

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» ооцитоплазмы, «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

(специальность 03.00.23 – Биотехнология)

Г.П. Маленко

Подпись Г.П. Маленко заверяю:

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

С.Н. Ковальчук

23.04.2019.

