

## ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора медицинских наук Кречетовой Любови Валентиновны  
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**

Диссертационная работа Михайловой В.А. посвящена изучению взаимодействия естественных киллеров (NK-клеток) с клетками трофобласта при беременности и при ее осложнениях, а именно при потерях беременности ранних сроков (привычном невынашивании беременности, ПНБ). Актуальность данного исследования определяется постоянным увеличением частоты различных заболеваний репродуктивной системы и частоты осложнений течения беременности, что, в свою очередь, отражается на демографической ситуации в Российской Федерации. ПНБ представляет собой акушерскую патологию, которая составляет до 25% случаев потери беременности в общей структуре невынашивания. Особенностью ПНБ является последовательная повторяемость потери беременности вследствие формирования фето-плацентарной недостаточности. Среди причин развития ПНБ отмечают анатомические дефекты строения матки, наличие очагов хронического воспаления урогенитального тракта, эндокринопатии, коагулопатии, генетические факторы. Иммунологические причины рассматриваются как ведущие в генезе идиопатического привычного выкидыша.

Физиологическое течение беременности развивается в случае успешной имплантации бластоцисты, инвазии клеток трофобласта плодного происхождения в децидуальную оболочку и, соответственно, успешного формирования маточно-плацентарного комплекса. Установлено, что NK-клетки (клетки системы врожденного иммунитета) составляют основную

популяцию лимфоцитов децидуальной оболочки в первом триместре беременности. Взгляды на функциональную роль НК-клеток в развитии физиологической беременности неоднозначны. Преобладает точка зрения, согласно которой НК-клетки децидуальной оболочки рассматривают как регуляторную популяцию, характеризующуюся способностью к синтезу цитокинов и низкой цитолитической активностью. Вместе с тем, участие НК-клеток в формировании маточно-плацентарного комплекса остается мало изученным, а вопрос происхождения НК-клеток децидуальной оболочки - открытым.

Участие популяции лимфоцитов с естественной киллерной активностью в патогенезе ПНБ исследователи в области иммунологии репродукции обсуждают более 40 лет. Однако сведения о связи фенотипических и функциональных характеристик НК-клеток децидуальной оболочки с развитием ПНБ неоднозначны. В разных группах пациенток с привычным выкидышем (а клинические группы с ПНБ крайне разнородные) выявляют и повышение, и снижение цитолитической активности киллеров. Данные о секреторной активности НК-клеток при ПНБ также различаются. Кроме того, маловероятным является получение образцов децидуальной оболочки в ранние сроки беременности, следовательно, фенотипирование НК-клеток децидуальной оболочки затруднено, отсутствует единый стандарт характеристики этой популяции, равно как и способов получения и характеристики трофобластов. Поэтому опубликованные в литературе данные не позволяют сделать однозначный вывод о патогенетических механизмах с участием НК-клеток, приводящих к ПНБ. В силу не только близкой локализации НК-клеток и клеток трофобласта в децидуальной оболочке, но и в силу понимания значимости их контактов для развития беременности, предположение о развитии невынашивания в результате нарушения их взаимодействия является обоснованным для проведения фундаментальных и прикладных исследований.



В связи с изложенным, настоящее диссертационное исследование, цель которого состояла в выявлении изменений функциональной активности естественных киллеров (как выделенных из периферической крови, так и линейных киллерных клеток) в условиях взаимодействия с линией клеток трофобласта *in vitro* и в попытке установления роли естественных киллеров в патогенезе ПНБ на основе модельных экспериментов, является чрезвычайно актуальным.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

Научная новизна диссертационного исследования состоит, в первую очередь, в экспериментальной части работы, основанной на модельных экспериментах с использованием стандартизованных линий киллерных клеток NK92 и трофобластных - JEG 3, в том числе, в условиях действия стимуляторов – стандартных цитокинов, факторов кондиционированных сред ворсин хорионов плацент I и III триместра физиологически протекающей беременности, полученных при выполнении аборт и после родов. Впервые установлено, что под влиянием цитокинов и растворимых факторов, секретлируемых клетками плаценты, NK-клетки могут мигрировать через трофобластическую выстилку, изменяя при этом экспрессию адгезионных рецепторов. В разработанной в диссертационной работе модели *in vitro* впервые продемонстрировано, что в условиях длительного контактного взаимодействия с клетками трофобласта NK-клетки изменяют экспрессию поверхностных рецепторов и транскрипционных факторов, характерных для дифференцированных NK-клеток, а также других групп лимфоидных клеток врожденного иммунитета (ILC). В исследовании получены новые данные о модифицирующем влиянии цитокинов и растворимых факторов, секретлируемых клетками плаценты, на взаимодействие клеток трофобласта и NK-клеток, способствующем экспрессии NK-клетками рецепторов, характерных для децидуальных NK-клеток. При этом исследователем установлено снижение цитотоксической активности NK-клеток в случае длительного контактного взаимодействия с клетками трофобласта, что также

является характерным для децидуальных НК-клеток. Кроме того, с использованием клеток линии NK-92 впервые показана способность естественных киллерных клеток формировать мембранные микровезикулы и впервые установлено наличие в них цитотоксических белков.

Особое значение в представляемой работе имеет воспроизведение условий модельных экспериментов в исследованиях с использованием НК-клеток периферической крови здоровых женщин и пациенток с ПНБ. В результате были получены новые данные об изменении экспрессии белка-маркера пролиферации Ki-67 в НК-клетках периферической крови в случае контактного взаимодействия с клетками трофобласта и установлено, что у пациенток с ПНБ пролиферативная активность общей популяции НК-клеток периферической крови, а также их отдельных субпопуляций, при взаимодействии с клетками трофобласта подавлена, в то время как у здоровых женщин подавление пролиферации НК-клеток было маловыраженным. Кроме того, в результате проведения комплексного исследования цитотоксической активности НК-клеток периферической крови убедительно показана ассоциация ПНБ с повышением цитолитической активности НК-клеток в секреторной фазе менструального цикла.

#### **Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций**

В научной работе использованы современные иммунологические, молекулярно-биологические методы исследования, отвечающие задачам экспериментальной работы. Выполненные в достаточном объеме экспериментальные наблюдения, последующая корректная статистическая обработка данных и глубокий критический анализ результатов обосновывают выводы, сделанные в работе. Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций определяется сопоставлением результатов экспериментальных исследований с данными, полученными на первичном клиническом материале.



## **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Диссертационное исследование Михайловой В.А. имеет фундаментальный характер, в котором было экспериментально установлено модулирующее влияние клеток трофобласта на НК-клетки, заключающееся в регуляции миграции НК-клеток, их секреторной и пролиферативной активности. Полученные данные об изменении функциональной активности НК-клеток в присутствии клеток трофобласта, а именно, о приобретении ими регуляторных характеристик и вместе с тем сохранении способности контроля инвазии трофобласта, представляются значимыми с позиции новых знаний о физиологии развития маточно-плацентарного комплекса. Автором также дано теоретическое обоснование диагностической ценности оценки цитотоксической активности НК-клеток в отношении клеток трофобласта при ПНБ. По результатам работы были запатентованы способ оценки активности НК-клеток, способ оценки риска развития невынашивания беременности у женщин с ПНБ в анамнезе и способ *in vitro*-оценки влияния медикаментозной терапии, планируемой к применению в клинике ПНБ. Полученные в диссертационной работе результаты используются в научной и клинической деятельности ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О.Отта», а также ряда медицинских других учреждений Санкт-Петербурга.

## **Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы полученными результатами и их сопоставлением с данными, представленными в литературе. На основании результатов работы может быть дополнена методология фундаментальных исследований механизмов реализации НК-клетками собственной функциональной активности. Значение проведенного исследования для практики определено тем, что разработанные способы оценки функционального статуса НК-клеток в отношении клеток трофобласта могут

способствовать разработке персонифицированного плана лечения женщин с ПНБ.

### **Структура и оформление работы**

Диссертационная работа построена по традиционному принципу, изложена на 367 страницах, проиллюстрирована 111 рисунками и 12 таблицами. Диссертация содержит разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», шесть глав с результатами исследования, «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации». Представлен список цитируемой литературы, состоящий из 778 источников.

Во введении представлена актуальность темы, степень ее разработанности, сформулированы цель исследования и задачи для ее реализации, раскрыты научная новизна проведенного исследования и его теоретическая и практическая значимость, изложены основные положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы представлены данные о фенотипических и функциональных характеристиках НК-клеток, регуляции процесса их дифференцировки, рассмотрены особенности НК-клеток децидуальной оболочки, в том числе при ПНБ.

В главе, посвященной материалам и методам, использованным в работе, дана характеристика клеточных линий, а также описан полученный от пациенток клинический материал. Представлены критерии включения/исключения для каждой группы обследованных женщин, таблица №2.1 содержит обобщенную информацию о количестве человек в группах, обследованных на каждом из этапов работы, представлены схемы, отражающие дизайн каждого из этапов работы. Подробно дано описание методов работы, в связи с чем не вызывает сомнений личное участие автора в проведении экспериментальной работы.

Результаты диссертационного исследования представлены в шести главах (в 3, 4, 5, 6, 7, 8) в виде столбчатых и боксовых диаграмм,



корреляционных таблиц и других видов графиков и рисунков. Подробно описаны выявленные различия и изменения исследуемых параметров. Четыре главы представляют собой результаты фундаментальных исследований поведения клеток линии NK-92 в различных модельных системах с использованием в качестве индукторов стандартных препаратов цитокинов, а также секреторных факторов плацент, полученных из эксплантатов плацент и нормированных по содержанию белка в них. Также с использованием клеток линии NK-92 исследованы особенности формирования NK-клетками мембранных микровезикул. Полученные данные позволили автору получить представление о механизмах взаимодействия линии NK-клеток с клетками линии трофобласта в целом. В двух главах представлены результаты работы с использованием NK-клеток, выделенных из периферической крови пациенток с ПНБ, что позволило прояснить роль естественных киллеров в развитии этой патологии. В конце каждой главы раздела дано результирующее описание основных полученных результатов.

В обсуждении автор последовательно сопоставляет данные, представленные в литературе, с собственными результатами. Каждый из разделов обсуждения сопровождается схемой, отражающей влияние факторов на фенотипические и функциональные характеристики NK-клеток.

В заключении автор обосновывает основные положения работы, объединяя их в итоговую схему предполагаемых механизмов взаимодействия NK-клеток с клетками трофобласта при физиологической беременности и участия NK-клеток в патогенетических механизмах ПНБ.

Выводы четко сформулированы и обоснованы полученными в исследовании результатами, на основании которых автором предложена концепция об активном контроле клетками трофобласта дифференцировки и функциональной активности естественных киллеров при беременности. Исследование активности NK-клеток в физиологических условиях их взаимодействия с клетками трофобласта в ранние сроки беременности позволило установить нарушение функциональной перестройки NK-клеток

при ПНБ. В работе даны практические рекомендации по стратегии оценки функций НК-клеток как в эксперименте, так и в диагностических целях.

Диссертация написана литературным научным языком и оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ. *Автореферат диссертации*, изложенный на 46 страницах, отражает суть работы и соответствует требованиям ВАК РФ. В него вошли основные научные результаты исследования и выводы.

**Личный вклад соискателя** заключается в формулировке цели и задач исследования, а также в планировании работы, апробации и постановке методов. Экспериментальная работа проведена соискателем самостоятельно или при непосредственном ее участии, что отдельно отмечается в тексте главы «Материалы и методы». Статистическая обработка данных выполнена автором самостоятельно с использованием современных методов. Личный вклад автора также состоит в теоретическом обобщении массива данных и его интерпретации, что отражено в материалах конференций, научных статьях и патентах.

**Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати, в том числе в изданиях, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, определенных ВАК**

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на всероссийских и международных конференциях. По теме диссертации автором опубликовано 78 научных работ, из которых 24 статьи опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а 10 статей - в журналах первого и второго квартилей международных баз WoS и Scopus. Отдельные результаты диссертации вошли в два учебных пособия для студентов биологических и медицинских ВУЗов, ординаторов и аспирантов, а также в руководство для врачей «Эндометрий в репродукции: оценка функции и возможности коррекции» под редакцией чл.-корр. РАН Когана И.Ю.



## **Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению диссертации**

Диссертационная работа Михайловой В.А. является самостоятельным законченным научным исследованием, отвечающим установленным требованиям к работам на соискание ученой степени доктора биологических наук, выполненным с применением современных методических приемов и возможностей современного прецизионного оборудования, используемого и в молекулярной биологии, и в медицинской лабораторной практике. Представлен впечатляющий объем экспериментального материала, подчиненного центральной идее, логично выстроенное обсуждение результатов, укладывающихся в современное понимание биологии клеточных взаимодействий.

В качестве дискуссионных замечаний хотелось бы обратить внимание на то, что столь насыщенный экспериментальный материал с очень обширной методической базой нуждается в большем количестве обобщающих схем, помогающих пониманию трактовки автором полученных отдельных результатов при обосновании обобщений и выводов.

Высказанное замечание носит рекомендательный характер, не является принципиальным, не умаляет достоинств работы и не влияет на общее положительное впечатление от диссертационной работы в целом.

### **Заключение**

Диссертация Михайловой Валентины Анатольевны «Естественные киллеры: взаимодействие с клетками трофобласта и роль в патогенезе привычного невынашивания беременности», является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение актуальной научной проблемы: определение роли взаимодействия клеток естественных киллеров с клетками трофобласта в модулировании свойств киллеров и выяснение участия клеток естественных киллеров в развитии физиологической беременности и в патогенезе привычного невынашивания беременности. Диссертация Михайловой Валентины Анатольевны по

актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов 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 и 3.2.7. Иммунология.

**Официальный оппонент:**

доктор медицинских наук,  
заведующая лабораторией клинической иммунологии  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Национальный медицинский исследовательский  
центр акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Л.В. Кречетова

« 11 » декабря 2023 г.

Подпись д.м.н. Кречетовой Любови Валентиновны заверяю:

Ученый секретарь  
к.м.н., доцент

Павлович С.В.

ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

Телефон: +7 495 531-44-44

Электронная почта: [info@oparina4.ru](mailto:info@oparina4.ru)

Официальный сайт: [ncagr.ru](http://ncagr.ru)