



**МИНИСТЕРСТВО ОБОРОНЫ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБОРОНЫ РОССИИ)
ВОЕННО-МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ**

г. Санкт-Петербург, ул. Академика
Лебедева, 6, 194044

« 16 » 03 2020 г. № 4/10/238
На № _____

УТВЕРЖДАЮ

**Заместитель начальника
Военно-медицинской академии
имени С.М. Кирова**

**по учебной и научной работе
доктор медицинских наук профессор**

Б.Н. Котив

« _____ » 2020г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Кривонос Марины Ивановны на тему: «Патогенетически обоснованная профилактика неблагоприятных исходов экстракорпорального оплодотворения у женщин с наличием антифосфолипидных антител», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 14.01.01 – акушерство и гинекология.

**Актуальность проблемы выполненной работы и ее связь с отраслями науки
и практической деятельности**

Наличие аутоиммунной патологии, в частности антифосфолипидного синдрома у женщин с бесплодием, планирующих применение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), является актуальной проблемой акушерства, гинекологии и репродуктологии в связи с известным неблагоприятным влиянием антифосфолипидных антител (АФА) на исходы протоколов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) (Машкова, Т.Я., 2015; Стулева Н.С., 2015), доказанным увеличением частоты невынашивания беременности после ЭКО (Levine A., 2014; Di Nisio M., 2018) и повышением риска развития тромбоэмболических осложнений на фоне гиперкоагуляционных изменений, развивающихся в ответ на стимуляцию яичников у этих женщин (Акиньшина С.В., 2014).

Роль АФА в развитии невынашивания беременности хорошо изучена, однако влияние данных антител на развитие ранних репродуктивных потерь, то есть на этапе инвазии и имплантации эмбриона изучено недостаточно и отсутствует единое представление о патогенезе их неблагоприятного воздействия на данном этапе беременности. Не определены особенности иммунологического статуса женщин с наличием АФА, недостаточно освещены в литературе особенности влияния на гемостаз протоколов овариальной стимуляции при наличии АФА. Дискуссионными остаются вопросы о возможности профилактики неблагоприятных исходов ЭКО при применении стандартной терапии низкими дозами ацетилсалициловой кислоты и низкомолекулярных гепаринов, а также кортикостероидов и иммуноглобулинов для внутривенного введения (ВВИГ).

Решение данных научных вопросов открывает возможность к улучшению исходов лечения бесплодия у женщин с циркуляцией АФА и профилактике ранних прерываний беременности в данной группе женщин.

Диссертационная работа Кривонос М.И. посвящена изучению роли АФА в возникновении неблагоприятных исходов ЭКО и оценке эффективности применения ВВИГ в комплексе лечебных мероприятий для их профилактики. Изучены клиничко-анамнестические данные и особенности иммунологического статуса у женщин с бесплодием и циркуляцией АФА, оценена результативность протоколов ЭКО по сравнению с сопоставимыми по акушерско-гинекологическому анамнезу женщин без АФА, охарактеризована динамика изменений показателей гемостаза. Определена клиническая эффективность инфузии ВВИГ у женщин с наличием АФА при проведении протоколов ЭКО.

Таким образом, рецензируемая диссертация представляется актуальным научным исследованием и вызывает высокий практический интерес.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В рецензируемой работе впервые определены существенные изменения

состава иммунокомпетентных клеток у женщин с бесплодием и циркуляцией АФА по сравнению с женщинами без репродуктивной патологии. На основании анализа данных субпопуляционного состава лимфоцитов выявлено, что у женщин с АФА значимо меньше содержание Т-регуляторных лимфоцитов и больше В-лимфоцитов по сравнению со здоровыми женщинами. Установлено значимо большее содержание В-лимфоцитов у женщин с АФА по сравнению с сопоставимыми по анамнезу женщинами с бесплодием и отсутствием АФА.

Автором не выявлены различия в частоте имплантации и частоте клинической беременности у женщин с циркуляцией АФА, по сравнению с женщинами без них, однако обнаружено, что при наличии аутоантител процент регистрации клинической беременности от числа женщин с положительным результатом анализа на β -субъединицу Хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) был значимо ниже, по сравнению с женщинами без АФА, что указывает на увеличение доклинических потерь беременности в данной группе женщин.

Впервые проанализированы качественные показатели развития эмбрионов у женщин с бесплодием и циркуляцией АФА и обнаружено, что у женщин с циркуляцией АФА доля эмбрионов хорошего качества на 3-й день культивации значимо меньше, по сравнению с женщинами без аутоантител.

Впервые подробно изучены динамические изменения в системе гемостаза у женщин с наличием и отсутствием АФА на фоне проведения протокола ЭКО и обнаружена значимая динамика изменений показателей системы гемостаза в обеих группах в виде нарастания коагуляционного потенциала (рост концентрации фибриногена), активации внутрисосудистого свертывания (увеличение Д-димеров) и уменьшения активности антикоагулянтной системы (снижение содержания антитромбина-III).

Впервые выполнен анализ взаимосвязи между показателями гемостаза, наличием АФА и исходами протоколов ЭКО. Было показано, что значимое влияние на частоту клинической беременности оказывал волчаночный антикоагулянт и концентрация фибриногена, определенные на этапе после переноса эмбрионов в полость матки.

Результаты работы позволили автору сформулировать практические рекомендации, в которых указывается необходимость расширения спектра обследования женщин с многократными неудачами ЭКО на наличие АФА (антитела к кардиолипину, β 2-гликопротеину-1, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте и волчаночный антикоагулянт). Автором предложено относить женщин с наличием АФА в группу риска по неудачным исходам программ ЭКО с исходной оценкой содержания Т-регуляторных лимфоцитов и наблюдением за состоянием системы гемостаза в дальнейшем. С целью профилактики ранних репродуктивных потерь при лечении бесплодия с применением ЭКО у женщин с циркуляцией АФА и многократными неудачами ВРТ автором рекомендуется проводить инфузию ВВИГ в протоколе ЭКО в курсовой дозе 300 мл (15 г): по 100 мл (5 г) внутривенно капельно с интервалом 5-7 дней, начиная с начала контролируемой стимуляции овуляции.

Практические рекомендации актуальны для практикующих врачей акушеров-гинекологов, репродуктологов и позволяют оптимизировать обследование и ведение женщин с бесплодием и наличием АФА в протоколе ЭКО.

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенной работы соответствуют области исследования, конкретно пунктам паспорта акушерства и гинекологии.

Значение для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов

Рецензируемая работа имеет несомненную теоретическую и практическую значимость. Результаты исследования показали, что женщины с бесплодием и циркуляцией АФА характеризуются высокой частотой многократных неудач ЭКО (36,7%) и невынашивания беременности в анамнезе (32,8%); у каждой десятой пациентки в анамнезе установлено бесплодие неясной этиологии. Автором

обоснована необходимость обследования женщин с бесплодием на наличие антифосфолипидных аутоантител при наличии у них в анамнезе многократных неудач ЭКО.

В результате работы достоверно установлено увеличение ранних репродуктивных потерь после проведения ЭКО у женщин с циркуляцией АФА. Доказана эффективность использования ВВИГ в составе комплексной терапии при проведении протокола ЭКО у женщин с наличием АФА и отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом с целью снижения частоты ранних репродуктивных потерь.

Несомненную важную теоретическую значимость имеет изучение клинко-иммунологических особенностей женщин с наличием АФА при отсутствии установленного диагноза антифосфолипидный синдром (АФС). В практическом акушерстве частота встречаемости данной группы женщин значительно выше, чем пациентов с подтвержденным диагнозом АФС и подходы к их ведению до конца не определены. Полученные результаты исследования указывают на невозможность игнорирования факта циркуляции АФА у женщин планирующих беременность и важности разработки для них алгоритмов прегравидарной подготовки, ведения протокола ЭКО и дальнейшей беременности.

Практическая направленность исследования заключается в разработке метода профилактики неблагоприятных исходов ЭКО у женщин с циркуляцией АФА.

Не вызывает сомнения тот факт, что применение полученных научных результатов и сформулированных соискателем практических рекомендаций позволит улучшить исходы лечения бесплодия с применением программ ЭКО у женщин с наличием АФА.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Адекватная математико-статистическая обработка представленных результатов исследования позволяет считать результаты диссертационного

исследования достоверными, а основные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации обоснованными.

Структура и содержание работы

Материалы диссертации изложены на 172-х страницах машинописного текста, иллюстрированы 27-ю таблицами, 30-ю рисунками и двумя приложениями, включающими 2 таблицы и 9 рисунков. Диссертация построена по классическому принципу: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации, список литературы и приложения. Список литературы состоит из 180-и источников (21-го отечественного и 159-и зарубежных). Оформление диссертации соответствует требованиям ВАК, работа написана грамотным научным языком, имеет четкую структурную последовательность в изложении.

Во **введении** обосновывается актуальность выбранной темы, сформулированы цель и задачи исследования, раскрыта научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, описана методология исследования и использованные методы, представлены сведения об апробации и внедрении результатов в практику, даны данные о личном участии автора и публикациях, структуре и объеме диссертации.

Для решения поставленных задач проведено обследование 280 женщин репродуктивного возраста на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта». Из числа обследованных в анализируемые группы была включена 191 женщина, соответствовавшая критериям включения в исследование. У 128 женщин были выявлены превышающие нормы значения АФА и они были разделены на 2 группы (основную группу А и Б). Основную группу А – составили 77 женщин с АФС или циркуляцией АФА, проходившие лечение бесплодия с использованием методов ЭКО и получавшие ВВИГ в курсовой дозе 300 мл (15 г) в дополнение к

низким дозам ацетилсалициловой кислоты и профилактическим дозам низкомолекулярных гепаринов. Основную группу Б – составила 51 женщина с АФС или циркуляцией АФА, проходившие лечение бесплодия с использованием методов ЭКО и получавшие только терапию с использованием низких доз ацетилсалициловой кислоты и профилактических доз низкомолекулярных гепаринов. В группу сравнения – были включены 63 сопоставимые по клинико-анамнестическим данным женщины с отсутствием АФА, проходящие лечение бесплодия с использованием методов ЭКО. Для сравнительной оценки иммунологических показателей использовали результаты обследования 27 здоровых небеременных женщин с неотягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом: одна и более физиологическая беременность, закончившаяся физиологическими родами.

В данном разделе представлен дизайн исследования и описана методология проведения исследования. В работе применялись клинико-лабораторное обследование, исследование иммунологического статуса, гормональное обследование, ультразвуковое исследование органов малого таза и морфологическое исследование репродуктивного материала. Не оставляет сомнений то, что примененные методы позволили получить достоверные результаты исследования. Обработка полученных результатов проводилась с помощью современных методов статистического анализа.

В первой главе представлен анализ современных литературных данных о роли АФА в развитии репродуктивных потерь, в частности после проведения протоколов ЭКО. При этом отмечена противоречивость данных имеющихся исследований о влиянии данных антител на исходы лечения бесплодия. Подробно описаны современные представления об иммунопатогенезе нарушений имплантации и развития ранних репродуктивных потерь у женщин с наличием АФА. Проанализированы научные публикации о подходах к ведению данной группы женщин в программах ЭКО. Подробно освещены современные данные о возможностях иммунотерапии при применении ВРТ и дальнейшем ведении

беременности у женщин с АФС, наличием иммунологических отклонений или многократных неудачах ЭКО.

Во **второй главе** представлена клиническая характеристика обследованных групп. Для того чтобы было возможно дальнейшее сравнение результативности программ ЭКО в данной главе было выполнено сравнение клинико-анамнестических данных в трех обследуемых группах с целью оценки их сопоставимости. Статистически значимых различий в параметрах репродуктивной и менструальной функции, частоте применения методов ВРТ и виду бесплодия выявлено не было. Среди женщин с циркуляцией АФА у 32,8% в анамнезе было невынашивание беременности, у 36,7% были многократные неудачные попытки ЭКО.

Анализ структуры сопутствующей гинекологической и соматической патологии не выявил различий в сравниваемых группах. Не было выявлено также значимых различий по сывороточным уровням гормонов и показателей спермиологического исследования супругов.

При оценке параметров стимуляции не было выявлено статистически значимых различий в курсовых дозах и длительности стимуляции препаратом рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона, частоте получения ооцитов, количестве фолликулов в день введения триггера овуляции и количестве полученных ооцитов.

На основании полученных данных автор делает выводы, что пациентки сравниваемых групп были сопоставимы по клинико-анамнестическим, исходным лабораторным данным и основным параметрам стимуляции и считает возможным проведение дальнейшего сравнения результативности их программ ЭКО.

В **третьей главе** представлены результаты собственных исследований. В начале автор приводит результат сравнительной оценки иммунологических параметров для женщин с бесплодием и отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом и здоровых небеременных женщин с неотягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом, где были выявлены множественные различия в показателях субпопуляционного состава лимфоцитов,

содержании Т-регуляторных клеток, индуцированной активности НК-клеток. Автор указывает, что наибольшие изменения характерны для женщин с циркуляцией АФА и приводит данные, где были выявлены наиболее важные различия в иммунологических параметрах. Обнаружено, что у женщин с АФА значимо ниже показатели абсолютного ($0,008 (0,006; 0,013)$ и $0,014(0,01; 0,025)$, $p < 0,001$) и относительного ($4,83 \pm 1,63$ и $5,89 \pm 1,46$, $p = 0,007$) содержания Т-регуляторных лимфоцитов по сравнению со здоровыми женщинами. Наиболее значимым различием было большее относительное содержание В-лимфоцитов CD19+ ($11,6 (9,7; 13,78)$ и $9,85 (8,43; 11,78)$, $p = 0,029$), в связи с чем делает вывод о наличии у них аутоиммунного процесса. У женщин с циркуляцией АФА установлено снижение абсолютного содержания НК-клеток и НКТ-клеток относительно группы здоровых женщин. Сравнение иммунологических параметров у сопоставимых по анамнезу женщин с наличием и отсутствием АФА выявило различия в отношении содержания В-лимфоцитов CD19+. У женщин с циркуляцией АФА было значимо выше относительное ($11,6 (9,7; 13,78)$ и $9,78 (7,74; 12,7)$, $p = 0,013$) и абсолютное содержание В-лимфоцитов CD19+ ($0,21 \pm 0,11$ и $0,16 \pm 0,06$, $p = 0,021$) в сравнении с женщинами без АФА.

На основании полученных данных, автор делает выводы о значимости влияния АФА на показатели иммунного статуса пациенток, что может объяснять причину различий в результативности программ ЭКО.

В дальнейшем автор приводит подробный сравнительный анализ показателей системы гемостаза на протяжении протокола ЭКО (начало стимуляции, перед пункцией и после переноса эмбрионов в полость матки). При проведении анализа данных коагулограммы у пациенток с наличием АФА по сравнению с женщинами без АФА были выявлены значимые различия в показателях системы гемостаза. Однако на фоне проводимой антикоагулянтной терапии значения показателей коагулограммы находились в пределах допустимых значений и не представляли угрозу развития тромбоэмболических осложнений. Оценка общей динамики показателей системы гемостаза в протоколе ЭКО выявила изменения, сопровождающиеся нарастанием коагуляционного

потенциала (рост концентрации фибриногена), активацией внутрисосудистого свертывания (увеличение Д-димеров) и уменьшением активности антикоагулянтной системы (снижение содержания естественного антикоагулянта – антитромбина-III). На основании изучения показателей системы гемостаза, автор делает выводы об общей тенденции к увеличению коагуляционного потенциала и уменьшения активности антикоагулянтной системы на фоне применения низких доз ацетилсалициловой кислоты и профилактических доз низкомолекулярных гепаринов у женщин с наличием и отсутствием АФА.

Следующим этапом выполнена оценка влияния АФА на результаты программ ЭКО. Определено, что у женщин с циркуляцией АФА, не получавших ВВИГ был достоверно ниже процент регистрации клинической беременности среди женщин с положительным результатом анализа на β -ХГЧ (биохимическая беременность) по сравнению к женщинам без АФА, (60% и 93,75%, $p=0,033$). В других показателях результативности программ ЭКО различий выявлено не было.

При сравнении результативности ЭКО у женщин с АФА, получавших и не получавших иммунотерапию выявлена значимо большая частота ранних репродуктивных потерь, определяемая по отсутствию клинической беременности у женщин с положительным β -ХГЧ, у последних (93,33 и 62,5%, $p=0,019$). Частота клинической беременности была значимо выше у женщин получавших ВВИГ по сравнению с женщинами не получавшими ВВИГ (42,65% и 20,41%, $p=0,012$). В отношении частоты имплантации и других показателей результативности ЭКО значимых различий выявлено не было.

При анализе факторов, оказавших влияние на исходы протоколов ЭКО, установлено, что значимое влияние на частоту клинической беременности оказывал волчаночный антикоагулянт и концентрация фибриногена, определенные на этапе после переноса эмбрионов в полость матки. Уровень волчаночного антикоагулянта был значимо ниже в группе женщин, получивших ВВИГ, по сравнению с женщинами с АФА не получившими ВВИГ ($1,24 \pm 0,03$ и $1,35 \pm 0,04$, $p=0,03$). У женщин, получивших ВВИГ, отсутствовало влияние уровня волчаночного антикоагулянта на результат протокола. У женщин, не получивших

ВВИГ, благоприятный исход протокола в виде регистрации клинической беременности отмечен у пациенток с меньшим содержанием волчаночного антикоагулянта ($1,20 \pm 0,06$ и $1,38 \pm 0,14$, $p=0,023$).

В группе женщин, получавших ВВИГ, содержание фибриногена на этапе после переноса эмбрионов в полость матки было значимо ниже, по сравнению с женщинами, не получившими ВВИГ ($3,61 \pm 0,6$ и $4,24 \pm 0,86$, $p=0,008$). Влияние концентрации фибриногена на частоту клинической беременности было выявлено в группе женщин, получивших ВВИГ. У женщин с клинической беременностью уровень фибриногена был достоверно ниже, чем у тех, у кого беременность не наступила ($3,38 \pm 0,51$ и $3,82 \pm 0,6$, $p=0,02$).

Анализ показателей развития эмбрионов среди женщин с наличием и отсутствием АФА показал значимо меньшую долю эмбрионов хорошего качества на 3-й день после оплодотворения при наличии АФА по сравнению с женщинами без АФА ($71,17 \pm 3,02$ и $81,1 \pm 3,62$, $p=0,016$), однако на 4-й день после оплодотворения значимых различий выявлено не было.

В четвертой главе представлен подробный и систематизированный анализ полученных результатов собственного исследования и сопоставления их с известными данными литературы, подводящий итог исследованию.

Материал диссертации изложен в виде рисунков и таблиц, легко доступных для восприятия. Полученные данные обработаны с использованием современных методов статистического анализа и не вызывают сомнений. Диссертация содержит 5 выводов и 3 положения практических рекомендаций, каждый из которых хорошо обоснован и логически вытекает из содержания диссертации.

Список литературы включает 21 отечественный и 159 зарубежных источников, оформление соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям ВАК.

Личный вклад диссертанта и наиболее значимые результаты

Изложенный в данной диссертации всесторонний глубокий анализ

доступной современной литературы, обоснованное в ходе исследования обсуждение полученных результатов, адекватная статистическая обработка и анализ полученных данных свидетельствуют о глубоком знании автором исследованного материала. В результате проведенной работы диссертант сформулировал ряд важных в теоретическом и практическом отношении положений, которые сводятся к следующему. Наличие АФА у женщин с бесплодием является значимым патогенетическим фактором неблагоприятных исходов программ ЭКО, связанным с увеличением частоты ранних репродуктивных потерь. У женщин с бесплодием и циркуляцией АФА выявлены существенные изменения состава иммунокомпетентных клеток, о чем свидетельствовало меньшее содержание Т-регуляторных лимфоцитов и большее содержание В-лимфоцитов, что явилось следствием реализации аутоиммунных процессов. В ответ на проведение стимуляции овуляции в протоколе ЭКО у женщин с циркуляцией АФА наблюдается значимая динамика изменений показателей системы гемостаза в виде нарастания коагуляционного потенциала (рост концентрации фибриногена), активации внутрисосудистого свертывания (увеличение Д-димеров) и уменьшения активности антикоагулянтной системы (снижение содержания антитромбина-III). Применение ВВИГ у женщин с бесплодием и циркуляцией АФА при проведении программ ЭКО способствует увеличению частоты клинической беременности.

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из которых 5 – публикации в рецензируемых ВАК научных журналах, что не оставляет сомнений в актуальности и научной новизне диссертационной работы.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Сформулированные в диссертационном исследовании выводы и практические рекомендации внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных репродуктивных технологии ФГБНУ «Научно-

исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» (199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3, тел.: 8 (812) 325-32-20, www.ott.ru, e-mail: iagmail@ott.ru) и городского акушерского гематологического центра на базе СПб ГУЗ «Родильный дом № 6 им. проф. В.Ф. Снегирева» (191014, г. Санкт-Петербург, ул. Маяковского д.5, тел.: +7-921-877-84-87, roddom6@zdrav.spb.ru).

Замечания к работе

Принципиальных замечаний к проведенному исследованию и оформлению диссертации нет.

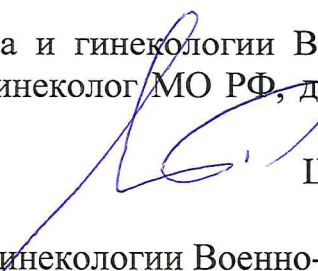
Заключение

Диссертационная работа Кривонос Марины Ивановны на тему: «Патогенетически обоснованная профилактика неблагоприятных исходов экстракорпорального оплодотворения у женщин с наличием антифосфолипидных антител», выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Зайнулиной Марины Сабировны и заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук, профессора Селькова Сергея Алексеевича, является научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной задачи – изучения роли антифосфолипидных антител в развитии неблагоприятных исходов ЭКО и разработке метода их профилактики. По своей актуальности, объему проведенного исследования, уровню его исполнения, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, обоснованности выводов и возможности практического использования полученных научных данных работа соответствует критериям, которым должна отвечать диссертация на соискание ученых степеней, установленных п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 01.10.2018

г. № 1168), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 14.01.01 – акушерство и гинекология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры акушерства и гинекологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, протокол заседания № 145 от 4 марта 2020 года.

Начальник кафедры акушерства и гинекологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, главный гинеколог МО РФ, доцент, кандидат медицинских наук

 Шмидт Андрей Александрович

Доцент кафедры акушерства и гинекологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, кандидат медицинских наук

 Бескровный Сергей Васильевич

Подписи Шмидта А.А., Бескровного С.В. заверяю

Начальник отдела кадров Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова

 Д.Е. Гусев

