

ОТЗЫВ

официального оппонента

профессора кафедры гистологии и эмбриологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктора медицинских наук, доцента Шурыгиной Оксаны Викторовны по
диссертации Макаровой Натальи Петровны на тему:

**«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 выполненного исследования

Диссертация Н.П. Макаровой посвящена изучению морфологических и молекулярно-биологических особенностей постовуляторных ооцитов и их роли в преимплантационном развитии эмбрионов человека. Тема выбрана автором не случайно и продиктована рядом важнейших не только теоретических, но и практических предпосылок:

а) успех вспомогательных репродуктивных технологий, а именно рождение здоровых детей, определяется, прежде всего, качеством ооцитов, которые на 70-80% определяют дальнейшее развитие эмбриона. Особенно важным в этом аспекте представляется анализ причин возникающих аномалий и их прогностическое значение, что весьма актуально в практической медицине.

б) ооциты человека являются привлекательным и весьма ценным объектом для исследования. Многообразие аномалий цитоплазматического и экстрацитоплазматического характера позволяет на одном и том же объекте анализировать и сопоставить динамику развития будущих эмбрионов, их генетический статус и степень спонтанного хетчинга.

Вышеперечисленные соображения в полной мере позволяют заключить, что диссертационное исследование Н.П. Макаровой является актуальным исследованием и может быть полезным и востребованным шагом в проблеме изучения качества ооцитов и их влияния на ранний эмбриогенез человека.

Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность

Автор диссертации, Н.П. Макарова, методологически правильно организовала свое исследование. Подробному ультраструктурному анализу ооцитов, генетическому исследованию эмбрионов предшествует морфологическое исследование ооцитов. Впервые определена структура аномалий ооцитов в популяции российских женщин. Автор диссертации детально проанализировал морфологический статус ооцитов и его взаимосвязь с показателями раннего развития — оплодотворения и дробления. Новые данные по определению числа копий митохондриальной ДНК в ооцитах с аномалиями подтверждают гипотезу о нарушении митохондриального аппарата в них. В диссертации показана четкая взаимосвязь между качеством ооцитов и уровнем анеуплоидности эмбрионов. Впервые приведены сведения о повышенной экспрессии мРНК генов *CTSL2*, *GATA3*, *CGB* в группе бластоцист с эффективным хетчингом. Автором раскрыто важное значение проведения вспомогательного хетчинга у бластоцист с трофэктодермой класса В и ниже в процессе имплантации.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Общий объем исследованного материала, использование комплекса современных методов морфологического анализа, грамотное использование соответствующих методов статистического исследования позволяет утверждать, что научные положения, выводы и рекомендации, изложенные в диссертации Н.П. Макаровой, достоверны и заслуживают доверия. Диссертационная работа имеет качественные иллюстрации, информативные таблицы и диаграммы, которые дополняют текст исследования, делая полученные результаты наглядными и доступными для понимания.

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.

Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования

Выявленные в диссертационном исследовании фундаментальные закономерности развития эмбрионов человека в условиях *in vitro* в зависимости от морфологического статуса женских половых клеток вносят существенный вклад автора в понимание цитофизиологии ооцитов и ее роли в раннем эмбриогенезе человека.

Полученные в диссертации Макаровой Н.П. результаты можно использовать как базу для преподавания на кафедрах гистологии и эмбриологии раздела по эмбриологии человека, а также обучения в рамках циклов повышения квалификации по клинической эмбриологии. Приведенные данные по морфологической оценке ооцитов следует учитывать в практике эмбриологических лабораторий для выявления и фиксации данных ооцитов с аномалиями, определения тактики их ведения на эмбриологическом этапе, возможного расширения показаний для проведения генетического тестирования, проведения процедуры вспомогательного хетчинга.

Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя, включающего 43 отечественных и 350 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 23 таблицами и 71 рисунками.

Анализ диссертации по главам

Диссертация написана в традиционном стиле, привычно структурирована. Введение имеет аргументированные цель и задачи и содержит все формальные моменты. Представленный в диссертации литературный обзор дает полное

теоретическое представление по теме диссертации. Автору удалось проследить основные тенденции исследуемой проблемы с позиции фундаментальных основ.

В главе «Материалы и методы» подробно и последовательно описаны все применяемые методы исследования в диссертационной работе.

Глава «Собственные данные» отражает решение поставленных задач и состоит из 7 подразделов.

В главе 3.1 автор последовательно описывает морфологические проявления аномалий ооцитов человека, их распределение в структуре популяции, систематизирует их на группы, показывает связь с результатами оплодотворения и дробления. Здесь же автором приведены корреляции между структурой ооцитов и данными аномального оплодотворения, дегенерации. В этой же главе приведены сведения, полученные после применения модифицированной методики ИКСИ ооцитов с цитоплазматическими нарушениями, достоверно снижающей уровень дегенерации клеток. Описанная методика может быть рекомендована в практической работе для профилактики снижения одного из ключевых показателей деятельности эмбриологической лаборатории – уровня дегенерации клеток после ИКСИ. Многочисленные таблицы понятны и информативны.

Глава 3.2 посвящена проверке выдвинутой гипотезы о нарушении митохондриального аппарата в ооцитах с морфологическими аномалиями как причины их неполного цитоплазматического созревания. Для чего было выполнено определение числа копий мтДНК ооцитов. Статистический анализ полученных данных с применением соответствующих методов показал статистически значимое различие ооцитов с нормальной морфологией и групп с цитоплазматическими и экстрацитоплазматическими аномалиями.

Глава 3.3 демонстрирует корреляцию генетического статуса эмбрионов с морфологическими аномалиями. Генетический скрининг на 13, 18, 21, X, Y хромосомы проведен классическим FISH методом на дробящихся эмбрионах. Автор приводит данные, свидетельствующие о наиболее высоком уровне

анеуплоидных эмбрионов в группе ооцитов с цитоплазматическими аномалиями, наибольший удельный вес принадлежит ооцитам с агрегатами эндоплазматической сети и центральной гранулярностью.

Глава 3.4 приводит собственные данные по электронно-микроскопическому исследованию ооцитов. Несмотря на то, что исследование проведено на небольшой группе материала и сосредоточено только на одном виде цитоплазматических аномалий, а именно центральной гранулярности, автору удалось продемонстрировать ультраструктурные изменения клеток. Следует подчеркнуть хорошее качество иллюстраций, приведенных в данной главе, несмотря на трудность выбранного объекта для исследователя.

В главе 3.5 автор описывает влияние морфологических особенностей ооцитов на процесс выхода эмбрионов из блестящей оболочки. Цитоплазматические аномалии и сочетанная патология ооцитов достоверно не оказывают влияния на спонтанный хетчинг бластоцист, в то время как у эмбрионов с экстрацитоплазматическими нарушениями ооцитов эффективность спонтанного хетчинга увеличена в 5,6 раза. Глубокий статистический анализ позволили автору показать и связь спонтанного хетчинга с качеством бластоцист с учетом выраженности внутриклеточной массы и трофэктодермы.

Глава 3.6, небольшая по своему объему, дает представление о молекулярно-генетических маркерах разрыва блестящей оболочки и качестве эмбрионов. Обнаружена более высокая экспрессия мРНК генов *CTSL2*, *GATA3*, *CGB* в группе бластоцист с эффективным хетчингом. Степень экспансии и качество бластоцист коррелирует с выявленной высокой экспрессией *CTSL2*, *GATA3*.

Глава 3.7 представляет собой комплекс данных по частоте имплантации в зависимости от степени развития трофэктодермы с применением процедуры вспомогательного хетчинга и без него. Частичное и полное удаление блестящей оболочки дает достоверно более высокий показатель имплантации у эмбрионов с трофэктодермой класса В и ниже.

Глава по обсуждению полученных данных является подробным

обсуждением полученных результатов и закономерностей, выявленных в ходе исследования. Заключение логично подводит к четким и структурированным выводам диссертации, которые в свою очередь полностью соответствуют поставленным задачам. Обширный список литературных источников свидетельствует о полноте понимания проблемы автором.

Данные диссертации используются в практической работе Отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ, а также в учебном процессе на кафедре эмбриологии МГУ им. М.В. Ломоносова в цикле «Вспомогательные репродуктивных технологии: клиническая эмбриология» и на базе Научно-образовательного центра вспомогательных репродуктивных технологий им. Фредерика Паулсена ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ в модуле «Экстракорпоральное оплодотворение: эмбриологический этап».

Принципиальных возражений по существу представленной работы. В отзыве могут быть отмечены следующие замечания и пожелания:

1. В главе 3.1 следует более аккуратно относиться к термину «нарушение» оплодотворения для ооцитов с 1PN (таблица №6). Объединение таких зигот в одну группу с аномальным оплодотворением (3PN и более) может привести к возникновению ошибочного представления об эуплоидности и тактике ведения пациентов на эмбриологическом этапе программ ВРТ. Ооциты с 1PN, полученные после ИКСИ, имеют подтвержденную степень диплоидности и только 7-14% имеют генетические аномалии в последующих эмбрионах.
2. В главе 3.3, посвященной корреляции качества ооцитов и генетического статуса эмбрионов 3-х суток развития, целесообразно в плане дальнейших исследований провести сравнение и с уровнем ploидности бластоцист, с учетом последних данных о высокой степени мозаицизма дробящихся эмбрионов и применением методов полногеномного секвенирования.
3. Данные, приведенные по патологии ультраструктурной организации ооцитов, следовало дополнить обзорными микрофотографиями, в том числе и для

демонстрации проявлений апоптотической гибели клеток (о чем рассуждает автор в своей работе).

В целом высказанные замечания не ставят под сомнения ни использованные методы, ни полученные с их помощью новые научные факты и поэтому не могут влиять на общее положительное впечатление от рецензируемой работы. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

По теме диссертации опубликовано 24 печатных работы, 12 — 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, 12 — материалы российских и зарубежных конференций.

Заключение

Таким образом, диссертация Макаровой Натальи Петровны является завершенной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований обоснованы морфологические и молекулярно-биологические особенности постовуляторных ооцитов и их роли в преимплантационном развитии эмбрионов человека, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в области изучения цитофизиологии и клеточной биологии ооцитов человека.

Результаты проведенных исследований вносят существенный вклад в понимание закономерностей и особенностей преимплантационного развития эмбрионов человека, что может составить основу для разработки новых эмбриологических технологий *in vitro*.

Полученные результаты имеют большое значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии, биологии развития, эмбриологии.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Макаровой Натальи Петровны 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), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, 03.03.05 – биология развития, эмбриология.

Официальный оппонент

Профессор кафедры гистологии и эмбриологии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук (специальность
03.03.04 – клеточная биология,
цитология, гистология)
доцент

Шурыгина Оксана Викторовна

443001 г. Самара, ул. Чапаевская, 227,
(846)3333684

oks-shurygina@yandex.ru

«26 апреля» 2019 г.

Подпись Шурыгиной О.В. заверяю

