

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Цепкиной Анны Викторовны «Роль HLA-DRB1 и HLA-G в предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца у детей», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3 – «патологическая физиология»

### Актуальность темы диссертации

Диссертация Анны Викторовны Цепкиной посвящена изучению генетической предрасположенности, ассоциированной с экспрессией HLA-DRB1 и HLA-G, к развитию врожденных пороков сердца. Несмотря на то, что последние несколько десятилетий ознаменовались существенным прогрессом в ранней диагностике и хирургической коррекции врожденных пороков сердца, многие аспекты патогенеза этих заболеваний остаются не расшифрованными. Признавая ключевую роль факторов внешней среды и взаимоотношений «мать – плод» в генезе врожденных пороков сердца, А.В. Цепкина фокусирует свое внимание на роли молекул главного комплекса гистосовместимости, участвующих в реализации сложных иммунных механизмов при вынашивании плода и фетогенезе. Следует отметить, что в этом контексте молекулы HLA комплекса выступают не только в качестве регуляторов межклеточных взаимодействий в иммунном ответе, но и, будучи экспрессированными на клетках цитотрофобласта плода, защищают развивающийся плод от aberrантного иммунного ответа со стороны материнского организма, определяя тем самым исход беременности. С учетом того, что известны, по крайней мере, несколько десятков тысяч аллелей HLA, а современные возможности секвенирования позволяют идентифицировать новые аллели, очевидно, что применение HLA генотипирования для оценки риска и изучения механизмов развития врожденной патологии приобретает дополнительную значимость и информативность.

Актуальность исследования, выполненного А.В. Цепокиной, также связана с тем, какое место занимают врожденные пороки сердца в структуре педиатрической заболеваемости: до 30% от числа всех пороков развития и до 0,7% от общего числа новорожденных. Принимая во внимание тот факт, что не все врожденные пороки сердца полностью корректируются, а в структуре инвалидизации врожденные пороки развития сердечно-сосудистой системы составляют более 25%, следует признать, что эта серьезная медико-социальная проблема может быть решена только комплексным образом на основе новых взглядов на этиологию и патогенез врожденных пороков сердца.

Оценка влияния разнообразных экзогенных и эндогенных факторов на возникновение врожденных пороков сердца позволила в свое время сделать вывод о том, что вне зависимости от того, какой конкретно фактор (генотоксические физические факторы, гормональный дисбаланс, ксенобиотики) действует во время критических периодов внутриутробного развития, формирование врожденного порока является результатом развития типовых патологических реакций на уровне клеток и тканей: окислительный стресс, повреждение ДНК, митохондриальная дисфункция, гипоксия, нарушение пролиферации, дифференцировки клеток и клеточной гибели. Однако многие точные механизмы развития таких изменений, а также причины разной предрасположенности развивающихся плодов к формированию врожденного порока сердца остаются не известными. В этом контексте, исследование А.В. Цепокиной, несомненно, актуально и своевременно. Попытка автора найти место для молекул главного комплекса гистосовместимости в комплексном (иммуно)патогенезе врожденных пороков сердца интересна, так как демонстрирует оригинальный взгляд автора на проблему.

Таким образом, диссертация А.В. Цепокиной является актуальным и перспективным исследованием, соответствующим современным тенденциям в развитии патологической физиологии и молекулярной медицины.



## Новизна проведенных исследований и полученных результатов

Методология исследования включила в себя формирование сопоставимых групп обследуемых, молекулярно-генетическое и иммунологическое исследования, выполненные с применением современных протоколов. Следует отметить, что работа осуществлена с использованием разнообразных методов статистического анализа данных, что сообщает полученным и обсуждаемым результатам достоверность. В целом, представленное в диссертации скрупулезное изложение автором последовательности и деталей всех примененных методов подтверждает высокий уровень владения А.В. Цепкиной всеми примененными протоколами исследования. Интерпретация полученных результатов проведена автором на основе имеющихся литературных данных, с позиции их сопоставления и критического анализа, что дополнительно подчеркивает новизну и оригинальность данных этого диссертационного исследования. Например, автор отвергает гипотезу о роли HLA-G системы в развитии врожденных пороков сердца, оставляя в поле патогенетически значимых механизмов особенности экспрессии HLA-DRB1.

В результате выполненного исследования автором впервые подтверждена научная гипотеза о том, что совместимость супругов по HLA определяет возможность возникновения и характер протекания иммунной реакции, результатов которой становится формирование врожденного дефекта развития сердца. Полагаю, что основные научные результаты, подтверждающие новизну работы, можно сгруппировать следующим образом: 1) отсутствие патогенетической значимости HLA-G UTR генотипа в развитии врожденных пороков сердца; 2) присутствие и специфические комбинации аллелей HLA-DRB1 у матери и отца детерминируют вероятность развития врожденных пороков сердца, в частности, аллель HLA-DRB1\*09 чаще встречается в контрольной группе семей, имеющих здоровых

детей, тогда как аллель HLA-DRB1\*10 – в группе семей с детьми, имеющими врожденные пороки сердца, а наибольшее отношение шансов риска формирования врожденного порока сердца выявлено для ассоциации общих аллелей HLA-DRB1\*11 у родителей; 3) увеличение встречаемости общих для обоих супругов аллелей HLA-DRB1 соответствует высокому риску развития врожденного порока сердца у ребенка, что автор связывает с нарушением механизмов иммунной сенсibilизации материнского микроокружения к алло-HLA трофобласта; 4) присутствие отличий в иммунологической реактивности по системе HLA лимфоцитов периферической крови родителей здоровых детей и детей с врожденными пороками сердца; 5) особенности экспрессии HLA-DR на лимфоцитах периферической крови матери обладают предикторным потенциалом и могут использоваться для оценки риска развития врожденного порока сердца у детей; 6) сам акт aberrантного иммунного распознавания по HLA в системе «мать-плод» не ассоциирован с формированием врожденных пороков сердца; 7) принадлежность всех ассоциированных с развитием врожденных пороков сердца общих аллелей у супругов к группе т.н. иммунопатологических аллелей, связанных с риском развития иммунопатологии и, вероятно, формирования воспаления в системе «мать-плод»; 8) особенности передачи отдельных аллелей от родителей к их детям, например, аллель HLA-DRB1\*13 чаще не наследуется детьми, имеющими врожденный порок сердца, тогда как аллель HLA-DRB1\*03 чаще наследуется здоровыми детьми.

По результатам проведенного анализа данных автором представлена оригинальная схема влияния иммуногенетических факторов на развитие врожденных пороков сердца, учитывающая выявленные молекулярно-генетические и иммунологические механизмы. Считаю важным отметить то, что результаты диссертационного исследования легли в основу двух патентов: «Способ прегравидарного прогнозирования риска формирования септальных форм врожденных пороков сердца у плода» (2017 год), «Способ прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических



септальных врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний в последующих поколениях» (2019 год), а также методических рекомендаций «Иммунологический метод прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний», что дополнительно свидетельствует о новизне результатов, представленных в диссертации.

В целом, диссертационное исследование А.В Цепкиной обладает несомненной научной новизной как по дизайну работы, так и по полученным результатам.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений**

Обоснованность основных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в работе, обусловлена несколькими важными факторами: 1) рациональный дизайн исследования с детализированным протоколом формирования групп обследуемых и использованием комплекса молекулярно-генетических и иммунологических методов; 2) использование большого арсенала способов статистического анализа полученных данных, с идентификацией значимых (в том числе с прогностической точки зрения) результатов; 3) критический анализ собственных данных, проведенный с использованием современной специальной литературы по данной проблематике; 4) обсуждение результатов работы научным сообществом по представленным в печати и в докладах конференций материалам; 5) широкий кругозор автора, который очевиден, исходя из качества аналитических разделов диссертации.

Положения, выносимые на защиту, и выводы опираются на конкретные результаты, свидетельствуют о достижении цели и решении всех заявленных в работе задач. Исследовательский уровень и характер интерпретации

данных подтверждают то, что в диссертации А.В. Цепкиной представлены достоверные и обоснованные результаты и выводы.

### **Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики**

Значимость полученных результатов диссертации А.В. Цепкиной для фундаментальной науки (патологическая физиология, генетика, иммунология) определяется тем, что автором: 1) получены новые данные о механизмах формирования феномена иммунологической толерантности к развивающемуся плоду и их нарушениях в патогенезе врожденных пороков сердца; 2) идентифицированы сочетания аллелей HLA-комплекса, ассоциированные с риском развития врожденных пороков сердца; 3) получены новые доказательства в пользу теории дисассортативного формирования пар, имеющего своей целью получение гетерозиготного потомства с большой резистентностью к заболеваниям инфекционного и неинфекционного генеза; 4) сформулирована гипотеза о развитии врожденных пороков сердца как воспалительной эмбриопатии, индуцированной аберрантными механизмами активации лимфоцитов материнского организма.

Значимость результатов диссертации для практической деятельности (медицина, в том числе репродуктология, педиатрия, неонатология и кардиология, а также клиническая лабораторная диагностика) определяется тем, что они: 1) создают научную основу для предупреждения риска развития врожденных пороков сердца на этапе планирования беременности, либо для формирования группы риска развития такой патологии с возможностью максимально раннего применения корригирующих воздействий; 2) определяют новые направления в фармакологической коррекции аберрантного иммунного ответа во время беременности, ориентированные на купирование воспаления в системе «мать – плод».



Считаю, что в силу указанных обстоятельств диссертационная работа А.В. Цепокиной имеет высокую теоретическую и практическую значимость.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Считаю, что результаты диссертационного исследования А.В. Цепокиной могут быть рекомендованы к использованию в следующих областях: 1) патофизиология, экспериментальная репродуктология и эмбриология - при планировании и проведении работ в области изучения патогенеза врожденных заболеваний, эмбриогенеза и механизмов взаимодействия в системе «мать-плод», оценки влияния внешних факторов на развитие плода и формирование врожденной патологии; 2) иммунология, медицинская генетика – при оценке формирования иммунологической толерантности к развивающемуся плоду и ее нарушений, идентификации надежных и информативных иммунологических и генетических маркеров врожденной патологии; 3) клиническая лабораторная диагностика – для разработки новых диагностических протоколов, применимых в практике репродуктологов и неонатологов; 4) высшее профессиональное образование в области медицины. Все указанные направления могут быть реализованы в университетах, клинических и академических центрах Российской Федерации.

**Оценивая содержание диссертации в целом, считаю важным** отметить, что работа написана в академическом стиле, читается с интересом. Работа хорошо структурирована, несомненным достоинством является присутствие в разных разделах диссертации резюмирующих фрагментов. Из текста диссертации понятно, что автор хорошо ориентируется в данной проблематике, корректно использует литературные данные, способен к формулировке новых оригинальных взглядов на изучаемую проблему.

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста, имеет классическую структуру, состоит из введения, обзора литературы, описания

материалов и методов исследования, главы с 4-мя разделами с описанием результатов, обсуждения, заключения, выводов, 2-х приложений, списка сокращений и списка литературы (последний включает в себя 177 источников, в том числе 37 – отечественных). Диссертация содержит таблицы и рисунки, они отражают полученные автором результаты.

Во введении представлены основные положения, касающиеся актуальности, цели, задач выполнения работы, ее научной новизны, теоретической и практической значимости, охарактеризованы общая методология работы, степень достоверности и апробации полученных результатов и личный вклад соискателя в работу. В обзоре литературы систематизированы данные о патогенезе врожденных пороков сердца, о роли комплекса HLA в регуляции иммунного распознавания, о вкладе иммунологических механизмов в реализацию взаимодействия в системе «мать – плод». Автор демонстрирует свободное владение терминологией и данными по этим направлениям науки. В главе «Материалы и методы исследования» автор подробно (в некоторых фрагментах – чересчур детализированно) описывает использованные методы и протоколы. Глава 3-я – «Результаты исследования», состоящая из 4-х подглав, а также главы «Обсуждение» и «Заключение» обладают внутренней логикой и читаются с большим интересом.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует ее содержанию и дает полное представление об основных положениях работы. Принципиальных замечаний по автореферату нет.

**При чтении работы возникли следующие замечания:** 1) в тексте встречаются стилистические ошибки, например, автор неоднократно использует слова «касаемые» или «касаемо» вместо «касающиеся» или «что касается», что абсолютно не соответствует нормам русского языка; 2) в тексте присутствуют единичные грамматические ошибки и опечатки; 3) неоправданным представляется подробное описание и использование



таблицы и рисунка при описании рутинной процедуры ПЦР-исследования в главе «Материалы и методы» (с. 41-43); 4) вызывает некоторое удивление использование автором таких стилистических конструкций, как «женские лимфоциты», «мужские лимфоциты»; 5) рис. 1 на с. 22 следовало заменить на авторский; 6) представляется неудачной формулировка вывода 4 («экспрессия молекулы HLA-DR на женских лимфоцитах с фенотипом CD3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> ассоциирована с риском развития врожденных пороков сердца при добавлении в смешанную культуру лимфоцитов супруга, добавление эмбриональной телячьей сыворотки приводит к ее снижению, а добавление женской ауто-сыворотки – к увеличению») - в этом блоке смешаны данные об изменениях экспрессии *in vitro* и о прогностической роли экспрессии, что логически никак не связано; 7) не очевидна необходимость выделения 2-х таблиц в качестве приложения к диссертации; 8) в списке использованной литературы удивляет незначительное количество работ последних 3-х лет; 9) в заключительной части диссертации отсутствует раздел «Практические рекомендации», что удивительно с учетом того, что они определенно возникают из полученных результатов. Однако все указанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общее положительное впечатление от работы.

Предлагаю автору следующие **вопросы в формате научной дискуссии** по проблематике исследования:

- 1) Автор полагает, что нарушения иммунологической реактивности, связанные с aberrантной экспрессией HLA на лимфоцитах материнского организма, играют ключевую роль в патогенезе врожденных пороков сердца. Как, по мнению автора, это сопряжено с развитием иммуновоспалительных процессов в системе «мать-плод» и может ли этот механизм эффективно купироваться имеющимися в настоящее время фармакологическими препаратами?
- 2) Что, по мнению автора, является доминирующим при развитии врожденных пороков сердца: генетически детерминированные факторы или

факторы внешней среды, обладающие генотоксическим и/или иммуногенным потенциалом?

3) В исследованной группе детей с врожденными пороками сердца присутствует более 10 различных фенотипов этой патологии. Насколько для всех из них подтверждаются выявленные автором закономерности? Как в этом контексте может формироваться специфичность в развитии того или иного порока развития?

4) Автор упоминает об экспрессии HLA-DR на прогениторных клетках при формировании нарушений эмбриогенеза. Какие прогениторные клетки интересны автору как HLA-DR-экспрессирующие участники процессов дисэмбриогенеза? Известно ли что-либо автору о возможностях регистрации и модуляции экспрессии HLA-DR на стволовых и прогениторных клетках в тканях развивающегося плода и во взрослом организме?

#### Заключение

Считаю, что диссертация Цепокиной Анны Викторовны «Роль HLA-DRB1 и HLA-G в предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца у детей» полностью соответствует паспорту научной специальности 3.3.3 – «патологическая физиология»: п. 2 («изучение общих патогенетических механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенного фактора»), п. 6 («изучение состояния реактивности организма, т. н. комплекса его видовых, половых, возрастных, конституциональных и индивидуальных особенностей, определяющих характер его реагирования на раздражители»).

Диссертация Цепокиной Анны Викторовны «Роль HLA-DRB1 и HLA-G в предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца у детей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей решение важной научной задачи патофизиологии – изучения механизмов развития врожденных пороков сердца, связанных с



формированием генетической предрасположенности и нарушенной иммунологической реактивности, вносящей таким образом значительный вклад в развитие представлений о патогенезе врожденных заболеваний. По новизне, научной и практической ценности полученных результатов, перспективам их практического применения диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168 с изменениями от 26 мая 2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Цепочкина Анна Викторовна - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3 – «патологическая физиология».

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник и заведующий  
Лабораторией экспериментальной нейробиологии  
Отдела исследований мозга  
Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Научный центр неврологии»,  
доктор медицинских наук  
(14.03.03 – патологическая физиология),  
профессор

Алла Борисовна Салмина

Россия, 125367, г. Москва,  
Волоколамское шоссе, д.80,  
Тел. +7(495)9170999; E-mail: allasalmina@mail.ru



Подпись доктора медицинских наук, профессора Салминой А.Б. удостоверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук Анна Николаевна Евдокименко

« 30 » августа 2021 г.