

**Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии
и репродуктологии имени Д.О. Отта»
(ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»)**

Менделеевская линия, д. 3
Санкт-Петербург, 199034
тел.: (812) 328-14-02, факс: (812) 328-23-61
e-mail: iagmail@ott.ru
ОКПО 01897162, ОГРН 1027800521704
ИНН/КПП 7801020890/780101001



12.04

2019 г.

**Утверждаю
Врио Директора
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»
член-корр. РАН д.м.н. профессор**

И.Ю.Коган

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности 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» и 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология»

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационное исследование Макаровой Натальи Петровны посвящено изучению морфологических особенностей постовуляторных женских половых клеток на процесс развития эмбриона человека в условиях *in vitro*. Актуальность данной темы не вызывает сомнений, так как с внедрением в широкую медицинскую практику методов лечения бесплодия с помощью экстракорпорального оплодотворения произошли существенные изменения в понимании биологических процессов, происходящих в половых клетках и эмбрионах человека. Стала понятна невозможность истинной экстраполяции данных по культивированию эмбрионов, например, крупного рогатого скота

или мышей, на половые клетки и эмбрионы человека. При этом сперматозоиды человека достаточно хорошо изучены, а вот женские половые клетки в силу недоступности материала долгое время оставались малоизученными, данные об их структурных и молекулярно-биологических изменениях малочисленны. Работа, представленная к защите, касается всего этапа культивирования эмбрионов человека – от момента оплодотворения до стадии бластоцисты 5-6 суток развития. На каждом этапе автор анализирует влияние морфологических особенностей ооцитов на развитие эмбрионов человека, что является важной задачей современной клеточной биологии и эмбриологии.

Изучение женских и мужских гамет и эмбрионов человека связано с перспективой оптимизации и улучшения исходов программ экстракорпорального оплодотворения, рождения большего числа здоровых детей.

Связь темы диссертации с планами отраслей медицинской науки

Тема диссертационного исследования Макаровой Натальи Петровны выполнена в соответствии государственным заданием №AAAA-A18-118053190022-8 на тему «Совершенствование программ вспомогательных репродуктивных технологий при применении инновационных технологических методик (эмбриологических, клеточных, молекулярно-генетических)».

Новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

В работе на достаточном биологическом материале половых клеток и эмбрионов человека установлено, что морффункциональные изменения постовуляторных ооцитов влияют на процесс оплодотворения, дробление и формирование бластоцисты при культивировании *in vitro*. Впервые показано, что нарушения цитоплазматических структур, наблюдаемые на световом уровне, связаны как со структурными нарушениями органелл (что показано на электронно-микроскопическом уровне), так и молекулярно-генетическими сдвигами (нарушения пloidности эмбрионов и числа копий митохондриальной ДНК).

Автором впервые проведена сравнительная оценка эмбриологических показателей развития эмбриона человека в условиях *in vitro* при оплодотворении женских половых клеток с различными морфологическими изменениями, прослежена динамика развития эмбрионов до 5-6 суток культивирования, до процесса хетчинга. Было выявлено, что морфологические изменения экстрацитоплазматических структур (зоны пеллюцида, перивителлинового пространства, первого полярного тельца) являются незначимыми при оплодотворении и дальнейшем культивировании, однако влияют на процесс выхода эмбриона из блестящей оболочки. Данный результат позволяет еще на этапе оплодотворения прогнозировать целесообразность использования методов вспомогательного хетчинга (целенаправленное надсечение или полное удаление зоны пеллюцида). Что касается изменений цитоплазмы, регистрируемых на световом уровне в день оплодотворения (появление вакуолей, гранулярности, рефрактерных телец), то такие изменения требуют проведения генетической диагностики эмбрионов и соответствующего консультирования пациентов для снижения риска рождения детей с хромосомными аномалиями.

Результаты, полученные в диссертационном исследовании Макаровой Натальи Петровны, имеют важное медико-социальное значение, так как изучение фундаментальных основ клеточной биологии женской половой клетки несет за собой оптимизацию таких важных медицинских технологий как лечение бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения у человека.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационное исследование основано на изучении большого числа постовуляторных женских половых клеток и эмбрионов, полученных при их оплодотворении. При этом все исследования, описанные в диссертации, проведены с соблюдением международных этико-правовых норм обращения с эмбрионами человека [Конвенция Совета Европы о защите прав человека и достоинства человеческого существа при использовании достижений биологии и медицины, 1997].

Достоверность и обоснованность полученных в диссертационном исследовании результатов обеспечивается использованием комплекса современных молекулярных, морфологических и генетических методов. Методом FISH была изучена анеуплоидия в бластомерах развивающихся эмбрионов, которые были получены оплодотворением ооцитов с различными морфологическими изменениями. Данные впервые получены на биологическом материале человека и позволяют использовать их при консультировании пациентов в программах экстракорпорального оплодотворения, а также вносят существенный вклад в понимание фундаментальных процессов делений дробления эмбрионов человека, причин появления анеуплоидии на этой стадии развития.

Анализ генной экспрессии методом ПЦР в бластоцистах человека также позволил автору получить сведения о влиянии работы некоторых генов на процесс освобождения бластоцисты из блестящей оболочки. Также метод ПЦР позволил получить уникальный материал о количественном содержании митохондриальной ДНК в единичных ооцитах, что имеет связь с изменениями морфологии и влияет на процесс дальнейшего развития эмбриона человека до стадии бластоцисты.

На каждом этапе изучения женских постовуляторных половых клеток автором построена модель исследования с достаточным числом наблюдений, что позволило получить статистически достоверные данные. Выбранные методы статистической обработки данных являются релевантными и обеспечивают должный уровень значимости результатов на каждом этапе работы.

Одним из несомненных достоинств представленной работы является богатый иллюстративный материал женских половых клеток с различными типами морфологических изменений, а также зигот и эмбрионов на разных стадиях доимплантационного развития.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Полученные автором данные по влиянию морфологических и морффункциональным изменениям постовуляторных ооцитов человека на развитие эмбриона от стадии зиготы до процесса хетчинга бластоцисты

являются фундаментальными, позволяют раскрыть закономерности развития эмбрионов человека при видимых на световом уровне нарушений ооцитов.

Представлены убедительные данные о негативном влиянии цитоплазматических нарушений постовуляторных ооцитов на доимплантационное развитие эмбриона человека – на процесс оплодотворения, формирования зиготы, дробление и хетчинга. Нарушения цитоплазматических структур ооцитов человека повышают риск неравномерного расхождения хромосом в процессе делений эмбриона, что приводит к анеуплоидии и остановке развития.

Среди всех цитоплазматических нарушений автор выделяет центральную гранулярность как наиболее тяжелое повреждение клетки, приводящее к генетическим нарушениям в эмбрионах. Показано, что применение метода вспомогательного хетчинга с полным удалением зоны пеллюцида для таких бластоцист позволяет им имплантироваться в полости матки. Данный факт требует пересмотра тактики работы с бластоцистами уже на этапе оплодотворения.

Установленные закономерности могут послужить основой для разработки новых подходов к оптимизации эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами экстракорпорального оплодотворения, повышения частоты оплодотворения, дробления, бластуляции и наступления клинической беременности при терапии бесплодия. Результаты диссертационного исследования также могут стать основой для персонифицированного подхода к культивированию эмбрионов человека в условиях *in vitro* с учетом морфологических изменений женских половых клеток.

Важное значение для клинической практики имеет выявленная автором группа риска – ооциты с цитоплазматическими нарушениями, оплодотворение которых может приводить к повышению частоты анеуплоидии в эмбрионах. В работе продемонстрировано, что именно в таких клетках нарушено расхождение хромосом при дроблении. Данный результат указывает на необходимость выполнения преимплантационного генетического тестирования бластоцист для снижения риска рождения детей с хромосомной патологией.

Представленные данные о частоте анеуплоидии в бластомерах целесообразно учитывать при консультировании пациентов в программах экстракорпорального оплодотворения.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов работы

Представленный в диссертационном исследовании уникальный иллюстративный материал по стовуляторных женских половых клеток и доимплантационных эмбрионов человека разных стадий развития может стать основой для формирования методических рекомендаций для практикующих клинических эмбриологов, работающих в программах экстракорпорального оплодотворения.

Результаты исследования 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». Возможно, следует рассмотреть возможность оформления результатов диссертации в виде пособий для клинических эмбриологов.

Личный вклад соискателя состоит в планировании исследования, выполнении эмбриологического этапа по оплодотворению половых клеток и культивированию эмбрионов человека, количественному анализу данных, биопсии и подготовке бластомеров для генетической диагностики методом FISH, сбору и подготовке половых клеток и эмбрионов для ПЦР-исследований, оптимизации этапа пробоподготовки для электронной микроскопии на единичных клетках, статистической обработке результатов, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций по выполненной работе.

Структура диссертации традиционная. Работа написана хорошим литературным языком, содержит высокоинформационный графический материал, иллюстрирована микрофотографиями хорошего качества.

Выводы диссертации соответствуют полученным результатам и задачам исследования. Автореферат полностью отражает основные положения диссертации. Результаты исследования в полном объеме опубликованы в 24 научных работах, из них 12 статей в журналах, которые входят в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, 12 – материалы российских и зарубежных конференций.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет.

Заключение

Диссертационная работа Макаровой Натальи Петровны «Морфологические и молекулярно-биологические особенности постовуляторных ооцитов и их роль в преимплантационном развитии эмбрионов человека», выполненная при консультировании доктора биологических наук, профессора Курило Л.Ф., является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в области изучения постовуляторных женских половых клеток и их влияния на преимплантационное развитие эмбриона человека.

Результаты диссертационного исследования имеют большое научно-практическое значение для морфологического изучения половых клеток в области клеточной биологии, цитологии, гистологии, биологии развития и эмбриологии, а также репродуктологии.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов работа Макаровой Натальи Петровны соответствует требованиям пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 №842 в редакции от 28.08.2017 №1024), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология» и 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология», а автор заслуживает

присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология» и 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология».

Отзыв обсужден и утвержден на совместном заседании отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий и отделения вспомогательных репродуктивных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О.Отта» (протокол № 1 от 16.04.2019).

Ведущий научный сотрудник
отдела иммунологии и
межклеточных взаимодействий
ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт акушерства, гинекологии
и репродуктологии имени Д.О. Отта»,
д.б.н. специальность 03.03.04 – «Клеточная
биология, цитология, гистология»
199034, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, д.3
+7(812)325-32-20 iagmail@ott.ru

 Павлов Олег Владимирович

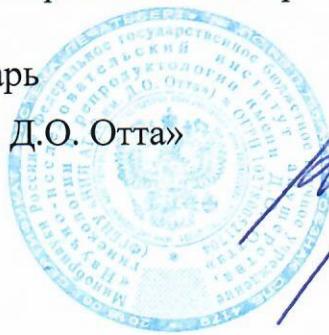
Заведующий отделением
вспомогательных репродуктивных
технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт акушерства, гинекологии
и репродуктологии имени Д.О.Отта»,
д.м.н, специальность 14.01.01 –
«Акушерство и гинекология»
199034, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, д.3
+7(812)325-32-20 iagmail@ott.ru

 Гзгзян Александр Мкртичевич

Подписи д.б.н. Павлова Олега Владимировича
д.м.н. Гзгзяна Александра Мкртичевича заверяю:

Ученый секретарь
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»

К.М.Н.



 Р.В.Капустин