

Заключение

диссертационного совета Д 208.125.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по диссертации Корольковой Анны Игоревны на тему: «Оптимизация программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста на основании оценки митохондриального потенциала и преимплантационного генетического скрининга эмбрионов», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.01 – акушерство и гинекология

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая научная идея, расширяющая представления о связи копийности митохондриальной ДНК (мтДНК) в кумулюсных клетках с возрастом, овариальным резервом женщин, а также о роли уровня мтДНК бластоцист в их преимплантационном развитии и имплантационном потенциале;

предложены оригинальные суждения о диагностической и прогностической значимости копийности мтДНК в клетках кумулюса и трофэктодермы для оптимизации программ вспомогательных репродуктивных технологий в группе пациенток позднего репродуктивного возраста;

доказана перспективность использования методики определения уровня мтДНК в трофэктодерме бластоцист, в совокупности с проведением преимплантационного генетического тестирования эмбрионов, как надежного метода селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом, который позволит увеличить эффективность лечения бесплодия в программах ЭКО;

введены новые понятия, касающиеся особенностей биогенеза митохондрий и их ДНК, также введен новый термин - пороговый уровень мтДНК в трофэктодерме бластоцист, на основании которого разработан алгоритм ведения пациенток позднего репродуктивного возраста в программах ВРТ с ПГС методом сравнительной геномной гибридизации и применением оценки митохондриального потенциала эмбрионов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, вносящие вклад в расширение представлений о роли митохондрий и мтДНК в старении репродуктивной системы и преимплантационном развитии эмбрионов,

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования ploидности эмбрионов, в том

числе экспериментальная методика определения копийности мтДНК в кумулюсных клетках, а также порогового уровня мтДНК в трофэктодерме бластоцист - методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

изложены доказательства связи уровней мтДНК в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы бластоцист с возрастом, овариальным резервом пациенток позднего репродуктивного возраста, а также уровней мтДНК в трофэктодерме с плоидностью и потенциалом к имплантации зуплоидных эмбрионов;

раскрыты новые проблемы методики определения копийности мтДНК и интерпретация получаемых результатов;

изучены причинно-следственные связи изменения уровня мтДНК в клетках кумулюса и трофэктодермы;

проведена модернизации существующей методики определения уровня мтДНК, обеспечивающая получение новых результатов по теме диссертации.

Значение полученных соискателем результатов для практики подтверждается тем, что:

разработан и внедрен в практическую работу 1 гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России малоинвазивный, не дорогостоящий дополнительный метод селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом;

определены перспективы практического использования предложенной методики определения уровня мтДНК;

создана система практических рекомендаций для оптимизации программ ВРТ в когорте пациенток позднего репродуктивного возраста;

представлены методические рекомендации и алгоритм ведения пациенток позднего репродуктивного возраста.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ результаты получены на сертифицированном оборудовании, с использованием современным методик: преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии проводилось методом сравнительной геномной гибридизации на чипе (aCGH). aCGH генетического материала эмбриона проводили на оборудовании фирмы “Agilent” (США), согласно инструкции. Объем выборки пациенток, включенных в исследование, был достаточен для решения поставленных задач; относительная количественная оценка копийности мтДНК в клетках кумулюса и трофэктодерме бластоцист проводилась с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В реакции использованы

специально разработанные олигонуклеотиды и TaqMan-пробы для амплификации и количественного определения специфических фрагментов мтДНК (ген MT-ND2 - mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2 и ген MT-ND4 - mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4). Нормировка осуществлялась на геномную ДНК (ген LTC4S - leukotriene C4 synthase). Пороговые значения мтДНК установлены с использованием ROC-анализа при сравнении образцов трофэктодермы имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов;

теория построена на известных, проверяемых данных и фактах, согласуется с опубликованными данными по этиологии, патогенезу (E. Fragouli, 2017; M. Ogino, 2016; M. Herbert, 2015; M. Tsutsumi, 2014; B. Thornton, 2014), диагностике изменений копийности мтДНК в кумулюсных клетках и трофэктодерме (L. Boucret, 2015; A. Taugourdeau, 2019; V. Desquirit-Dumas, 2017; M. de los Santos, 2018; D. Wells, 2017; K. Ravichandran, 2017, E. Fragouli, 2011, 2017).

идея базируется на анализе практических данных, обобщении накопленного опыта ведения пациенток позднего репродуктивного возраста, современных сведениях об этиологии, патогенезе изменений копийности мтДНК, а также на анализе результатов практической деятельности 1 гинекологического отделения (заведующий – к.м.н. Абубакиров А.Н.) и Института репродуктивной генетики (директор – д.б.н., профессор РАН Трофимов Д.Ю.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. В работе обобщен мировой опыт, посвященный решению данной проблемы (E. Fragouli, M. Ogino, M. Herbert, M. Tsutsumi, B. Thornton, L. Boucret, A. Taugourdeau, V. Desquirit-Dumas, M. de los Santos, D. Wells, K. Ravichandran),

использованы сравнения авторских данных об уровне мтДНК в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы бластоцист, и данных мировой литературы, полученных ранее по рассматриваемой тематике,

установлены совпадения авторских результатов с данными зарубежных авторов по рассматриваемой проблеме (с авторами E. Fragouli et al, 2015, 2017; M. Ogino et al, 2016; A. Taugourdeau et al., 2018; K. Ravichandran et al., 2017)


использованы современные методики сбора и обработки первичной документации, сбора, хранения, анализа, первичной обработки и представления клинического материала, представлены репрезентативные выборки (161 пациентка), позволяющие четко сформировать группы и выявить статистически значимые различия. Статистическая обработка данных выполнена с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и программы «IBM SPSS Statistics 22.0» (США).

Личный вклад соискателя состоит в:


Непосредственном участии автора на всех этапах выполнения диссертационной работы: выборе темы диссертационной работы, поиске и мониторинге данных литературы по теме диссертации, определении целей и задач исследования, разработке индивидуальной анкеты для сбора анамнеза и добровольного информированного согласия на проведение исследования, изучении анамнеза, результатов клиничко-лабораторного обследования пациенток. Автор лично принимала участие в ведении пациенток, включенных в исследование, на всех этапах программ ЭКО с ПГТ-А и программ переноса размороженных эмбрионов. Автор лично участвовал в сборе материала, получении, анализе и интерпретации экспериментальных данных, их обобщении и статистической обработке. Автором самостоятельно написан текст диссертации, автореферат, сформированы выводы, практические рекомендации, научные положения. Автором подготовлены публикации по теме исследования.

Проект заключения диссертационного совета подготовили члены диссертационного совета Д 208.125.01:


доктор медицинских наук, профессор

 Уварова Е.В.

доктор медицинских наук, профессор

 Калинина Е.А.

доктор медицинских наук, профессор

 Гус А.И.