

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 001.001.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ» ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 24 июня 2021 № 277

О присуждении Андреевой Евгении Александровне, гражданке РФ,
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Иммуноактивные факторы фолликулярной жидкости у женщин в программе экстракорпорального оплодотворения» по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» принята к защите 22 апреля 2021 года, протокол № 275 диссертационным советом Д001.001.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ), почтовый индекс 630099, адрес организации: г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, дом 14, действующего на основании приказа № 714 от 02.11.2012 года.

Соискатель Андреева Евгения Александровна, 1991 года рождения, окончила в 2012 году бакалавриат ФГАОУ ВПО «Сибирский Федеральный Университет» Институт фундаментальной биологии и биотехнологии г.Красноярск с присвоением степени бакалавра по направлению «Биология». В 2014 году окончила ФГАОУ ВПО «Сибирский Федеральный Университет» с присвоением квалификации Магистр по направлению «Биология» (магистерская программа «Реконструктивная биоинженерия») г.Красноярск.

В 2014 году прошла курс повышение квалификации по профессиональной программе: «проведение ИКСИ» в ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

С 2015 по настоящее время проходит обучение в аспирантуре (заочная форма) ФГБНУ НИИФКИ; с 01.02.2018 по 01.02.2021 находилась в отпуске по беременности и родам, с последующим отпуском по уходу за ребенком до 3 лет.

Диссертация выполнена в лаборатории клеточной иммунотерапии отдела клинической иммунологии НИИФКИ.

Научный руководитель – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИФКИ Хонина Наталья Алексеевна.

Официальные оппоненты:

Чистякова Гузель Нуховна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики Федерального государственного бюджетного учреждения «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Трунов Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии естественных наук, заведующий научным отделом Федерального государственного автономного учреждения Национального медицинского исследовательского центра Межотраслевого научно-технического комплекса «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Иваново (ФГБУ «Ив НИИ МиД им. В.Н. Городкова» Минздрава России).

В своем положительном заключении, подписанном заведующей лабораторией клинической иммунологии, доктором медицинских наук,

профессором Сотниковой Натальей Юрьевной, указано, что диссертационная работа Андреевой Евгении Александровны является научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований, решены задачи, важные для фундаментальной и клинической иммунологии, а именно: обнаружена взаимосвязь FoxP3⁺- регуляторных клеток, свободной ДНК, микровезикул с ранними этапами репродуктивного процесса: с количеством фолликулов, ответивших на стимуляцию суперовуляции, с количеством получаемых ооцитов, с индексом оплодотворения и качеством получаемых эмбрионов. Практическую ценность представляют результаты по сопряженности уровней свДНК и МВ в фолликулярной жидкости и наступлением беременности. Проведенный анализ позволил рассматривать содержание свДНК и популяций МВ в фолликулярной жидкости в качестве прогностических критериев наступления беременности в программах ЭКО.

Диссертация Андреевой Е.А. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016г. №335), а её автор достоин присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология».

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, включая 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, из них 1 статья, индексируемая в базе Web of Science.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Андреева Е.А.** Цитокины в регуляции овариального фолликулогенеза (обзор литературы)/ Е.А. Андреева, Н.А. Хонина, Н.М. Пасман, Е.Р.

- Черных // Проблемы репродукции. - 2017. - Т. 23. - С. 8-14. DOI: 10.17116/repro20172318-14
2. **Андреева Е.А.** Регуляторные Т-клетки в фолликулярной жидкости у женщин, проходящих лечение по программе ЭКО/ Е.А. Андреева, Н.А. Хонина, М.А. Тихонова М.А., Е.В. Баторов, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология. - 2018. - Т. 20.- №5. - С. 657-666. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-657-666.
 3. **Андреева Е.А.** Свободная ДНК в фолликулярной жидкости женщин с различными показателями овариальной функции и исходами ЭКО/ Е.А. Андреева, Н.А. Хонина, Е.Н. Демченко, Е.Д. Гаврилова, Н.М. Пасман, В.А. Козлов, Е.Р. Черных // Бюллетень сибирской медицины. - 2019. –Т. 18. - № 2. - С. 16-23. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-16–23.
 4. Хонина Н.А. Интерлейкин-6 как возможный регулятор интрафолликулярных FOXP3+ регуляторных Т-клеток у женщин в цикле ЭКО/ Н.А. Хонина, **Е.А. Андреева**, М.А. Тихонова, Е.В. Баторов, А.А. Останин, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // Иммунология. - 2019. Т.40. - №2. - С. 30-38. DOI: 10.24411/0206- 4952-2019-12005.
 5. **Андреева Е.А.** Свободная ДНК и IL-8 в фолликулярной жидкости у женщин в цикле экстракорпорального оплодотворения/ Е.А. Андреева, Н.А. Хонина, Е.Н. Демченко, Е.Д. Гаврилова, А.А. Останин, Н.М. Пасман Е.Р. Черных // Гены & Клетки. – 2020. Т. XIV. - №2. - С. 96-100. DOI: 10.23868/202004017.

Все основные результаты, представленные на защиту, опубликованы в оригинальных статьях в рецензируемых изданиях. Основные экспериментальные результаты получены при непосредственном участии автора, статистическая обработка результатов выполнена автором лично. Представление результатов в виде публикаций выполнены в том числе соискателем лично.

На автореферат поступило 2 отзыва:

1. доктора биологических наук, заведующей лабораторией Иммунологии репродукции Института иммунологии и геномики человека Академии Наук Республики Узбекистан, **Мусаходжаевой Дилорам Абдуллаевны;**
2. доктора медицинских наук, доцента, ведущего научного сотрудника отдела аллергических и аутоиммунных заболеваний в педиатрии научно-исследовательского института акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовского государственного медицинского университета» МЗ РФ, **Левкович Марины Аркадьевны.**

Во всех отзывах отмечается высокая актуальность темы диссертационного исследования, научная и практическая значимость, высокий методический уровень, адекватный подход к достижению поставленной цели.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что **ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» МЗ РФ** является одним из ведущих научно-исследовательских институтов России, осуществляющий комплексное решение фундаментальных и практических проблем репродукции. В институте активно проводятся исследования Т-лимфоцитов при акушерских патологиях и патологиях развития плода, иммунного статуса у пациенток с бесплодием. Также, в институте активно разрабатываются новые методы диагностики, профилактики и лечения нарушений репродуктивного здоровья.

Выбор официального оппонента, доктора медицинских наук, **А.Н. Трунова**, обосновывается его работами, посвященными изучению роли иммунной системы при женском бесплодии и акушерских патологиях.

Выбор официального оппонента, доктора медицинских наук, **Г.Н. Чистяковой**, обосновывается ее работами, посвященными выявлению ранних лабораторных предикторов оценки нарушений репродуктивной функции.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Доказано, что в фолликулярной жидкости женщин выявляются различные субпопуляции FoxP3⁺ регуляторных клеток (CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁻FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), при этом более высокий уровень CD4⁻FoxP3⁺ ассоциирован с лучшим индексом оплодотворения, высоким качеством эмбрионов и вероятностью наступления беременности

Доказано, что в фолликулярной жидкости женщин выявляется свДНК, содержание которой прямо коррелирует с параметрами овариального резерва и обратно ассоциировано с качеством бластоцист и вероятностью наступления беременности.

Доказано, что женщины с низким качеством эмбрионов и отрицательным исходом ЭКО характеризуются более высоким уровнем IL-6 в фолликулярной жидкости, концентрация которого обратно коррелирует с содержанием CD4⁻FoxP3⁺ клеток.

Доказано, что в фолликулярной жидкости выявляются микровезикулы с различным фенотипом, при этом повышение содержания AnnV⁺CD206⁺ и AnnV⁺CD107a⁺ микровезикул ассоциировано с наступлением беременности.

Разработан подход к выявлению ранних предикторов наступления беременности с помощью оценки содержания свДНК, AnnV⁺CD206⁺MB и AnnV⁺CD107a⁺ MB в фолликулярной жидкости женщин. Показано, что уровень свДНК <34,7нг/мл (Sp 74,3%; Se 70,6%), AnnV⁺CD206⁺ - >9,6 MB/мкл (Sp 75,0%, Se 61,9%) и AnnV⁺CD107a⁺ >12,7 MB/мкл (Sp 62,9%, Se 62,9) позволяет прогнозировать наступление беременности в циклах ЭКО.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Впервые продемонстрировано, что повышенный уровень регуляторных клеток ассоциирован не только на вынашивание беременности, но и на ранние этапы эмбриогенеза. Впервые продемонстрировано, что в контроле над ранними этапами эмбриогенеза принимают участие не только CD4⁺FoxP3⁺, но и CD4⁻FoxP3⁺ -клетки. Так, выявлена сопряженность

высокого содержания FoxP3⁺ -клеток и формирования бластоцист высокого качества, имплантации и развития беременности. Показано, что низкое содержание CD4⁺FoxP3⁺ регуляторных клеток ассоциировано с высоким уровнем IL-6 в фолликулярной жидкости, что оказывает негативное влияние на blastogenesis.

Выявлено, что стимуляция гонадотропинами сопровождается появлением более высокого уровня свДНК в фолликулярной жидкости, превышающего таковой у женщин в естественном цикле. При этом выброс свДНК не обусловлен повышением уровня IL-8 и образованием нейтрофильных ловушек. Данные факторы являются независимыми, имеют различную направленность эффектов (позитивную для IL-8 и негативную для свДНК) и влияют на различные этапы оо-эмбриогенеза.

Обнаружено, что высокий уровень свДНК в фолликулярной жидкости можно рассматривать как неблагоприятный прогностический признак для наступления беременности, в то время как повышенный уровень микровезикул с фенотипом Ann⁺CD206⁺ и Ann⁺CD107a⁺ в фолликулярной жидкости женщин ассоциируется с высоким качеством бластоцист и эффективным циклом ЭКО.

Применительно к проблематике диссертации:

Результативно использован комплекс экспериментальных методик, включающих современные иммунологические и молекулярно-биологические методы: выделение FoxP3⁺ регуляторных клеток, микровезикул, цитокинов с помощью проточной цитометрии, флюориметрический метод оценки уровня свДНК.

Показано наличие субпопуляций FoxP3⁺ -регуляторных клеток в ФЖ женщин. При этом показано, что более высокое содержание CD4⁺FoxP3⁺ и CD4⁺FoxP3⁺ -клеток в ФЖ сопряжено с числом преовуляторных фолликул, формированием бластоцист лучшего качества и позитивными исходами ЭКО.

Получены новые данные о наличии в ФЖ женщин детектируемого уровня свДНК как в стимулированных, так и в естественных циклах. При этом показано, что уровень свДНК при стимулированной овуляции значительно выше, чем в естественных циклах.

Показано, что более высокое содержание свДНК в ФЖ ассоциировано с длительностью бесплодия, большим числом антральных фолликулов и высоким уровнем антимюллера гормона. При этом высокий уровень свДНК сопряжен с низким качеством бластоцист и отрицательным исходом ЭКО.

Расширены представления о роли микровезикул в репродуктивном процессе, в частности обнаружено более высокое содержание $\text{Ann}^+\text{CD107a}^+$, $\text{Ann}^+\text{CD14}^+$, $\text{Ann}^+\text{CD206}^+$ МВ в ФЖ женщин, у которых впоследствии наступала и прогрессировала беременность.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

выявление новых биомаркеров, характеризующих эффективность стимуляции суперовуляции в циклах ЭКО. Было показано, что эффективные циклы ЭКО ассоциированы с более высокими показателями – количества FoxP3^+ регуляторных клеток, уровня IL-8, а также содержания $\text{AnnV}^+\text{CD107a}^+$ и $\text{AnnV}^+\text{CD206}^+$ микровезикул в фолликулярной жидкости. В то же время высокий уровень свДНК и IL-6 ассоциирован с отрицательным исходом ЭКО. Определены пороги содержания свДНК (12,7 МВ/мкл), $\text{Ann}^+\text{CD107a}^+\text{МВ}$ ($>9,6$ МВ/мкл), которые можно рассматривать как прогностические критерии позитивных исходов ЭКО. Определение данных биомаркеров у женщин в стимулированных циклах в будущем позволит провести своевременную коррекцию терапии сопровождения и повысить эффективность ЭКО. Полученные данные используются при подготовке студентов НГУ по программе «Клиническая иммунология».

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты получены на сертифицированном оборудовании и с использованием сертифицированных реагентов, работа выполнена на высоком методическом уровне, достаточна по объему материала. Теория построена на доказанных и проверяемых фактах, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации. Идеи базируются на обобщении литературных данных, а также анализе результатов, полученных в репрезентативном количестве наблюдений. Достоверность результатов определяется методически правильно построенным ходом исследования, использованием современных и адекватных методик сбора и статистической обработки исходной информации. Выводы соответствуют поставленным задачам, основаны на фактических данных, вытекают из сути работы и отражают ее содержание.

Личный вклад соискателя состоит в: непосредственном участии в получении исходных данных и экспериментальной работе. Автором был проведен анализ имеющейся научной информации по теме исследования. Экспериментальная работа выполнена при непосредственном участии автора и включала сбор анамнеза женщин, сбор образцов фолликулярной жидкости, проведение эмбриологической части программы, а также анализ содержания регуляторных клеток, цитокинов и микровезикул методом проточной цитометрии, а уровень свДНК – флюориметрическим методом. Статистическая обработка и интерпретация экспериментальных данных проведена автором лично. Научные положения и выводы, сделанные в диссертационной работе, сформулированы автором. Подготовка основных публикаций, отражающих результаты диссертационного исследования, проведена лично автором или при непосредственном его участии.

Диссертационная работа Андреевой Евгении Александровны «Иммуноактивные факторы фолликулярной жидкости у женщин в программе экстракорпорального оплодотворения» по актуальности избранной темы, методическому уровню, поставленным задачам, новизне и значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов полностью

соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. №842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 01.10.2018 г. № 1168, с изменениями от 26.05.2020 г.).

На заседании 24 июня 2021 года диссертационный совет принял решение присудить Андреевой Е.А. ученую степень кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Заседание диссертационного совета Д 001.001.01 проходило в интерактивном удаленном режиме с очным присутствием - 12 человек и дистанционным - 5 человек из 20 человек, входящих в состав совета.

При проведении голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 8 докторов наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» (биологические науки), участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение учёной степени – 17, против присуждения учёной степени – 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель диссертационного
совета,
доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН



Козлов Владимир
Александрович

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук

Облеухова Ирина
Александровна

24 июня 2021 года