

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор федерального государственного
автономного образовательного учреждения
высшего образования «Российский
национальный исследовательский
медицинский университет
им. Н.И. Пирогова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
доктор биологических наук, профессор,
академик РАН
Лукьянов С.А.



2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Зиганшиной Марины Михайловны
на тему «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

Диссертационная работа Зиганшиной М.М. посвящена изучению иммунопатофизиологических механизмов развития больших акушерских синдромов (БАС), в частности, преэклампсии (ПЭ) и задержки роста плода (ЗРП), частота развития которых составляет до 8 и до 10% наблюдений, соответственно, что является большой проблемой для общественного здравоохранения, т.к. оба синдрома связаны с тяжелыми осложнениями для матери и новорожденного, вплоть до летального исхода. Роль иммунной системы в патогенезе обоих синдромов исследовалась достаточно подробно. В аспекте взгляда на эти нозологии, как на проявления хронического отторжения плода, основополагающим постулатом, который обосновывает развитие осложнений беременности, является различие матери и плода по антигенам HLA. В настоящее время доказана связь отдельных полиморфизмов HLA I и HLA II классов у супружеских пар с развитием различных клинических фенотипов ПЭ и ЗРП, а также обосновано их влияние на клеточный и гуморальный иммунитет, в частности, преобладание Th1/Th17-зависимых иммунных реакций и продукцию анти-HLA, антиотцовских антилейкоцитарных,

антифосфолипидных и др. антител к клеткам и клеточным фрагментам при осложненной беременности. Однако очевидно, что патологические реакции отторжения не ограничиваются только реакцией на высокополиморфные антигены HLA, но имеет значение роль комплекса факторов.

В представленной диссертационной работе автором изложено новое видение этой сложной проблемы: показана связь между развитием гликопатологии плаценты и нарушениями механизмов толерантности к фетальным аллоантигенам. Контакт аллогенных клеток происходит в области мембраны, покрытой гликокаликсом. Поскольку подавляющее большинство молекул биологических жидкостей и мембранных рецепторов, включая HLA антигены гликозилировано, очевидно, что роль гликанов, а также антигликановых антител, которые в значительном количестве представлены в крови, не исследована, а их значение не обосновано в акушерстве.

Механизмы нарушений периферической и центральной толерантности к аллоантигенам плода рассмотрены в диссертационной работе в аспекте формирования в плаценте гликопаттернов опасности, их влияния на клеточный и гуморальный иммунитет матери и плода, а также недостаточной продукции антигликановых антител с протективной, регуляторной функцией. Т.о. сформулирована и научно обоснована новая концепция, которая расширяет понимание патофизиологических механизмов развития осложнений беременности, предлагает новые диагностические и прогностические маркеры и создает базу для разработки терапевтических подходов, основанных на иммуноглобулинах, что является актуальным, т.к. существующие диагностические и лечебные мероприятия не имеют эффекта.

Связь с планом научно-исследовательских работ

Диссертационное исследование Зиганшиной М.М. выполнено в соответствии с планом соответствующей отрасли науки и технологий и планом научно-исследовательских работ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, в рамках Государственного задания МЗ России: № г.р.: 116082210002 «Изучение диагностической и прогностической роли молекулярно-

генетических, иммунологических, эпигенетических факторов в развитии преэклампсии»; № г.р. ААА-А15-1151231101178 «Изучение диагностической и прогностической роли молекулярно-генетических, иммунологических, биохимических, митохондриальных факторов в задержке роста плода»; № 121040600435-0 «Обоснование персонализированных подходов к антигипертензивной терапии при ГРБ и ПЭ», а также гранта РФФИ №19-015-00102 «Изучение фундаментальных механизмов формирования иммунологической толерантности к плоду».

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Автором сформулирована новая концепция развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод, которая обосновывает нарушения иммунного реагирования матери и новорожденного при БАС, связанных с дефектами плацентации. В рамках концепции впервые дано понятие о гликопатологии плаценты, охарактеризованы гликопаттерны в основных структурах плацентарного барьера, которые активируют иммунную систему матери, инициируя клеточный и гуморальный иммунный ответ. Впервые доказано, что составной частью гликопаттернов в ткани патологической плаценты беременных с ПЭ и ЗРП являются Галили-подобные гликотопы, которые обуславливают реакции хронического отторжения плода. Установлена их локализация в клетках и структурах плаценты, различная при ПЭ и ЗРП.

В диссертационной работе впервые дана комплексная и детальная характеристика факторов, регулирующих периферическую толерантность к аллоантигенам плода в плаценте. В частности, проведена элюция с ткани плаценты антител, которые находятся в связанном с антигенами состоянии (в терминологии автора плацента-ассоциированные антитела) и протестировано их связывание с широким репертуаром гликанов высокопредставительного гликанового эррея (рассматривались антитела к 400 гликанам). Необходимо отметить, что до этого специфичность антител, связанных с антигенами плаценты, вследствие методических ограничений, установлена не была.

Автором впервые проведено аффинное выделение антигликановых антител отдельных специфичностей из ткани плаценты и определены особенности изотипического состава IgG выделенных антител. В диссертационной работе впервые продемонстрирован выраженный эффект антигликановых антител к β -форме N-ацетилнейраминовой кислоты на снижение экспрессии поздних маркеров активации эндотелия. Этот эффект воспроизводился при различных экспериментальных условиях *in vitro*, которые моделируют как протективный эффект предсуществующих антител в условиях, предшествующих воздействию провоспалительного стимула, так и эффект терапевтического воздействия антител в условиях воспалительной реакции и восстановления после ее завершения. Необходимо отметить, что данные антитела были идентифицированы в диссертационной работе как плацента-ассоциированные и не исследовались ранее.

Не менее значимым аспектом диссертационной работы Зиганшиной М.М. явилось исследование механизмов развития центральной толерантности к плоду. Диссертант рассматривает гликопатологию плаценты как активационный стимул для изменений клеточного и гуморального звена иммунной системы матери и влияние этого стимула на развитие иммунной системы новорожденного. Автором впервые проведено масштабное исследование клеток иммунной системы в периферической крови матерей и пуповинной крови новорожденных с акцентом на клетки активированных и регуляторных фенотипов, которые являются значимым фактором механизмов развития толерантности к плоду на системном уровне. Впервые проведено детальное исследование В-клеточного звена иммунной системы. С помощью различных техник гейтирования были охарактеризованы В-клетки, находящиеся на разных стадиях дифференцировки – от наивных В-клеток до В-клеток памяти. Ряд субпопуляций клеток, в частности, NK-клетки с фенотипом регуляторных ($CD56^{bright}CD127^{+}$), Т-регуляторные цитотоксические ($CD3^{+}CD8^{+}CD28^{-}$) впервые исследовались у беременных и их новорожденных.

Кроме новых данных по клеточному иммунитету в диссертационной работе получены данные о антигликановых антителах у беременных с гипертензивными расстройствами во время беременности (ГРБ), которые не были описаны ранее. Полученные результаты легли в основу нового диагностического подхода, основанного на сигнатурах антигликановых антител, предложенного для уточнения

диагноза нозологий из группы ГРБ, предикции неонатальных исходов при ПЭ, и предикции течения раннего неонатального периода у новорожденных от матерей с ПЭ на поздних сроках беременности.

Обоснованность использованных методов, а также полученных результатов и положений диссертации

Диссертационная работа Зиганшиной М.М. выполнена на достаточном клиническом материале. В исследование совокупно было включено 399 беременных различных нозологий (ЗРП и нозологии группы ГРБ), а также здоровые беременные, как группа сравнения. Диагноз ЗРП и дифференциация гипертензивных расстройств во время беременности проводились по МКБ-10 и клиническим рекомендациям. Включение в группы исследования осуществлялось по методу подбора пар, что является свидетельством сопоставимости групп. Часть данных получено экспериментально. В экспериментальных исследованиях представлено обоснование выбранных условий эксперимента, учтены и устранены вмешивающиеся факторы. Каждый эксперимент повторялся не менее трех раз.

Основными принципами планирования и выполнения исследований были: тщательный отбор пациенток на основании подробного изучения клинико-анамнестических данных, течения и исходов беременности; сопоставление клинико-анамнестической характеристики беременных с результатами морфологических исследований плаценты; комплексное клинико-иммунологическое исследование с выявлением взаимосвязей между исследуемыми факторами. Диссертационная работа состоит из трех этапов, которые взаимосвязаны и обоснованы логикой исследования. Результаты каждого этапа исследования определяют последующий. Выводы и положения диссертации доказаны и аргументированы. Практические рекомендации обоснованы клиническими и экспериментальными данными.

В работе использован комплекс современных высокотехнологичных методов исследования: иммуногистохимия, лектиновая гистохимия, метод тканевых матриц, многоцветная проточная цитометрия, ИФА, ОТ-ПЦР, культуральный метод, аффинная хроматография, а также использованы высокопредставительные гликановые эрреи для исследования AgAT и галектинов.

Автором выполнен адекватный статистический анализ полученных данных, что определяет высокую степень достоверности результатов, положений и выводов диссертационного исследования. Стоит отметить, что математическая обработка результатов гликанового эррея проводилась в соответствии с разработанным алгоритмом для анализа массивных данных с контролем воспроизводимости, нормализации данных и учетом поправки на множественность. Поиск диагностических сигнатур антигликановых антител, основывался на блочном гибридном генетическом алгоритме с методом оптимизации Тагучи.

Результаты диссертационного исследования опубликованы в отечественных и зарубежных высокорейтинговых рецензируемых журналах, а также представлены и обсуждены на международных и всероссийских форумах, конференциях и конгрессах.

Диссертационная работа Зиганшиной М.М. полностью отвечает требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология (п. 2, 3, 4, 6, 10) и 3.2.7. Иммунология (п. 2, 4, 6).

Научная и практическая значимость результатов, полученных автором диссертации

Автором на значительной выборке беременных, на основании анализа результатов экспрессии гликанов в структурах плацентарного барьера, а также изучения в плаценте, у матери и у новорожденного комплекса клеточных и гуморальных факторов, регулирующих периферическую и центральную толерантность и ассоциированных с регуляцией гликозилирования, впервые сформулирована новая иммунопатогенетическая концепция развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод. Полученные при выполнении диссертационной работы результаты свидетельствуют о формировании “образов опасности” углеводной природы в плаценте беременных с ПЭ и ЗРП, что имеет патофизиологическое значение, т.к. описанные гликопаттерны отсутствуют в норме и вызывают активацию иммунной системы матери, направленную на элиминацию чужеродных антигенов. Идентифицированные в плаценте гликопаттерны в дополнение к антигенам гистосовместимости имеют ключевое значение в иммунном

ответе в аллогенных системах, что существенно дополняет понимание механизмов отклонения от иммунного надзора при беременности. Результаты открывают новое направление исследований – изучение гликопатологии плаценты, и способствуют расширению представлений о патогенезе ПЭ и ЗРП.

В представленном исследовании гликопатология плаценты рассмотрена как фактор, влияющий на функционирование системы мать-плацента-плод при плацента-ассоциированных осложнениях беременности, который определяет развитие иммунного реагирования по патологическому типу у матери и, особенности иммунного реагирования у плода. Результаты диссертационной работы обосновывают участие гликанов, антигликановых антител и факторов, регулирующих гликозилирование в развитии центральной и периферической толерантности к плоду, что представляется значимым с позиции новых знаний о механизмах развития толерантности при беременности и их нарушениях при патологии.

Примененный в диссертации подход, основанный на сопоставлении спектров антигликановых антител, элюируемых с плаценты и детектируемых в периферической крови, позволил выявить истинные плацента-ассоциированные антитела, которые имели высокую частоту встречаемости в плаценте, но практически не встречались в крови. Эти антитела вызывают особый интерес, поскольку являются прямыми кандидатами на роль блокирующих антител, которые играют центральную роль в развитии толерантности к аллоантигенам плода. Этот подход открывает новые перспективы для поиска биологически активных молекул, регулирующих иммунный ответ в аллогенных системах. С его помощью были выявлены и охарактеризованы антитела к β -форме N-ацетилнейраминовой кислоты. Их эффект на клетки эндотелия, выявленный в *in vitro* исследованиях указывает на возможности для дальнейших исследований в практических целях и разработки иммуноглобулинового препарата с регуляторным действием на сосудистый эндотелий.

Полученные результаты позволили обосновать диагностическую ценность определения антигликановых антител периферической и пуповинной крови. Определение антигликановых антител рекомендовано в медицинских организациях

3-го уровня у беременных с ГРБ на поздних сроках для верификации диагноза, предикции перинатальных осложнений и течения раннего неонатального периода.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные в диссертационном исследовании результаты и выводы внедрены в образовательный процесс при подготовке студентов, научных и научно-педагогических кадров ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ; ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России; ГНЦ институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН. Результаты диссертационной работы внедрены в практическую работу первого акушерского отделения патологии беременности ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России и в лабораторные разработки ООО «Семиотик». Разработан прототип диагностической тест-системы для дифференциальной диагностики гипертензивных расстройств во время беременности.

Полученные результаты могут иметь значение в реализации персонифицированного подхода для прогноза перинатальных осложнений и течения раннего неонатального периода у новорожденных. Прослеживается дальнейшее продолжение темы в аспекте разработки подходов к патогенетически обоснованному лечению эндотелиальной дисфункции при ПЭ на основе полученных в диссертационной работе результатов в моделях *in vitro* по установленному эффекту снижения экспрессии поздних активационных маркеров под воздействием анти-Neu5Ac β антител в провоспалительных условиях на клетки эндотелия.

Структура и объем диссертации

Диссертация Зиганшиной М.М. имеет традиционную структуру и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список использованной литературы. Работа изложена на 393 печатных листах, включает 83

рисунка и 44 таблицы. Список литературы состоит из 664 источников, из которых 41 – отечественные и 623 – зарубежные.

Автореферат изложен на 48 листах и отражает основные результаты и положения диссертационного исследования.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Зиганшиной Марины Михайловны не имеется.

Заключение

Диссертационная работа Зиганшиной Марины Михайловны на тему: «Иммунопатогенетическая концепция развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод», научные консультанты - академик РАН, д.м.н, профессор Сухих Г.Т. (ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России) и д.х.н., профессор Бовин Н.В. (ФГБУН ГНЦ ИБХ РАН), представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология, 3.2.7. Иммунология, является завершенным научно-квалификационным исследованием, результаты которого можно квалифицировать как научное достижение, имеющее существенное значение для современной патофизиологии, иммунологии и акушерства, содержащее решение важной научной проблемы: разработка новой концепции, основанной на выявлении нарушений гликан-зависимых механизмов иммунологической толерантности к плоду при плацента-ассоциированных осложнениях беременности, что расширяет представления об их патогенезе и способствует повышению эффективности диагностики и прогноза перинатальных осложнений, и имеет важное научно-практическое значение для патологической физиологии и иммунологии.

По актуальности, объему выполненных исследований, теоретической и практической значимости, достоверности результатов и обоснованности выводов, диссертационная работа Зиганшиной Марины Михайловны полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (в действующей редакции), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.3.3. Патологическая физиология, 3.2.7. Иммунология.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на совместном заседании кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии ИБПЧ и кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, протокол № 3 от 10.12.2024.

Профессор кафедры
патофизиологии и клинической
патофизиологии ИБПЧ
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России
д.м.н., профессор

Панина

Панина М.И.

Профессор кафедры
иммунологии МБФ
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России
д.м.н., профессор

Ганковская

Ганковская Л.В.

Подпись профессора кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии ИБПЧ Паниной М.И. и профессора кафедры иммунологии МБФ Ганковской Л.В. заверяю

Ученый секретарь
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России
к.м.н., доцент

26.12.2024г.



О.М. Демина

О.М. Демина

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет).

Адрес: 117513, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

Телефон: +7 (495) 434-14-22; +7 (495) 434-03-29; e-mail: rsmu@rsmu.ru

Официальный сайт: <http://rsmu.ru>