

**Заключение диссертационного совета Д 001.022.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук**

Аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от «21» сентября 2021 г. № 146

О присуждении Марковой Ксении Львовне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Микровезикулы естественных киллеров как регуляторы функций эндотелия и участники патогенеза эндометриоза» по специальностям «14.03.03 – патологическая физиология» и «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология» принята к защите 25 мая 2021 г., протокол № 137 диссертационным советом Д 001.022.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12 (утвержден приказом Минобрнауки Российской Федерации №105/нк от 11.04.2012).

Соискатель Маркова Ксения Львовна, 1994 года рождения.

В 2015 году соискатель окончила факультет химической и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», получив степень бакалавра по направлению подготовки – «Биотехнология». В 2017 году - биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», получив степень магистра биологии. Диссертация была выполнена в лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-

исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», где с 2015 года и по настоящее время соискатель работает младшим научным сотрудником.

Научные руководители:

1. Сельков Сергей Алексеевич, заслуженный деятель наук РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»;
2. Соколов Дмитрий Игоревич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта».

Официальные оппоненты:

1. Головкин Алексей Сергеевич, доктор медицинских наук, Руководитель группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации;
2. Кудряшова Анна Владимировна, доктор биологических наук, Ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения "Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург), в своем положительном заключении, подписанным Балдуевой Ириной Александровной, доктором медицинских

наук, и утвержденным Щербаковым Александром Михайловичем, доктором медицинских наук, профессором, заместителем директора, указала, что диссертация является самостоятельной законченной квалификационной научно-исследовательской работой, в которой содержится решение важной и актуальной задачи – оценка роли микровезикул естественных киллеров в регуляции функций эндотелия и вовлеченность в патогенез эндометриоза.

Соискатель имеет 80 печатных работ, в том числе по теме диссертации - 1 патент, 1 свидетельство о регистрации программы для ЭВМ, 7 статей и 12 тезисов докладов – общим объемом 6,2 условных печатных листов, авторский вклад составил 80%. Все статьи по теме диссертации опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus и включенных в перечень ВАК для опубликования основных научных результатов диссертаций. Диссертация не содержит некорректных заимствований.

Наиболее значимые работы:

1. Маркова К.Л. Микровезикулы лейкоцитарного происхождения / К.Л. Маркова, И.Ю. Коган, А.Р. Шевелева, В.А. Михайлова, С.А. Сельков, Д.И. Соколов // Вестник РАМН. -2018. - Т. 73. № 6.- С. 378-388.
2. Sokolov D.I. Phenotypic and functional characteristics of microvesicles produced by natural killer cells / D.I. Sokolov, K.L. Markova, V.A. Mikhailova, L.P. Vyazmina, Yu.P. Milyutina, A.R. Kozyreva, A.A. Zhdanova, D.A. Malygina, K.V. Onokhin, A.N. Ivanova, A.V. Korenevsky, S.A. Selkov // Medical Immunology (Russia). – 2019. – Vol. 21, № 4. – P. 669-688.
3. Markova K.L. Microvesicles produced by natural killer cells of the NK-92 cell line affect the phenotype and functions of endothelial cells of the EA.Hy926 cell line / K.L. Markova, V.A. Mikhailova, A.V. Korenevsky, Yu.P. Milyutina, V.V. Rodygina, E.P. Aleksandrova, A.S. Markov, O.A. Balabas, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // Medical Immunology (Russia). – 2020. – Vol. 22, № 2. – P. 249-268.
4. Markova K.L. Methodological Approaches to Assessing the Size and Morphology of Microvesicles of Cell Lines / K.L. Markova, A.R. Kozyreva, A.A. Gorshkova, E.P. Aleksandrova, M.E. Berezkina, V.A. Mikhailova, A.N. Ivanova,

S.Yu. Kaputkina, K. V. Onokhin, K. A. Benken, S. A. Sel'kov, D.I. Sokolov // Bull Exp Biol Med. – 2020. – Vol.169. – P.586–595.

5. Markova K.L. Microvesicles Produced by Natural Killer Cells Regulate the Formation of Blood Vessels / K.L. Markova, A.R. Kozyreva, A.A. Gorshkova, D.I. Sokolov, S.A. Selkov // Bull Exp Biol Med. – 2020. – Vol.170. – P.123–127.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

1. Николаевой Марины Аркадьевны, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова».

2. Миндукшева Игоря Викторовича, доктора биологических наук, главного научного сотрудника, заведующего лабораторией «Клеточные механизмы гомеостаза крови» ФГБУН Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

3. Талаева Владимира Юрьевича, доктора медицинских наук, заведующего лабораторией клеточной иммунологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора.

4. Коваленко Елены Ивановны, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Все отзывы положительные, принципиальных критических замечаний и вопросов не содержат.

В отзыве Коваленко Елены Ивановны принципиальных замечаний к работе нет, однако в порядке научной дискуссии автору заданы вопросы и сделан ряд комментариев:

1. С чем связан выбор IL-1 $\beta$  в качестве основного активирующего агента клеток NK-92, с учетом того, что из цитокинов, оказывающих активирующее

влияние на NK-клетки в первые фазы воспаления, наиболее известны IL-12, IL-18?

2. В работе получены весьма интересные данные, в частности, по составу микровезикул клеток NK-92. Можно, однако, было бы более подробно обсудить некоторые вопросы, в частности, возможные причины более выраженной экспрессии CD11b и менее выраженной экспрессии CD18, молекул, формирующих гетеродимеры, на поверхности микровезикул по сравнению с исходными клетками.

3. Могут ли микровезикулы сорбировать белки из внеклеточного пространства и тем самым изменять свои модулирующие свойства?

4. Картина анализируемой в работе возможности наличия цитотоксической активности микровезикул клеток NK-92 (по отношению к клеткам K562 и EA.hy926) была бы более полной, если бы автор использовал несколько альтернативных методов для оценки цитотоксичности/апоптоза.

Диссертант дал исчерпывающие ответы на эти комментарии.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается наличием публикаций в соответствующей сфере исследований, широкой известностью своими достижениями в рассматриваемой области медико-биологических наук.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**разработана новая научная концепция** о том, что микровезикулы естественных киллеров являются активными участниками межклеточных взаимодействий и способны оказывать влияние на изменение функциональных и фенотипических характеристик эндотелиальных клеток; **предложена оригинальная научная гипотеза** о возможном механизме реализации функциональной активности естественных киллеров при помощи продуцируемых ими микровезикул, а также о вовлеченности микровезикул естественных киллеров в патогенез эндометриоза; **доказано** влияние микровезикул NK-клеток в отношении жизнеспособности эндотелиальных

клеток, их пролиферативной и миграционной активности, изменении фенотипа, формирования капилляроподобных структур и передачи несвойственных для них белков в условиях *in vitro*; **изучены** фенотипические характеристики микровезикул лейкоцитарного происхождения, выделенные из периферической крови здоровых женщин и женщин с эндометриозом; **введены** новые представления о функциях микровезикул естественных киллеров в организме человека; **сделаны заключения**, значимые для дальнейших исследований в области регуляции функций эндотелиальных клеток, в частности процесса ангиогенеза, микровезикулами естественных киллеров, а также раскрытия механизмов патогенеза эндометриоза.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

**доказана** регуляторная роль микровезикул естественных киллеров в отношении функций эндотелия и установлено их участие в патогенезе эндометриоза; **применительно к проблематике диссертации результативно** использован комплекс высокоточных молекулярно-биологических, иммунологических и статистических методов; **изучены** морфометрические, фенотипические характеристики микровезикул интактных и активированных НК-клеток; **приведены** данные о том, что микровезикулы естественных киллеров содержат в своем составе цитотоксические белки гранзим В и перфорин, что указывает на возможность микровезикул обладать цитотоксическим потенциалом; **изложены** доказательства того, что микровезикулы естественных киллеров изменяют фенотипические и функциональные характеристики эндотелиальных клеток, переносят в них мембранный белок CD45 и цитотоксический белок гранзим В, способствуют активации в них каспаз, стимулируют неразветвляющийся тип ангиогенеза, что подтверждает тот факт, что микровезикулы способны изменять поведение эндотелиальных клеток; **получены сведения** о различиях фенотипических характеристик микровезикул плазмы периферической крови женщин с наружным генитальным эндометриозом I и II степени и микровезикул здоровых женщин.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**Разработана и внедрена** программа для ЭВМ, предназначенная для автоматического анализа изображения клеточных культур, полученных в ходе исследования миграционной активности клеток и метод криоконсервации плазмы периферической крови с целью дальнейшего выделения микровезикул и изучения их фенотипических характеристик; **определены** перспективы дальнейшего исследования иммунорегуляторных свойств микровезикул естественных киллеров в норме и при патологии; **предложено** использовать материалы настоящей работы для дальнейшего исследования иммунопатогенеза эндометриоза и разработки методов его диагностики.

**Оценка достоверности результатов выявила, что:**

**результаты экспериментальных работ** получены на современном, высокоточном, сертифицированном оборудовании, с использованием методов, оптимально подобранных для решения поставленных задач; воспроизводимость результатов показана в достаточном числе независимых экспериментов; **теории и идеи**, изложенные в работе, основаны на детальном анализе экспериментальных данных, полученных автором, их сопоставлении с опубликованными ранее результатами отечественных и мировых исследований, обобщении и систематизации полученных результатов в сочетании с пониманием фундаментальных положений патологической физиологии, цитологии и иммунологии; **установлено** качественное соответствие ряда полученных данных результатам, представленным в независимых литературных источниках по данной тематике; **использованы** адекватные современные методы сбора и статистической обработки полученной информации.

**Личный вклад соискателя** состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования: формулировке рабочей гипотезы, поиске и анализе научной литературы; в планировании и проведении экспериментальных исследований: культивировании клеточных линий,

выделении микровезикул естественных киллеров, изучении их морфометрических, фенотипических и функциональных характеристик, оценке их роли в регуляции функций эндотелия, исследовании фенотипа микровезикул лейкоцитарного происхождения здоровых женщин (20 человек) и женщин с эндометриозом (97 человек). Автор лично проводил статистическую обработку и интерпретацию полученных данных, формулировал выводы; участвовал в подготовке публикаций по выполненной работе и апробации ее результатов на всероссийских и международных конференциях.

На заседании 21 сентября 2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Марковой Ксении Львовне ученую степень кандидата биологических наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 26 человек, из них 14 докторов наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология и 3 доктора наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, участвовавших в заседании, из 33 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 3 человека, проголосовали: За – 26, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель диссертационного совета

д.б.н., чл.- корр. РАН



Шамова О.В.

Ученый секретарь диссертационного совета

д.б.н., доцент

Алешина Г.М.

21.09.2021 г.