

ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующего лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства, доктора биологических наук профессора, Филатова Александра Васильевича о научно-практической значимости диссертационной работы Зиганшиной Марины Михайловны на тему: «Иммунопатогенетическая концепция развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод», представленной к защите в Диссертационный совет 24.1.180.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям: «3.3.3. – Патологическая физиология» и «3.2.7. – Иммунология»

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Зиганшиной Марины Михайловны посвящена изучению новых патогенетических механизмов развития больших акушерских синдромов и разработке инновационных подходов к диагностике и прогнозированию осложнений беременности и неонатальных исходов. В акушерстве проблема преэклампсии и задержки роста плода является глобальной, т.к. связана со стабильно высокими показателями материнских, перинатальных и неонатальных осложнений, профилактика, предикция и лечение которых (особенно ранних фенотипов) имеют очень низкую эффективность и пока неподвластны клинической медицине. Научные исследования патогенеза этих синдромов сфокусированы на изучении механизмов нарушений плацентации, развития гипертрофированного системного воспалительного ответа и связанной с ним эндотелиальной дисфункции. Однако результаты научных исследований, внедренных в клиническую практику, не приводят к заметным улучшениям сложившейся ситуации, и частота развития преэклампсии и задержки роста плода в популяции продолжает оставаться высокой.

В данной диссертационной работе основное внимание уделяется механизмам, основанным на гликан-опосредованных взаимодействиях между углевод-связывающими белками и их лигандами-гликанами, осуществляемых как в плаценте, так и в иммунной системе матери и

плода. Роль гликанов и углевод-связывающих белков в патофизиологии осложнений беременности и репродуктивной иммунологии не исследована должным образом. Автор на основании комплексного анализа факторов, участвующих в регуляции гликозилирования, а также гликанов клеточной поверхности и углевод-связывающих белков иммунной системы научно обосновал иммунопатогенетическую концепцию развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод. Концепция не только объединяет известные и изученные патофизиологические механизмы с позиции развития гликопатологии, и ее влияния на нарушение периферической и центральной толерантности при патологической беременности, но и предлагает систему путей решения клинических задач. Все вышеуказанное свидетельствует, что тема диссертационной работы Зиганшиной М.М. имеет особую актуальность, как для клинической медицины, так и для фундаментальной науки.

Научно-практическая значимость, новизна исследования и полученных результатов диссертационной работы

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений. Автором впервые представлена концепция развития плацента-ассоциированных осложнений беременности, основанная на идее взаимосвязи между формированием активированного гликотипа клеток и структур плаценты и нарушениями центральной и периферической толерантности к плоду.

В данной работе впервые введено понятие о гликопатологии плаценты, установлены гликаны, которые входят в состав паттернов опасности и являются активирующим фактором для иммунной системы матери и плода и могут инициировать реакции отторжения. Установлена их различная гистотопография в тканях плаценты беременных с преэклампсией и задержкой роста плода и отсутствие в тканях нормальной плаценты. Ранее реакции подобного типа связывали, главным образом, с высокополиморфными антигенами HLA I и II классов отцовского происхождения. Полученные в диссертационном исследовании данные существенно дополняют представления об иммунологических взаимоотношениях матери и плода и о развитии периферической толерантности к аллоантигенам, существующие на сегодняшний день.

Впервые из ткани плаценты выделены антигликановые антитела и установлена их специфичность. Идентифицированы резидентные антигликановые антитела, которые демонстрируют тропность к плацентарной ткани. Эти антитела можно назвать кандидатами на роль “блокирующих” антител, которые долгое время считались одним из основных факторов, обеспечивающих толерантность к плоду, но их специфичность не была установлена. Охарактеризованы особенности количественного содержания и содержания подклассов IgG этих антител в ткани плаценты при преэклампсии. Для одного из таких антител установлен регуляторный эффект на экспрессию маркеров активации эндотелия. В комплексе с исследованием мРНК генов иммунорегуляторных белков в ткани плаценты в диссертационной работе впервые были охарактеризованы особенности гликан-опосредованных иммунологических реакций при преэклампсии и оценена их роль в нарушениях периферической толерантности к плоду. Эти результаты имеют абсолютную новизну, не имеют аналогов в мировой и российской науке и являются значительным вкладом в иммунологию репродукции и понимание патофизиологических механизмов развития осложненной беременности.

В диссертационной работе на основании определения и анализа широкого перечня факторов клеточного и гуморального иммунитета были охарактеризованы механизмы нарушения центральной толерантности при беременности, осложненной развитием ПЭ. Были оценены субпопуляции иммунных клеток регуляторных и активированных фенотипов, иммунно-эндокринные факторы в периферической крови матери и пуповинной крови младенцев. Анализ этих результатов позволил автору сделать заключение об активирующем влиянии измененных гликопаттернов плаценты на иммунную систему матери и плода, т.к. эпитопы обнаруженных у матери и новорожденного антигликановых антител близки к гликанам, выявленным в составе гликопаттернов плаценты, а для ряда антител совпадает с этими гликопаттернами. Кроме того, у новорожденного измененный спектр антигликановых антител G класса, полученных от матери, ассоциирован с развитием перинатальной патологии. Патогенетическое значение антител ряда специфичностей подтверждается их присутствием в составе элюатов плаценты, крови матери и новорожденного, а также в составе диагностических сигнатур,

полученных в диссертационной работе. Также, некоторые антигликановые антитела связывают общие гликаны-мишени с галектинами человека, что чрезвычайно важно, поскольку галектины являются иммунорегуляторными белками иммунной системы и регулируют иммунологические реакции в системе мать-плацента-плод. Аналогичные результаты не были представлены и опубликованы в российской и зарубежной печати и имеют высокую теоретическую значимость для обеих специальностей, по которым защищается диссертационная работа.

Работа кроме теоретического имеет и практический выход – впервые получены диагностические сигнатуры, отличающие преэклампсию от других гипертензивных расстройств во время беременности, что необходимо на этапе постановки диагноза, и будет способствовать более раннему выявлению беременных с преэклампсией. Также установлены сигнатуры, прогнозирующие рождение ребенка с перинатальной патологией у матерей с преэклампсией на поздних сроках беременности и прогнозирующие осложненное (тяжелое) течение раннего неонатального периода. Сигнатурный подход в диагностике и прогнозировании имеет значительные преимущества, т.к. повышает показатели диагностической ценности теста и еще не имеет широкого распространения в клинической лабораторной диагностике.

Т.о., основные положения диссертационной работы имеют новизну и несомненное научное и практическое значение. В теоретическом плане работа существенно расширяет представления о механизмах иммунологической толерантности организма матери к плоду во время беременности и срыве этих механизмов при преэклампсии. В практическом приложении – работа предлагает новые маркеры, полученные с использованием сигнатурного подхода, который значительно повышает показатели диагностической ценности теста, поскольку объединяет несколько маркеров.

Обоснованность и достоверность результатов, выводов и положений, полученных в диссертационной работе

Целью диссертационного исследования, явилось изучение изменений гликанов и гликан-опосредованных взаимодействий между углевод-связывающими белками и их лигандами-гликанами в системе

мать-плацента-плод при больших акушерских синдромах, для расширения представлений об их патогенезе, и разработка на основании полученных результатов эффективного метода диагностики осложнений беременности. Таким образом, данное исследование имеет не только фундаментальное, но и практическое значение. Задачи соответствуют цели и выполнены в полном объеме.

Диссертационное исследование выполнено на высоком методическом уровне с использованием современных общеклинических, морфологических, биохимических и иммунологических методов исследования: ткань плаценты исследовалась методами иммуногистохимии, лектиновой гистохимии и методом тканевых матриц, клеточный иммунитет – с помощью 4-х и 5-цветного цитометрического анализа, гуморальный иммунитет – с использованием высокопредставительного гликанового эррея и ИФА. В диссертационном исследовании также были использованы методы ОТ-ПЦР, аффинная хроматография. Исследование получило одобрение этического комитета ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И Кулакова Минздрава России». Достоверность полученных данных не вызывает сомнений и подтверждается достаточным объемом клинических и воспроизводимостью экспериментальных исследований. При обработке результатов использованы адекватные и корректные методы статистического анализа, учитывающие массивность полученных данных и особенности расчета диагностических сигнатур. Все это демонстрирует высокий методический и доказательный уровень исследования.

Все части диссертационной работы имеют логическую взаимосвязь. Выводы и положения диссертации основаны на результатах, полученных в ходе выполнения работы, корректно интерпретированы и представляются в полной мере аргументированными. Печатные работы, основанные на результатах работы, опубликованы в ведущих рецензируемых журналах в полном соответствии со специальностями, по которым представлена работа.

Общая характеристика диссертационной работы

Оформление диссертационной работы соответствует требованиям ВАК РФ. Диссертация построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы

результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 393 листа, иллюстративный материал включает 44 таблицы и 83 рисунка. Список литературы состоит из 664 работ, из которых 41 – отечественный, 623 – зарубежный источник.

Во введении отражены актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи работы, определены научная новизна, научно-практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту и личный вклад автора.

В обзоре литературы, автор освещает современный взгляд на механизмы развития иммунологической толерантности к плоду и иммунопатогенез осложнений беременности. Центральная часть обзора посвящена описанию механизмов толерантности с участием гликан - опосредованных механизмов. Автор отмечает, что гликан - опосредованные механизмы толерантности изучены, главным образом, при онкологии и при аутоиммунных процессах. Механизмы иммунологической толерантности к плоду с участием гликанов исследованы точно и фрагментарно, и больше в животных моделях при беременности у плацентарных млекопитающих, что обосновывает их изучение при беременности у человека, поскольку гликан - опосредованные механизмы в иммунной системе регулируют процессы активации и торможения иммунного ответа. Обзор литературы свидетельствует о глубоком знании автором отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования.

Раздел “Материалы и методы” диссертационной работы представлен на 38 страницах и дает подробное и детальное описание используемых методов. Раздел “Результаты” занимает 115 страниц и иллюстрирован рисунками и таблицами. В разделе “Обсуждение” автор на 68 страницах проводит системный анализ полученных результатов, сравнивает их с основными тенденциями и направлениями, имеющимися в современной науке.

Заключение обобщает исследование и дает перспективы дальнейшей разработки темы. Выводы, основные положения диссертации и практические рекомендации соответствуют цели исследования, логично следуют из поставленных задач и отражают результаты исследования.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК и полностью отражает основное содержание диссертационной работы.

Достоинства, недостатки и замечания по содержанию и оформлению диссертации

Основным достоинством диссертационной работы является системный, междисциплинарный подход, который позволил комплексно исследовать гликаны, углевод-связывающие белки и факторы, влияющие и регулирующие гликозилирование, и рассматривать каждый объект функциональной системы мать-плацента-плод как часть целого, и представить основные результаты исследования как концепцию.

Необходимо также отметить методическую часть данной работы. Использованные методики описаны детально подробно, что позволит их воспроизвести и использовать в дальнейшем широкому кругу исследователей. Автором обоснован и доказан выбор каждого метода и методического варианта, сфокусировано внимание на частностях, например, временных сроках, которые допустимы до анализа выделенных из плаценты антител, т.к. при превышении этих сроков антитела теряют свою активность. Такие частности очень важны, т.к. могут приводить к искажению общей картины и влиять на результат. Но автор акцентирует внимание на таких подробностях, которые не являются лишними в контексте этой работы, и повышают доверие к полученным результатам.

Также необходимо отметить часть работы, связанную с исследованиями клеточного иммунитета. Использование широкой панели антител к маркерам клеточной поверхности иммунокомпетентных клеток позволило визуализировать в многоцветном цитометрическом анализе основные и малые субпопуляции Т-, В- и NK-клеток. Такое глубокое, по сути, и объемное, по существу, исследование клеточного иммунитета в парах мать-новорожденный проведено впервые. Кроме рутинных В1-, В2-клеток, Т-хелперов, Т-цитотоксических клеток, NK-клеток и NKT-клеток выявлен целый ряд субпопуляций клеток с фенотипом регуляторных: Т(рег)-хелперы ($CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{low\ to\ neg}$), Т(рег)-цитотоксические ($CD3^+CD8^+CD28^-$), В(рег)-клетки трех фенотипов ($CD19^+CD24^+CD27^+$; $CD19^+CD24^+CD38^{hi}$ и $CD19^+CD24^+CD38^{dim}$), NK(рег)-клетки ($CD3^-CD56^{bright}CD127^+$), а также активированные клетки: Т-хелперы

(активированные $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^+$), Т-цитотоксические эффекторные клетки ($CD3^+CD8^+CD28^+$), что позволило оценить регуляторный и активационный статус клеток иммунной системы матери и новорожденного. Так как исследование предполагало детальную оценку широкого спектра антител, было выполнено определение В-клеток памяти с помощью трех вариантов фенотипирования в соответствии с тремя системами классификации, что позволило оценить различные варианты В-клеток разных стадий дифференцировки и на разных стадиях иммунного ответа: от наивных В-клеток до покоящихся и поздних В-клеток памяти, что является сильной частью работы, т.к. полученные данные дополняют друг друга и позволяют дать обоснованную характеристику В-клеточного звена иммунной системы. Несмотря на то, что в практических рекомендациях клеточные маркеры осложнений беременности не предлагаются к клиническому внедрению, в данной работе идентифицированы субпопуляции, которые могут служить в качестве прогностических маркеров для оценки и прогнозирования осложнений в послеродовом и постнатальном периоде.

Существенных замечаний по диссертации нет.

Заключение

Диссертационная работа Зиганшиной Марины Михайловны «Иммунопатогенетическая концепция развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям «3.3.3. - Патологическая физиология» и «3.2.7. - Иммунология» является завершенной концептуальной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором комплексных исследований сформулированы представления о гликан-опосредованных иммунологических взаимоотношениях в системе мать-плацента-плод при нормальной и при патологической беременности и предложены маркеры для диагностики и предикции осложнений беременности, перинатальных и неонатальных исходов, что в совокупности можно квалифицировать как решение научной проблемы, имеющей научно-практическое значение для патологической физиологии и иммунологии.

Содержание диссертационной работы Зиганшиной Марины Михайловны «Иммунопатогенетическая концепция развития

гликопатологии в системе мать-плацента-плод», ее актуальность, научная новизна, объем исследований, методический уровень, достоверность полученных результатов, обоснованность сделанных выводов и положений, а также практические рекомендации и публикации по ней полностью соответствуют заявленным специальностям «3.3.3. - Патологическая физиология» и «3.2.7. - Иммунология». Диссертация соответствует требованиям п.п. 9–14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 (в актуальной редакции), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям «3.3.3. - Патологическая физиология» и «3.2.7. - Иммунология».

Официальный оппонент: Заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России», доктор биологических наук (14.00.36 Аллергология и иммунология),

профессор

Филатов

Филатов Александр Васильевич



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России» (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России). 115522, Российская Федерация, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24. Телефон: 8(499)311-67-78. E-mail: info@nrcii.ru