

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Долгушиной Наталии Витальевны на диссертацию Лихачевой Виктории

Васильевны на тему «Экстракорпоральное оплодотворение: иммунологические характеристики различных форм бесплодия и их влияние на исходы лечения», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.01 –

Акушерство и гинекология

Актуальность темы исследования

Актуальность диссертационной работы Лихачевой В.В. обусловлена все большим внедрением в клиническую практику программ вспомогательной репродукции при лечении бесплодия, а также попытками повысить их эффективность и безопасность. Высокотехнологичные методики, такие как инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ), вспомогательный хетчинг, преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ), оценка рецептивности эндометрия, персонализированные протоколы овариальной стимуляции, и др., не позволяют повысить частоту наступления беременности (ЧНБ) в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) более 40%, и не всегда профилактируют повторные неудачи имплантации. Этот факт актуализирует дальнейший поиск причин, препятствующих имплантации эмбрионов в программах ВРТ, среди которых несомненный интерес представляет исследование иммунного статуса пациентов. Несмотря на наличие многочисленных работ, демонстрирующих взаимосвязь различных иммунологических параметров в составе биологических жидкостей (сыворотке крови, фолликулярной и перитонеальной жидкостей, промывной жидкости эндометрия) с результативностью программ ВРТ, данные, полученные

в них, отличаются противоречивостью и неоднозначностью. Кроме того, отсутствуют сведения о физиологических изменениях иммунологического статуса пациенток, страдающих бесплодием, в том числе в процессе овариальной стимуляции. Также недостаточно данных об особенностях иммунного статуса пациенток с бесплодием различного генеза, в частности трубноперитонеального, эндометриоз-ассоциированного и связанного с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ). Немаловажное значение в программах ВРТ принадлежит поиску предикторов развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ), особенно его «поздней» формы, развивающейся на фоне наступления беременности. С учетом того, что в основе развития СГЯ лежит системная воспалительная реакция организма, выявление доклинических лабораторных предикторов этого осложнения, диктующих необходимость изменения лечебной тактики в сторону витрификации всех эмбрионов, позволит избежать развития этого грозного осложнения программы ВРТ.

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

Обоснованность научных положений, сформулированных в диссертации Лихачевой В.В., поддерживается достаточным объемом клинического материала, сопоставимостью групп, включенных пациентов, продуманным дизайном исследования, а также применением современных лабораторно-инструментальных методов для оценки исследуемых параметров, обеспечивающих статистически значимые положения и заключение.

Все применяемые методики научно обоснованы. Выводы и практические рекомендации вытекают из задач исследования и материалов диссертации.

Объем исследований и статистическая обработка материалов с использованием адекватных статистических методов достаточны для получения достоверных выводов и обоснованности практических рекомендаций.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Данная диссертационная работа является первым исследованием, где определены нормативные значения изучаемых иммунологических показателей у здоровых женщин, принимающих участие в программе ВРТ при мужском факторе бесплодия.

Изучена и обоснована динамика иммунологических показателей в процессе овариальной стимуляции в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости.

Разработана математическая модель прогноза ЧНБ в программах ВРТ у пациенток с наиболее распространенными причинами бесплодия - трубно-перитонеальным, эндометриоз-ассоциированным и эндокринным бесплодием на фоне СПКЯ.

Разработаны иммунологические критерии СГЯ у пациенток с СПКЯ, определяющие показания к криоконсервации эмбрионов.

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

Диссертационная работа Лихачевой В.В. выполнена на современном научно-методическом уровне, имеет значение для решения актуальных проблем репродуктологии и является серьезным вкладом в науку и практику.

При выполнении данного исследования автор показал свою компетентность как практический врач, на основании получения высокой ЧНБ среди пролеченных пациенток, сопоставимой с данными ведущих центров репро-

дукции человека, а также как исследователь, в полной мере владеющий спектром современных клинических, иммунологических, морфологических и статистических методов.

Результаты данного диссертационного исследования являются существенным вкладом в понимание механизмов иммунного ответа в плане зависимости иммунной реакции от генеза бесплодия и влияния ее на исход лечения в программах ВРТ. Данная работа имеет значение для выбора тактики переноса эмбрионов (ПЭ) - нативного ПЭ или ПЭ в криоцикле после нормализации неблагоприятной иммунологической среды, определяющей неудачи имплантации.

Для определения наиболее оптимальной тактики создана математическая модель и компьютерная программа, основанная на комплексном клинико-иммунологическом многофакторном анализе данных, позволяющая с высокой точностью предиктировать ЧНБ в программах ВРТ у различных групп пациентов.

Оценка содержания диссертации

Диссертация имеет традиционное построение, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, клиническую характеристику обследованных пациентов, 5 глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и список использованной литературы. Текст работы занимает 208 машинописных страниц. Работа содержит 41 таблицу, иллюстрирована 48 рисунками. Библиография включает 322 литературных источника, в том числе 123 отечественных и 199 иностранных, что позволило автору составить полное представление о предмете исследования, формулировке цели и задач данной работы.

В разделе «Введение» диссертант аргументировано обосновывает актуальность, новизну и практическую значимость выполненного исследова-

ния, четко формулирует цель и задачи работы, а также основные положения, выносимые на защиту. Замечаний и вопросов по данной части диссертации нет.

В 1 главе («Предикторы результативности программ экстракорпорального оплодотворения и показания к криоконсервации эмбрионов» – обзоре литературы) автор осветил существующие в настоящее время теории развития наиболее распространенных причин бесплодия, среди которых доминируют трубно-перитонеальное бесплодие, эндометриоз-ассоциированное бесплодие и эндокринное бесплодие на фоне СПКЯ. Автором подробно и понятно описаны физиологические и патологические особенности иммунной регуляции, задействованные в генезе бесплодия на фоне данных заболеваний, отражена роль ауто- и аллоиммунного компонента как при ненаступлении беременности, так и при привычном выкидыше. Также автором продемонстрирован имеющийся в литературе задел о предиктивной роли отдельных параметров системы иммунитета в наступлении беременности в программах ВРТ. Отражена разноречивость мнений о показаниях к криоконсервации эмбрионов в программах ВРТ. Автор глубоко изучил проблему с точки зрения науки и практики, имеет обширный клинический опыт в данной сфере. Замечаний и вопросов по данной части диссертации нет.

Глава 2 («Материалы и методы исследования») содержит дизайн исследования, описание групп обследованных пациентов и описание принципов их выбора, а также методов исследования. Выборка из 317 пациенток, обследованных в полном объеме согласно регламентирующих документов (Приказ Минздрава России №107 от 30.08.2012 «Об использовании ВРТ, показаниях и ограничениях к их применению»), а также поэтапного иммунологического исследования образцов сыворотки крови и фолликулярной жидкости вполне достаточны для понимания патогенетических механизмов, харак-

терных для каждой из изучаемых токсологических единиц, оценки динамики иммунологических показателей в программе ВРТ и влияния их как на исход данной программы, так и на развитие СГЯ.

Первым замечанием к данному разделу является недостаточное описание пациентов с точки зрения клинико-лабораторных данных, которые могут быть факторами, оказывающими значительное влияние на исходы программ ВРТ. В частности, не представлены следующие данные пациентов как в целом, так и при стратификации по группам: индекс массы тела (ИМТ), наличие вредных привычек, прием лекарственных препаратов помимо используемых в программах ВРТ, гинекологическая и соматическая заболеваемость, gravidарность и паритет, длительность бесплодия, используемые гонадотропины и общая доза вводимых гонадотропинов, эмбриологические параметры: доля ИКСИ, вспомогательного хетчинга, вид используемых культуральных сред, способ культивирования эмбрионов, применение ПГТ, способ оценки качества эмбрионов, параметры спермограммы, число и качество полученных ооцит-кумулюсных комплексов, фертилизация ооцитов, бластуляция эмбрионов, число полученных бластоцист и бластоцист отличного качества, день ПЭ, доля перенесенных одного или двух эмбрионов. Данные факторы в случае их разной представленности в группах могут быть конфаундерами, влияющими на исход программ ВРТ помимо иммунологических параметров, изучаемых диссертантом. Кроме того, эти данные могут определять или быть связанными с изучаемыми иммунологическими параметрами, что требует более детального их рассмотрения и изучения.

Вторым замечанием к данной части работы является невозможность расчета референсных значений показателей на столь маленькой выборке пациентов. Для определения референсных значений любых лабораторных показателей используются рекомендации Международной Ассоциации Клини-

ческой Химии (IFSS) и Института Клинических Лабораторных Стандартов (CLSI). При этом существенное значение имеет тип лабораторного оборудования и используемые методы. Также референсные интервалы согласно требованиям CLSI лежат в пределах 2,5 и 97,5 перцентили с 90% доверительным интервалом, т.е. включают 95% здоровой контрольной популяции. И для разработки референсных пределов непараметрическими методами с 90% доверительными интервалами рекомендуется использовать как минимум 120 пациентов в группе. В данной работе в группах было 33 и 37 человек, что недостаточно для определения референсных значений. Также референсные значения были определены в пределах между 5 и 95 перцентили, т.е. включали только 90% здоровой контрольной популяции, что противоречит требованиям CLSI. Поэтому, диссертанту на этапе подготовки к оппонированию была дана рекомендация о замене термина «референсные значения» на «5-95 перцентильный интервал» при внедрении полученных результатов и использовании их в клинической практике и образовательном процессе.

Третьим замечанием к данной части работы является отсутствие запланированной оценки такого важного исхода программ ВРТ как частота потерь беременности и частота родов живым ребенком, и кумулятивная частота родов живым ребенком. Диссертантом представлены только данные о ЧНБ в каждой группе пациентов, хотя известно, что самым важным исходом лечения бесплодия, в том числе с помощью методов ВРТ, является живорождение.

Также **несущественным замечанием** является избыточное включение в исследование 33 пациенток без бесплодия для сопоставления их иммунологических параметров с параметрами пациенток в программах ВРТ с мужским фактором бесплодия. Возможно было избежать включения данных пациенток в исследование, сделав допущение о том, что в парах с мужским факто-

ром бесплодия при отсутствии выявленных гинекологических заболеваний у женщин, эти пациентки являются фертильными. Однако включение здоровых фертильных пациенток позволило в целом увеличить объем выборки для расчета референсных значений.

Значимым положительным аспектом данной части работы является четкое обоснование диагнозов на основании лабораторных и инструментальных методов диагностики, а также международных принятых критериев, в частности наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) был верифицирован на основании данных лапароскопии, СПКЯ диагностировался на основании Роттердамских критериев, диагноз трубно-перитонеального бесплодия с разделением на 2 подгруппы пациенток в зависимости от тяжести течения был подтвержден с помощью данных контрастной эхосальпингоскопии и/или эндоскопической хромосальпингоскопии.

В главах 3, 4, 5, 6 представлены результаты проспективного исследования в оценке системного и локального иммунологического статуса здоровых фертильных небеременных женщин в сравнении с инфертильными пациентками с наиболее распространенными причинами бесплодия. Определены средние значения и диапазон референсных значений изучаемых показателей для программ ВРТ, а также особенности и влияние иммунологического статуса пациенток с трубно-перитонеальным, СПКЯ-ассоциированным и эндометриоз-ассоциированным бесплодием на результаты программ ВРТ.

Получены важные и интересные данные об особенностях иммунного статуса в группе условно здоровых пациенток (с мужским фактором бесплодия – контрольная группа), которые также затем были отмечены у пациенток с бесплодием, обусловленным различной гинекологическими заболеваниями, в виде снижения уровня альбумина и ИЛ-8 и повышением уровня VEGF в сыворотке крови ко дню трансвагинальной пункции фолликулов (ТВП). Дан-

ные изменения в иммунном статусе грамотно и обоснованно объясняются автором в главе «Заключение». Альбумин сыворотки крови снижается ко дню ТВП вследствие избыточного его поглощения для транспортировки лекарственных препаратов и повышенной концентрации в периферических жидкостях, в частности, фолликулярной жидкости (ФЖ). В дальнейшем, автором показано, что снижение белка в ФЖ при различных заболеваниях является неблагоприятным фактором для развития ооцитов, что в дальнейшем приводит к развитию эмбрионов с низким имплантационным потенциалом. Снижение интерлейкина 8 (ИЛ-8) в сыворотке крови также связано с его высоким накоплением в ФЖ, что было подтверждено автором, и обуславливает его значимость в регуляции фолликулогенеза и овуляции. Повышение уровня VEGF в сыворотке крови ко дню ТВП объясняется автором, как естественная воспалительная реакция в ответ на введение хорионического гонадотропина (ХГ), приводящего к разрыву фолликула. Таким образом, автором были получены важные данные, отражающие общепатологические основы естественного процесса созревания фолликула и овуляции.

Далее диссертантом оценены особенности изменения иммунного статуса в сыворотке крови и в ФЖ при различных гинекологических заболеваниях, ассоциированных с бесплодием, по сравнению с группой контроля и в подгруппах в зависимости от наступления беременности.

Для пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия значимые изменения выявлены в подгруппе с выраженным поражением маточных труб. ЧНБ в этой подгруппе было значимо ниже по сравнению с контрольной группой и с пациентками с минимальным поражением маточных труб, и составила 24,4% по сравнению с 38,3% в группе контроля. Отрицательные исходы программ ВРТ у этих пациенток ассоциированы с повышенной концентрацией ФНО- α в сыворотке крови (≥ 3 пкг/мл) и снижением общего белка в

ФЖ (≤ 57 г/л). Повышение провоспалительного цитокина в сыворотке крови ФНО- α связано с общим воспалительным состоянием, а снижение общего белка ассоциировано с некачественным развитием ооцитов, как было указано выше.

Пациенток с СПКЯ по сравнению с группой контроля отличают повышенный уровень общего белка в сыворотке крови, что может свидетельствовать о снижении его в ФЖ, что может отрицательно сказаться на оогенезе. При этом уровень белка и альбумина напрямую связан с триггером овуляции. При использовании ХГ в качестве триггера также отмечается повышение других провоспалительных факторов, таких как $\alpha 2$ -макроглобулин, ИФН- γ , но снижение ФНО- α , ИЛ-8. Отрицательные исходы программ ВРТ у этих пациенток ассоциированы со снижением ИЛ-8 в ФЖ (≤ 130 пкг/мл) и снижением альбумина в ФЖ (≤ 38 г/л).

Пациенток с НГЭ по сравнению с группой контроля отличают повышенный уровень $\alpha 2$ -макроглобулина, ИФН- γ , альбумина, общего белка, но снижение ИЛ-6 и ИЛ-8 в сыворотке крови. При этом сохраняющийся уровень сывороточного альбумина более 47,5 г/л в день ТВП ассоциирован с неудачей имплантации.

Замечанием по данным главам работы является акцент на чувствительности созданных моделей без упоминания их специфичности. Как известно, специфичность любого диагностического метода имеет не меньшее, а иногда и большее клиническое значение, если речь не идет о социально опасных или жизнеугрожающих состояниях и заболеваниях. В случае предикции шансов наступления беременности при бесплодии высокая специфичность метода позволяет нивелировать ложноположительные результаты, что является в данном случае более важным. Так, в случае ложноотрицательного результата, пациентке будет рекомендован не обязательный для нее криопротокол,

который, скорее всего, не ухудшит, но даже улучшит результаты ВРТ. Но при ложноположительном результате пациентке не будет предложен необходимый для нее криопротокол, что, скорее всего, приведет к негативному результату ВРТ.

Глава 7 посвящена математическому анализу клиническо-анамнестических и иммунологических данных, а также созданию математического алгоритма риска отрицательного исхода программы ВРТ с учетом нозологической формы заболевания. С использованием метода логистической регрессии построены модели и выявлены значимые прогностические предикторы отрицательного исхода программы ВРТ. На основании этого разработаны шкалы балльной оценки риска отрицательного исхода программы ВРТ, а также дифференциально-диагностический и лечебно-тактический алгоритмы, позволяющие выбрать тактику ПЭ в нативном цикле или применить метод криоконсервации эмбрионов.

Особенно следует отметить высокопрофессиональный сложный статистический анализ, используемый автором для валидации созданной математической модели предикции ЧНБ в программах ВРТ с применением тестирующей и обучающей выборок.

Замечаний и вопросов по данной части диссертации нет.

В главе 8 «Заключение» автор обсуждает полученные результаты, обосновывает их научную новизну и практическую значимость, представляя свой взгляд на некоторые механизмы имплантации человеческого эмбриона и развитии опасного для жизни пациентки СГЯ в программах ВРТ.

На этапе подготовки к оппонированию диссертанту была дана рекомендация о целесообразности продолжения данного исследования в плане изучения иммунологической среды эндометрия и сопоставления полученных данных с иммунологическими параметрами сыворотки крови.

Диссертация заканчивается **выводами и практическими рекомендациями**, которые полностью соответствуют поставленным в диссертации цели и задачам, логически вытекают из проведенного исследования и хорошо обоснованы. Практические рекомендации сформулированы конкретно и, безусловно, будут полезны для применения в клинической практике клиник, занимающихся лечением бесплодия с использованием программ ВРТ.

Подводя итоговую оценку выполненной диссертации, следует отметить четкую постановку задач исследования, грамотный отбор профильных больных, методологически правильное выполнение работы и хороший литературный стиль при изложении полученных результатов.

Вопросы, возникшие в ходе оппонирования диссертационной работы

1. Какова представленность клинико-лабораторных данных, которые могут быть факторами, оказывающими значительное влияние на исходы программ ВРТ (конфаундеров), в группах пациентов с различными причинами бесплодия, а также внутри каждой группы в зависимости от наступления беременности?

2. Имется ли влияние ИМТ на параметры иммунограммы и исходы программ ВРТ, ведь ожирение является доказанным фактором риска неэффективности программ ВРТ в связи с его провоспалительным и прооксидативным статусом? В исследование были включены пациентки с ИМТ до 35 кг/м², т.е. в том числе страдающие избыточной массой тела и ожирением, поэтому интересно знать долю таких пациенток и исходы программ ВРТ у них в зависимости от иммунного статуса.

3. Какова частота родов живым ребенком в группах пациентов в зависимости от причины бесплодия и какова характеристика рожденных детей

(доля мальчиков и девочек, доля детей, рожденных преждевременно, с низкой и экстремально низкой массой тела, с задержкой роста плода, с пороками развития, путем операции кесарева сечения), а также наблюдались ли изменения данных показателей после внедрения разработанного алгоритма?

4. Какова специфичность созданных моделей прогноза эффективности программ ВРТ?

5. В случае получения высокого значения отрицательного прогноза для ПЭ в нативном цикле и перехода к криоконсервированию, какие методы лечения Вы предлагаете для улучшения иммунологически неблагоприятной среды для имплантации?

5. Если выявленные иммунологические факторы, например, низкий уровень белка и/или альбумина в ФЖ, ассоциированы с низким качеством ооцитов и, как следствием, дальнейшей низкой имплантационной активностью эмбриона, то каким образом можно улучшить иммунологический имплантационный потенциал эндометрия, планируя ПЭ не в нативном цикле, а впоследствии - в цикле с размороженными эмбрионами? Быть может, следует стратифицировать выявленные иммунологические нарушения на нарушения, связанные со сниженной имплантационной возможностью эндометрия, и нарушения, связанные со сниженной имплантационной возможностью эмбрионов? В случае выявления первой группы нарушений, действительно, целесообразно рекомендовать ПЭ в криоцикле, а в случае выявления второй группы нарушений (по данным сыворотки крови), целесообразно рекомендовать отсроченную овариальную стимуляцию после проведения соответствующей подготовки и повторного иммунологического исследования?

По содержанию и оформлению диссертационной работы есть несколько несущественных замечаний: список сокращений не является полным, а в тексте диссертации используются сокращения, не приведенные в

списке сокращений, что осложняет чтение диссертации; текст диссертации изложен достаточно сложно, неоднократно практикуются повторы одного и того же текста; использована терминология, не соответствующая утвержденному Глоссарию, закрепленному в клинических рекомендациях «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация», однако диссертация могла быть написана до утверждения данного Глоссария (февраль 2019 г.).

Отмеченные недостатки не умаляют научной и практической ценности диссертационного исследования, не снижают его актуальности.

Материал, представленный автором в автореферате и 24 опубликованных работах, в числе которых 10 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 7 патентов на изобретение и 1 программа для ЭВМ, в полном объеме отражают основные научные положения диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Лихачевой Виктории Васильевны «Экстракорпоральное оплодотворение: иммунологические характеристики различных форм бесплодия и их влияние на исходы лечения» является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена крупная научная проблема акушерства и гинекологии – повышение эффективности и безопасности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с бесплодием различного генеза, что имеет важное значение для акушерства и гинекологии.

Диссертационная работа Лихачевой В.В. полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 28.08.2017 г. № 1024) предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а автор достоин присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.01 – Акушерство и гинекология.

Официальный оппонент:

Заместитель директора – руководитель
департамента организации научной деятельности
федерального государственного бюджетного
учреждения «Национальный медицинский
исследовательский центр акушерства, гинекологии
и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор
(специальность: 14.01.01 –
акушерство и гинекология)

Опигушина Наталья Витальевна

Подпись д.м.н., профессор
Ученый секретарь ФГБУ
В.И. Кулакова» Мин
кандидат медицин

Владиславович

117997, г. Москва
ул. Академика Опарина
Телефон: 8(495) 438-18
E-mail: secretariat@oparina

7
16
15

27.07.2021