

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Козлова Ивана Генриховича 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 специальностям: 3.3.3. Патологическая физиология, 3.2.7. Иммунология.

Актуальность темы диссертации. Фундаментальные исследования механизмов развития беременности и патогенеза привычного невынашивания беременности (ПНБ) указывают на важную роль нарушений взаимодействия клеточных компонентов маточно-плацентарного комплекса с клетками иммунной системы в возникновении и развитии патологии. Исследования в этой области очень важны, так как ситуация с репродуктивным здоровьем населения в Российской Федерации остается напряженной, и для ее разрешения требуется комплексный междисциплинарный подход.

К настоящему времени известно, что благополучное течение беременности определяется адекватной трансформацией эндометрия, обеспечивающей имплантацию плодного яйца, инвазией клеток трофобласта и последующим формированием структуры плаценты. Так как клетки трофобласта являются генетически чужеродными по отношению к организму матери, в процессе инвазии в децидуальную оболочку их могут распознавать иммунные клетки, присутствующие в матке. Имеются данные, указывающие на преобладание клеток естественных киллеров (НК-клеток) в децидуальной оболочке в первом триместре беременности, а также на близкую локализацию клеток трофобласта и НК-клеток. В литературе описана регуляторная трансформация НК-клеток децидуальной оболочки при физиологической беременности, выражающаяся в преимущественной секреции клетками цитокинов и снижении цитотоксических свойств. Однако, сведения о вкладе взаимодействия НК-клеток и клеток трофобласта в регуляцию формирования плаценты представлены фрагментарно. Отсутствует комплексная оценка модулирования функций НК-клеток в ходе физиологической беременности, происхождение НК-клеток матки не охарактеризовано. Представленные в литературе данные о связи характеристик НК-клеток матки с развитием ПНБ неоднозначны, представляет интерес исследование модулирования НК-клеток и клеток трофобласта при ПНБ.

В связи с вышеизложенным, диссертационная работа Михайловой В.А., посвященная изучению взаимодействия естественных киллеров с клетками



трофобласта при беременности и определению их роли в патогенезе ПНБ, является актуальным научным исследованием.

Научная новизна исследования и полученных результатов. Научная новизна диссертационной работы Михайловой В.А. не вызывает сомнений и заключается в том, что автором было впервые экспериментально продемонстрировано комплексное влияние клеток трофобласта на НК-клетки, вызывающее их трансформацию в регуляторные клетки. Впервые оценен вклад цитокинов и растворимых факторов, секретируемых клетками ворсин хориона, в регуляцию взаимодействия НК-клеток и клеток трофобласта, в том числе впервые дана характеристика роли цитокина TGF β в этом взаимодействии. В диссертационной работе получены новые данные об образовании НК-клетками мембранных субклеточных структур - микровезикул, которые в свою очередь могут опосредовать межклеточную коммуникацию посредством передачи содержащихся в них белков. Впервые экспериментально установлено, что клетки трофобласта обладают механизмами защиты от индукции апоптоза естественными киллерами, так как содержат белок серпин В9, инактивирующий гранзим В. В работе впервые продемонстрировано, что длительное контактное взаимодействие НК-клеток с клетками трофобласта в присутствии цитокинов, характерных для маточно-плацентарного комплекса, приводит к снижению НК-клетками цитотоксической активности и изменяет их фенотип, приближая его к регуляторному. Соискателем впервые оценено изменение функционального статуса НК-клеток в присутствии клеток трофобласта в экспериментальной модели с использованием клеточных линий и НК-клеток периферической крови женщин с физиологической беременностью и пациенток с ПНБ.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций. Диссертационная работа представляет комплексное исследование, выполненное с использованием современных иммунологических, молекулярно-биологических методов, отвечающих задачам экспериментальной работы. В работе реализованы многостадийные эксперименты *in vitro*, в том числе с использованием клинического материала, полученного от пациенток с ПНБ. Основные положения диссертации обоснованы представленным материалом достаточного объема, подкреплены рисунками и таблицами. Достоверность выводов и рекомендаций определяется использованием современных методов статистической

обработки данных и сопоставлением результатов экспериментальных исследований с данными, полученными с использованием первичного клинического материала.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в том, что в ней были получены новые знания об изменениях, претерпеваемых НК-клетками, в процессе взаимодействия с клетками трофобласта, подтвержденные экспериментальными исследованиями и рассмотрением клинического материала пациенток с ПНБ. Выявлены и охарактеризованы ранее неизученные механизмы дистантного взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта с участием микровезикул. Определен вклад цитокинового микроокружения в регуляцию функциональной активности НК-клеток. Полученные в диссертационной работе новые данные позволили сформулировать концепцию о наличии активного контроля клетками трофобласта функциональной активности НК-клеток при беременности, выражающееся в контроле миграции, секреции и пролиферации естественных киллеров.

Результаты диссертационной работы применяются в ходе научной работы отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта», а также внедрены в научную деятельность ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и использованы в курсах общей и клинической иммунологии, и иммунологии репродукции на кафедре иммунологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им.И.П. Павлова Минздрава России.

Выводы работы и практические рекомендации обоснованы и представляют важное значение как для теоретической науки, так и для клинической практики. Полученные в диссертационном исследовании результаты позволили обосновать ценность установленных закономерностей изменения функциональной активности НК-клеток периферической крови для диагностики ПНБ и ведения беременности, что подкреплено тремя патентами РФ. Отдельные результаты диссертационной работы внедрены в клиническую практику медицинских учреждений Санкт-Петербурга.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Полученные в диссертации результаты могут быть использованы для подбора и усовершенствования модельных систем взаимодействия клеточных популяций *in vitro*, а также разработки и внедрения

новых подходов к определению функционального статуса клеток естественных киллеров при патологии. Разработанные автором способ оценки риска невынашивания беременности у женщин с ПНБ в анамнезе и способ оценки эффективности планируемой медикаментозной терапии могут быть использованы для реализации персонифицированного подхода к лечению пациенток с ПНБ.

Структура и оформление работы. Диссертация обладает традиционной структурой и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», шести глав с результатами исследования, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списков сокращений и цитируемой литературы. Работа изложена на 367 страницах, проиллюстрирована 111 рисунками и 12 таблицами, название соответствует поставленной цели и сформулированным задачам работы.

Введение включает в себя обоснование актуальности темы исследования, степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования, описана новизна и научно-практическая значимость исследования, представлены выносимые на защиту основные положения, методология работы, сведения о реализации и апробации материалов диссертации, а также сведения о структуре работы, личном вкладе диссертанта и публикациях по теме исследования.

Глава №1 «Обзор литературы» содержит три подглавы и включает информацию о фенотипических и функциональных характеристиках клеток естественных киллеров, регуляции их дифференцировки, особенностях популяции НК-клеток матки, в том числе описаны имеющиеся в литературе данные о их роли в патогенезе ПНБ. Автором проведен глубокий анализ данных литературы, касающийся биологии НК-клеток в целом и их участия в развитии маточно-плацентарного комплекса.

Глава №2 «Материалы и методы» содержит подробное описание лабораторных методов, в том числе характеристику использованных в исследовании клеточных линий, а также описание групп обследованных пациентов, подходы к статистической обработке данных. Глава также снабжена схемами, иллюстрирующими дизайн каждого из этапов исследования. Не вызывает сомнений, что автор лично участвовала в постановке большинства экспериментов, самостоятельно провела статистическую обработку и интерпретацию результатов. Отдельно отмечено

на каких этапах работы исследования выполнены совместно с другими исследователями.

Главы №3-8 содержат подробные представленные результаты по каждому из этапов исследования, а именно описание влияния клеток трофобласта на фенотип и функции адгезии и трансмиграции НК-клеток, параметров дифференцировки НК-клеток в присутствии трофобласта, пролиферации НК-клеток периферической крови при беременности и ПНБ, образования НК-клетками микровезикул, механизмов цитотоксической активности НК-клеток, изменений цитотоксичности НК-клеток периферической крови при беременности и ПНБ.

В главе №9 «Обсуждение» проведен подробный анализ полученных в исследовании результатов и их поэтапное сопоставление в данными литературы. В главе приведены схемы, построенные на основании полученных данных, и отражающие модификации НК-клеток в зависимости от условий микроокружения.

Заключение обобщает основные положения, изложенные в обсуждении, а также содержит результирующую схему предполагаемых механизмов взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта при физиологической беременности и патогенетические составляющие клеточных взаимодействий при ПНБ. На основании результатов исследования сформулировано новое представление о взаимодействии естественных киллеров с клетками трофобласта, как о процессе двусторонней регуляции, в котором клетки трофобласта определяют миграцию НК-клеток в матку, а также вызывают изменения рецепторного профиля НК-клеток и экспрессию ими транскрипционных факторов, в то время как НК-клетки сохраняют способность к контролю инвазии клеток трофобласта, реализуя контактный и рецептор-опосредованный цитолиз и формируя микровезикулы, содержащие цитотоксические белки. Результаты диссертационной работы указывают на ассоциацию ПНБ с изменением пролиферативной и цитотоксической активности естественных киллеров, а также их потенциала к дифференцировке в регуляторные НК-клетки.

Диссертация завершается 10 выводами, которые соответствуют поставленным задачам и отражают существо работы, а также 3 практическими рекомендациями.

Структура диссертации, ее содержание, последовательность изложения материала характеризуются внутренним единством. Содержание автореферата в полной мере отражает научные результаты и выводы,

полученные в диссертационном исследовании. Текст диссертации и автореферата оформлен в соответствии с требованиями актуального ГОСТ. Выполненная научная работа соответствует пп.1 и 2 паспорта специальности 3.3.3. «Патологическая физиология» и пункту № 4 паспорта специальности 3.2.7 «Иммунология».

Личный вклад диссертанта состоит в постановке цели и формулировке задач исследования, в планировании и выборе методов работы. Экспериментальная работа проведена соискателем самостоятельно или при непосредственном ее участии. Автором выполнен анализ полученных данных с использованием современных методов статистической обработки, а также их теоретическое обобщение, в том числе в материалах конференций, научных статьях и патентах.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации. По теме диссертации опубликовано 24 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Среди работ по теме диссертации 10 статей опубликованы в журналах квартилей Q1-Q2, индексируемых международными базами данных и систем цитирования (WoS и Scopus). Результаты диссертационного исследования вошли в ряд учебных пособий для студентов биологических и медицинских высших учебных заведений, ординаторов и аспирантов. Основные результаты диссертации были представлены автором и обсуждены на международных и всероссийских конференциях.

Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению диссертации. Диссертация Михайловой В.А. отвечает всем установленным требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени доктора биологических наук. Задачи в полной мере определены целью исследования и решены в работе. На основании полученных результатов сформулированы выводы и практические рекомендации, которые позволяют считать диссертацию завершенной.

Заключение

Диссертационная работа Михайловой Валентины Анатольевны на тему: «Естественные киллеры: взаимодействие с клетками трофобласта и роль в патогенезе привычного невынашивания беременности», представленная к

защите на соискание ученой степени доктора биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных авторов исследований разработаны теоретические положения и практические рекомендации, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение, а именно установление роли взаимодействия клеток естественных киллеров с клетками трофобласта в развитии беременности и манифестации ПНБ, что имеет важное значение для развития медико-биологической науки в целом.

По своей актуальности, новизне проведенных исследований, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует требованиям п.9 и п.14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 в актуальной редакции, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Михайлова Валентина Анатольевна заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология, 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент

доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры организации и управления
в сфере обращения лекарственных средств
Института последипломного образования
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования
Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет)
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

И.Г. Козлов

119991 г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2
ФГАОУ ВО первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет)
Тел. +7(499)248-05-53; E-mail: rektorat@sechenov.ru



Подпись: *И.Г. Козлов*
22.11.2023