

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию ЗИГАНШИНОЙ Марины Михайловны «ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ РАЗВИТИЯ ГЛИКОПАТОЛОГИИ В СИСТЕМЕ МАТЬ-ПЛАЦЕНТА-ПЛОД», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.3.3 Патологическая физиология; 3.2.7 Иммунология

Актуальность темы исследования

Фундаментальной концепцией иммунологии является различие своего и чужого, которое формировалось на протяжении длительного времени в процессе эволюции. Эта способность иммунитета включает в себя широкий спектр сложных молекулярных механизмов, которые слаженно работают в системе. Именно поэтому с иммунологической точки зрения беременность является парадоксальным состоянием, при котором возникает так называемая иммунная толерантность. Иммунная толерантность при беременности – отсутствие у матери иммунной реакции на развивающийся плод и плаценту. Иммунную толерантность обеспечивает широкий спектр тканево-клеточных механизмов, в том числе и концепция «Th1/Th2/Th17/Treg». В то же время, феномен иммунной толерантности во время беременности обеспечивает не только организм матери, но и организм плода. Известно, что при гемохориальном типе плаценты, происходит тесный контакт плаценты и материнским кровообращением, вследствие чего клетки плода и матери взаимно проникают друг в друга. В связи с этим можно утверждать, что иммунная толерантность поддерживается с двух сторон.

Вопросы формирования иммунной толерантности, а также нарушение ее развития изучаются с позиции поиска генетических и эпигенетических факторов, с позиции функционирования иммунной системы, а также со стороны фетоплацентарных белков. Новый взгляд на эту проблему, со стороны углевод-белковых взаимодействий и гликома плаценты может существенно расширить наши представления о фундаментальных процессах формирования иммунной толерантности во время беременности.

Преэклампсия (ПЭ) и задержка роста плода (ЗРП) непосредственно влияют на структуру как материнской, так и перинатальной заболеваемости и смертности, что предопределяет медико-социальную значимость изучения данных патологий. Известно, что ключевыми факторами патогенеза ПЭ и ЗРП являются дефекты плацентации и последующее нарушение формирования иммунологической толерантности к аллоантигенам плода. Предполагается, что изменения гликома плаценты может быть значимым фактором патогенеза нарушений плацентации при ряде патологий.

В связи с этим, изучение механизмов формирования иммунной толерантности, поиск взаимосвязей между состоянием гликома и патологией беременности является одной из важнейших задач современной иммунологии репродукции. Целью данной работы являлось изучение гликанопосредованных взаимодействий между углевод-связывающими белками и их лигандами-гликанами в системе мать-плацента-плод при больших акушерских синдромах, связанных с дефектами плацентации (ПЭ и ЗРП). В целом, диссертация Марины Михайловны представляет собой научное исследование, актуализирующее проблему формирования иммунной толерантности во время беременности. Данная проблема имеет как фундаментальное, эволюционное значение, так и непосредственно прикладное, связанное с изучением механизмов формирования патологических состояний (ПЭ и ЗРП), что несомненно является актуальным направлением современной иммунологии.

Достоверность и обоснованность полученных в диссертационном исследовании результатов определяются высоким методическим уровнем работы, что включает контролируемые условия проведения экспериментов, использование обоснованных и адекватных контрольных образцов в лабораторных экспериментах, и групп сравнения в клиническом исследовании. Дизайн экспериментов и клинических исследований продуман и обоснован, соблюдалась этапность и логика выполнения исследований.

Первый этап исследований включал в себя исследование плаценты в норме и при патологии (ПЭ и СЗР), после анализа полученных результатов

были сформулированы задачи второго этапа – изучение клеточного иммунитета у матери и новорожденных, после чего были изучены гуморальные иммунные факторы, регулирующие процессы гликозилирования и развития толерантности (третий этап).

Число наблюдений в группах исследования достаточно, экспериментальные наблюдения выполнены в достаточном числе повторов. Статистические методы исследования адекватны и проводились с учетом массивных данных, полученных с использованием высокопроизводительных гликановых эрреев с введением поправки на множественность сравнений. Выводы и положения диссертационной работы сформулированы на основании полученных результатов и соответствуют цели и задачам исследования. Статистический анализ данных сделан на высоком уровне, оценка достоверности различий между группами проводилась с использованием критериев Манна-Уитни, Шапиро-Уилка, Краскелла-Уоллиса, Вилкоксона-Манна-Уитни в зависимости от распределения данных и поставленных задач. В ряде случаев применялся корреляционный анализ и поправка Бонферрони. В целом, статистические методы подобраны адекватно.

Материалы диссертации опубликованы в 61 печатных работах, в том числе 24 статьи в журналах перечня ВАК, 20 статей вошли в базу данных Scopus. Важно подчеркнуть наличие публикаций в таких профильных журналах, как Placenta (IF 3,1), Pregnancy Hypertension (IF 2,6), Reproductive Biology and Endocrinology (IF 4,2), International Journal of Molecular Sciences (IF 4,5), Scandinavian Journal of Immunology (IF 4,1), где Марина Михайловна является первым автором. Помимо этого, данные многократно были представлены на конференциях разного уровня, от Всероссийских до международных.

Характеристика содержания диссертационной работы.

Диссертация написана в классическом стиле и состоит из введения, и четырех глав: “обзор литературы”, “материалы и методы”, “результаты собственных исследований”, “обсуждение”, заключения, выводов, практических

рекомендаций, списка литературы, включающего 664 источника. Диссертация иллюстрирована 83 рисунками, представлено 44 таблицы.

Для реализации исследования было поставлено девять задач, которые направлены на достижение поставленной в диссертации цели.

Во **введении** диссертации автором сформулирована актуальность исследования, цель и задачи исследования, сформулирована научная новизна и теоретическая и практическая значимость, степень достоверности и апробация результатов диссертационного исследования, представлены основные положения, выносимые на защиту, а также внедрение результатов исследования в практику и соответствие диссертации паспорту научной специальности, а также личный вклад автора в получение результатов.

В **первой главе** представлен обзор литературы, детально рассматривающий факторы формирования иммунологической толерантности к аллоантигенам плода: основные иммунологические механизмы, основанные на углевод-белковом взаимодействии, поддерживающие гомеостаз при беременности. Обзор написан хорошим языком и затрагивает все аспекты, касающиеся данной работы. Особенно стоит отметить фрагмент обзора, посвященный АгАТ, который исчерпывающе описывает данный аспект формирования иммунной толерантности.

Глава 2 содержит описание материалов и методов, используемых в работе. Подробно описана организация работы, объем и дизайн исследования, глава содержит удачные иллюстрации, посвященные дизайну исследований. В главе описаны стандартные методы исследования (общеклинические, клинко-лабораторные и инструментальные методы), а также специальные методы - молекулярно-генетические, биохимические, иммунологические и морфогистохимические методы. Подробно описан микрочиповый анализ антигликановых антител сыворотки периферической и пуповинной крови. В конце главы описаны применяемые в работе статистические методы.

Глава 3 содержит результаты собственных исследований. Для плаценты представлены результаты макро- и микроскопическое

исследования, иммуно- и гистохимическое исследования, данные экспрессии мРНК генов иммунорегуляторных белков в ткани плаценты. Далее описана процедура выделения плацента-ассоциированных АгАТ и их характеристика, а также характеристика мишеней в тканях плаценты и биологических эффектов плацента-ассоциированных АгАТ. Представлены результаты по изучению субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток в периферической крови матери и пуповинной крови новорожденных, содержание прогестерона и IL-6 в периферической и пуповинной крови. Далее представлена характеристика профилей АгАТ у пациенток с физиологической беременностью и беременностью, осложненной ПЭ и ЗРП и характеристика репертуара АгАТ пуповинной крови здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией. В конце главы представлен расчет сигнатур АгАТ для дифференциальной диагностики ГРБ, расчет сигнатур АгАТ для предикции состояния здоровья новорожденного. В завершении представлена характеристика профилей специфичности галектинов человека, и сопоставление специфичности АгАТ, выявленных в периферической крови беременных с ГРБ и пуповинной крови новорожденных, со специфичностью галектинов. Полученные данные представлены как в рисунках, так и таблицах, в конце каждого блока есть ссылка на статью, где данные были опубликованы.

В главе 4 представлен последовательный и тщательный анализ всех полученных результатов, дана интерпретация полученных данных в сопоставлении с данными литературы. В частности, проанализированы патофизиологические изменения гликанов плаценты при плацента-ассоциированных осложнениях беременности, и патогенетические особенности продукции факторов периферической толерантности при плацента-ассоциированных осложнениях беременности. На уровне клеточного и гуморального иммунитета проанализированы патогенетические особенности системного иммунитета у беременных с ПЭ и их новорожденных. В завершении дан анализ возможного применения полученных данных к диагностике ПЭ и прогнозу неонатальных исходов.

В целом, описание полученных результатов проведено подробно, хорошо иллюстрировано рисунками и таблицами, таблицы и рисунки понятны и соблюден баланс между ними. При интерпретации результатов автор тщательно рассматривает все аспекты полученных данных с привлечением литературных данных, также обсуждаются предполагаемые причины выявленных изменений. В ряде случаев полученные данные суммированы в итоговые таблицы (Таблица 34, 38, 43) или тепловые карты (Рисунок 72), что упрощает понимание материала и позволяет представить большой объем полученных данных. В обсуждении результатов и заключении представлены удачные итоговые рисунки, суммирующие полученные результаты (Рисунок 81, 82, 83). По результатам выполненной работы сформулировано 11 выводов, сформулированных конкретно и соответствующих цели работы.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов, сформулированных в диссертации. Впервые проведено исследование антигенного репертуара антигликановых антител (АгАТ) при гипертензивных расстройствах во время беременности, получены новые данные об антигенном репертуаре при ПЭ и ЗРП; установлены характерные для беременности общие гликаны-мишени для АгАТ и галектинов; впервые получены характеристики резидентных АгАТ, локализованных в плаценте, и продемонстрировано их снижение при ПЭ; в результате сравнения плацентарных АгАТ и периферических АгАТ обнаружены отличия, ответственные за «блокирующую» функцию этих антител.

В широком смысле, расширено наше представление о гликоме плаценты и о гликопаттернах плаценты в норме и при патологии, а выявленные данные позволили впервые сформулировать понятие о гликопатологии плаценты при ПЭ и ЗРП.

Помимо этого, впервые проведено изотипирование IgG, аффинно выделенных из ткани плаценты, в результате которого установлено преобладание IgG1 над другими изотипами, а в ситуации ПЭ было установлено сниженное содержание IgG1 и, напротив, повышенное

содержание других изотипов IgG.

В данной работе впервые установлена различная экспрессия гликотопов анти-Галили антител в ткани нормальной и патологической плаценты (ПЭ и ЗРП): так, в норме Галили-подобные эпитопы практически отсутствуют, но в плаценте пациенток с ПЭ и ЗРП присутствуют.

На уровне клеточного компонента иммунной системы впервые установлено, что сформированный активированный гликотип плаценты при ПЭ влияет на иммунную систему матери и плода по-разному: у матери обнаружены изменения В-клеточного звена иммунитета, а у новорожденного – активированные Т-хелперы и Т-клетки с фенотипом регуляторных. Выявлено сниженное содержание анти Neu5Ac β антител в ткани плаценты при ПЭ. На модели *in vitro* с применением эндотелиальных клеток установлен активирующий эффект анти Neu5Ac β антител на экспрессию маркеров активации эндотелия. Таким образом, впервые показано, что данные антитела обладают регуляторной и блокирующей функцией во время беременности.

Теоретико-практическая значимость результатов исследования. Полученные результаты диссертационного исследования Марины Михайловны Зиганшиной вносят вклад в развитие представлений о формировании иммунной толерантности к полуаллогенному плоду на уровне углевод-белковых взаимодействий в норме и при патологии. Проведена огромная работа по уточнению специфичности плацентарных АгАТ, в результате которой выявлены антитела, функции которых связаны с блокированием т.н. “образов опасности”, вызывающим отторжение при аллотрансплантациях. Очевидно, что данное исследование имеет большое теоретическое значение, так как показано, что идентифицированные гликаны дополняют антигены гистосовместимости в процессе формирования иммунной толерантности в полуаллогенном эмбриону. В целом, идентифицированные гликаны могут иметь ключевое значение в иммунном ответе в аллогенных системах, которые ассоциированы не только с беременностью, но и с трансплантацией. Помимо этого, автор установил, что измененные гликопаттерны плаценты при ПЭ модулируют клеточный

иммунитет матери и новорожденного по-разному: у матери выражено влияние на В-клеточное звено, у новорожденного – на Т-клетки. При изучении АгАт выявлены корреляционные связи между АгАТ(IgG) одинаковой специфичности в пуповинной крови младенца и периферической крови матери, что на новом уровне подтвердило ключевую роль материнских IgG, проникающих через фетоплацентарный барьер в кровоток плода.

Практическая значимость работы заключается в прогностическом значении полученных результатов. Так, используя полученные данные по специфичности антител, рассчитаны т.н. диагностические сигнатуры, которые позволяют дифференцировать преэклампсию от других патологических состояний. Также на основании полученных результатов рассчитаны диагностические сигнатуры для прогнозирования неонатальных исходов, тяжести течения раннего неонатального периода и прогноза развития патологии у новорожденного.

Автореферат в полном объёме отражает результаты диссертационной работы.

Замечания и вопросы содержанию диссертации.

Важно подчеркнуть, что диссертация написана на очень высоком уровне и представленные замечания и вопросы несколько не снижают ее ценность.

В обзоре дана исчерпывающая информация про клетки иммунной системы, участвующие в формировании иммунной толерантности, однако не упоминаются Th17 клетки и Т-клетки иммунной памяти, которые также важны во время беременности. Также в главе 4 при изложении результатов в ряде рисунков (69,70) не указано число экспериментальных точек (n).

Вопросы:

1. Известно, что иммуномодулирующие эффекты основных

фетоплацентарных белков – α -фетопротеина, хорионического гонадотропина и гликоделина зависят от степени их гликозилирования. Возможна ли взаимосвязь между изменением гликома плаценты и продукцией данных белков?

2. Антитела против антигенов Галили относятся к естественным и продуцируются В1-клетками, являясь IgM, однако в работе исследуются прежде всего IgG, то есть можно предположить, что происходит переключение класса антител или антигенная презентация данных эпитопов через Т-хелперы?
3. Как Вы думаете, имеет ли значение для формирования иммунной толерантности на уровне углевод-белковых взаимодействий является ли беременность первой или повторной? Возможно ли, что уровень АгАТ зависит от этого фактора?

**Соответствие диссертации критериям, установленным
Положением о присуждения учёных степеней.**

Диссертация Зиганшиной Марины Михайловны на тему «ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ РАЗВИТИЯ ГЛИКОПАТОЛОГИИ В СИСТЕМЕ МАТЬ-ПЛАЦЕНТА-ПЛОД», является законченной квалификационной работой, в которой решена проблема, имеющая значение для патологической физиологии и иммунологии в целом, и для иммунологии репродукции в частности – проблема формирования иммунной толерантности в период беременности с позиции гликома плаценты; сформулирована концепция развития гликопатологии при приэкламписии и синдроме задержки роста плода и идентифицированы диагностические и прогностические маркеры для совершенствования тактики ведения осложненной беременности и улучшения перинатальных и неонатальных исходов.

Представленное к оппонированию диссертационное исследование соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых

степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, – с последующими редакциями, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Зиганшина Марина Михайловна, достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.3.3 Патологическая физиология; 3.2.7 Иммунология.

Официальный оппонент:

Д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник
Лаборатории клеточной иммунологии и
нанобиотехнологии «ИЭГМ УрО РАН»



С.А. Заморина

На обработку данных согласна



С.А. Заморина

Подпись д.б.н., доцента С.А. Замориной заверяю.
Директор «ИЭГМ УрО РАН», д.м.н., профессор



С.В. Гейн

2 декабря 2024 г.

Данные об авторе отзыва: Заморина Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН») – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева 13, тел.: 8 (342)280-74-42, +7-9194737737; e-mail: secretary@iegm.ru, mantissa7@mail.ru; <http://www.iegm.ru/>