

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

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» и 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология»

Актуальность избранной темы исследования

Проблема вклада морфологических, функциональных и генетических особенностей женских половых клеток в развитие эмбриона широко обсуждается среди специалистов, занимающихся лечением бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения. От качества постовуляторных ооцитов полностью зависит развитие эмбрионов до стадии 8 клеток (3-и сутки развития), до момента включения собственного генома и начала синтеза собственных белков. До этого момента играют ключевую роль накопленные вещества именно в ооците. Именно поэтому морфологические изменения, регистрируемые на световом уровне, в момент оплодотворения могут влиять на развитие эмбриона человека в условиях *in vitro*. Однако проведенный автором диссертационного исследования анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что представленные данные фрагментарны, касаются часто только одного морфологического изменения и не прослеживают влияние этих особенностей на всем протяжении доимплантационного развития эмбриона в условиях *in vitro*. В тоже время в литературе встречаются противоречивые данные о параметрах, которые влияют на процесс естественного высвобождения бластоцисты человека из блестящей оболочки на 5-е сутки развития, и нет данных о связи компетентности женской половой клетки на бластоцисту, которая получена при оплодотворении этого ооцита. В связи с вышеизложенным актуальность выбранной темы не вызывает сомнений.

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

В диссертационной работе Макаровой Н.П. представлены новые данные о морфофункциональных различиях женских постовуляторных половых клетках, их

влиянии на оплодотворение, генетический статус полученного эмбриона, а также высвобождения бластоцисты из блестящей оболочки.

Впервые установлено, что вероятность остановки дробления эмбрионов человека практически в три раза выше при нарушениях цитоплазматических структур ооцита. И именно в этой группе выше риск неравномерного расхождения хромосом и появления анеуплоидии в эмбрионах человека.

Автором впервые показано, что по сравнению с морфологически нормальными ооцитами при появлении в цитоплазме агрегатов гладкого эндоплазматического ретикулума частота оплодотворения снижается в два раза, а развитие таких зигот приводит к нарушениям бластуляции.

Впервые на модели эмбрионов человека с соблюдением всех этических норм выявлено, что процесс хетчинга не зависит от качества клеток эмбриобласта. Даже при дегенерации клеток внутренней клеточной массы в эмбрионах человека на стадии бластоцисты хетчинг происходит за счет клеток трофобласта в 55,5% случаев, что не отличается от контрольной группы. Хетчинг зависит от генной экспрессии в клетках трофоэктодермы эмбрионов человека.

Автором впервые показано, что метод полного удаления зоны пеллюцида эффективен в когорте бластоцист в качестве клеток трофобласта В и С.

Научно-практическая значимость

Работа Макаровой Натальи Петровны обладает ценностью для науки, а результаты могут быть использованы в дальнейших научных изысканиях и клинической практике, так как представленные в диссертации данные являются фундаментальными и расширяют имеющиеся знания о женских постовуляторных ооцитах человека, а также способствуют лучшему пониманию общих закономерностей развития эмбриона человека в условиях *in vitro*.

Автором установлено, что неблагоприятным прогнозом обладают нарушение цитоплазматических структур постовуляторных ооцитов, именно при данной патологии регистрируют изменения в процессах оплодотворения, дробления, бластуляции и хетчинга эмбрионов человека.

Выявленные закономерности развития эмбрионов человека в условиях *in vitro* являются доказательной базой для разработки новых подходов к культивированию эмбрионов человека в программах экстракорпорального оплодотворения.

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

Изучение различных форм патологии постовуляторных женских половых клеток выполнено на большом числе наблюдений — 6134 ооцит-кумулюсных комплекса, из них 5137 ооцитов на стадии МII. Достаточный объем данных позволил автору сделать убедительные выводы о частоте встречаемости морфологических изменений ооцитов, а также определить показатели нормального оплодотворения. Зиготы с двумя пронуклеусами и двумя полярными тельцами появляются в группе с нормальными ооцитами в 94% случаев, а вот при нарушениях цитоплазмы — 78,9%. Дробление эмбрионов человека в условиях *in vitro*, как убедительно показал автор диссертационного исследования, также происходит в зависимости от морфофункционального статуса женской половой клетки.

Генетические аномалии эмбрионов изучены на 529 наблюдениях, что позволило автору получить результаты, способствующие более тщательному отбору ооцитов на моменте оплодотворения и консультированию пациентов по поводу применения программ преимплантационного генетического скрининга.

Автор диссертационного исследования использовал комплекс методов, позволяющих в полном объеме охарактеризовать развитие эмбрионов человека, исходя из морфологических особенностей ооцитов, из которых эти эмбрионы были получены — от момента появления зиготы до высвобождения бластоцисты из блестящей оболочки.

Анализ экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (РТ-ПЦР) позволил выявить фундаментальные закономерности участия клеток внутренней клеточной массы и клеток трофобласта в процессе хетчинга. Несмотря на то, что были изучены всего три гена — CTS2L, GATA3, CGB — которые, согласно данным мировой литературы, принимают участие в хетчинге, полученные в диссертации данные позволяют убедительно говорить об участии разных типов клеток в растворении блестящей оболочки. Полученные результаты подтверждаются адекватными методами статистического анализа.

Таким образом, учитывая объем биологического материала, специфику изучаемых половых клеток и эмбрионов, широкий спектр методов и адекватных цели задач, достоверность и обоснованность полученных автором результатов и представленных выводов не вызывает сомнения. Личный вклад автора заключался в планировании и проведении исследования, осуществление всего процесса эмбриологического этапа экстракорпорального оплодотворения, сбора материала для молекулярно-генетический методов, биопсии эмбрионов, анализе результатов и адекватной их статистической обработке, а также обобщении и сравнении их с данными современной литературы, подготовке публикаций.

Диссертация написана по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, разделов материалы и методы, результаты исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа составлена логично, читается с интересом, результаты опубликованы в полном объеме. Стиль изложения рациональный, диссертация представляет собой завершенный научный труд. Диссертационный материал иллюстрирован таблицами, диаграммами, схемами, а также большим числом иллюстраций. Основные положения диссертации в полном объеме отражают ее содержание.

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. Автореферат диссертации по своему содержанию соответствует материалам, изложенным в тексте диссертации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные данные о влиянии морфофункциональных изменений женских половых клеток на развитие эмбриона человека в условиях *in vitro* следует включить в курс лекций по клеточной биологии, эмбриологии, цитологии и биологии развития биологических ВУЗов России.

Результаты работы рекомендуется опубликовать в виде монографии (или атласа), которая благодаря актуальности исследования, будет востребована не только специалистами в области биологии развития и клеточными биологами, но и клиническими эмбриологами, занимающимися экстракорпоральным оплодотворением.

Замечания

1. Обращает на себя внимание слишком сжатое описание молекулярных методов изучения содержания митохондриальной ДНК в единичных ооцитах. Считаю целесообразным указывать полную последовательность используемых праймеров.
2. При анализе количественного содержания митохондриальной ДНК в ооцитах обращает на себя внимание слишком большой разброс значений. Как это согласуется с результатами других авторов?
3. В качестве вопроса хотелось бы узнать мнение автора относительно целесообразности оплодотворения женских половых клеток с выраженными нарушениями цитоплазмы. Согласно представленной работе, существует повышенный риск рождения ребенка с генетической патологией.

Указанные замечания носят рекомендательный характер, их целесообразно учесть в дальнейшей работе по этому направлению, и они не влияют на общую положительную оценку представленного диссертационного исследования.

Заключение

Таким образом, диссертация Макаровой Натальи Петровны является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения о влиянии морфологических изменений постовуляторных ооцитов на все этапы развития эмбриона человека – от оплодотворения до высвобождения из блестящей оболочки, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в области изучения половых клеток и эмбрионов человека.

Результаты проведенных исследований вносят вклад в понимание общих закономерностей развития эмбриона человека *in vitro*, что может составить основу для разработки принципиально новых персонализированных подходов к культивированию эмбрионов в зависимости от морфофункционального состояния женских половых клеток. Полученные данные имеют большое значение для клеточной биологии, цитологии, биологии развития и эмбриологии.

По актуальности темы исследования, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости и достоверности полученных результатов диссертация Макаровой Натальи Петровны соответствует требованиям пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 №842 в редакции от 28.08.2017 №1024), предъявляемым

к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология» и 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология», а ее автор Макарова Наталья Петровна заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология» и 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология».

**Доктор биологических наук (по
специальности 03.01.02 Биофизика),
профессор, заведующий лабораторией
функциональной микроскопии
биоструктур Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки «Институт
теоретической и экспериментальной
биофизики» Российской Академии наук
142290, Московская обл., г. Пущино, ул.
Институтская, 3
agpogorelov@rambler.ru**

«26» апреля 2019 г.

Погорелов Александр Григорьевич

Подпись Погорелова заверяю

