

ОТЗЫВ

Официального оппонента профессора кафедры фундаментальной медицины Медицинского института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», доктора медицинских наук Волковой Ларисы Владимировны 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

Преэклампсия – это тяжелая акушерская патология, характеризующаяся гипертензией со значительной протеинурией, развивающаяся при беременности после 20-24 недель гестации, приводящая к поражениям почек, головного мозга и печени матери, к полиорганной недостаточности, относящаяся к ведущим причинам материнской смертности и нередко вызывающей патологию плода.

Преэклампсия и эклампсия относятся к полиэтиологичным заболеваниям, и, несмотря на то, что в настоящее время известно несколько теорий этиопатогенеза данных состояний, механизмы развития указанной патологии беременности изучены недостаточно. Известно, что преэклампсия этиопатогенетически связана с патологией плаценты, плацентарные нарушения, такие как проявления ишемии, редукции маточно-плацентарного кровотока рассматриваются как важнейшие этапы патогенеза при преэклампсии. Тем не менее, очевидно, что для полного понимания морфофункциональных изменений плаценты при указанной патологии необходимы дальнейшие, в том числе и мультидисциплинарные исследования.

В связи с несомненной клинической значимостью, необходимостью углубления теоретических сведений о патогенезе преэклампсии и

эклампсии - тяжелой патологии беременности, дальнейшего изучения морфофункционального состояния плаценты при беременности, поиска прогностических и предиктивных биомаркеров для оценки динамики развития патологического процесса, мультидисциплинарные подходы, включающие как современные морфологические и иммуногистохимические, так и молекулярно-биологические, генетические методы для исследования патологических изменений плаценты и ведущих звеньев патогенеза патологии матери представляются крайне актуальными.

Диссертационное исследование Н.В.Низяевой является своевременной и актуальной работой, посвященной изучению морфофункционального состояния плаценты и патогенеза преэклампсии с помощью комплексного углубленного морфологического подхода в сочетании с современными молекулярно-биологическими, генетическими методами для анализа ряда маркеров не только в ткани плаценты, но и в плазме крови, моче пациенток, страдающих преэклампсией. Выявление и изучение прогностических и предиктивных биомаркеров при преэклампсии в материале, полученном с помощью малоинвазивных методов, имеет несомненную ценность как для углубления знаний о механизмах развития данной патологии, так и для определения тактики ведения беременности, сроков и методов родоразрешения. Это обуславливает высокую актуальность, научную и практическую значимость исследованной в диссертационной работе проблемы для патологической анатомии, патофизиологии, акушерства и гинекологии, лабораторной диагностики.

Диссертация Н.В. Низяевой соответствует паспорту специальности 14.03.02 — «патологическая анатомия» по следующим областям исследования: 1) проведено макроскопическое и комплексное углубленное гистологическое исследование плаценты с применением современных морфометрических методов при преэклампсии; 2) приведены результаты, полученные методом электронной

трансмиссионной микроскопии, изучены ультраструктурные особенности мезенхимальных клеток стромы ворсин плаценты и трофобласта при преэклампсии; 3) выполнено иммуногистохимическое исследование экспрессии ряда маркеров с применением количественной оценки с помощью программы для анализа изображений, изучена экспрессия пептидов ангиотензина, ингибитора протеаз SERPINA1 в ткани плаценты при преэклампсии, исследованы структуры плаценты, синтезирующие микроРНК методом хромогенной гибридизации *in situ*.

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

Исследование проведено в группах достаточного объема, включающих пациенток с преэклампсией (237 женщин), и группы сравнения, включающих беременных женщин соответствующих сроков гестации (всего - 539 случаев, 473 женщины с неотягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом и неосложненной беременностью на сроках 34-40 недель и 66 беременных без гипертензивных расстройств с родоразрешением в период от 20 до 34 недель). При формировании выборок использованы адекватные задачам исследования критерии включения и невключения в исследование, объем выборок соответствует требованиям биомедицинской статистики для получения достоверных результатов.

Результаты исследований, представленные в диссертации не вызывают сомнений в их достоверности. В соответствии с поставленными задачами автором использованы адекватные современные методы исследования. Полученные данные обработаны статистически с использованием пакетов прикладных программ “MedCalc Statistical” и “IBM SPSS Statistics 8”. Проведена оценка нормальности распределения первичных данных, в соответствии с этим обоснованно использованы необходимые критерии параметрической и непараметрической статистики, проведена сравнительная

оценка достоверности различий между выборками с эклампсией и группами сравнения, использованы методы корреляционного анализа.

Выводы диссертационного исследования обоснованы, соответствуют цели работы, поставленным задачам и полученным результатам.

Научная новизна

В диссертационной работе Низяевой Н.В. впервые проведено комплексное исследование морфофункционального состояния плаценты, направленное на изучение патогенетических механизмов развития преэклампсии. Выполнен поиск эффективных прогностических и предиктивных биомаркеров в плаценте, крови и моче для оценки степени тяжести и динамики развития патологического процесса с использованием мультидисциплинарного подхода, включающего адекватные современные морфологические, иммуногистохимические, молекулярно-биологические и генетические методы.

Автором убедительно продемонстрировано, что при преэклампсии тяжелого течения имеют место выраженные изменения хориального компонента плаценты - повреждение и слущивание синцитиотрофобласта с поверхности хориальных ворсин, нарушения гемоплацентарного барьера, морфологическим проявлением которого является фиброзирование стромы ворсин. Помимо оценки степени повреждения синцитиотрофобласта ворсин при преэклампсии к важным признакам при исследовании ворсинчатого дерева автор обоснованно относит снижение количества телецитов и появление клеток с ультраструктурными признаками фибробластов и фиброцитов. Низяевой Н.В. впервые детально охарактеризована гетерогенная популяция телецитов хориальных ворсин. Описаны четыре типа телецитов, отличающихся по форме, локализации в ворсине и экспрессии иммуногистохимических маркеров. Для верификации телецитов в строме плацентарных ворсин диссертантом предложен иммуногистохимический маркер TMEM16a.

Автором впервые установлено, что при тяжелой преэклампсии и в группе женщин с ранней манифестацией данной патологии имеет место достоверное увеличение уровня свободной внеклеточной фетальной ДНК в крови матери по сравнению с группами с преэклампсией умеренной степени тяжести и с поздней манифестацией заболевания. Данный показатель может быть эффективным маркером для оценки степени повреждения ворсинчатого дерева при преэклампсии в доступном биоматериале.

Важным результатом диссертационного исследования является факт, выявленный автором, свидетельствующий о том, что при развитии гипертензивных состояний при беременности, определенный вклад могут вносить метаболиты ренин-ангиотензиновой системы, синтезируемые структурами плаценты. Повреждение трофобласта при преэклампсии и поступление метаболитов ренин-ангиотензиновой системы в материнский кровоток ассоциировано с повышением ангиотензина II и снижением ангиотензина I-7 в плазме крови.

Автором апробирован новый подход, направленный на определение степени тяжести преэклампсии по наличию и/или отсутствию пептидов SERPINA1 в образцах мочи беременных женщин с гипертензивными расстройствами. Отсутствие SERPINA1 было характерно для умеренной преэклампсии, в то время как положительный тест на SERPINA1 в моче коррелировал с высоким артериальным давлением, повышенным уровнем протеинурии, нарушениями в системе свертывания крови, с более длительным периодом выхаживания новорожденных.

Научная новизна результатов исследования морфофункционального состояния плаценты при преэклампсии, полученных автором с помощью этапного применения комплекса морфологических и молекулярно-биологических методов очевидна, а указанный мультидисциплинарный подход к изучению системы-мать-плацента-плод в норме и патологии представляется очень ценным.

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

В настоящем исследовании не только получены новые данные, характеризующие морфофункциональные изменения плаценты при преэклампсии, но и разработаны обоснованные практические подходы к диагностике степени тяжести данной патологии, возможного прогнозирования динамики ее развития на основе анализа образцов плазмы крови и мочи.

По наличию SERPINA1 в моче преэклампсию можно разделить на два патогенетических варианта: более благоприятный (с негативным тестом SERPINA1 при исследовании мочи) и менее благоприятный (с обнаружением SERPINA1 в моче). Появление пептидов SERPINA1 в моче ассоциировано с исчезновением иммуногистохимического окрашивания SERPINA1 в синцитиотрофобласте ворсин плаценты, что позволяет выявлять пациенток с более тяжелым течением заболевания.

В плазме крови женщин с преэклампсией преобладало повышение соотношения ангиотензина 1-8, обладающего вазоконстрикторным эффектом на фоне снижения ангиотензина 1-7 с вазодилатирующими свойствами, что наиболее выражено при ранней преэклампсии.

Оценка повышения уровня фетальной ДНК в крови беременных женщин уже начиная с 11 недели гестации может быть рекомендовано для апробации в клинической практике с целью прогноза манифестации симптомов заболевания, оценки возможной динамики развития и степени тяжести преэклампсии.

Оценка содержания диссертации

Диссертация Низяевой Н.В. написана логично, хорошим языком, изложена на 336 страницах печатного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, 8 глав результатов собственных исследований, заключение, выводы и практические

рекомендации, приложения и список литературы (571 источник, 513 - зарубежных, 58- отечественных), содержит 25 таблиц и 44 рисунка.

Во введении автор четко обосновывает актуальность исследования преэклампсии, подчеркивает теоретическую значимость и недостаточную степень изученности проблемы, крайне важное практическое значение для здравоохранения. Основная цель диссертационного исследования - проведение анализа морфологических и молекулярно-генетических изменений в плаценте, определения их роли в патогенезе преэклампсии, задачи исследования соответствуют основной цели работы. Научная новизна, практическая значимость диссертации Н.В. Низяевой не вызывает сомнений, автором получены 2 патента на изобретения. Положения, выносимые на защиту, полностью обоснованы и не вызывают возражений.

Глава, посвященная литературному обзору, включает общие сведения о проблеме преэклампсии и эклампсии, как мультифакториальной патологии, кратко характеризует известные теории этиопатогенеза, ключевые патогенетические моменты, подчеркивает важное значение морфологических изменений плаценты, необходимость углубления известных теоретических знаний о причинах и механизмах развития преэклампсии. Автор подробно излагает литературные данные о морфофункциональных особенностях телоцитов, обосновывает необходимость их исследования в плаценте, анализирует возможную роль иммунологического фактора в развитии преэклампсии, значение недавно открытого и недостаточно изученного феномена, характеризующего наличие ДНК плода в крови беременных женщин при патологии беременности и дисфункции плаценты. Одним из важнейших компонентов симптомокомплекса при преэклампсии и эклампсии является артериальная гипертензия, важнейшую роль в развитии которой играет ренин-ангиотензиновая система. В некоторых экспериментальных исследованиях, как отмечает автор, рассматривается возможная роль плаценты в продукции отдельных метаболитов ренин-ангиотензиновой системы плаценты при

беременности, тем не менее, значение данных метаболитов при развитии нормальной беременности у человека, а также при ее патологии практически не изучено. Низяева Н.В. обращает внимание на важность анализа метаболических изменений мочи при патологии беременности, изменения концентрации определенных метаболитов в моче указывает на метаболические сдвиги в организме беременной, в том числе и связанные с преэклампсией, отражает патогенетические механизмы развития данной патологии. Автор анализирует публикации, посвященные возможной ассоциации плацентарных микроРНК с акушерской патологией и преэклампсией, обращая внимание на актуальность данного методического подхода, использование которого способствует получению новых теоретических знаний и может иметь прикладное значение для диагностики патологии беременности.

В главе «Материалы и методы исследования» Низяевой Н.В. представлен дизайн диссертационного исследования, которое выполнено на выборке, включающей 776 беременных женщин, описание групп исследования и адекватных групп сравнения, критериев включения и невключения в исследование. Пациентки с преэклампсией были разделены на 4 группы: 1) 120 пациенток с тяжелой преэклампсией; 2) 117 женщин с преэклампсией умеренной степени тяжести; 3) 112 женщин с ранней преэклампсией, развившейся до 34 недель гестации; 4) 125 пациенток с поздней преэклампсией и манифестацией после 34 недель.

Автором подробно описаны методы исследования, включающие как традиционные общеклинические, клинико-лабораторные, инструментальные, морфологические методы, так и современные методики, направленные на решение поставленных исследовательских задач. Следует отметить широкий спектр примененных автором морфологических методов, как обязательных макро- и микроскопических, так и методов электронной трансмиссионной микроскопии, иммуногистохимии с применением достаточно широкой, обоснованной задачами исследования, панели

антител, компьютерной оценки морфологических изображений. В дополнение к углубленным морфологическим исследованиям автором использованы современные технологии для пептидомного анализа мочи (жидкостная хромато-масс-спектрометрия), количественный иммуноферментный анализ, хромогенная гибридизация *in situ* для выявления микроРНК в тканях, глубокое секвенирование микроРНК в образцах плаценты и плазмы крови, количественная ПЦР в реальном времени. Полученные данные обработаны статистически с использованием адекватных методов, с проверкой распределений на нормальность, применением методов параметрической и непараметрической статистики.

Результаты собственных исследований изложены подробно, хорошо иллюстрированы, имеются фотографии макроскопических изменений плаценты при преэклампсии, микрофотографии, характеризующие патологические изменения, выявляемые при гистологических, иммуногистохимических методиках, фотографии ультраструктурных изменений. В отдельных случаях автор использует комбинированные фотографии с подписями к ним на следующих страницах текста, что несколько затрудняет восприятие. Во всех главах автором приводится анализ и интерпретация выявленных патологических изменений в сравнении с известными данными литературы, что, несомненно, является положительным фактором, позволяющим сделать обоснованные выводы.

В главе «Морфологическая характеристика поражений плаценты при преэклампсии» автором продемонстрировано, что масса плаценты не является ведущим значимым параметром, тогда как большее значение при оценке тяжести преэклампсии имеет оценка состояния ворсинчатого дерева и степени его повреждения. При преэклампсии умеренной степени тяжести Низяевой Н.В. выявлены гиперкапилляризация терминальных ворсин и увеличение количества синцитиальных узелков, которые автор относит к компенсаторным изменениям. При преэклампсии тяжелого течения и преэклампсии с ранней клинической манифестацией автором выявлено

повреждение и слущивание синцитиотрофобласта с поверхности ворсин, фиброз стромы ворсин, увеличение числа инфарктов и псевдоинфарктов, площади афункциональных зон ворсинчатого дерева, депозитов плодного фибриноида на фоне снижения признаков ангиогенеза и числа синцитиальных узелков.

В главе «Ультраструктурные особенности мезенхимальных клеток стромы ворсин плаценты и трофобласта при преэклампсии» автором исследованы изменения трофобласта ворсин плаценты в зависимости от степени тяжести преэклампсии. Установлено, что при заболевании умеренной степени тяжести имеются ультраструктурные признаки вакуолизации цитоплазмы, тогда как при тяжелом течении преэклампсии выявляются конденсация хроматина ядер, потеря ворсинок на поверхности синцитиотрофобласта, его очаговая десквамация, более выраженные дистрофические изменения. Автором впервые детально охарактеризована гетерогенная популяция телоцитов ворсинчатого дерева плаценты, описаны изменения мезенхимального компонента при преэклампсии. Установлено, что при преэклампсии тяжелого течения и преэклампсии с ранней клинической манифестацией имеет место нарушение формирования капиллярного русла ворсин – уменьшение числа капилляров, выявлены неравномерный диаметр сосудов, хаотичное их расположение, признаки фиброза стромы, уменьшение количества телоцитов, что интерпретируется как нарушение плацентарного барьера и ангиогенеза, обуславливающих развитие плацентарной недостаточности при преэклампсии. При иммуногистохимическом исследовании плацентарных ворсин автором подтверждена гетерогенность популяции телоцитов ворсин плаценты, апробировано и рекомендовано применение такого маркера как TMEM16a для верификации телоцитов.

В главе «Значение рецепторов врожденного иммунитета в развитии преэклампсии» автором продемонстрировано распределение и уровень экспрессии рецепторов врожденного иммунитета в гистологических

структурах плаценты в зависимости от срока гестации и степени тяжести преэклампсии. Установлено, что при преэклампсии имеет место тенденция к снижению признаков противовоспалительной активности на фоне повышения провоспалительной, особенно при ранней преэклампсии тяжелого течения. Низяевой Н.В. описаны морфологические признаки повреждения мембран и слущивание синцитиотрофобласта ворсин, а фрагменты поврежденных клеток и фетальной ДНК, по мнению автора, поступая в материнский кровоток, могут участвовать в механизмах развития системного воспалительного ответа, эндотелиальной дисфункции, а затем и ДВС-синдрома.

В главе «Оценка содержания в материнской крови внеклеточной ДНК плода, как предиктора развития преэклампсии» автором продемонстрировано достоверное повышение уровня свободной внеклеточной ДНК плода у женщин с последующим развитием преэклампсии на всех сроках, начиная уже с 11-14 недели гестации. Наиболее высокий уровень данного показателя выявлен при преэклампсии тяжелого течения, причиной этого, по мнению автора, является повреждение трофобласта. Повышение содержания в крови матери внеклеточной ДНК плода является специфичным признаком преэклампсии, данный тест может оказаться полезным для диагностики и прогноза ее развития.

В главе «Роль нарушений регуляции ренин-ангиотензиновой системы в генезе преэклампсии» автором с помощью методов иммуногистохимии и ИФА получены данные о наличии в плаценте ренин-ангиотензиновой системы, активация которой при плацентарной дисфункции может вносить определенный вклад в развитие гипертензии при беременности. Слущивание и массивное поступление клеток трофобласта в материнский кровоток, по-видимому, вносит определенный вклад в нарушение соотношения метаболитов ренин-ангиотензиновой системы в материнской плазме и повышение артериального давления. Хотелось бы, на наш

взгляд, более подробное изложение и анализ известных литературных данных о вкладе ренин-ангиотензиновой системы организма и плаценты в механизмы регуляции артериального давления при беременности и возможных взаимоотношениях указанных систем.

В главе «Значение SERPINA1 при гипертензивных расстройствах во время беременности» автором представлены результаты, свидетельствующие о том, что в моче пациенток с преэклампсией различной степени тяжести имеются пептиды SERPINA 1 (α1-антитрипсин). С помощью корреляционного анализа Низяевой Н.В. установлено, что при преэклампсии тяжелого течения наличие пептидов SERPINA1 в моче коррелирует с повышением артериального давления, протеинурией, маркерами повреждения печени, с балльной шкалой Апгар на 1-й и 5-й минуте у новорожденных и их длительностью пребывания в реанимации. С учетом наличия SERPINA 1 в моче автор выделяет 2 патогенетических варианта преэклампсии - с более легким течением (с негативным тестом SERPINA 1 в моче) и с более тяжелым (при наличии SERPINA 1 в моче).

В главе «Изменения экспрессии микроРНК в плаценте и в плазме крови при преэклампсии» с помощью методов хромогенной гибридизации *in situ* (CISH), ПЦР в реальном времени, глубокого секвенирования автором продемонстрированы изменения содержания микроРНК в ткани плаценты и плазме крови при преэклампсии. Плацента секретирует большое количество различных молекул, в том числе и микроРНК, последние способны модулировать регуляцию многих биологических процессов – пролиферации, дифференцировки, апоптоз, метаболизм белков и другие. Автором выявлено снижение экспрессии микроРНК- 127-3p, -376a-5p, -423-5p, -519-3p, -532-5p, -539-5p, -let-7e-5p, -let-7c-5p, ассоциированных с трофобластом в ткани плаценты при ранней и поздней преэклампсии. Повышение уровня микроРНК-423-5p в плазме крови беременных отмечено

при ранней преэклампсии, что может рассматриваться как потенциальный прогностический маркер.

В главе «Заключение» автором обсуждаются морфологические и молекулярные особенности плаценты при преэклампсии различной степени тяжести, с манифестацией на разных сроках гестации. Автором предложена схема патогенеза преэклампсии, включающая полученные результаты, свидетельствующие о первичных изменениях морфофункционального состояния ворсин плаценты, ее «молекулярного портрета», что обуславливает снижение инвазивных свойств трофобласта, а затем и неполноценную фибриноидную трансформацию спиральных артерий матки.

Использованный диссертантом комплексный мультидисциплинарный подход для изучения патогенеза преэклампсии заслуживает высокой оценки и представляется перспективным для дальнейшего исследования патологии в системе мать-плацента-плод. Работа является современным исследованием, выполненным на высоком научном и методическом уровне, ценной добротной работой, открывающей новое направление в изучении такой актуальной и клинически значимой патологии беременности, как преэклампсия. Результаты настоящего исследования обобщены в виде 9 выводов, которые соответствуют цели и задачам диссертационной работы и вытекают из полученных данных. Основные полученные результаты диссертации отражены в 82 научных публикациях, 29 - в изданиях из перечня ВАК, 3 статьи - в международных научных изданиях, имеется 2 патента на изобретение. Автореферат полностью отражает основные положения диссертации. Выполненная диссертационная работа заслуживает высокой оценки и не вызывает каких-либо принципиальных замечаний по содержанию и оформлению.

Заключение

Диссертационная работа Низяевой Натальи Викторовны на тему «Морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика поражений

плаценты и их роль в патогенезе преэклампсии», представленная на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.02 – «патологическая анатомия» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение научной проблемы на основании комплексного анализа результатов морфологических и молекулярно-генетических изменений плаценты, раскрывающей многие недостаточно изученные аспекты патогенеза преэклампсии, настоящая работа имеет существенное значение для патологической анатомии, 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.

Профессор кафедры фундаментальной медицины
Медицинского института федерального
государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования
«Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта,
доктор медицинских наук

 Лариса Владимировна Волкова,

Подпись доктора медицинских наук, профессора
Л.В. Волковой
заверяю
Ученый секретарь Ученого Совета
Федерального государственного
автономного образовательного

« 04 » 08 2021 г.

Сайт: <http://www.kantiana.ru>