

Министерство здравоохранения
Российской Федерации
Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Ивановский научно-исследовательский
институт материнства и детства
им. В.Н. Городкова»
153045, г. Иваново, ул. Победы, д.20
тел.: (4932) 33-62-63; факс: (4932) 33-62-56

«09» 11 2023г. № 1136

«Утверждаю»
Директор
ФГБУ "Ив НИИ М и Д
им. В.Н. Городкова»

Минздрава России, д.м.н., проф.
А.И. Малышкина

« 9 » 11 2023г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Михайловой Валентины Анатольевны на тему «Естественные киллеры: взаимодействие с клетками трофобласта и роль в патогенезе привычного невынашивания беременности», на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология, 3.2.7 Иммунология.

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа В.А. Михайловой на тему: «Естественные киллеры: взаимодействие с клетками трофобласта и роль в патогенезе привычного невынашивания беременности», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям: 3.3.3. Патологическая физиология, 3.2.7. Иммунология, посвящена исследованию роли клеток естественных киллеров (НК-клеток) в развитии физиологической беременности и выявлению нарушений их функциональной активности в патогенезе распространенной репродуктивной патологии – привычного невынашивания беременности (ПНБ).

Исследуемая репродуктивная патология представляет собой мультифакторное заболевание, в патогенезе которого могут присутствовать анатомические, генетические, эндокринные и иммунологические компоненты. Больше, чем в половине клинических случаев этиология ПНБ остается неизвестной, при этом значимой считают роль иммунной регуляции взаимодействия организма женщины с клетками плодового происхождения - трофобластом. К иммунным факторам риска развития ПНБ относят наличие в сыворотке аутоиммунных антител, в частности антифосфолипидных, антинуклеарных антител, антител к хорионическому гонадотропину.

Описана связь повышения содержания активированных макрофагов, а также продуцируемых иммунными клетками провоспалительных цитокинов TNF α , IFN γ , антагониста рецептора IL-1, с развитием ПНБ. Среди иммунных факторов патогенеза ПНБ выделяют повышенное содержание НК-клеток в децидуальной оболочке матки.

В настоящее время активно изучают изменения метаболизма и активности НК-клеток, происходящие при физиологической беременности. Предполагают, что нарушение функциональной трансформации НК-клеток в регуляторные клетки и сохранение ими цитотоксического потенциала способствует нарушению имплантации и инвазии бластоцисты. Однако, исследования, касающиеся функциональной активности НК-клеток и изменения их фенотипа при ПНБ, не позволяют однозначно установить связь между изменением характеристик НК-клеток и риском развития потери беременности. Экспериментальные исследования в этой области, выполненные на модельных животных, демонстрируют противоречивые результаты. Актуальна разработка подхода для определения функционального статуса НК-клеток у пациенток с ПНБ, которая могла бы использоваться при выборе тактики лечения. Кроме того, представляет безусловный интерес исследования, касающиеся общих закономерностей процесса формирования популяции НК-клеток матки, исследования ее гетерогенности и функциональных особенностей. Актуально исследование влияния клеток трофобласта на НК-клетки в связи с близким расположением этих клеток в децидуальной оболочке и возможностью их взаимодействия.

Таким образом, диссертационная работа Михайловой В.А., посвященная исследованию изменений, которые претерпевают НК-клетки в присутствии клеток трофобласта, и определению вклада взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта в патогенезе ПНБ, актуальна как с точки зрения получения фундаментальных знаний о биологии НК-клеток, так и в практическом плане – для персонализации диагностики и терапии ПНБ.

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

В диссертационной работе Михайловой В.А. впервые продемонстрировано, что клетки трофобласта оказывают выраженное влияние на НК-клетки, модифицируя фенотип НК-клеток, стимулируя приобретение ими характеристик децидуальных регуляторных НК-клеток, способствуя подавлению экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих

дифференцировку зрелых NK-клеток, а также других лимфоцитов врожденного иммунитета.

Впервые проведено детальное исследование влияния растворимых факторов, секретируемых клетками ворсин хориона, а также влияния отдельных цитокинов на систему контактного взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта *in vitro* с использованием стандартных клеточных линий NK-92 и JEG-3. Примененный подход позволил установить непосредственные эффекты, оказываемые растворимыми факторами, на фенотип NK-клеток, их адгезионную и трансмиграционную функции, способность к образованию мембранных микровезикул, содержание цитотоксических белков и цитотоксическую активность.

В работе впервые сопоставлены результаты, полученные при исследовании клеточной линии NK-92, с данными, установленными для NK-клеток периферической крови, а также оценены эффекты факторов, секретируемых клетками ворсин хориона в первом и третьем триместрах беременности. С использованием разработанной в диссертационной работе модели впервые показано, что клетки трофобласта могут подавлять пролиферацию NK-клеток периферической крови. Впервые установлены закономерности изменения пролиферативной и цитотоксической активности NK-клеток периферической крови в ходе менструального цикла и в первом триместре беременности. Показано, что наступление беременности ассоциировано с повышением пролиферации NK-клеток и снижением их цитотоксичности.

Впервые исследована пролиферативная активность NK-клеток периферической крови и их субпопуляций у пациенток с ПНБ, что позволило выявить в секреторной фазе менструального цикла снижение экспрессии фенотипического рецептора CD56, маркирующего регуляторный фенотип NK-клеток.

В работе были получены новые данные о механизме реализации цитотоксической активности NK-клеток, включающей помимо экспрессии проапоптотических рецепторов и белков, а также белка серпина В9, инактивирующего гранзим В, синтез клетками микровезикул, содержащих гранзим В. Впервые установлено наличие белка серпина В9 в клетках трофобласта. Впервые продемонстрировано, что NK-клетки периферической крови пациенток с ПНБ обладают повышенной цитотоксической активностью в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 *in vitro*. Полученные результаты легли в основу предложенного в работе диагностического подхода для оценки риска развития невынашивания беременности у пациенток с ПНБ.

Значимость полученных результатов для науки и практики

В диссертационной работе получены экспериментальные данные, касающиеся изменений, претерпеваемых НК-клетками при взаимодействии с клетками трофобласта. Описание цитотоксической функции НК-клеток дополнены исследованием ранее неизвестного компонента дистантного взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта – мембранных микровезикул. Результаты, полученные с использованием клеточных линий, верифицированы данными, полученными на НК-клетках периферической крови небеременных и беременных женщин, пациенток с ПНБ, а также результатами, полученными с использованием секреторных факторов ворсин хориона первого и третьего триместра беременности. На основании результатов работы предложена концепция о наличии активного контроля функций НК-клеток со стороны клеток трофобласта, включающей регуляцию миграции НК-клеток, их пролиферации, фенотипа и цитотоксической активности. Результаты работы свидетельствуют о необходимости дополнения исследования цитотоксической функции НК-клеток определением их пролиферативной и секреторной активности, продукции микровезикул, для комплексной оценки функционального статуса. В целом, результаты диссертационной работы представляются значимыми с позиции новых знаний о непосредственном участии клеток-мишеней в регуляции функциональной активности НК-клеток и их трансдифференцировки в другие лимфоидные клетки врожденного иммунитета. Полученные результаты позволили обосновать диагностическую ценность определения цитотоксической активности НК-клеток у пациенток с ПНБ для прогнозирования успешности течения беременности и выбора тактики ведения пациентки.

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

В диссертации Михайловой В.А. выполнен адекватный математическо-статистический анализ полученных данных, что определяет высокую степень достоверности полученных результатов. Сопутствующие элементы описания и статистический анализ выполнены автором лично, при этом использованы пакеты программ Statistica 10 и GraphPad Prism 8.

Выводы, сформулированные в диссертации, основаны на анализе достаточного количества наблюдений и аргументировано доказываются соответствующими исследованиями. Сформулированные в работе

практические рекомендации обоснованы полученными экспериментальными данными.

Результаты исследований, включенных в диссертацию, доложены и обсуждены на многих международных и всероссийских научных конференциях и конгрессах, в частности, на:

1. XVII, XVIII, XIX, XX Всероссийских научно-образовательных форумах «Мать и дитя» (Москва, 2016г., 2017г., 2018г., 2019г.),
2. XVI, XVII Всероссийских научных форумах с международным участием им. акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017г., 2023г.),
3. 5-ом Европейском конгрессе по иммунологии (Амстердам, Нидерланды, 2018г.),
4. I, II, IV Национальных конгрессах с международным участием «Лабораторные Технологии в Репродуктивной Медицине и Неонатологии (ЛАБРИН)» (Москва, 2019г., 2020г., 2022г.),
5. Конференции «Новые концепции врожденного иммунитета» (Тюбинген, Германия, 2019г.),
6. 17-ом Международном конгрессе по иммунологии (Пекин, Китай, 2019г.),
7. II, III Общероссийских научно-практических конференциях для акушеров-гинекологов «Оттовские чтения» (Санкт-Петербург, 2020г., 2021г.),
8. Конференциях с международным участием «Здоровье женщины, плода, новорожденного» (Санкт-Петербург, 2021г., 2022г.)
9. IX Всероссийской конференции «Иммунология репродукции» в рамках Всероссийского научно-образовательного форума «XXII Мать и дитя» (Санкт-Петербург, 2021г.).

Практические рекомендации, сформулированные по результатам работы, подкреплены патентами РФ.

Тема диссертационной работы Михайловой В.А. полностью отвечает требованиям, предъявляемым к работам по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология (п. 1, 2) и 3.2.7. Иммунология (п.4).

Содержание диссертационной работы и ее оформление

Диссертационная работы изложена на 367 страницах, построена по традиционному плану и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, шесть глав с результатами исследований, обсуждение, заключение, выводы и практические рекомендации, список сокращений и список использованной литературы.

Работа выполнена на современном методическом уровне, содержит 12 таблиц и проиллюстрирована 111 рисунками, список литературы содержит 778 источников. По теме диссертации опубликовано 24 научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также входящих в международные реферативные базы, при этом 10 из статей опубликованы в журналах первого и второго квартилей. Материалы исследования вошли в ряд учебных пособий для специалистов в области биологии и медицины. Опубликованные работы отражают основные этапы диссертационного исследования.

Во введении обоснована актуальность исследования, изложена степень разработанности темы, поставлены цель и задачи работы, отражена научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость. Сформулированная цель исследования соответствует названию диссертационной работы и шифрам заявленных научных специальностей. Задачи работы соответствуют поставленной цели. Во введении сформулированы положения, выносимые на защиту, описана методология исследования, степень достоверности, апробация и реализация результатов исследования.

Первую главу диссертации составляет обзор литературы, состоящий из трех подглав, подробно описывающих фенотип и функции НК-клеток, регуляцию дифференцировки НК-клеток и особенности популяции НК-клеток матки.

В главе, посвященной материалам и методам, использованным в работе, подробно изложена характеристика клеточных линий, материала, полученного от пациентов, а также подробное описание примененных современных молекулярно-биологических и иммунологических методов. В главе приведены схемы, иллюстрирующие дизайн каждого из этапов исследования, что способствует цельному восприятию работы. Совместно выполненные этапы работы отмечены в тексте благодарностью автора соисполнителям.

В главах с третьей по восьмую подробно представлены результаты выполненных исследований. В работе приведены данные, полученные при оценке влияния клеток трофобласта на фенотип и функции трансмиграции НК-клеток в присутствии цитокинов и растворимых факторов ворсин хориона (глава 3), при определении параметров дифференцировки НК-клеток в присутствии трофобласта (глава 4), при оценке пролиферативной активности НК-клеток периферической крови при физиологической беременности и ПНБ (глава 5). В работе представлены результаты исследования формирования НК-клетками микровезикул и секреции цитокинов (глава 6), определения механизмов цитотоксической активности

НК-клеток в присутствии трофобласта (глава 7) и оценки изменений цитотоксической функции НК-клеток периферической крови у пациентов с ПНБ (глава 8).

Глава «Обсуждение» представляет собой глубокий анализ результатов, полученных в диссертационной работе, и их сопоставление с данными литературы. Обсуждение проиллюстрировано схемами предполагаемых механизмов взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта, построенными на основании результатов работы. Основные итоги проведенных исследований представлены в главе «Заключение», снабженной общей схемой взаимного влияния НК-клеток и клеток трофобласта при физиологической беременности и при ПНБ.

На основании проведенных исследований и полученных результатов сформулировано 10 выводов, которые соответствуют поставленной цели и задачам. Основные положения диссертации отражены в автореферате.

Представленная диссертационная работа Михайловой В.А. в целом заслуживает высокой положительной оценки как комплексное исследование взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта, выполненная на современном уровне и имеющая большое научное и практическое значение.

Внедрение основных результатов исследования и конкретные рекомендации по дальнейшему использованию результатов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы внедрены в научную деятельность ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта», ФГУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, а также использованы в качестве материалов курсов по общей и клинической иммунологии, и иммунологии репродукции на кафедре иммунологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им.И.П.Павлова Минздрава России. Результаты диссертационной работы используются в практике отдела гинекологии и эндокринологии, отдела репродуктологии, а также консультативно-диагностического отделения ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта», а также применяются в работе Родильного дома №6 им.проф.В.Ф.Снегирева.

Результаты исследования могут быть внедрены в работу акушерских стационаров и клиник, специализирующихся на оказании медицинской помощи с применением вспомогательных репродуктивных технологий. Полученные автором результаты о роли НК-клеток в патогенезе ПНБ могут иметь значение для реализации персонализированного подхода в мониторинге лечения пациенток с ПНБ.

Дальнейшая разработка темы в плане оценки эффективности планируемой к применению медикаментозной терапии в моделях *in vitro* позволяет ожидать, что будут разработаны подходы к патогенетически обоснованному лечению репродуктивных патологий, в том числе ПНБ.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. В порядке научной дискуссии хотелось бы узнать мнение автора по следующим вопросам:

Каков вклад отмеченного в работе формирования НК-клетками микровезикул, содержащих цитотоксические белки, в цитотоксическую активность НК-клеток?

Какие автор видит перспективы дальнейших исследований в области регуляции межклеточных взаимодействий НК-клеток с трофобластом?

Какие автор видит перспективы для практического использования полученных данных?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Михайловой Валентины Анатольевны на тему: «Естественные киллеры: взаимодействие с клетками трофобласта и роль в патогенезе привычного невынашивания беременности», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология, 3.2.7. Иммунология, является завершенным самостоятельным научно-квалификационным исследованием по актуальной теме, результаты которого можно квалифицировать как научное достижение, имеющее существенное значение для современной патофизиологии, иммунологии и акушерства, содержащее решение важной научной проблемы по определению механизмов регуляции взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта и изменений функционального статуса НК-клеток, способствующих развитию ПНБ.

По актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований, теоретической и практической значимости, достоверности результатов и обоснованности выводов, диссертационная работа Михайловой Валентины Анатольевны полностью соответствует требованиям п.9 и п.14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», от 24.09.2013 №842 (с изменениями от 01.10.2018 г. №1168, от 20.03.2021 г. №426), утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой

степени доктора биологических наук по специальностям: 3.3.3. Патологическая физиология, 3.2.7. Иммунология.

Отзыв заслушан, обсужден, и одобрен на заседании лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Ив НИИ МиД им. В.Н. Городкова» Минздрава России, протокол №7 от 23.10.2023.

Заведующая лабораторией клинической иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения "Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова Министерства здравоохранения Российской Федерации" д-р мед. наук (специальность 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология), профессор, заслуженный врач РФ

Сотникова Н.Ю.

Контактная информация лица, составившего отзыв:

Адрес: 153045, г. Иваново, ул. Победы, д.20,
телефоны +7(4932)33-69-28 (раб),
+7(906)619-36-53 (моб.),
e-mail: niimid.immune@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «Ив НИИ МиД им. В.Н. Городкова» Минздрава России)

Адрес: 153045, Российская Федерация, г. Иваново, ул. Победы, д. 20,
тел. (4932) 33-62-63; факс: (4932) 33-62-56,
e-mail: ivniimid@inbox.ru, сайт: www.niimid.ru

