузырчаткой" автором детально охарактеризованы включенные в обследование 132 больных пузырчаткой. Контрольную группу составили 100 здоровых лиц.

Описаны результаты определения диагностической значимости клинических индексов в оценке тяжести пузырчатки, для чего рассчитывались значения индекса площади поражения при пузырчатке - PDAI, балльной оценки тяжести аутоиммунного буллезного заболевания кожи - ABSIS, индекса активности вульгарной пузырчатки - PVAS, дерматологического индекса тяжести заболевания - DIDS в соответствии с методикой подсчета каждого из индексов у 132 больных пузырчаткой.

В четвертой главе "Результаты лабораторных исследований при обследовании больных пузырчаткой" автор приводит результаты морфологического, иммунофлюоресцентного методов исследования при обследовании больных пузырчаткой.

Автором, на основании проведенного клинико-лабораторные исследования, описаны результаты изучения уровня циркулирующих антител к десмоглеинам 1 и 3 типов у больных с разными клиническими формами пузырчатки с учетом степени тяжести заболевания. Диссертантом

предложены критерии оценки степени тяжести пузырчатки на основании определения уровня антител к десмоглеинам 1 и 3 типа.

Отдельное внимание уделено изучению патогенетической роли гена *PERP* и кодируемого им структурного белка десмосом *PERP* в развитии пузырчатки, в том числе характеристике белок-кодирующей последовательности экзонов гена *PERP* у больных пузырчаткой и оценке возможной взаимосвязи полиморфизмов с клиническими особенностями заболевания, результатам определения экспрессии белка *PERP* в коже больных пузырчаткой. Автор отметил, что нуклеотидная замена в полиморфизмах rs648802/rs648396 3-го экзона гена *PERP* является значимой, приводит к снижению экспрессии структурного белка десмосом *PERP* и к нарушению функций десмосом по обеспечению межклеточной адгезии в коже.

В главе опубликованы результаты исследований по уровню экспрессии гена толл-подобного рецептора 7 типа (*TLR7*) в коже больных пузырчаткой. Результаты представленных данных показали, что у пациентов выявлено увеличение экспрессии гена по сравнению с контрольной группой. Абрамова Т.В. установила сильную корреляционную связь между показателями уровня антител к десмоглеину 1 типа и уровнем экспрессии гена *TLR7/PANK*, указывающую на роль *TLR7* в увеличении выработки пемфигусных аутоантител.

Пятая глава "Результаты экспериментальных исследований" посвящена экспериментам по созданию экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных (неонатальных мышах инбредной линии BALB/c). Подробно описаны эксперименты по созданию селективного иммуносорбента для удаления пемфигусных аутоантител из крови больных пузырчаткой, оценке его эффективности *in vitro* (методом иммуноферментного анализа) и *in vivo* (на лабораторных животных).

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

исследования, обобщены научная и практическая целесообразность использования селективной иммуносорбции в терапии больных пузырчаткой, на основании полученных результатов предложена концепция патогенеза пузырчатки.

Выводы диссертации и положения, выносимые на защиту, базируются на результатах работы, конкретны, аргументированы, соответствуют поставленным задачам исследования.

Практические рекомендации логично вытекают из анализа полученных результатов исследования и имеют важное значение для дерматовенерологии.

Основные положения диссертации опубликованы в 50 научных работах, 21 из них - в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации. В опубликованных работах и в автореферате полностью отражены основные положения диссертации.

Также автором получено 3 патента на изобретения, оформлено 2 учебных пособия.

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, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение большой научной проблемы - разработан подход к патогенетической терапии больных пузырчаткой на основании изучения иммунологических и молекулярно-генетических механизмов развития пузырчатки. Разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых можно квалифицировать как достижение в развитии

перспективного направления в дерматовенерологии, что полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, утвержденного Постановлением Правительства России "О порядке присуждения ученых степеней" от 24.09.2013г. №842 (ред. от 01.10.2018г. №1168), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 14.01.10. – кожные и венерические болезни.

Официальный оппонент:

Главный врач
ГБУЗ Московской области
«Московский областной клинический
кожно-венерологический диспансер»
Минздрава Московской области,
д.м.н., профессор

 Наталья Викторовна Махнева

«21» 11 _____ 2019г.

Адрес: 129110, Москва, Щепкина ул., 61/2, корпус 2.
Тел. +7(495)109-07-87
e-mail: info@mokvd.ru

Подпись доктора медицинских наук Н.В. Махневой заверяю

М. А. Земцова

Сергей Владимирович



В