

Отзыв

на автореферат диссертации

МАКАРОВОЙ НАТАЛЬИ ПЕТРОВНЫ

«Морфологические и молекулярнобиологические особенности постовуляторных ооцитов и их роль в преимплантационном развитии эмбрионов человека», представленной к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология и

03.03.05 – Биология развития, эмбриология

Актуальность темы исследования. Проблема зачатия и вынашивания является основной в медицине репродукции, поскольку – по разным данным – бесплодие во всех странах мира выявляют почти у 30% супружеских пар. Принято считать, что одним из решений проблемы деторождения может быть использование вспомогательных репродуктивных технологий. Однако эффективное решение этой проблемы может быть основано только на использовании междисциплинарного подхода, который в настоящее время разработан далеко не полностью и нуждается в проведении дополнительных многопараметровых исследований в разных областях биологии развития, эмбриологии, клеточной биологии, цитологии, гистологии, медицине репродукции и клинической эмбриологии, что обуславливает высокую актуальность темы диссертационной работы Н.П.Макаровой.

Проблемы единой системы оценки форм патологии женских гамет, роли их генетических нарушений и полиморфизма в невозможности реализации зачатия, дифференциальной диагностики бесплодия, разработка новых комплексных подходов к его терапии – все это стало предметом исследования и обсуждения в данном исследовании.

Целью работы является установление закономерностей влияния цитофизиологических и молекулярно-биологических особенностей постовуляторных ооцитов на преимплантационное развитие эмбрионов

человека. Круг задач, решаемых в работе, включает логично иерархически выстроенный большой комплекс разнохарактерных исследований от анализа распространенности различных типов морфологических изменений женских половых клеток человека и выявления наиболее значимых морфологических нарушений ооцитов, негативно влияющих на формирование зигот человека в условиях *in vitro*, характеристики молекулярно-биологических особенностей эмбрионов человека в условиях культивирования *in vitro* в зависимости от типа морфологических нарушений ооцитов, из которых данные эмбрионы были получены, до установления связи между повреждениями внутриклеточных структур и развитием эмбрионов, включая оценку содержания митохондриальной ДНК в ооцитах с различными типами морфологических изменений и анализ уровней экспрессии генов, отвечающих за процесс хетчинга, в клетках трофэктодермы при культивировании эмбрионов человека и анализ связи обнаруженных феноменов с эффективностью технологии частичного и полного удаления зоны пеллюцида у эмбрионов с различными морфологическими особенностями. Такой уникально широкий и, вместе с тем, четко детализированный с позиций цели исследования взгляд на проблему создает редко встречающуюся в одной работе возможность проведения высокоэффективного исследования.

В работе использован оригинальный комплекс методических приемов от световой и электронной микроскопии до современных молекулярно-генетических исследований, способствующий четкому и последовательному решению поставленных задач.

В диссертации проведена систематизация данных о значимости структурных и функциональных изменений гамет для развития эмбриона от стадии зиготы до процесса высвобождения бластоцисты из блестящей оболочки, что доказывает необходимость морфологической оценки ооцитов для прогнозирования успешного развития эмбриона и наступления беременности. Кроме того, обоснованы критерии оценки морфофункционального состояния постовуляторных ооцитов, что создает

научную основу для оптимизации методов экстракорпорального оплодотворения, применяемых для лечения бесплодия у человека, а также впервые на эмбрионах человека изучена экспрессия мРНК ряда генов, участвующих в процессе спонтанного хетчинга и установлена взаимосвязь уровня их экспрессии с цитофизиологическими особенностями клеток трофобласта и эмбриобласта бластоцист. Получены уникальные данные по применению метода полного удаления зоны пеллюцида, который позволяет увеличить частоту имплантации эмбрионов человека на стадии бластоцисты с качеством трофобласта класса В и ниже.

К наиболее значимым результатам следует отнести доказательство того, что:

- морфологические аномалии женских гамет, выявляемые методами световой микроскопии, сопровождаются снижением числа копий митохондриальной ДНК, дезорганизацией гладкого эндоплазматического ретикулума и нарушением расхождения хромосом в ядрах бластомеров эмбриона;

- морфофункциональное состояние ооцита определяет процессы хетчинга, имплантации бластоцисты и развитие беременности.

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе эмбриологов Отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ. Стандартные операционные процедуры работы с половыми клетками и эмбрионами человека в рамках программ лечения бесплодия с помощью экстракорпорального оплодотворения составлены с учетом результатов данного исследования. Материалы, представленные к защите, используются в учебном процессе на кафедре эмбриологии МГУ имени М.В. Ломоносова в цикле «Вспомогательные репродуктивные технологии: клиническая эмбриология» и на базе Научно-образовательного центра вспомогательных репродуктивных технологий имени Фредерика Паулсена ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ в модуле

«Экстракорпоральное оплодотворение: эмбриологический этап». Разработанные автором методы работы с субфертильными гаметам успешно внедрены и применяются в клинической практике при проведении эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий.

По результатам исследования разработаны практические рекомендации по использованию предлагаемых критериев оценки ооцитов и созданию условий для их подготовки к участию в оплодотворении *in vitro*.

Сформулированные выводы полностью соответствуют результатам исследования. Большую практическую ценность представляют практические рекомендации по диагностике и дальнейшему ведению беременности.

Диссертационное исследование выполнено на высоком методическом уровне с использованием большого комплекса современных методов. Достаточный объем материала, и его корректная обработка позволили автору в полной мере решить поставленные задачи.

Обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Основные результаты работы достаточно полно освещены в 24 печатных работах, из них 12 – в отечественных (рекомендованных ВАК) и высокорейтинговых зарубежных журналах, таких как *Gynecological Endocrinology* и *Zygote*.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет.

Диссертационная работа Натальи Петровны Макаровой «Морфологические и молекулярнобиологические особенности постовуляторных ооцитов и их роль в преимплантационном развитии эмбрионов человека» является законченным оригинальным исследованием, обладает существенной научной новизной и большой практической значимостью для решения весьма актуальной в мировой исследовательской и медицинской практике задачи совершенствования методологии и методов экстракорпорального оплодотворения с целью решения проблем бесплодия.

Работа отвечает требованиям п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 г. Москвы «О порядке присуждения учёных степеней», в редакции от 01.10.2018), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Наталья Петровна Макарова заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология и 03.03.05 – Биология развития, эмбриология

Зав. лабораторией генетической токсикологии
с группой цитогистологии ФГБУ «Центр
стратегического планирования и
управления медико-биологическими рисками» МЗ РФ,
д.б.н.  Ингель Фаина Исааковна

Адрес
Москва 119121, Ул. Погодинская 10 стр1
Тел.: 8-499-246-4813;
e-mail: fainaingel@mail.ru

Подпись руки д.б.н. Ингель Фаины Исааковны заверяю
Ученый секретарь ФГБУ «ЦСП» Минздрава России,
к.б.н. Мария Александровна Водянова
22 апреля 2019 года 

ОТЗЫВ

На автореферат диссертации Макаровой Натальи Петровны

«Морфологические и молекулярно-биологические особенности постовуляторных ооцитов и их роль в преимплантационном развитии эмбрионов человека»

представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология; 03.03.05 – биология развития, эмбриология

Актуальность проблемы

Диссертационная работа Н.П. Макаровой касается важной и интересной проблемы, которая связана с все более широкой востребованностью и применением методов ЭКО. Известно, что технологии ЭКО применяются, как правило, в тех случаях, когда есть физиологические проблемы репродуктивного характера как минимум у одного из будущих родителей – это возраст, врожденные или приобретенные заболевания, влияние образа жизни и экологических факторов, и многое другое, что, возможно, мы даже пока не можем оценить. Вместе с тем, по очевидным причинам, ооциты человека оставались, и к сожалению, остаются малоизученными клетками вследствие недоступности этого материала для регулярных и полноценных исследований. Поэтому актуальность работы, которая посвящена оценке цитофизиологического состояния женских половых клеток и влиянию на постимплантационное развитие эмбрионов, является очевидной. Сразу хотелось бы отметить тот факт, что работа выполнена на материале человека с соблюдением всех международных правил и этических стандартов, что безусловно, ставит ее в один ряд с исследованиями мирового уровня.

Научная новизна

Автор представленного исследования провела комплексную оценку влияния цитоплазматических и экстрацитоплазматических нарушений ооцитов человека на раннее доимплантационное развитие эмбриона. Впервые было исследовано число копий мтДНК в ооцитах с различными типами морфологических изменений, представлены уникальные данные о взаимосвязи между числом копий мтДНК и аномалиями зрелой женской половой клетки, прослежена взаимосвязь частоты анеуплоидии в ядрах бластомеров эмбрионов и морфологических изменений ооцитов, из которых данные эмбрионы были получены. Установлены ультраструктурные изменения в цитоплазме зрелых постовуляторных ооцитов, которые следует учитывать

при экстракорпоральном оплодотворении и культивировании эмбрионов человека. Кроме этого, впервые на эмбрионах человека изучена экспрессия мРНК генов, участвующих в процессе спонтанного хетчинга (ген катепсина L2, экспрессирующийся в клетках трофобласта и эмбриобласта – *CTSL2*; ген семейства транскрипционных факторов, участвующий в бластуляции – *GATA3* и β -субъединица хорионического гонадотропина – *CGB*), и установлена взаимосвязь уровня их экспрессии с цитофизиологическими особенностями клеток трофобласта и эмбриобласта бластоцист. Эти данные могут быть использованы для оценки качества и жизнеспособности постовуляторных ооцитов с целью прогнозирования имплантационного потенциала полученного эмбриона.

Теоретическая и практическая значимость

В работе было проведено последовательное и детальное изучение параметров оплодотворения и раннего эмбриогенеза ооцитов с определенными морфологическими нарушениями; определение числа копий митохондриальной ДНК в ооцитах с различными морфологическими аномалиями; оценка анеуплоидии эмбрионов, полученных из ооцитов с выявленными морфологическими нарушениями; электронно-микроскопическое изучение ооцитов с нарушением морфологии цитоплазмы; влияния морфологических особенностей ооцитов на процесс выхода эмбрионов из блестящей оболочки в условиях *in vitro*; молекулярно-генетических маркеров разрыва блестящей оболочки и качества эмбрионов; связи между наличием блестящей оболочкой ооцита и имплантационным потенциалом бластоцисты.

Исходя из полученных данных, в работе четко обоснована необходимость и значимость морфологической оценки женских гамет для успешного развития эмбриона человека в доимплантационном периоде. Показано, что цитоплазматические типы нарушений женских половых клеток следует учитывать на всех этапах доимплантационного развития эмбриона для увеличения частоты развития беременности в программах лечения бесплодия методами экстракорпорального оплодотворения.

Автореферат в полном объеме отражает результаты исследования. Выводы также отражают суть работы, хотя их можно было бы немного сократить, и особо хотелось бы отметить лаконичное и емкое заключение, которое обобщает полученные данные. По теме диссертации опубликовано 24 работы, 12 из которых - статьи в журналах входящих в перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание

ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук. Материалы диссертации доложены на всероссийских и международных конференциях.

По тексту автореферата имеется ряд замечаний, которые хотелось бы отметить:

- 1) В тексте есть фраза: «Также на ультраструктурном уровне были обнаружены элементы экзоцитоза» - из иллюстративного материала, представленного в автореферате, не совсем ясно, что имеется в виду.
- 2) Также автор пишет: «Наблюдаемые ультраструктурные деформации цитоплазмы ооцита в области гранулярности могут отражать деструктивные процессы, связанные с начавшимся апоптозом клетки» - также непонятно, что имеется в виду.
- 3) Еще один вопрос касается интерпретации изображений, демонстрирующих процессы протекающие на ультраструктурном уровне. Автор описывает изменения состояния митохондрий, их расположения вблизи и даже в контакте с элементами гладкого ЭПР, но не дает объяснений наблюдаемым картинам. Вместе с тем, эти изображения демонстрируют морфологические проявления митофагии – селективной аутофагии мелких и фрагментированных митохондрий с конденсированным матриксом, и вероятно, не функционирующих. На фотографиях отчетливо видны разные стадии формирования фагофора вокруг отдельных и собранных в кластеры митохондрий, аутофагосомы с митохондриями внутри, и кроме этого, есть признаки микроаутофагии – поглощения митохондрий лизосомами. Из этого следует, что нарушенные или поврежденные митохондрии могут подвергаться деградации с помощью митотофагии, и эти процессы следует изучать в дальнейшем для того, чтобы установить их роль к контроле «качества» ооцитов.

Хотелось бы подчеркнуть, что приведенные выше замечания не носят принципиального характера не влияют качество проведенного исследования и достоверность полученных данных.

Таким образом, диссертационная работа Н.П. Макаровой «Морфологические и молекулярно-биологические особенности постовуляторных ооцитов и их роль в преимплантационном развитии эмбрионов человека» представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология; 03.03.05 – биология развития, эмбриология, является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны практические и теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как крупное достижение в области комплексной

оценки влияния цитоплазматических и экстрацитоплазматических форм нарушений ооцитов человека на раннее доимплантационное развитие эмбриона.

По актуальности, новизне, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертация Натальи Петровны Макаровой соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, в ред. Постановления Правительства РФ от 24.04.2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ей ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология; 03.03.05 – биология развития, эмбриология.

Дата

Профессор кафедры клеточной биологии
и гистологии Биологического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова

119234 Москва Ленинские горы 1 стр. 12

kinggobi@yandex.ru

+7 495 939 4567



ПОДПИСАТЕЛЬ
ЗАВЕРЯЮ

Документовед биологического факультета МГУ

Е.А. Смирнова

Данные об авторе:

Смирнова Елена Александровна - доктор биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология», профессор кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,

Эл. почта: kinggobi@yandex.ru

Телефон: 8 (495) 939-4567

Почтовый адрес: Адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ.

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Натальи Петровны Макаровой «Морфологические и молекулярно-биологические особенности постовуляторных ооцитов и их роль в преимплантационном развитии эмбрионов человека», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология и 03.03.05 – Биология развития, эмбриология

Актуальность работы. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) у человека находят все большее применение в мире. С одной стороны это обусловлено ростом случаев бесплодия женщин в результате перенесенных заболеваний, под воздействием неблагоприятных условий внешней среды, стрессовых состояний. С другой стороны, ВРТ позволяют отсрочить рождение ребенка, сохранить возможность иметь детей после проведения лечебных процедур при онкологических заболеваниях. Кроме того, благодаря фундаментальным разработкам и совершенствованию технологии составляющих этапов эффективность ВРТ в последние годы существенно возросла. В конце естественного полового цикла у женщины овулирует один доминантный фолликул и выделяется одна зрелая яйцеклетка. В клиники ЭКО обращаются женщины, главным образом, с отклонениями в воспроизводительной функции, в том числе связанными с нарушениями в развитии и созревании яйцеклеток. Кроме того, для получения достаточного количества зрелых яйцеклеток в одном цикле по программе ВРТ принята технология вызывания суперовуляции, которая может внести определенное влияние в процесс дозревания ооцитов. Яйцеклетки могут быть оценены по морфологическим признакам неинвазивным методом при помощи световой микроскопии. Хорошего качества ооциты на стадии М II характеризуются светлой равномерно гранулированной цитоплазмой, небольшим перивителлиновым пространством и прозрачной блестящей оболочкой. Цитоплазматические отклонения включают появление разного типа и степени цитоплазматических грануляций, изменения цвета, появление оптически плотных телец, скопления гладкого эндоплазматического ретикулома, вакуолизацию ооплазмы. К экстрацитоплазматическим отклонениям относятся изменение формы ооцита, цвета, формы и толщины блестящей оболочки, величины и формы полярного тельца, увеличение перивителлинового пространства и присутствие дебриса (Balaban and Urman, 2006). Однако оценка качества зрелых яйцеклеток в зависимости от выявленных морфологических отклонений является очень трудной задачей, имеющиеся в научной литературе данные разрозненны и зачастую противоречивы. Автором была предпринята оценка молекулярно-биологического статуса яйцеклеток с различными типами морфологических изменений с целью прогнозирования потенциала к последующему преимплантационному развитию полученных из них эмбрионов. Поэтому диссертационная работа Н.П. Макаровой является, безусловно, актуальной.

Объектом исследований являлись яйцеклетки, полученные в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения. При помощи световой микроскопии были морфологически оценены свыше 5 тысяч яйцеклеток человека на стадии М II. На основе полученных данных была дана оценка распространенности различных типов морфологических изменений зрелых яйцеклеток в обследованной популяции женщин. В качестве одного из критериев молекулярно-биологического статуса яйцеклеток с различными типами морфологических изменений было проведено измерение содержания

митохондриальной ДНК в их составе. Яйцеклетки с признаками центральной гранулярности цитоплазмы, являющейся самой тяжелой формой морфологических отклонений, были изучены с помощью электронной микроскопии.

Была исследована взаимосвязь между различными типами морфологических изменений яйцеклеток с уровнем нормального оплодотворения, молекулярно-биологическими особенностями полученных из них на третьи сутки культивирования эмбрионов, частотой анеуплоидии биопсированных бластомеров трехдневных эмбрионов, частота выхода бластоцист из блестящей оболочки в условиях культивирования *in vitro*. Был проанализирован уровень хетчинга бластоцист в условиях *in vitro* и экспрессия генов CTSL2, GATA3 и CGB в зависимости от качества эмбрионов и качества эмбриобласта и трофобласта.

Работа выполнена с использованием современных методов исследований в области эмбриологии, цитологии, молекулярной биологии, клеточных технологий. Эксперименты проведены на большом материале, данные экспериментов обработаны статистически. Выводы следуют из представленного в автореферате экспериментального материала. Таким образом, изложенные в автореферате научные положения и выводы высоко достоверны и хорошо обоснованы.

Научная новизна диссертационной работы. Было показано, что частота нормального оплодотворения в группе морфологически нормальных ооцитов составляла 94%, тогда как в группе с цитоплазматическими нарушениями этот показатель оказался самым низким и составил 79%. На третьи сутки культивирования при морфологической оценке наибольшее число качественных эмбрионов также было получено в группе нормальных ооцитов. При проведении цитогенетического анализа отдельных бластомеров, полученных путем биопсии на третьи сутки развития эмбрионов, большая часть эмбрионов, полученных из морфологически нормальных ооцитов (69,8%) и ооцитов, имевших экстрацитоплазматические отклонения (69,0%), была признана эуплоидными. Напротив, при наличии у ооцитов морфологических цитоплазматических нарушений, 68,4% исследованных бластомеров были анеуплоидными. На уровень спонтанного вылупления бластицисты из блестящей оболочки *in vitro* решающее влияние оказывает качество трофобласта. Было показано, что частичное или полное удаление блестящей оболочки у эмбрионов с качеством трофэктодермы класса В и ниже способствует их имплантации в полости матки.

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в систематизации данных о влиянии морфологических отклонений яйцеклеток на уровень нормального оплодотворения и последующее преимплантационное развитие полученных эмбрионов.

По диссертационной работе имеются некоторые вопросы и замечания:

- Выражения «оплодотворение ... в центральной части» ооплазмы, «оплодотворение в неповрежденной части цитоплазмы», возможно, не самые удачные.
- Количественная оценка митохондриальной ДНК была проведена на неоплодотворившихся ооцитах через 40 часов после проведения оплодотворения. Однако, неоплодотворившиеся ооциты, вероятно, не могут быть признаны полноправными представителями групп ооцитов, сформированных по морфологическим признакам в день их аспирирования. Более того, в течение 40 часов у неоплодотворившихся ооцитов, в отсутствие нормальных процессов эмбрионального развития, могли быть запущены внутриклеточные механизмы, ведущие к деградации компонентов и структур клетки, в

том числе и mtDNA (Babayev and Seli, 2015). Поэтому вызывает сомнение значимость проведенного теста.

– В автореферате не указано, каким способом проводили полное снятие блестящей оболочки у бластоцист.

– Стр. 35. «Показано, что морфофункциональное состояние ооцита определяет процессы хэтчинга, имплантации бластоцисты и развитие беременности». Однако в тексте автореферата данные по имплантации бластоцист и развитию беременности в связи с морфологическими особенностями исходных яйцеклеток не приведены.

Отмеченные замечания не принципиальны и не умаляют значимости диссертационной работы.

Апробация работы и публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 12 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также 12 публикаций по материалам, доложенным на конгрессах и конференциях.

Заключение

На основании изложенного, считаю, что диссертационная работа Натальи Петровны Макаровой «Морфологические и молекулярно-биологические особенности постовуляторных ооцитов и их роль в преимплантационном развитии эмбрионов человека», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология и 03.03.05 – Биология развития, эмбриология, является завершенным научным трудом, в котором содержатся новые научные сведения, имеющие существенное научно-практическое значение. По актуальности, объему, научному и методическому уровню проведенных исследований, по новизне и практической значимости полученных результатов диссертация соответствует требованиям, предъявляемым пп. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, в ред. Постановления Правительства РФ от 28.08.2017 г. № 1024) к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология и 03.03.05 – Биология развития, эмбриология.

Д.б.н., заведующий отделом экспериментальной эмбриологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий

ФГБНУ ЦЭЭРБ 127422 г. Москва, ул. Костякова, 12, стр. 4

Г.П. Маленко

Подпись Г.П. Маленко заверяю:

Врио директора ФГБНУ ЦЭЭРБ
к.б.н., доцент



С.Н. Ковальчук

23.04.2019.

