

ОТЗЫВ

Официального оппонента доктора медицинских наук, ведущего научного сотрудника лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии Федерального государственного бюджетного учреждения «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Кулида Людмилы Викторовны о научно-практической значимости диссертационной работы Низяевой Натальи Викторовны на тему «Морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика поражений плаценты и их роль в патогенезе преэклампсии», представленной на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.02 – Патологическая анатомия.

Актуальность избранной темы исследования

Диссертационное исследование Низяевой Натальи Викторовны «Морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика поражений плаценты и их роль в патогенезе преэклампсии» посвящено одной из актуальных проблем современного акушерства. Преэклампсия (ПЭ) – это мультисистемное патологическое состояние, возникающее во время беременности. Клинические признаки ПЭ манифестируют после 20-й недели гестации. ПЭ определяет высокие показатели перинатальной заболеваемости и занимает ведущее место в структуре причин младенческой и материнской смертности. Частота ПЭ составляет 3–8% и, несмотря на многочисленные научные исследования, не имеет стойкой тенденции к снижению.

Патологические процессы при ПЭ развиваются во всех элементах функциональной системы «мать-плацента-плод», при этом наибольшие изменения определяются в плаценте и исчезают после родоразрешения. Результаты многочисленных научных исследований доказана ведущая роль плаценты в манифестации ПЭ, однако патофизиология данного состояния требует дальнейшего исследования и детализации ряда позиций.

В диссертации Низяевой Н.В. дана комплексная характеристика поражений плаценты на различных уровнях ее структурной организации, и определена их роль в развитии ПЭ.

Выявление патогенетических детерминант данного осложнения беременности позволит расширить представления о механизмах его развития, что обеспечит новый персонифицированный подход к прогнозированию и диагностике ПЭ с определением тактики ведения данной категории пациенток.

Важной отличительной чертой представленного диссертационного исследования является то, что автор раскрывает звенья патогенеза ПЭ через комплексное морфологическое и молекулярно – генетическое исследование плаценты. На основании анализа динамики ряда диагностических маркеров, как в ткани плаценты, так и в биологических жидкостях (кровь, моча), позволили Низяевой Н.В. разработать новые подходы к диагностике и предикции данного осложнения беременности. Учитывая высокую социальную и медицинскую значимость проблемы, анализируемая работа является актуальной не только для науки, но и для практического здравоохранения.

Диссертация соответствует паспорту специальности 14.03.02 – патологическая анатомия по следующим областям исследования: 1) морфологическая характеристика поражений плаценты при преэклампсии (макроскопическое исследование плаценты; гистологическое исследование); 2) ультраструктурные особенности мезенхимальных клеток стромы ворсин плаценты и трофобласта при преэклампсии; 3) анализ экспрессии toll-like рецепторов в структурах плаценты; 4) оценка экспрессии ренина и пептидов ангиотензина в ткани плаценты (иммуногистохимическое исследование); 5) особенности экспрессии SERPINA1 в структурах плаценты при ПЭ (иммуногистохимическое исследование); 6) оценка экспрессии микроРНК в ткани плаценты при ранней и поздней ПЭ методом CISH.

Степень обоснованности и достоверности полученных научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.

Обоснованность научных положений, сформулированных в диссертации Низяевой Н.В., обусловлена четко поставленной целью, полностью соответствующей названию и содержанию диссертации. Цель работы и задачи исследования согласуются с положениями, выносимыми на защиту. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации обоснованы результатами проведенных исследований.

Изучение представленных в диссертации материалов показывает, что работа выполнена на достаточной клинической выборке. В исследовании приняли участие 776 беременных женщин, включая 237 пациенток с преэклампсией ($n = 237$) и 539 пациенток - без гипертензивных расстройств. Группы сравнения были сопоставимы по срокам гестации (до и после 34 недель беременности), возрасту, характеристикам соматического и акушерско - гинекологического анамнезов. Представленные в исследовании группы достаточны по количеству пациенток, репрезентативны по независимым характеристикам, доказана их однородность и нормальность распределения в группах. Таким образом, контингент обследованных пациенток, современные комплексные методы исследования позволили решить поставленные задачи на высоком научно-практическом уровне.

Представленные автором данные не вызывают сомнений в достоверности. Статистическая обработка полученных результатов проведена в пакете программ «Statistica for Windows v. 8». Для описания количественных параметров использовались средние, минимальные и максимальные значения, стандартное отклонение, медианный и межквартильный интервал. Сравнение средних величин проводилось с помощью t-критерия Стьюдента и дисперсионного анализа с проверкой равенства дисперсий тестом Бартлетта. Оценка полуколичественных

показателей проводилась с помощью непараметрического теста Манна–Уитни, а проверка нормальности распределения исходных данных с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Выраженность иммуногистохимического окрашивания и хромогенной гибридизации *in situ* (CISH) оценивались посредством компьютерной программы по интенсивности коричневого окрашивания продукта реакции в структурах при помощи системы анализа изображения Nis-Elements на базе микроскопа Nikon ECLIPSE в единицах оптической плотности. Кроме того, значимость результатов подтверждена методами статистической обработки данных, адекватными поставленным задачам. Достоверность полученных различий определялась по общепринятым принципам в аналитической статистике (при $p \leq 0.05$ выводы считались значимыми, при $p \leq 0.001$ – максимально значимыми).

Научная новизна

Научной новизной данного исследования является то, что автором впервые в стромах ворсин описана гетерогенная популяция клеток мезенхимального происхождения, телоцитов, которые являются своеобразными зонами роста и регенерации ворсин. Дана характеристика четырех типов телоцитов, отличающихся по форме, расположению в ворсине и экспрессии. Определен маркер (TMEM16a) для идентификации телоцитов плаценты. Приведены данные об ультраструктурных и иммуногистохимических особенностях телоцитов и их роли в развитии ПЭ.

Низяевой Н.В. впервые доказана способность трофобласта плаценты к экспрессии ингибитора протеаз SERPINA1 ($\alpha 1$ -антитрипсин) с выявлением цитоплазматического, мембранозного и гранулярного типов окрашивания. Наряду с данной локализацией, накопления SERPINA1 при преэклампсии выявлены в депозитах плодного фибриноида в зонах Лангханса, Рора и Нитабуха, что является дополнительным фактором снижения инвазии трофобласта.

Посредством жидкостной хромато-масс-спектрометрии определено наличие пептидов SERPINA1 в моче беременных при тяжелой ПЭ, и их отсутствие при неосложненной беременности и при ПЭ умеренного течения. При сопоставлении полученных результатов автором разработана диагностическая основа теста для определения степени тяжести ПЭ, что подчеркивает и практическую значимость проведенных исследований.

Впервые при ПЭ был описан ZBP-1 (DAI), ДНК-распознающий рецептор, определяемый в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте, в клетках стромы ворсин и эндотелии сосудов. Расширены теоретические представления о патогенезе ПЭ на основании анализа специфических для трофобласта микроРНК: микроРНК-127-3p, -376a-5p, -423-5p, -519-3p, -532-5p, -539-5p, let-7e-5p, let-7c-5p, -181a, -155 и -146a, что отражает неполноценность трофобласта и дисфункцию плаценты.

Диссертационное исследование Низяевой Н.В. имеет фундаментальное значение, т.к. содержит доказательные моменты роли плаценты в качестве альтернативного источника продукции вазоконстрикторов во время беременности. Выявленная повышенная экспрессия пептидов ангиотензина в структурах плаценты отражает один из важных механизмов развития гипертензивных состояний при ПЭ.

Значение выводов и рекомендаций, полученных в диссертации для науки и практики

Углубленное изучение клинических данных, молекулярно-генетических, функциональных, иммунологических и патоморфологических параметров позволило существенно дополнить и расширить фундаментальные представления о патогенезе ПЭ. Дана морфологическая характеристика плацент при ранней и поздней ПЭ, определен спектр патоморфологических изменений при различных степенях тяжести данного осложнения беременности. В исследовании было показано, что тяжелая преэклампсия ассоциирована с выраженной дисфункцией плаценты, необратимостью морфологических изменений в виде повреждения

синцитиотрофобласта и фиброзирования стромы ворсин. При умеренной преэклампсии, имеющей преимущественно позднюю манифестацию, плацента находится в состоянии компенсации, проявляющейся менее выраженными изменениями ворсин.

В качестве показателя тяжелой ПЭ диссертантом предложено использовать повышение соотношения вазоконстриктора ангиотензина II (1-8) по отношению к вазодилататору ангиотензина (1-7) в плазме крови при ранней ПЭ.

Автором диссертационного исследования Низяевой Н.В. доказано, что повышение уровня пептидов SERPINA1 в моче при ПЭ может стать основой для диагностического теста при выявлении пациенток с наиболее тяжёлым течением преэклампсии.

При анализе микроРНК было выявлено, что микроРНК-423-5p значимо повышается в материнской плазме при ранней преэклампсии.

Оценка содержания диссертации

Диссертация изложена на 336 страницах печатного текста, содержит 25 таблиц и 44 рисунка, состоит из введения, основной части, включающей обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 8 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложений.

Во введении автором чётко сформулированы цель и задачи исследования. Основной целью диссертационного исследования явился анализ морфологических, молекулярно-генетических поражений плаценты и установление их роли в патогенезе преэклампсии.

Во введении чётко отражена актуальность исследования, акцентированы нерешенные вопросы патогенеза ПЭ. Формулировка научной новизны и положений, выносимых на защиту, не вызывают никаких возражений.

Литературный обзор, основанный на углубленном анализе современных литературных источников, четко определяет зону интересов,

которые будут рассматриваться в данной главе. Библиография, включающая 571 источник: 58 - на русском и 513 - на английском языках, что дает всесторонне представление о текущем состоянии вопроса.

Раздел «Материалы и методы исследования» содержит тщательно изложенную информацию о разнообразных методиках, которые использовались автором для достижения поставленной цели и реализации задач исследования.

Отличительной чертой диссертационного исследования является то, что с каждой задачей соотнесен дизайн исследования с выделением ретроспективного и проспективного этапов. Основной объём работы выполнен с использованием как традиционных морфологических (макро и микроскопического методов), так и современных методов исследования, включающих иммуногистохимию, иммуноферментный анализ, хромогенную гибридизацию *in situ*, жидкостную хромато-масс-спектрометрию и ПЦР в реальном времени.

Статистическая обработка полученных результатов выполнена согласно современным требованиям медико-биологической статистики.

Результаты собственных исследований подробно изложены и четко систематизированы. На первом этапе исследования был выполнен анализ клинико-лабораторных показателей пациенток, включенных в исследование. В работе приведены морфологические особенности плаценты, соотнесены с тяжестью течения заболевания.

В главе, посвященной морфологическим изменениям плаценты при преэклампсии, представлен подробный анализ морфологических особенностей при различных вариантах и степени тяжести преэклампсии. Низяевой Н.В. было показано, что показатель массы плаценты не является значимой характеристикой, которую следовало бы принимать во внимание. Автором доказано, что большее значение при оценке тяжести ПЭ имеет анализ структурных особенностей ворсинчатого дерева и степень его повреждений.

В главе, посвященной ультраструктурным особенностям ворсинчатого хориона, плаценты диссертантом сделан вывод, что тяжелая ПЭ, ассоциированная со повреждением синцитиотрофобласта, ведет к резкому нарушению гемоплацентарного барьера и развитию плацентарной недостаточности.

Высокий уровень повреждения трофобласта ворсин плаценты подтверждает и увеличение концентрации фетальной ДНК в плазме материнской крови. Уровень фетальной ДНК был измерен в плазме материнской крови на сроках 11-14, 24-26, и 30-32 недель гестации (проспективное исследование). В результате исследования было выявлено, что, по сравнению с неосложненной беременностью, концентрация фетальной ДНК в плазме крови матери значимо выше в группе ПЭ на всех сроках, начиная с 11–14 недель гестации. Значительное повреждение и слущивание трофобласта с поверхности ворсин, а также выраженные дистрофические изменения при тяжелой ПЭ – причина повышения фетальной ДНК. Кроме того, оценка ДНК и РНК-распознающих рецепторов врожденного иммунитета в ворсинах плаценты продемонстрировала наиболее высокую цитоплазматическую экспрессию TLRs (особенно TLR9), а также NOD, ZBP-1 в цито-, синцитиотрофобласте, синцитиальных узелках, вневорсинчатом цитотрофобласте, децидуальных клетках при тяжелой ПЭ на фоне снижения мембранного окрашивания.

В главе, посвященной анализу метаболитов ренин-ангиотензиновой системы (РАС) показана возможность синтеза плацентой ключевых лигандов РАС ренина и ангиотензина с повышением их уровня в структурах плаценты при ПЭ. Учитывая, что тяжелая ПЭ ассоциирована с повреждением плаценты и трофобласта, слущивание и массивное поступление клеток трофобласта в материнский кровоток приводит к изменениям соотношения метаболитов РАС в плазме крови, что способствует повышению артериального давления.

Кроме того, в настоящей диссертационной работе приведены данные о наличии пептидов SERPINA1 в моче женщин, страдающих гипертензивными

расстройствами при беременности. Наличие пептидов SERPINA1 в моче женщин, страдающих тяжёлой преэклампсией, выявленных методом жидкостной масс-спектрометрией, коррелировало практически со всеми значимыми клиническими и лабораторными показателями: с артериальным давлением, протеинурией, маркерами повреждения печени и др.

Наряду с этим, при иммуногистохимическом исследовании установлено наличие экспрессии SERPINA1 в ворсинах плаценты. При ПЭ экспрессия SERPINA1 значимо увеличена в цито- и синцитиотрофобласте, синцитиальных узелках, вневорсинчатом трофобласте и децидуальных клетках по сравнению с неосложненной беременностью. С разрушением цито- и синцитиотрофобласта при тяжелой ПЭ связана потеря мембранной экспрессии SERPINA1 в трофобласте вплоть до её полного исчезновения. Особенно отчётливо эта тенденция проявлялась у пациенток, с обнаружением пептидов SERPINA1 в моче.

В главе, посвященной анализу микроРНК в ткани плаценты и плазме крови при различных вариантах преэклампсии разными методами: методом глубокого секвенирования, ПЦР в реальном времени, а также для оценки локализации микроРНК в ворсинах плаценты – методом хромогенной гибридизации *in situ* (CISH).

Первоначально микроРНК были проанализированы методом глубокого секвенирования на ограниченном количестве образцов. Для подтверждения этих данных был использован метод количественной ПЦР в реальном времени. ПЦР-анализ позволил отметить значимое снижение экспрессии выбранных 6 микроРНК: -532-5p, -423-5p, -127-3p, -376a-5p, -539-5p, -519a-3p в ткани плаценты как при ранней, так и при поздней ПЭ ($p < 0.001$). Повышение уровня микроРНК-423-5p в плазме крови беременных отмечено при ранней ПЭ. Методом CISH было показано, что микроРНК, могут также синтезироваться не только в цито- и синцитиотрофобласте, но и синцитиальными узелками, децидуальными клетками, слабая экспрессия отмечена в мезенхимальных клетках и в эндотелии сосудов ворсин.

В диссертационной работе на основе специальных баз микроРНК и их генов–мишеней приведен подробный анализ функций изучаемых микроРНК.

При обсуждении результатов исследования и в заключении представлен подробный анализ полученных результатов исследования.

Документация оформлена правильно, результаты исследования, приведенные в диссертации полностью соответствуют объему выполненных исследований. Полученные результаты обобщены в виде 9 выводов, которые соответствуют цели и вытекают из реализованных задач диссертации.

Материалы проведенного исследования достаточно полно освещены на многочисленных научно-практических конференциях с международным участием и международных конгрессах. Печатные работы, опубликованные по теме диссертации, отражают в полном объеме, полученные автором данные.

Диссертация построена по традиционному принципу, состоит из введения, обзора литературы, 8 глав собственных исследований, Работа написана хорошим научным языком и имеет четкую структурную и логическую последовательность в изложении материала, дает всесторонне представление о текущем состоянии вопроса. Основные положения диссертации отражены 82 научных работах, из которых 29 из списка, рекомендованного ВАК, 3 статьи – в высоко рейтинговых международных изданиях (Q1), имеется 2 патента на изобретение: «Способ диагностики преэклампсии на сроках гестации до 34 недель по оценке уровней вазоконстриктора ANG (1–8) и вазодилататора ANG (1–7). Патент № RU2663456C1 от 06.08.18 г. (заявка 2017130534 от 29.08.2017); «Способ диагностики тяжести преэклампсии на основании оценки экспрессии ДНК-распознающих рецепторов DAI-1 в ткани плаценты. Патент № RU2641029C1 от 15.01.18 г. (заявка 2017111609 от 06.04.2017).

Автореферат полностью передает содержание работы.

Введение написано кратко, логично убеждая в необходимости данного научного исследования. Цель исследования сформулирована четко. В соответствии с поставленной целью определены 7 задач, призванных полностью раскрыть тему диссертации. Основные положения диссертации отражены 82 научных работах, из которых 29 рекомендованных ВАК, 3 статьи – в высокорейтинговых международных изданиях (Q1), имеется 2 патента на изобретение. Автореферат полностью передает содержание работы.

Диссертационная работа хорошо иллюстрирована таблицами, рисунками высокого качества, схемами, что облегчает восприятие материала. Выполненная диссертационная работа не вызывает каких-либо принципиальных замечаний по своему содержанию и оформлению.

Заключение

Диссертационная работа Низяевой Натальи Викторовны на тему «Морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика поражений плаценты и их роль в патогенезе преэклампсии», представленной на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение проблемы связи поражений плаценты с развитием преэклампсии, поиска молекулярно-генетических предикторов для установления степени тяжести преэклампсии и имеющих прогностическое значение для развития преэклампсии и существенное значение для патологической анатомии и современного акушерства и гинекологии.

Диссертация полностью соответствует требованиям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученых степеней, установленных п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской

Федерации №335 от 21.04.2016 г. И № 746 от 2.08.2016 г.), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а диссертант Низяева Наталья Викторовна заслуживает присуждения искомой степени по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия.

Ведущий научный сотрудник лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии федерального государственного бюджетного учреждения «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации;
доктор медицинских наук Кулида Людмила Викторовна,



«05» 07 2021 г.

Личную подпись	Кулида Л.В.
заверяю. Ученый секретарь ФГБУ «Ив НИИ М и Д им. В.Н. Городкова» Минздрава России, к.м.н.	
Подпись	«05» 07 2021 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации



Адрес: 153045, г. Иваново, ул. Победы, 20 .

Тел:8(4932)336256

E-mail:ivniimid@inbox.ru

Сайт: <http://www.niimid.ru>