

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора
Когана Игоря Юрьевича по диссертационной работе
Кулаковой Елены Владимировны на тему «Совершенствование тактики
лечения бесплодия с использованием вспомогательных репродуктивных
технологий с преимплантационным генетическим тестированием
эмбрионов», представленной на соискание ученой степени доктора
медицинских наук, по специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология

Актуальность темы исследования

Диссертация Е.В. Кулаковой посвящена решению крупной задачи акушерства и гинекологии – преодоления нарушений репродуктивной функции, снижению детской инвалидности и младенческой смертности у супружеских пар, страдающих бесплодием, после лечения методами вспомогательных репродуктивных технологий.

Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) эмбрионов является важнейшим этапом лечения бесплодия методами ВРТ, поскольку определяет наличие генетических отклонений у эмбрионов до их переноса в полость матки. Именно применение ПГТ позволяет снизить риск невынашивания беременности, выкидышей и ранних репродуктивных потерь, приводит к повышению эффективности лечения бесплодия и увеличению шансов рождения детей без генетических отклонений.

Выбор автором темы исследования продиктован необходимостью тщательной оценки роли ПГТ у пациентов с различными типами бесплодия, которые проходят лечение методами ВРТ. Успешное внедрение в России новых генетических технологий, таких как высокопроизводительное секвенирование нового поколения (NGS), требует оценки их клинической и экономической значимости, а также определение групп пациентов, которым ПГТ в программах ВРТ принесут максимальную пользу с позиции решения проблемы бесплодного брака.

Согласно последним эпидемиологическим данным, число бесплодных

браков в России неуклонно растет, возраст первородящих женщин увеличивается, обнаруживаются новые причины мужского бесплодия, все большее число мужчин и женщин прибегают к программам ВРТ. Успех лечения методами ВРТ во многом обусловлен персонализированным подходом к каждой супружеской паре и назначением медицинских манипуляций, которые принесут максимальную лечебную пользу за минимальное время. К таким методам относится и преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов. Однако в нормативно-правовых актах до настоящего времени не были определены группы пациентов с бесплодием, которым показано использование ПГТ, кроме фертильных супружеских пар с носительством моногенных заболеваний и при нарушениях кариотипа.

Все вышесказанное делает диссертационное исследование Кулаковой Елены Владимировны крайне актуальным и своевременным, поскольку позволяет приблизиться к решению проблемы бесплодного брака с помощью современных генетических и эмбриологических технологий.

Научная новизна результатов исследования

Результаты настоящего диссертационного исследования научно обосновали использование современных генетических технологий на доимплантационных стадиях развития человека для преодоления инфертильности в разном возрасте и профилактики тяжёлых генетических заболеваний.

Так, до настоящего времени, предметом научных дискуссий является вопрос влияния отдельных репродуктивно значимых заболеваний на риск формирования анеуплоидных эмбрионов у женщин оптимального для реализации репродуктивной функции возраста. При этом рассматриваются разные механизмы этого процесса. К такой частой патологии относится наружный генитальный эндометриоз, дисфункция яичников, ассоциированная с синдромом поликистозных яичников. Рассматриваемая

работа убедительно, на большом материале, предоставляет ответ в рамках подобных научных дискуссий. Так, у женщин до 35 лет с синдромом поликистозных яичников и наружным генитальным эндометриозом I и II стадий распространения, проведение преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии не является клинически целесообразной и экономически выгодной стратегией. Так как частота наступления беременности и живорождения статистически значимо не отличается от таковой при вспомогательных репродуктивных технологиях без преимплантационного генетического тестирования. Определено, что кумулятивные затраты на 1 живорождение при синдроме поликистозных яичников увеличиваются на 26,5%, при наружном генитальном эндометриозе — на 16,8%, а в случае невынашивания беременности не изменяются. Аналогичные результаты были получены и для пациенток с невынашиванием беременности в анамнезе.

В работе обоснована и сформулирована гендерная составляющая механизма формирования анеуплоидного эмбриона. В частности, установлено влияние возраста мужчины (был взят промежуток 32-48 лет) и степени нарушения сперматогенеза. Было показано, что частота получения эуплоидных эмбрионов у мужчин моложе 40 лет и 40-48 лет сопоставима (50,9% и 47,2% соответственно). При этом частота анеуплоидных эмбрионов закономерно повышается при наличии тяжёлых степеней нарушения сперматогенеза, в том числе в случаях применения технологии получения материала из биоптата яичка (встречаемость генетически аномальных эмбрионов при данной патологии сперматогенеза увеличивается в 1,75 раза по сравнению с нормозооспермией).

Одной из важных частей исследования, имеющей большое фундаментальное значение, явились данные об уровне копийности митохондриальной ДНК в клетках трофэктодермы на частоту имплантации, клинической беременности и родов. Для этого были исследованы образцы

троктодермы 244 бластоцист. Автором было установлено, что статистически значимой разницы в уровне мтДНК у пациенток с положительным и отрицательным результатом имплантации выявлено не было. Однако при анализе исходов беременности и живорождения отмечено, что ранние репродуктивные потери до 12 недель гестации статистически значимо коррелировали с повышенным уровнем экспрессии мтДНК в клетках трофобласта (21,17 у.е. против 13,17 у.е.). При этом частота невынашивания беременности до 12 недель гестации была в 3,4 раза выше при уровне копийности мтДНК равной или превышающей 21,17 у.е. По сути дела, в настоящем исследовании изучена вариабельность плазмона, - совокупности генов, сосредоточенных в цитоплазме и наследуемых по материнской линии) эмбрионов, имеющих различные «клинические перспективы». В частности, полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение дозы генов, локализованных в митохондриальной ДНК и соответствующее отклонение количества белковых структур (АТФ-синтазы, цитохром С оксидазы, кофермента Q – цитохром редуктазы, белков тРНК), может нарушать систему обеспечения энергией клеток и формировать «фенотип потери беременности». Последний проявляется дисфункцией клеток трофобласта, недостаточностью первой волны инвазии трофобласта, нарушением становления гемоциркуляции в межворсинчатом пространстве, и клинически проявляется в виде неразвивающейся беременности и самопроизвольного аборта (ранних репродуктивных потерь). Безусловно, данный фрагмент диссертационной работы имеет важнейшее фундаментальное значение для развития акушерства и гинекологии. Полученные в работе причинно-следственные закономерности доказали, что в трофобласте имеется сопряжённость двух ключевых систем, поддерживающих гомеостаз, - системы синтеза белка и получения энергетических ресурсов.

Полученные результаты стали теоретической основой для предлагаемого в настоящей работе нового практического направления в оценке

доимплантационных этапов развития эмбриона человека.

Высокой степенью научной новизны отличаются результаты диссертационного исследования, посвящённые научному анализу влияния мозаицизма эмбрионов человека на имплантацию и исход гестационного процесса. Тактика ведения пациенток с мозаицизмом эмбрионов, а также механизмы формирования и возможной компенсации такого состояния являются актуальной мировой проблематикой. Автор с помощью современного метода исследования – высокопроизводительного секвенирования следующего поколения – на отечественной популяции определила частоту встречаемости мозаицизма по разным хромосомам (161 из 3092 тестируемых бластоцист; 5,3%). Более того, клинический анализ позволил выявить интактность процессов имплантации, плацентации и развития эмбриона/плода при переносе эмбрионов с наличием мозаицизма в абсолютном большинстве из 12 анализируемых случаев (в 6 - наступила беременность; родилось 5 живых здоровых детей), что, вероятно, может быть объяснено как его выраженностью, характером хромосомного нарушения (полная хромосома или фрагмент; какая хромосома), и компенсаторными возможностями эмбриона. Данные результаты явились основой для предлагаемой автором новой тактики ведения сложной группы пациентов в протоколах ВРТ - с наличием мозаичных, но не эуплоидных эмбрионов.

Отдельного внимания заслуживает часть диссертационной работы, посвящённой научному анализу стратегий профилактики тяжёлой моногенной патологии - преимплантационной генетической диагностики на моногенные заболевания (16 нозологических единиц). Каждый рассматриваемый в диссертации случай является уникальным, тем более, что спектр изучаемой патологии был достаточно широким и представлен в том числе заболеваниями, которые еще во время написания работы не вошли в список для неонатального скрининга (болезнь Гентингтона, синдром Альпорта, синдром Кальмана, синдром Марфана и другие). Автор доказала,

что преимплантационное генетическое тестирование на моногенные заболевания и анеуплоидии у фертильных пар с носительством моногенных заболеваний является эффективным по числу рожденных здоровых детей (родилось 8 здоровых детей у пациентов–носителей 16 различных моногенных заболеваний).

Инновационной частью диссертации является изучение влияния использования культуральных сред с гиалуроновой кислотой на развитие зуплоидного эмбриона и последующую эффективность программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста (37–43 года). Выявлено, что подобная стратегия статистически значимо снижает частоту ранних репродуктивных потерь в сроке до 12 недель гестации — в 1,73 раза. При этом в общей когорте пациенток использование на эмбриологическом этапе культуральных сред, содержащих гиалуроновую кислоту, при переносе зуплоидного эмбриона не повышает частоту имплантации.

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

Общий объем исследованного материала (13 595 супружеских пар на первом этапе исследования и 3 321 — на последующих), использование комплекса современных методов генетического анализа преимплантационных эмбрионов (высокопроизводительное секвенирование нового поколения, сравнительная геномная гибридизация), грамотное использование соответствующих методов статистического исследования позволяет утверждать, что научные положения, выводы и рекомендации, изложенные в диссертации Кулаковой Елены Владимировны, достоверны и заслуживают доверия. Диссертационная работа имеет информативные таблицы и диаграммы, которые дополняют текст исследования, делая полученные результаты наглядными и доступными для понимания.

В диссертационной работе Кулаковой Елены Владимировны разработана современная персонифицированная тактика ведения пациентов в программах ВРТ с применением преимплантационного генетического тестирования эмбрионов не только для повышения эффективности оказания врачебной помощи, но и для снижения рисков рождения детей с генетическим нарушениями.

Личный вклад автора заключается в планировании и проведении исследования, анализе результатов и адекватной их статистической обработке, а также обобщении и сравнении их с данными современной литературы, подготовке публикаций.

По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, 18 — в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 1 публикация на английском языке в журнале, входящем в перечень Scopus WoS, 5 — материалы российских и зарубежных конференций.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертации позволили чётко сформулировать ряд практических рекомендаций:

- установлены показания для преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий при тяжелых формах нарушений сперматогенеза (олигозооспермия) и при использовании для оплодотворения сперматозоидов, выделенных из ткани яичка;

- определены рамки возможностей переноса эмбрионов с мозаицизмом в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных

технологий, а также рекомендации по ведению такой беременности, в том числе с применением пренатальной диагностики;

- сформулированы принципы реализации репродуктивной функции у фертильных пар с носительством моногенных заболеваний и аномалиями кариотипа;

- разработаны принципы применения культуральных сред с гиалуроновой кислотой;

- разработан новый комбинированный подход преимплантационного генетического тестирования, включающий в себя определение уровня копийности мтДНК;

- установлен конкретный уровень копийности мтДНК, ассоциированный с риском невынашивания беременности.

Полученные данные о роли преимплантационного генетического тестирования эмбрионов при лечении бесплодия различного генеза методами ВРТ были обобщены в виде алгоритма ведения пациентов, который позволяет повысить клиническую эффективность и снизить экономические затраты на рождение здорового ребенка.

Результаты работы целесообразно опубликовать в виде руководства для акушеров-гинекологов для большего охвата врачей, занимающихся репродуктивным здоровьем, а также включить в национальные рекомендации по лечению бесплодия. Полученные в диссертации данные позволяют на разных этапах оказания врачебной помощи приблизиться к решению вопроса о снижении детской инвалидности и младенческой смертности в Российской Федерации.

Оценка содержания диссертации и ее завершенность

Диссертация написана по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, разделов: материалы и методы, результаты исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа

составлена логично, читается с интересом, результаты опубликованы в полном объеме. Стил ь изложения рациональн ый. Введение имеет аргументированную цель и задачи и содержит все формальные моменты.

Представленный в диссертации Кулаковой Е.В. литературный обзор дает полное теоретическое представление по теме диссертации. Автору удалось проследить основные тенденции исследуемой проблемы с позиции фундаментальной науки и практической медицины. Кулакова Е.В. описывает современное состояние вопроса бесплодного брака и возможности генетического тестирования эмбрионов разными методами. Описано решение проблемы профилактики рождения детей у супружеских пар с нарушениями кариотипа и при носительстве моногенных заболеваний. Раздел, посвященный истинному мозаицизму преимплантационных эмбрионов, представляет собой не только информацию с позиции клеточной биологии, но и описывает задачи, стоящие перед клиницистами, при переносе эмбрионов с мозаицизмом в полость матки в программах лечения бесплодия методами ВРТ.

В главе «Материалы и методы» подробно и последовательно описаны все применяемые методы исследования в диссертационной работе, в том числе молекулярно-генетические. Подробно представлены процедуры забора биологического материала у эмбрионов, методы его диагностики в зависимости от клинической ситуации.

Глава 4 «Результаты собственных исследований» отражает решение поставленных задач и состоит из 12 подразделов. В главе 4.1. представлены эпидемиологические данные о частоте обращаемости пациентов к программам ВРТ с ПГТ. Обследовано более тринадцати тысяч супружеских пар. В виде наглядных диаграмм показаны проанализированные данные по увеличению возраста пациенток в протоколах ВРТ и структура потребности в проведении ПГТ-А.

В главах 4.2–4.5. автор последовательно описывает особенности

проведения лечения у пациенток позднего репродуктивного возраста, с наружным генитальным эндометриозом I и II стадии распространения, с синдромом поликистозных яичников, с множественными выкидышами в анамнезе. Обоснованный набор групп контроля позволяет Кулаковой Е.В. провести сравнительный анализ эффективности лечения бесплодия у данных категорий больных и сделать соответствующие выводы о необходимости применения ПГТ-А эмбрионов с позиции клинической целесообразности.

Глава 4.6. посвящена изучению фактора мужского бесплодия и эффективности выполнения ПГТ-А при различных типах нарушения сперматогенеза. Полученные результаты по частоте получения анеуплоидных эмбрионов позволили Кулаковой Е.В. обосновать целесообразность проведения ПГТ при тяжелых формах нарушений сперматогенеза, в частности при оплодотворении сперматозоидами, выделенными из ткани яичка.

В главах 4.7 и 4.9. представлены убедительные доказательства эффективности применения ПГТ-СП и ПГТ-М у пар с носительством моногенных заболеваний и при нарушениях кариотипа. Предложенная тактика ведения данных пациентов позволяет значительно снизить риски рождения детей с генетическими нарушениями.

В главе 4.8. описаны уникальные данные по частоте истинного мозаицизма у эмбрионов человека в программах ВРТ. Эмбрионы человека доимплантационных стадий развития являются очень сложным материалом с этической точки зрения, однако Кулакова Е.В. указывает на это обстоятельство, приводит решение комиссии по биомедицинской этике. Также получены оригинальные данные по переносу эмбрионов с мозаицизмом в полость матки, родились здоровые дети.

Главы 4.10 и 4.11 посвящены оптимизации эмбриологического этапа программ переноса эуплоидного эмбриона. К сожалению, даже генетически, нормальный эмбрион в половине случаев не имплантируется в полости

матки, именно эту проблему пытается решить Кулакова Е.В в диссертационной работе. Автору удалось выявить группу пациентов (позднего репродуктивного возраста), которым при переносе зуплоидного эмбриона удалось снизить частоту ранних выкидышей в программах ВРТ с ПГТ-А с помощью использования культуральных сред с гиалуроновой кислотой. Также Кулаковой Е.В. предложен новый критерий селекции зуплоидного эмбриона для переноса — копияность митохондриальной ДНК при ее одновременной оценке с плоидностью методами высокопроизводительного секвенирования нового поколения.

Глава 4.12. посвящена выявлению группы пациентов, которым использование ПГТ является не только клинически целесообразным, но и экономически выгодным. Автор блестяще справляется с поставленной задачей.

Глава «Обсуждение» позволила Кулаковой Е.В. найти правильное место полученным в работе результатам среди современных научных достижений в области репродуктивной медицины. Заключение логично подводит к четким и структурированным выводам диссертации, которые в свою очередь полностью соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации логичны и убедительны. Список используемой литературы содержит 26 источников на русском языке, 256 - зарубежные источники.

Диссертация Кулаковой Елены Владимировны представляет собой законченный научный труд. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Кулаковой Елены Владимировны нет.

Вопросы:

1. Как можно объяснить статистически значимое увеличение частоты мозаичных эмбрионов при нормозооспермии по сравнению с патоспермией и оплодотворением тестикулярными сперматозоидами?

2. Что Вы считаете истинным мозаицизмом эмбриона?

3. Почему автор считает целесообразным проводить ПГТ-А при нарушениях сперматогенеза, если результаты, полученные в рамках диссертационного исследования, свидетельствуют об отсутствии статистически значимых отличий при сравнении исходов программ ВРТ с ПГТ-А при нормо- и патоспермии?

4. Каков возможный механизм благоприятного влияния культуральных сред с гиалуроновой кислотой на развитие эуплоидного эмбриона и последующую эффективность программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста (37–43 года)?

Заключение

Таким образом, диссертация Кулаковой Елены Владимировны является завершенной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований клинически, экономически и научно обосновано применение преимплантационного генетического тестирования у пациентов с бесплодием. Совокупность полученных результатов, а также разработанная концепция персонифицированного ведения пар с бесплодием с учетом рисков рождения детей с генетическими нарушениями, можно квалифицировать как крупное научное достижение и решение проблемы в области репродуктивного здоровья, акушерства и гинекологии.

Результаты проведенных исследований вносят существенный вклад в понимание особенностей назначения и проведения преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах лечения бесплодия методами ВРТ, прегравидарной подготовки пациентов и профилактики детской инвалидности и смертности.

Полученные результаты имеют большое значение для специалистов в области репродуктивной медицины, акушеров-гинекологов, андрологов, клинических эмбриологов.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Кулаковой Елены Владимировны полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. постановления Правительства РФ от 21.04.2016 №335, 28.08.2017 №1024 01.10.2018 №1168, от 26.05.2020 №75), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология.

Директор
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и
репродуктологии имени Д.О. Отта»
Член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук,
профессор
(специальность 3.1.4. Акушерство и
гинекология)
«07 10 _____ 2022 г.



Коган Игорь Юрьевич

Подпись доктора медицинских наук, профессора Когана И.Ю. заверяю:
Ученый секретарь
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»
доктор медицинских наук



Капустин Роман Викторович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3
Тел. +7 (812) 328-98-68
E-mail: iagmail@ott.ru