

ОТЗЫВ

официального оппонента члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Когана Игоря Юрьевича на диссертационную работу Сыркашевой Анастасии Григорьевны на тему «Профилактика нарушений репродуктивной функции, обусловленных неблагоприятным влиянием антропогенных химических веществ, на основании дифференцированного подхода к прегравидарной подготовке», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.4 – акушерство и гинекология

Актуальность исследования

Последние годы демографическая ситуация в Российской Федерации характеризуется снижением рождаемости и увеличением смертности, что приводит к негативному показателю прироста населения. Также наблюдается тенденция к повышению числа супружеских пар с бесплодием, повышается потребность в использовании методов вспомогательной репродукции. Восстановление фертильности и планирование здоровья будущего потомства является актуальной задачей для общественного здравоохранения. По этой причине, диссертационная работа Сыркашевой Анастасии Григорьевны, посвященная оптимизации прегравидарной подготовки у пациенток с повышенной антропогенной химической нагрузкой, вызывает научный и практический интерес.

Под антропогенным загрязнением понимают привнесение в природную среду новых, чуждых ей химических веществ, или увеличение количества существующих в природе веществ, несущих опасность для человека и окружающей среды. Репродуктивная система чувствительна к воздействию антропогенного загрязнения, а для негативного влияния на гаметогенез, эмбриогенез и плод во время беременности достаточно более низких концентраций, чем для взрослого организма. Целью

диссертационной работы Сыркашевой Анастасии Григорьевны является оптимизация прегравидарной подготовки на основании комплексного изучения воздействия антропогенных химических веществ на репродуктивную систему человека. Решение поставленных задач позволяет полностью раскрыть заявленную тему.

Научная новизна диссертационного исследования

Ряд результатов диссертационного исследования характеризуются выраженной научной новизной. В работе изучено содержание антропогенных химических веществ в организме пациентов с бесплодием, произведена оценка влияния уровня данных веществ на качество гамет, эмбрионов, и результаты циклов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Выделены факторы образа жизни, ассоциированные с повышенной экспозицией антропогенных химических веществ. Проанализированы молекулярно-генетические предикторы повышенного накопления антропогенных химических веществ в организме пациенток и научно разработан комплекс мер, компенсирующих неблагоприятное влияние экологических факторов на реализацию репродуктивной функции при применении вспомогательных репродуктивных технологий.

Автором в преконцепционном периоде определен уровень в биологических жидкостях пациентов целого ряда веществ, связанных с хозяйственной деятельностью человека в современном мире и сформулирована концепция о необходимости дифференцированного подхода к оценке поступления, накопления и метаболизма различных ксенобиотиков, значимых для реализации репродуктивной функции. Так, тяжелые металлы (ртуть, свинец, кадмий) и стирол определялись в крови у 100%, бисфенол А – у 92% пациенток, планирующих беременность.

Важно, что в рамках данного исследования определяли содержание одного из органических веществ (бисфенол А, БФА) в фолликулярной жидкости (ФЖ) пациенток. БФА был обнаружен в 16,8% (49/292) образцах фолликулярной жидкости. Интересным является обнаруженный факт того, что нет статистической достоверной связи между уровнем БФА в крови и фолликулярной жидкости у одних и тех же пациенток. Это объясняется автором особенностью метаболизма БФА в фолликулярной жидкости или различной длительностью экспозиции данного вещества.

В диссертации выявлено, что уровень ртути находится в положительной корреляционной связи с уровнем свинца. Более того, концентрация органических соединений не имела корреляционной связи с уровнем тяжелых металлов у одних и тех же пациенток. Для объяснения данного факта автор пользуется двумя гипотезами. Так, во-первых, разными источниками повышенной экспозиции тяжелых металлов и органических соединений в природе. Во-вторых, более коротким периодом полувыведения органических соединений. Автор исследования предполагает, что повышенное содержание органических веществ в организме пациенток в большей степени связано с особенностями образа жизни, питания и т.д., чем с генетическими детерминантами данного процесса. Вместе с этим положительная корреляция между уровнем различных тяжелых металлов у одних и тех же пациенток (т.е. ртути, свинца и кадмия), вероятно, по мнению автора, связана с наличием генетической предрасположенности к накоплению тяжелых металлов.

В исследовании выявлены 2 фактора, существенно влияющих на накопление ртути и кадмия – возраст пациентки и её индекс массы тела. Так, повышение уровня ртути отмечено у пациенток позднего репродуктивного возраста, а уровень кадмия был выше у пациенток с избыточной массой тела (по сравнению с пациентками с нормальным индексом массы тела).

В диссертации разработана условная шкала для оценки суммарного уровня АХВ в организме. Это может явиться основой для разработки двух подходов к оценке неблагоприятного воздействия антропогенных химических веществ на отдельные этапы репродуктивного процесса – изолированного или суммарного влияния. Данный подход нашёл отражение и в результатах настоящей работы.

Полученные данные позволили автору диссертационного исследования логично подойти к созданию оценочной шкалы факторов образа жизни, ассоциированных с накоплением антропогенных химических веществ в организме. В работе были чётко определены факторы, ассоциированные с повышенным уровнем в организме АХВ: курение - с повышенным уровнем кадмия, свинца и ртути; частое употребление рыбы (>1 раза в неделю) - с повышенным уровнем ртути; частое употребление консервированных продуктов из жестяных банок (>1 раза в неделю) - с повышенным уровнем свинца, кадмия, БФА и стирола; частое употребление готовой еды (>1 раза в неделю) и разогревание пластиковой посуды в микроволновой печи - с повышенным уровнем свинца, кадмия, ртути, БФА и стирола; частое употребление напитков из пластиковых бутылок (>1 раза в неделю) - с повышенным уровнем стирола и БФА; использование бутилированной воды в качестве основного источника питьевой воды - с повышенным уровнем БФА и стирола, использование водопроводной воды – с повышенным уровнем свинца; низкая физическая активность - с повышенным уровнем свинца и стирола; проживание на 1-4 этажах - с повышенным уровнем свинца, а постоянное проживание за городом – с повышенным уровнем стирола; частое использование наличных денежных средств - с повышенным уровнем кадмия и свинца; работа в условиях закрытого помещения и небольшого кабинета ассоциирована с повышенным уровнем свинца; ежедневное пребывание на свежем воздухе <1 часа - с повышенным уровнем кадмия.

Доказана взаимосвязь между содержанием вредных веществ в крови пациенток и распространенностью первичного бесплодия, что, вероятно, связано с повреждающим действием АХВ на гаметогенез, фертилизацию и ранний эмбриогенез. Нужно отметить тот факт, что эти результаты вносят существенный вклад в разрешение проблематики бесплодия неясного генеза.

Логичным следующим научным блоком разрабатываемой проблематики явились данные о негативном влиянии антропогенных химических веществ на эмбриологический этап и эффективность циклов ВРТ. Научно доказан существенный фактор нарушения раннего развития эмбриона человека под влиянием факторов внешней среды. Установлено наиболее выраженное негативное влияние свинца, кадмия и суммарного влияния комплекса АХВ. Так, повышенный уровень свинца был ассоциирован со снижением уровня фертилизации ооцитов, а повышенный уровень кадмия – со снижением числа бластоцист и сниженным уровнем бластуляции. Так, риск низкой бластуляции (менее 30%) был в 1,34 раз выше по сравнению с подгруппой пациенток с низким уровнем АХВ. Кроме этого, отмечена тенденция к снижению частоты наступления беременности (в группе с низким уровнем АХВ частота наступления беременности выше в 1,4 раза) и повышению частоты выкидыша (в 1,67 раза) у пациенток с высоким суммарным уровнем АХВ. По данным автора частота родов была в 1,5 раза выше у пациенток с низким уровнем АХВ.

Не было найдено связи между уровнем БФА в фолликулярной жидкости и количеством ооцитов и эмбрионов. Не найдено также различий при сравнении параметров оогенеза и раннего эмбриогенеза у пациенток с определяемой и неопределяемой концентрацией бисфенола А в яичнике. Автором было установлено, что средние и максимальные уровни бисфенола А в фолликулярной жидкости значительно ниже, по сравнению с содержанием бисфенола А в крови. При этом в половине случаев (n=24)

уровень бисфенола А в ФЖ был выше, чем в крови, и в данной подгруппе пациенток наблюдали тенденцию к снижению количества ооцитов и эмбрионов. Интересной находкой исследования является корреляционная связь между соотношением уровня БФА в ФЖ/крови и индексом массы тела пациенток.

В диссертации сформулировано и научно обосновано новое представление о возможном наличии «синдрома репродуктивной дисфункции, связанной с симультантным накоплением органических ксенобиотиков» в крови партнеров, планирующих беременность. Доказательством тому явилась положительная корреляционная связь между уровнем стирола, бисфенола А в организме женщины и её супруга, что обусловлено их совместным проживанием на одной территории и частичной общностью образа жизни, питания, физической активности и т.д. Важно, что уровень органических соединений у мужчин был выше, по сравнению с аналогичными показателями у женщин. Это может явиться новым взглядом на гендерную составляющую в тактике ведения супружеских пар в прекоцепционном периоде.

Важным вкладом в понимание процессов этиологии нарушения гаметогенеза в современных условиях внесли результаты диссертационной работы, касающиеся анализа показателей эякулята и уровня ряда химических веществ у мужчин. Стирол определялся в 100% образцах крови мужчин, бисфенол А - в 91,6% образцах крови. Не отмечено корреляционной связи между уровнями стирола и бисфенола А у одних и тех же мужчин, а также между уровнями данных веществ, возрастом пациентов и основными параметрами спермограммы (концентрация, подвижность, морфология сперматозоидов. Отмечена только тенденция к снижению концентрации сперматозоидов при увеличении уровня БФА у мужчин. Показано, что повышение уровня БФА у мужчин ассоциировано с возрастанием частоты самопроизвольного аборта. Предполагается, что

наиболее вероятным механизмом влияния бисфенола А на риск невынашивания беременности является воздействие на целостность ДНК сперматозоидов и на мейоз. С помощью ROC-анализа был определен пороговый уровень бисфенола А у мужчин, при котором повышалась вероятность прерывания беременности в 1-м триместре (0,4 нг/мл; ОШ самопроизвольного прерывания беременности при уровне бисфенола А у мужчин 0,4 нг/мл и выше составило 4,06; 95% ДИ 0,77; 40,13). Установлено, что повышенный уровень стирола в крови мужчин был ассоциирован с низкой эффективностью ВРТ (при наличии высокого уровня стирола, по сравнению с низким, частота наступления беременности снижается в 3,6 раз, а частота родов – в 2,6 раз).

Были получены научные данные о взаимосвязи между полиморфизмами генов системы детоксикации и уровнем тяжелых металлов в организме женщины, а также сочетанным влиянием тяжелых металлов и полиморфных вариантов генов на процесс оплодотворения. Выявлена достоверная связь между генетическим полиморфизмом системы детоксикации и содержанием тяжелых металлов в организме пациенток. Выявлены аллельные варианты (отсутствие делеции гена *GSTT1*, наличие аллеля G гена *GSTP1*rs1695 и аллеля A *SULT1A1*rs9282861, отсутствие аллеля T гена *CYP1A1*rs4646903), которые имеют протективное значение и предотвращают накопление тяжелых металлов в крови. Выявлены аллельные варианты, предрасполагающие к накоплению стирола в организме (делеция гена *GSM*, наличие аллеля G гена *NAT2*rs179930, наличие аллеля C гена *NAT2*rs1801280, наличие аллеля C гена *GSTP1*rs1138272 и отсутствие аллеля C гена *SOD*rs4880. Доказано, что частота наличия в фолликулярной жидкости детектируемого уровня БФА была выше при отсутствии аллеля A гена *SULT1A1*rs9282861, а также погранично значимо выше при наличии аллеля C гена *SOD*rs4880 и отсутствии аллеля C гена *CYP1A1*rs1799814. Уровень БФА в крови был

погранично значимо выше у пациенток, имеющих аллель С гена *GSTP1* rs1138272, а также не имеющих аллеля G гена *GSTP1*rs1695. Выявлено сочетанное влияние *CYP1A1**Pb на фертилизацию ооцитов. Отмечена связь между полиморфизмом системы детоксикации и содержанием органических соединений в организме пациенток. При оценке сочетанного влияния содержания органических веществ в организме пациенток и аллельного состояния системы детоксикации отмечено влияние аллеля А гена *CYP1A1*rs1799814 и наличия БФА в фолликулярной жидкости на уровень бластуляции, а также влияния аллеля А гена *NAT2*rs179930 и содержания стирола на частоту живорождения.

Отдельного внимания заслуживают результаты работы, посвящённые возможности коррекции выявленных нарушений. Показано, что прием пероральных антиоксидантов в рамках прегравидарной подготовки (полиненасыщенные жирные кислоты и коэнзим Q10) способствует уменьшению концентрации антропогенных химических веществ в организме пациенток, и повышает эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий. Определено, что прием антиоксидантной терапии при наличии высокого уровня антропогенной химической нагрузки увеличивает частоту наступления беременности в 1,6 раза, а частоту родов – в 1,8 раз. Установлено, что для достижения 1 дополнительного случая наступления беременности терапию должны получать 9 пациенток.

Повышенное содержание органических АХВ (стирола и бисфенола А) в организме пациенток с бесплодием ассоциировано со снижением уровня витамина Д. Риск сниженного уровня витамина Д у пациенток с высоким уровнем стирола (выше медианы) увеличивается в 1,5 раз, у пациенток с высоким уровнем бисфенола А (выше медианы) – в 1,78 раз.

**Степень обоснованности и достоверность научных положений,
выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, на
достоверность и новизну**

Для выполнения цели и задач работы обследовано 300 пар, планирующих реализацию репродуктивной функции. Для проведения исследования были использованы строгие критерии отбора пациенток. В исследование отбирали пациенток молодого возраста, с нормальным овариальным резервом, без тяжелой гинекологической патологии, т.е. наиболее перспективных для наступления беременности в циклах ВРТ. Аномалии или особенности кариотипа, метаболический синдром или ожирение, а также варианты патозооспермии, снижающие эффективность ВРТ, служили критериями исключения. Для уменьшения информационной ошибки исследования включали пациенток, постоянно проживающих на территории города Москвы не менее 5 лет. Проведен расчёт выборки для реализации каждого этапа исследования.

Организация исследования включала в себя последовательное выполнение нескольких этапов, которые отражены в задачах работы. Для оценки эффективности антиоксидантной терапии было проведено проспективное рандомизированное исследование. При этом антиоксидантную терапию назначали в течение 3-х менструальных циклов перед вступлением в цикл ВРТ. Конечной точкой исследования явилось отношение шансов наступления клинической беременности в группах сравнения.

Методы исследования современны, адекватны поставленным задачам. Важно отметить, что наряду со стандартными методиками (клиническое, ультразвуковое, гормональное, микроскопическое исследование, в том числе эякулята, ооцитов, их зрелости и дисморфизмов, оплодотворения, эмбрионов), в работе применены специальные методики для определения

уровня свинца, ртути, кадмия, бисфенола А, стирола в биологических средах (метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой; высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия). Изучение генотипов системы детоксикации осуществлялось методом ПЦР в реальном времени. Для исследования были использованы образцы венозной крови. Образцы ФЖ отбирали непосредственно после извлечения ооцитов. Для анализа были отобраны образцы ФЖ из первых 2-3 аспирированных фолликулов. Образцы фолликулярной жидкости, контаминированные кровью, исключались из исследования. После взятия все образцы подвергали криоконсервации.

Статистические методы исследования адекватны поставленным задачам.

Основные положения и выводы диссертационной работы внедрены в практическую деятельность ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 10 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертации позволили сформулировать рекомендации для использования в практике:

- разработан алгоритм по дифференцированной прегравидарной подготовке пациенток, планирующих реализацию репродуктивной функции, в том числе с использованием ВРТ;

- сформирована анкета для пациенток, планирующих беременность, с целью определения факторов повышенной экспозиции АХВ;
- определен пороговый уровень бисфенола А у мужчин, при котором повышалась вероятность прерывания беременности в 1-м триместре (0,4 нг/мл);
- обосновано показание для выполнения обследования на полиморфизм генов детоксикации (*GSTT1*, *GSTP1*rs1695, *GSM*, *CYP1A1*rs4646903, *NAT2*rs179930, *NAT2*rs1801280, *GSTP1*rs1138272, *SOD*rs4880, *SULT1A1*rs9282861, *CYP1A1*rs1799814);
- установлено показание для определения уровня АХВ в крови пациенток (наличие «неблагоприятных» аллельных вариантов генов детоксикации - делеция гена *GSTT1*, делеция гена *GSM*, отсутствие аллеля G гена *GSTP1*rs1695, наличие аллеля T гена *CYP1A1*rs4646903, наличие аллеля G гена *NAT2*rs179930, наличие аллеля C гена *NAT2*rs1801280, наличие аллеля C гена *GSTP1*rs1138272 и отсутствие аллеля C гена *SOD*rs4880)
- обоснована необходимость модификации образа жизни;
- выделена группа пациенток, нуждающаяся в назначении препаратов с антиоксидантным действием на прекоцепционном этапе;
- предложена конкретная схема применения препаратов антиоксидантного действия.

Внедрение в клиническую практику мер по снижению антропогенной химической нагрузки позволило повысить эффективность циклов вспомогательных репродуктивных технологий, а именно увеличить частоту наступления беременности в 1,7 раз.

Оценка содержания диссертации и её завершенность

Диссертационная работа имеет стандартную структуру, состоит из введения, пяти глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводов, практических рекомендаций, приложения, списка сокращений и списка литературы.

Работа написана хорошим литературным языком, иллюстрирована 28 таблицами и 10 рисунками. Диссертация выполнена на достаточном объеме выборки, внутренняя и внешняя валидность полученных автором результатов не вызывает сомнений.

Во введении обосновывается актуальность выбранной темы, формулируется цель и задачи исследования. Научная новизна, практическая значимость, внедрение результатов работы в практику и ее апробация, положения, выносимые на защиту, изложены четко и соответствуют содержанию диссертационной работы.

Первая глава посвящена обзору современных данных о влиянии антропогенного химического загрязнения на репродуктивную функцию человека. Также обзор литературы содержит данные о генетических аспектах системы детоксикации. Приведены данные о роли приема препаратов с антиоксидантной активностью в повышении эффективности лечения бесплодия. В обзоре освещено 25 работ на русском языке и 292 работы на английском языке.

Во второй главе представлен дизайн исследования и методы обследования пациенток (общеклинические, инструментальные и лабораторные), описаны особенности проведения программ ВРТ у пациенток, включенных в исследование. У всех пациенток проведен тщательный анализ соматического, акушерско-гинекологического, репродуктивного и наследственного анамнеза. Проведено

гинекологическое исследование, ультразвуковое исследование органов малого таза, определение уровней основных гормонов в плазме крови. Для определения уровня антропогенных химических веществ использовали масс-спектрометрические исследования, а для определения генотипа системы детоксикации – метод ПЦР в реальном времени. Также в разделе представлено описание методов статистической обработки данных и условия их применения.

В третьей главе представлена клинико-анамнестическая характеристика пациенток в зависимости от наступления беременности в изученном цикле ВРТ. Создана шкала экспозиции антропогенных химических веществ, на основании которой пациентки разделены на группы (высокий и низкий уровень антропогенных химических веществ). Проанализированы клинические особенности пациенток с высоким уровнем антропогенных химических веществ. Проведена оценка эмбриологического этапа и клинических исходов циклов вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с различным уровнем антропогенных химических веществ. Изучена ассоциация между аллельными вариантами генов детоксикации и накоплением антропогенных химических веществ в организме пациенток. Также изучено влияние уровня антропогенных химических веществ на основные параметры сперматогенеза.

На следующем этапе работы выполнена оценка мер по снижению антропогенного химического воздействия на эффективность лечения бесплодия. Определена доля пациенток, выполняющих рекомендации по изменению образа жизни, а также влияние данных изменений на частоту клинической беременности. Отмечено, что использование препаратов с антиоксидантной активностью совместно с изменением образа жизни повышает частоту наступления беременности в 1,7 раз.

Глава «Обсуждение» содержит обобщение полученных результатов, их сравнение с результатами других авторов. Выводы и практические рекомендации сформулированы четко, логично вытекают из полученных результатов, соответствуют задачам и цели исследования.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Принципиальных замечаний к диссертации нет.

Вопросы:

1. Получена ли взаимосвязь между содержанием в крови или фолликулярной жидкости пациенток антропогенных химических веществ и аномалиями строения ооцитов (дисморфизмами)?
2. Известно, что система детоксикации ксенобиотиков состоит из трех равнозначных фаз. В Вашей работе основное внимание уделено генам 2 фазы системы детоксикации суперсемейства глутатионтрансфераз. Учитывали ли Вы в своей работе не только контакт и экспозицию действия тяжелых металлов у пациенток с репродуктивными нарушениями, но и прием различных фармакологических препаратов: витаминно-минеральные комплексы, антибиотики, гормоны и препараты, которые принимали пациентки, если у них было основное экстрагенитальное заболевание?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Сыркашевой Анастасии Григорьевны на тему «Профилактика нарушений репродуктивной функции, обусловленных неблагоприятным влиянием антропогенных химических веществ, на основании дифференцированного подхода к прегравидарной

подготовке» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальной научной задачи в акушерстве и гинекологии – оптимизации прегравидарной подготовки у пациенток с повышенной антропогенной химической нагрузкой.

Научная новизна, достоверность и объективность материалов исследования, теоретическая и практическая значимость полученных результатов позволяют считать, что диссертационная работа Сыркашевой Анастасии Григорьевны соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.4. – акушерство и гинекология.

Член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор,
Директор ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта"

199034, г. Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, д.3
тел. +7 (812) 679-55-51
iagmail@ott.ru



Коган Игорь Юрьевич

«25» 11 2022 года

Подпись члена-корреспондента РАН, д.м.н., профессора Когана И.Ю. заверяю:

Ученый секретарь
ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта",
к.м.н.



Пачулия О.В.

«25» 11 2022 года