

**Заключение диссертационного совета 24.1.158.01 на базе
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Институт экспериментальной медицины» по диссертации
на соискание ученой степени доктора биологических наук
аттестационное дело № _____**

Решение диссертационного совета от 23 января 2024 г. № 182

О присуждении Михайловой Валентине Анатольевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация Михайловой Валентины Анатольевны на тему «Естественные киллеры: взаимодействие с клетками трофобласта и роль в патогенезе привычного невынашивания беременности» по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология и 3.2.7. Иммунология принята к защите 10 октября 2023 г., протокол № 179, диссертационным советом 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 (утвержден приказом Минобрнауки Российской Федерации №105/нк от 11.04.2012).

Соискатель Михайлова Валентина Анатольевна, 1986 года рождения.

В 2009 году соискатель с отличием окончила магистратуру биологического факультета Федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет», с присвоением степени магистра по направлению «Биология». С 2009 г. по 2012 г. обучалась в очной аспирантуре Санкт-Петербургского государственного университета по программе «Клеточная биология, цитология, гистология». С 2007 г. Михайлова В. А. работает в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» (ФГБНУ «НИИГиР им. Д.О. Отта»)

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Фенотипические и функциональные характеристики лейкоцитов периферической крови и их микрочастиц при преэклампсии» по специальностям 14.03.03 - патологическая физиология, 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология защитила в 2015 году, в диссертационном совете Д 001.022.02, созданном на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Во время подготовки диссертации на соискание степени доктора биологических наук работала в должности научного сотрудника и с 2017 г. по настоящее время - старшего научного сотрудника отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта». С 2023 г. занимает также должность доцента кафедры иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России).

Диссертация выполнена в ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта» в рамках плановой научно-исследовательской работы, часть работы поддержана грантами Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга, грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований, грантами Российского Научного Фонда и грантом Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации.

Научные консультанты:

1. Соколов Дмитрий Игоревич – доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий;

2. Сельков Сергей Алексеевич – доктор медицинских наук,

профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий.

Официальные оппоненты:

1. Самойлович Марина Платоновна – доктор биологических наук, 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;

2. Кречетова Любовь Валентиновна – 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;

3. Козлов Иван Генрихович – 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
дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «Ив НИИ М и Д им. В.Н. Городкова» Минздрава России), г. Иваново, в своем положительном отзыве, подписанном Сотниковой Натальей

Юрьевой, доктором медицинских наук, профессором, заслуженным врачом РФ, заведующей лабораторией клинической иммунологии, и утвержденном Малышкиной Анной Ивановной, доктором медицинских наук, профессором, директором ФГБУ «Ив НИИ М и Д им. В.Н. Городкова» Минздрава России, указала, что диссертация 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 привычного невынашивания беременности.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывался высоким уровнем их профессиональной компетентности, профессиональной деятельности, наличием публикаций в соответствующей сфере исследования и широкой известностью своими достижениями в рассматриваемой области медико-биологических наук.

Соискатель имеет 78 опубликованных работ по теме диссертации, в том числе 3 патента на полезную модель, 24 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования, 10 из статей опубликованы в журналах квартилей Q1-Q2, индексируемых международными базами Web of Science и Scopus, тезисы докладов на Российских и международных научно-практических конференциях и конгрессах, общим объемом 50 условных печатных листов, авторский вклад составил 80%.

Наиболее значимые работы:

1. Mikhailova, V.A. Interactions of NK cells and trophoblast cells. methodological aspects / V.A. Mikhailova, D.O. Bazhenov, M.E. Belikova, A.N. Viknyanshchuk, I.Y. Kogan, S.A. Sel'kov, D.I. Sokolov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2018. – Vol. 165, No 4. – P. 548-553.

2. Mikhailova, V.A. Evaluation of microvesicles formed by natural killer (NK) cells using flow cytometry / V.A. Mikhailova, K.L. Belyakova, L.P. Vyazmina, A.R. Sheveleva, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Medical Immunology (Russia)*. – 2018. – Vol. 20. – P. 251-254.

3. 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. Viazmina, Y.P. Milyutina, A.R. Kozyreva, A.A. Zhdanova, D.A. Malygina, K. Onohin, A.N. Ivanova, A.V. Korenevsky, S.A. Selkov // *Medical Immunology (Russia)*. – 2019. – Vol. 21, No 4. – P. 669-688.

4. Mikhailova, V.A. Cytotoxic activity of peripheral blood NK cells towards trophoblast cells during pregnancy / V.A. Mikhailova, D.O. Bazhenov, L.P. Viazmina, A.O. Agnaeva, O.N. Bupalova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2019. – Vol. 166. – P. 567-573.

5. Milyutina, Y.P. Role of caspases in the cytotoxicity of NK-92 cells in various models of coculturing with trophoblasts / Y.P. Milyutina, V.A. Mikhailova, K.M. Pyatygina, E.S. Demidova, D.A. Malygina, T.E. Tertychnaia, A.V. Arutjunyan, D.I. Sokolov, S.A. Selkov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2019. – Vol. 84, No 10. – P. 1460-1472.

6. Mikhailova, V.A. Changes in expression of Ki-67, CD16 and CD56 by natural killer cells from peripheral blood mononuclear cells in the setting of recurrent miscarriage after in vitro culturing in the presence of trophoblast cells and IL-2 / V.A. Mikhailova, E.V. Khokhlova, D.O. Bazhenov, A.O. Agnaeva, A.R. Kozyreva, O.N. Bupalova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Cytotechnology*. – 2019. – Vol. 71, No 4. – P. 861-871.

7. Bazhenov, D.O. Receptor expression by JEG-3 trophoblast cells in the presence of placenta secreted factors / D.O. Bazhenov, K.N. Furaeva, O.I. Stepanova, L.P. Viazmina, A.R. Sheveleva, E.V. Khokhlova, V.A. Mikhailova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Gynecological Endocrinology*. – 2019. – Vol. 35, Sup 1. – P. 35-40.

8. Sokolov, D.I. NK and trophoblast cells interaction: cytotoxic activity on recurrent pregnancy loss / D.I. Sokolov, V.A. Mikhailova, A.O. Agnayeva, D.I.

Bazhenov, E.V. Khokhlova, O.N. Beshpalova, A.M. Gzgzyan, S.A. Selkov // *Gynecological Endocrinology*. –2019. – Vol. 35, Sup 1. – P. 5-10.

9. Михайлова, В.А. Лимфоциты врожденного иммунитета эндометрия и децидуальной оболочки человека / В.А. Михайлова // *Иммунология*. – 2019. – Vol. 40, No 3. – P. 83-92.

10. Mikhailova, V.A. Trophoblast cell influence on peripheral blood natural killer cell proliferation and phenotype in non-pregnant women and women in early pregnancy / V.A. Mikhailova, I.V. Kudryavtsev, M.K. Serebryakova, Y.P. Milyutina, E.S. Demidova, A.N. Panina, D.O. Bazhenov, M.E. Belikova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Immunobiology*. – 2020. – Vol. 225, No 3. – P. 151910.

11. Bazhenov, D.O. Characteristics of Natural Killer cell interaction with trophoblast cells during pregnancy / D.O. Bazhenov, E.V. Khokhlova, L.P. Viazmina, K.N. Furaeva, V.A. Mikhailova, N.A. Kostin, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Current Molecular Medicine*. – 2020. – Vol. 20, No 3. – P. 202-219.

12. Bazhenov, D. The uteroplacental contact zone cytokine influence on NK cell cytotoxicity to trophoblasts / D. Bazhenov, V. Mikhailova, I. Nikolaenkov, K. Markova, Z. Salloum, I. Kogan, A. Gzgzyan, S. Selkov, D. Sokolov // *Gynecological Endocrinology*. – 2020. – Vol. 36, NoS1. – P. S1-S6.

13. Mikhailova, V. NK-92 cells change their phenotype and function when cocultured with IL-15, IL-18 and trophoblast cells / V. Mikhailova, E. Khokhlova, P. Grebenkina, Z. Salloum, I. Nikolaenkov, K. Markova, A. Davidova, S. Selkov, D. Sokolov // *Immunobiology*. – 2021. – Vol. 226, No 5. – P. 152125.

14. Mikhailova, V.A. Phenotypic profile of peripheral blood NK cells under culturing with trophoblast cells and IL-15 and IL-18 cytokines / V.A. Mikhailova, P.V. Grebenkina, E.V. Tyshchuk, A.A. Davydova, V.A. Zagaynova, I.Y. Kogan, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Medical Immunology (Russia)*. – 2021. – Vol. 23, No 6. – P. 1383-1388.

15. Mikhailova, V. Pro- and anti-inflammatory cytokines in the context of NK cell-trophoblast interactions / V. Mikhailova, P. Grebenkina, E. Khokhlova, A. Davydova, Z. Salloum, E. Tyshchuk, V. Zagaynova, K. Markova, I. Kogan, S.

Selkov, D. Sokolov // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, No 4. – P.2387.

16. Bazhenov, D.O. The role of cytokines in maintaining the dynamics of cell-cell interaction between Natural Killer cells and trophoblast cells / D.O. Bazhenov, V.A. Mikhailova, K.L. Furaeva, L.P. Vyaz'mina, D.I. Sokolov, S.A. Sel'kov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2022. – Vol. 172, No 5. – P.622-631.

17. Sokolov, D. Natural Killer cell derived microvesicles affect the function of trophoblast cells / D. Sokolov, A. Gorshkova, K. Markova, Y. Milyutina, K. Ryatygina, M. Zementova, A. Korenevsky, V. Mikhailova, S. Selkov // Membranes. – 2023. – Vol. 13, No 2. – P. 213

В диссертации не содержится некорректных заимствований и недостоверных сведений об опубликованных автором результатах исследований.

На автореферат поступили отзывы от:

1. Тетруашвили Наны Картлосовны, доктора медицинских наук, доцента, заведующего 2-м акушерским отделением патологии беременности Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

2. Черных Елены Рэмовны, доктора медицинских наук, профессора, член-корр. РАН, заместителя директора по научной работе, заведующей лабораторией клеточной иммунотерапии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»;

3. Миндукшева Игоря Викторовича, доктора биологических наук, главного научного сотрудника, заведующего лабораторией клеточных механизмов гомеостаза крови Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук;

4. Талаева Владимира Юрьевича, доктора медицинских наук, профессора, ведущего научного сотрудника, заведующего лабораторией клеточной иммунологии Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;

5. Заботиной Татьяны Николаевны, доктора биологических наук, заведующего лабораторией клинической иммунологии и инновационных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

6. Петленко Сергея Викторовича, доктора медицинских наук, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» Федерального медико-биологического агентства;

7. Лиознова Дмитрия Анатольевича, доктора медицинских наук, профессора, директора ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, заведующего кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России;

Все отзывы положительные, принципиальных критических замечаний и вопросов не содержат. В отзывах подчеркивается актуальность исследования, новизна полученных результатов и их значимость для фундаментальной науки и практики. Отмечается, что диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне, положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации достоверны и полностью соответствуют цели исследования и поставленным задачам.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных

соискателем исследований: разработана научная концепция об активном контроле клетками трофобласта функциональной активности естественных киллеров при беременности, в рамках которой продемонстрированы стимуляция клетками трофобласта миграции NK-клеток в маточно-плацентарный комплекс, приобретение естественными киллерами под влиянием клеток трофобласта фенотипа децидуальных NK-клеток и изменение NK-клетками профиля экспрессии транскрипционных факторов; **впервые выявлено** подавление клетками трофобласта пролиферативной активности NK-клеток периферической крови, установлена более выраженная способность NK-клеток беременных женщин к пролиферации в присутствии клеток трофобласта; **впервые описано** снижение в присутствии клеток трофобласта экспрессии маркера регуляторной популяции NK-клеток - CD56 естественными киллерами женщин с привычным невынашиванием беременности; **впервые установлены** изменения проапоптотических рецепторов к TRAIL и цитотоксических белков в NK-клетках при взаимодействии с клетками трофобласта в присутствии цитокинов маточно-плацентарного комплекса, **впервые выявлены закономерности** изменения содержания белков, опосредующих цитотоксичность (гранзимов, перфорины, серпина B9), в NK-клетках и клетках трофобласта при их контакте; **дана комплексная характеристика** участия цитокина TGF β в коммуникации клеток трофобласта и NK-клеток; **доказано** наличие механизмов дистантного взаимодействия NK-клеток с клетками трофобласта с участием микровезикул; **определена ключевая роль** цитокинового микроокружения маточно-плацентарного комплекса, способствующего проявлению функциональных характеристик NK-клеток; **продемонстрировано**, что взаимодействие NK-клеток с клетками трофобласта не приводит к полной утрате естественными киллерами цитотоксических свойств, что подтверждает роль NK-клеток, как основных регуляторов инвазии трофобласта; **раскрыты закономерности** изменения цитотоксической активности NK-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта у пациенток с привычным невынашиванием беременности

в зависимости от фазы менструального цикла.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: **доказано положение** об изменении фенотипических и функциональных характеристик НК-клеток под влиянием клеток трофобласта и физиологических стимулов (цитокинов, растворимых факторов, секретируемых клетками ворсин хориона), в том числе **определен вклад** изменений взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта в патогенез привычного невынашивания беременности; **применительно к проблематике диссертации результативно** применены экспериментальные методы исследования, в том числе предполагающие использование клеточных линий, цитокинов и факторов, секретируемых клетками плаценты, а также НК-клеток периферической крови пациенток с привычным невынашиванием беременности, для обоснования выносимых на защиту положений диссертационного исследования; **изложены доказательства** диагностической ценности определения закономерностей цитотоксической активности НК-клетками при привычном невынашивании беременности.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: **разработана технология** определения функционального состояния НК-клеток периферической крови, на основании данных диссертационной работы разработаны и внедрены в клиническую практику способ оценки цитотоксической активности НК-клеток в отношении клеток трофобласта и способ оценки цитопротективного эффекта препаратов для лечения невынашивания беременности и бесплодия в отношении клеток трофобласта при их взаимодействии с естественными киллерами; **определены перспективы** практического использования результатов диссертационной работы, заключающиеся в оценке степени участия потенциальных клеток-мишеней в регуляции функциональной активности НК-клеток, а также в рекомендации дополнения оценки непосредственно цитотоксической активности НК-клеток определением их секреторной активности, способности к формированию микровезикул и определением пролиферативной активности

НК-клеток в присутствии клеток-мишеней; **представлены рекомендации** по оценке цитотоксической активности НК-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта для определения выраженности иммунной составляющей патогенеза привычного невынашивания беременности; **предложено** использовать разработанный технологический подход по определению цитотоксичности НК-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта для реализации персонализированного подхода в лечении привычного невынашивания беременности и оценке эффективности планируемой к применению медикаментозной терапии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что: **результаты** получены на современном сертифицированном оборудовании; выбор методов обоснован спецификой исследования и соответствует поставленным в работе задачам; основные результаты получены с применением разных экспериментальных подходов, предполагающих использование перевиваемых клеточных линий (NK-92, JEG-3, K-562) и первичного клинического материала (периферическая кровь, образцы ворсин хориона); разнообразие оцененных параметров и достаточный объем клинического материала увеличивает достоверность и значимость полученных результатов; **теория** построена на известных, проверяемых данных о характеристиках НК-клеток и их изменении при беременности; **идея** базируется на анализе собственных экспериментальных данных и результатах, представленных в литературе; **использованы** адекватные методы статистической обработки и анализа данных, объем проведенных экспериментов достаточен для получения статистически достоверных результатов; **концепция** о ведущем влиянии клеток трофобласта на функциональные характеристики НК-клеток при беременности подтверждена большим объемом экспериментальных наблюдений; **основные положения и выводы диссертационной работы** базируются на анализе полученных результатов, их грамотном обобщении и аргументированном сравнении с данными литературы, представленными в независимых источниках по данной тематике.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационной работы, а именно: в постановке цели и формулировке задач исследования, планировании работы, в подборе и анализе литературы, отражающей современное состояние исследований по выбранной проблематике, разработке оптимальных методических подходов, получении экспериментальных данных, статистической обработке полученных результатов и их анализе, в интерпретации и обобщении данных, и выработке на их основании концепции работы, в подготовке публикаций, написании текста диссертации и автореферата, апробации результатов на конференциях.

На заседании 23 января 2024 г. диссертационный совет принял решение присудить Михайловой Валентине Анатольевне ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 29 человек, из них 14 докторов наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология, 4 доктора наук по специальности 3.2.7. Иммунология, участвовавших в заседании, из 34 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 4 человека, проголосовали:

«за» – 29, «против» – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета

чл.-корр. РАН, д.б.н.



Шамова О.В.

Ученый секретарь диссертационного совета

д.б.н.

Алешина Г.М.

23 января 2024 г.