

ОТЗЫВ

**официального оппонента Лебедевой Ирины Юрьевны
на диссертацию Макаровой Натальи Петровны на тему:**

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

Актуальность темы исследования

Реализация репродуктивной функции, лежащая в основе сохранения любого вида, зависит в первую очередь от качества яйцеклеток и их способности к последующему эмбриональному развитию. Хотя значительное число исследовательских работ посвящено изучению оогенеза у млекопитающих, в частности, на модели созревания ооцитов *in vitro*, фундаментальные механизмы регуляции этого процесса до сих пор до конца не ясны. Это особенно актуально в случае яйцеклеток человека вследствие труднодоступности биологического материала, юридических и этических ограничений экспериментальной работы в данной области. Отдельную проблему в этом контексте представляет поиск надежных прижизненных критериев оценки качества женских гамет, которые были бы напрямую связаны с функциональным состоянием последних и давали возможность повышать эффективность технологии экстракорпорального оплодотворения, широко применяемой в медицине.

Таким образом, тема диссертационной работы Макаровой Натальи Петровны «Морфологические и молекулярно-биологические особенности постовуляторных ооцитов и их роль в преимплантационном развитии эмбрионов человека» представляется, безусловно, актуальной на современном этапе исследования механизмов биологического контроля формирования компетентной яйцеклетки.

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

В диссертационной работе Макаровой Натальи Петровны впервые представлено комплексное исследование зависимости между различными типами морфологических изменений созревших ооцитов человека, их ультраструктурными и молекулярно-биологическими особенностями и последующим эмбриональным развитием до стадии бластоцисты, включая состояние пloidности и генетический контроль выхода из блестящей оболочки.

Наиболее важными новыми научными результатами являются данные о том, что цитоплазматические нарушения морфологии постовуляторных ооцитов связаны с уменьшением числа копий митохондриальной ДНК и негативными ультраструктурными изменениями в яйцеклетках, что обуславливает снижение их оплодотворяемости и качества дробящихся эмбрионов, в том числе вследствие анеуплоидии. Центральная гранулярность цитоплазмы ооцитов идентифицирована как морфологическое проявление наиболее негативных трансформаций на ультраструктурном уровне, а именно гипертрофии гладкого эндоплазматического ретикулума и повреждения митохондрий. При этом на основании полученных результатов рекомендовано рассматривать женские гаметы с экстрацитоплазматическими изменениями в качестве морфологически нормальных половых клеток.

Впервые показаны различия на уровне транскрипции в экспрессии генов, участвующих в регуляции спонтанного хетчинга бластоцист человека (*CTSL2*, *GATA3* и *CGB*), в зависимости от качественных характеристик трофобласта и эмбриобласта, а также обнаружена связь между морфологическими аномалиями созревших ооцитов и процессом выхода бластоцист из блестящей оболочки. Кроме того, продемонстрирована обоснованность полного удаления зоны пеллюцида для повышения частоты имплантации бластоцист с качеством трофобласта класса В и ниже.

Научно-практическая значимость

Диссертационная работа Макаровой Натальи Петровны представляет научную значимость, поскольку затрагивает ряд фундаментальных механизмов, лежащих в основе снижения качества постовуляторных ооцитов человека, а также обусловливающих нарушения в развитии эмбрионов, полученных методом экстракорпорального оплодотворения. Автором проведен детальный анализ связей между морфологическими, ультраструктурными и молекулярно-биологическими изменениями ооцитов и их потенциалом к эмбриональному развитию. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях, направленных на поиск прижизненных критерииов оценки качества яйцеклеток у различных видов млекопитающих.

Результаты представленной диссертации также обеспечивают научную основу для использования морфологической оценки зрелых ооцитов человека в рутинной практике экстракорпорального оплодотворения. Предлагаемая классификация яйцеклеток, основанная, в первую очередь на оценке их цитоплазматических аномалий, позволит проводить адекватную селекцию ооцитов и, таким образом, повысить эффективность технологии ЭКО. Кроме того, автором апробировано и рекомендовано применение метода полного удаления зоны пеллюцида для повышения частоты имплантации бластоцист с низким качеством трофобласта.

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

В основе диссертационной работы Макаровой Натальи Петровны лежит достаточно большой объем проведенных исследований, в которых было использовано свыше 6 тысяч ооцит-кумулюсных комплексов, около 5 тысяч зигот и 2,5 тысячи эмбрионов человека, что свидетельствует о репрезентативности эмпирического материала, особенно с учетом его труднодоступности. Автор имеет многолетний опыт работы с половыми клетками и эмбрионами человека и их оценки в рамках программ

экстракорпорального оплодотворения. При проведении исследований были использованы следующие методы: световая микроскопическая оценка ооцитов, зигот, дробящихся эмбрионов и бластоцист человека; оплодотворение ооцитов *in vitro* и культивирование эмбрионов; электронно-микроскопическое исследование ооцитов; метод ПЦР в реальном времени для определения числа копий митохондриальной ДНК в ооцитах; метод ОТ-ПЦР для измерения уровня экспрессии мРНК в эмбрионах на стадии бластоцисты; преимплантационная генетическая диагностика единичных бластомеров эмбрионов методом FISH-диагностики для выявления анеуплоидии.

В основе научного подхода к проведению исследований лежит комплексный анализ и сопоставление цитоморфологических, молекулярных и генетических характеристик ооцитов, зигот и эмбрионов на разных стадиях развития. Экспериментальные данные обработаны параметрическими или непараметрическими методами в соответствии с характером их распределения, что обеспечивает достоверность полученных результатов.

В целом, автором использованы современные методы и подходы, отвечающие поставленным цели и задачам, полученные результаты соответствующим образом обработаны и проанализированы. Это обеспечивает высокую степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Личный вклад соискателя заключался в планировании и проведении исследований, статистической обработке результатов, их анализе, обобщении и сопоставлении с данными современной литературы, подготовке публикаций по теме диссертации.

Диссертационная работа Макаровой Натальи Петровны написана по традиционному академическому плану, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Основные положения диссертации в полной мере отражают ее содержание. В целом работа производит неплохое впечатление, написана хорошим языком, логично

построена и представляет собой завершенный научный труд. Экспериментальный материал наглядно иллюстрирован фотографиями, таблицами, диаграммами.

Материалы диссертации отражены в полном объеме в 24 научных работах, 12 из которых опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Содержание автореферата полностью соответствует материалам, изложенным в диссертации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты работы, связанные с морфологической оценкой постовуляторных ооцитов человека, целесообразно использовать в центрах ЭКО для повышения эффективности программы лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения.

Материалы диссертации рекомендуется включить в курс лекций по эмбриологии в медицинских вузах.

Замечания. При общей положительной оценке работы по материалам диссертации возник ряд замечаний и вопросов:

1. В представленных таблицах автором использованы не совсем удачные обозначения, поэтому иногда не ясно, между какими именно экспериментальными группами выявлены достоверные различия. Также возникает вопрос, всегда ли проводилось сравнение между группами ооцитов с цитоплазматическими и экстрацитоплазматическими изменениями?

2. Некоторые экспериментальные данные представлены автором одновременно и в виде таблицы, и в виде диаграммы. Не должно быть дублирования результатов.

3. Почему исследование зависимости между разными типами морфологических изменений ооцитов и качеством полученных после их оплодотворения эмбрионов выполняли не на бластоцистах, а на эмбрионах более ранних стадий?

4. Данные таблицы 14 (таблицы 12 автореферата), касающиеся ооцитов с экстрацитоплазматическими аномалиями, не соответствуют тексту диссертации, в котором они описываются.

5. Некоторые морфологические изменения ооцитов могут возникать вследствие материнского старения. Почему в представленной работе не проводилось сравнения частоты цитоплазматических и экстрацитоплазматических трансформаций яйцеклеток в зависимости от возраста женщин?

6. Морфологические аномалии яйцеклеток могут появляться не только во время созревания, но и во время постовуляторного старения. Доказано, что в ооцитах, достигших стадии метафазы-II, процессы старения резко ускоряются (*Miao et al., Hum. Reprod. Update 2009, 15: 573-585*). К сожалению, этот аспект в представленной диссертации не рассматривался даже на уровне обсуждения.

Указанные замечания не затрагивают существа диссертации и не снижают ее научной и практической значимости.

Заключение

Таким образом, диссертация Макаровой Натальи Петровны является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения о роли цитоплазматических и экстрацитоплазматических изменений постовуляторных ооцитов человека в генезисе нарушений преимплантационного эмбрионального развития, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в области патофизиологии женской репродуктивной системы. Результаты проведенных исследований вносят вклад в понимание механизмов, связывающих различные морфологические аномалии яйцеклеток с их компетенцией к оплодотворению и дальнейшему развитию до стадии вылупившейся бластоцисты, что обеспечивает научную основу прогностической оценки качества зрелых ооцитов для улучшения результатов лечения бесплодия.

методами экстракорпорального оплодотворения. Полученные результаты имеют большое значение для биологии развития, эмбриологии, клеточной биологии и цитологии.

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 г. № 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 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
специальностям 03.01.04 – Биохимия
и 03.02.07 – Генетика), главный научный
сотрудник, зав. лабораторией биологических
проблем репродукции животных
Федерального научного центра животноводства
– ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста
(ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста)
142132, Московская обл., г.о. Подольск,
пос. Дубровицы, 60
тел.: +7(926)850-27-03
irledv@mail.ru
«24 » апреля 2019 г.

Подпись И.Ю. Лебедевой заверяю:
Ученый секретарь ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста,
к.с.-х.н.
«24 » апреля 2019 г.



Ирина Юрьевна
Лебедева

Н.В. Сивкин