

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Самойлович Марины Платоновны на диссертационную работу Михайловой Валентины Анатольевны на тему: «ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТА И РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по научным специальностям: 3.3.3. Патологическая физиология и 3.2.7. Иммунология

Актуальность темы исследования

Физиологическое протекание беременности во многом определяется нормальным функционированием иммунологических механизмов, которые обеспечивают формирование толерантности материнского организма в отношении развивающегося плода, а также сложный комплекс морфо-функциональных взаимодействий этих двух организмов, изменяющийся на протяжении беременности. Естественные киллеры (NK), которые представляют собой важнейший клеточный компонент системы врожденного иммунитета и одновременно связующее звено между системами врожденного и приобретенного иммунитета, играют ведущую роль в установлении и поддержании толерантности в системе мать и полу-аллогенный плод. Имеются серьезные аргументы в пользу представления о том, что именно патология физиологических взаимоотношений NK-клеток с трофобластом являются причиной привычного невынашивания беременности (ПНБ). До настоящего времени нет целостного представления о происхождении децидуальных NK-клеток, о влиянии трофобласта на их функциональные свойства при нормальной и патологической беременности, а также о воздействии NK-клеток на трофобласт. Знание механизмов взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта на разных этапах физиологической беременности и их отклонений при патологии является

необходимой предпосылкой для профилактики, своевременной диагностики и лечения патологий беременности.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Итогом исследования, выполненного Михайловой В.А., явилось раскрытие ряда существенных аспектов взаимодействия клеток трофобласта и НК-клеток. В результате проделанной Михайловой В.А. работы выяснилось, что под действием трофобласта происходит дифференцировка НК-клеток периферической крови в клетки, обладающие характеристиками децидуальных НК-клеток. Помимо этого, в присутствии клеток трофобласта периферические НК-клетки беременных женщин обладают более высокой пролиферативной активностью, чем НК-клетки из периферической крови небеременных женщин. Таким образом был получен ответ на вопрос о происхождении децидуальных НК-клеток, содержание которых возрастает многократно в период беременности. Новыми явились данные о том, что НК-клетки при контактном взаимодействии вызывают апоптоз клеток трофобласта, но при длительном взаимодействии с трофобластом происходит снижение их цитотоксической активности. Выбирая направление исследования, Михайлова В.А. отмечает, что имеющиеся в научной литературе сведения о влиянии трофобласта на НК-клетки носят разрозненный характер. Результаты проделанной Михайловой В.А. работы безусловно восполняют этот пробел в знаниях, поскольку автором получен и обобщен огромный материал, разносторонне характеризующий эти влияния. Впервые получены данные об обратном векторе действия, когда микровезикулы, формируемые НК-клетками, влияют на пролиферацию и миграцию клеток трофобласта. Ранее неизученным был феномен измененной цитотоксической активности НК-клеток от пациенток с ПНБ в отношении клеток трофобласта.

Совокупность результатов, полученных Михайловой В.А. и разносторонне охватывающих комплекс взаимодействий НК-клеток и

трофобласта, является крупным научным достижением в области фундаментальной и прикладной науки.

Диссертационное исследование Михайловой В.А. безусловно имеет практическую направленность. На основе результатов, полученных в процессе выполнения работы, Михайлова В.А. с соавторами разработала способ оценки цитотоксической активности НК-клеток, способ оценки риска невынашивания беременности, а также способ оценки эффективности применения препаратов иммуноглобулинов для модуляции взаимоотношения НК-клеток и трофобласта. Все перечисленные разработки, имеющие практическую направленность, были защищены патентами.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Цель работы Михайловой В.А. состояла в том, чтобы комплексно определить механизмы взаимодействия трофобласта и НК-клеток, модулирование свойств НК-клеток клетками трофобласта в процессе нормально протекающей беременности и при патологии, приводящей к ПНБ.

Достижение заявленной цели определялось выбором модельной системы для проведения экспериментов. Михайловой В.А. для создания модели были выбраны две клеточные линии. Клетки линии NK-92 происходили из клеток неходжкинской лимфомы и по фенотипическим и функциональным свойствам соответствовали естественным киллерам. Трофобласт был представлен линией JEG-3, которая исходно была получена из хорионкарциномы и по своим характеристикам воспроизводила инвазивный трофобласт I триместра беременности. Использование клеточных линий позволило изучить характеристики естественных киллеров и клеток трофобласта, а также их взаимодействия в стандартизованных, воспроизводимых условиях. Привлечение в исследование клеток, выделенных из мононуклеарной фракции периферической крови здоровых небеременных женщин, беременных с физиологической беременностью, а также пациенток с ПНБ позволило

верифицировать результаты, полученные на клеточных линиях. Известно, что во взаимодействии трофобласта и НК-клеток ведущую роль играют гуморальные факторы: многочисленные цито- и хемокины, которые воспринимаются соответствующими клеточными рецепторами. Помимо гуморальных факторов имеется как контактное взаимодействие клеток, так и передача сигнальных молекул через микровезикулы. Все эти аспекты взаимодействия трофобласта и НК-клеток исследованы в работе Михайловой В.А. Наконец, изучение влияния на фенотип, миграционные характеристики и дифференцировку НК-клеток сред, кондиционированных тканью плаценты и содержащих весь комплекс хемокинов и цитокинов, позволили получить информацию о взаимодействиях в условиях, приближенных к реальным ситуациям в организме.

В работе четко обозначены и мотивированы критерии отбора доноров материала для исследования. Планы большинства экспериментов представлены не только в текстовом изложении, но также схемами, что облегчает их восприятие и дает возможность оценить правильность планирования. Весь объем данных, полученных в экспериментах, подвергнут обработке адекватными статистическими методами. Везде указано количество повторов эксперимента и количество дублей в пределах каждого опыта.

Таким образом постановка задач, выбор экспериментальных подходов к их решению, постановка экспериментов и статистическая обработка результатов всесторонне обоснованы.

Объем и структура диссертации, анализ результатов

Диссертация Михайловой В.А. построена по традиционному плану. Обзор литературы содержит весь основной массив современных сведений по каждому из разделов, которые затронуты в экспериментальной части работы. Материал, представленный в обзоре настолько объемный, что он может служить информационным справочником для тех, кто будет дальше заниматься ролью НК-клеток на разных стадиях физиологической и

патологической беременности. Обзор содержит иллюстрации, которые удачно дополняют текст, что особенно важно при описании многокомпонентных лиганд-рецепторных взаимодействий и путей передачи сигналов.

Описание материалов и методов исследования выполнено подробно, что позволяет воспроизвести эксперименты. Работа огромна по разнообразию использованных методов. В главе, посвященной описанию методов, выделены подзаголовки следующего содержания: «Дизайн и методы исследования..» и далее следует формулирование задачи, которую позволяет решить описываемый методический подход. Такой прием изложения методов исследования позволяет вникнуть в схемы построения экспериментов, направленных на решение конкретных задач. Высокой оценки заслуживает подробно иллюстрированное описание выбора гейтов при исследовании, а также при сортинге клеток с помощью проточного цитофлуориметра. С необходимой полнотой описан процесс получения и верификации микровезикул.

Результаты экспериментов, описанные в главах 3-5, выполнены на клеточной модели NK-92 – JEG-3 и посвящены изучению воздействия трофобласта на фенотип и функции естественных киллеров. Исследовано взаимодействие этих клеток в ростовой среде, или в условиях добавления в культуру того или иного интерлейкина, а также при добавлении среды, кондиционированной тканью плаценты, которая одновременно содержит весь набор индукторов. Отдельную главу составляет описание микровезикул, образуемых NK-клетками и их воздействие на клетки трофобласта. В главе 7 проведен анализ цитотоксической функции NK-клеток по отношению к клеткам трофобласта в присутствии цитокинов, а также сред, кондиционированных тканью плаценты. Глава 8 полностью посвящена оценке цитотоксичности NK-клеток периферической крови в разные сроки беременности в норме и при ПНБ. Эта часть работы направлена на

разработку способов мониторинга и прогнозирования осложнений у женщин, имеющих в анамнезе ПНБ.

Обсуждение полученных результатов выполнено с достаточной степенью критической оценки и в сопоставлении с имеющимися на сегодняшний день опубликованными в научной литературе сведениями. Обсуждение дает четкое представление о том, что нового получено автором в результате выполненных исследований. На основании совокупности результатов Михайлова В.А. выстроила схему, отражающую влияние клеток трофобласта на пролиферацию НК-клеток, на их дифференцировку. Приведены схемы действия обратной направленности, а именно, цитотоксического влияния НК-клеток на клетки трофобласта при ПНБ. Составлены обширные сводные таблицы об экспрессии поверхностных рецепторов НК-клетками разного происхождения при сокультивировании с клетками трофобласта.

В разделе «Заключение» приведена многокомпонентная схема, построенная по результатам всего комплекса исследований, иллюстрирующая сложные взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта при беременности. Приведены те нарушения взаимодействия НК-клеток и трофобласта, которые, как считает автор, являются наиболее значимыми при ПНБ. К таковым относится нарушение приобретения НК-клетками регуляторного фенотипа. При ПНБ нарушения взаимодействия НК-клеток и клеток трофобласта затрагивают также пролиферативную и цитотоксическую функции естественных киллеров.

Сделанные в итоге выполнения работы выводы отражают все наиболее существенные результаты, которые изложены также в публикациях в высокорейтинговых журналах, в том числе и в журналах, рекомендованных ВАК РФ. На основании разработок Михайловой В.А. зарегистрировано три патента.

Автореферат диссертационной работы оформлен согласно требованиям ГОСТ. В автореферате изложены основные научные результаты исследования и отражена суть работы.

Личный вклад диссертанта

Цель исследования, его задачи и методические подходы к решению задач были сформулированы лично автором диссертационной работы. Ею же были выполнены все эксперименты, проведена обработка и анализ результатов. В тех случаях, когда требовалось использование специального оборудования и помощь коллег из других учреждений, Михайлова В.А. принимала участие в постановке экспериментов и в тексте диссертации это всегда специально оговорено. Публикации и патенты подготовлены лично Михайловой В.А. или при ее активном участии.

Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению диссертации

Подробное знакомство с диссертацией Михайловой В.А. позволило высоко оценить выполненное исследование. Однако с моей точки зрения текст перегружен фактическим материалом и читается не без труда. Это замечание не снижает высокой оценки работы Михайловой В.А. в целом.

Вопрос к обсуждению: Каков механизм цитопротективного действия препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения в отношении клеток трофобласта при их взаимодействии с естественными киллерами?

Какими должны быть критерии выбора линий клеток трофобласта для оценки цитотоксической активности НК-клеток периферической крови при использовании этого теста в практических целях при обследовании пациенток с ПНБ ?

Заключение

Диссертационная работа Михайловой Валентины Анатольевны «ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТА И РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ», представленная на соискание

ученой степени доктора наук, является самостоятельной завершенной концептуальной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором комплексных исследований сформулированы представления о взаимоотношениях трофобласта и НК-клеток в процессе нормальной и патологической беременности, что следует квалифицировать как достижение, значимое для развития биомедицинской науки и здравоохранения. Содержание работы, выводы и публикации по ней соответствуют заявленным специальностям: 3.3.3. Патологическая физиология и 3.2.7. Иммунология. Работа Михайловой В.А. полностью соответствует требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. №842 в актуальной редакции, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Михайлова Валентина Анатольевна, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальностям: 3.3.3. Патологическая физиология и 3.2.7. Иммунология.

доктор биологических наук
(14.00.36 иммунология, аллергология),
главный научный сотрудник, руководитель
лаборатории гибридной технологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, Ленинградская ул., 70
тел. (812) 596-66-53;
E-mail: info@rncrst.ru, mpsamoylovich@gmail.com

15.12.2023

Самойлович Марина Платоновна

Подпись руки Самойлович М.П. заверяю,

ученый секретарь ФГБУ «РНЦРХТ им. академика А.М.Гранова»

Минздрава России д.м.н. Бланк О. А.

