

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Доктора биологических наук Курило Любови Федоровны на диссертационную работу Сысоевой Анастасии Павловны «Влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на морфофункциональные характеристики мужских половых клеток», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 Клеточная биология

Актуальность темы

Диссертационное исследование Сысоевой Анастасии Павловны посвящено крайне актуальной проблеме – влиянию фолликулярной жидкости на морфофункциональные характеристики мужских половых клеток посредством внеклеточных везикул, которые, транспортируя важнейшие биологически активные молекулы, влияют не только на изменение подвижности сперматозоидов, но и на запуск их капацитации и подготовку к акросомной реакции. Проведенный автором диссертационного исследования анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что представленные данные малочисленны и фрагментарны, и исследования о взаимодействии внеклеточных везикул и сперматозоидов выполнены на экспериментальных животных моделях. Изучение особенностей оплодотворения у человека, в частности, взаимодействия женских и мужских гамет в репродуктивных путях во время оплодотворения и изменения морфофункциональных характеристик сперматозоидов, все еще является малоизученной и сложнейшей из проблем репродукции человека.

Выбор Анастасией Павловной Сысоевой темы исследования продиктован, также, нарастающей необходимостью совершенствования эмбрионального этапа программ вспомогательных репродуктивных технологий, требующего новых подходов к отбору наиболее перспективного сперматозоида для оплодотворения *in vitro*, приближенному к естественным условиям.

В представленной диссертационной работе А.П. Сыроевой исследованы как фундаментальные биологические процессы репродукции человека на клеточном и молекулярном уровне, так и приведены предпосылки для разработки методов для их использования в клинической практике.

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

Научная новизна кандидатской диссертации А.П. Сыроевой заключается в комплексном подходе к изучению взаимодействия внеклеточных везикул (ВВ) фолликулярной жидкости (ФЖ) со сперматозоидами: было проведено сравнение изменения подвижности и гиперактивации сперматозоидов после сокультивирования их с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости женщин разных возрастных групп, показана специфика связывания везикул с мембраной мужских гамет в зависимости от репродуктивного возраста женщины, а также, проанализирован состав внеклеточных везикул фолликулярной жидкости с акцентом на молекулы, потенциально участвующие в активации оплодотворяющей способности сперматозоидов человека. Таким образом, соискателем впервые было показано, что специфика и качество взаимодействия внеклеточных везикул и мужских половых клеток напрямую зависит от возраста женщины и химического состава самих везикул, что не только дополняет понимание фундаментальных основ размножения человека, но и объясняет угасание репродуктивных функций с увеличением возраста.

Впервые на модели сперматозоидов человека было продемонстрировано связывание внеклеточных везикул фолликулярной жидкости с функционально значимыми участками мужских гамет, которое происходит в маточных трубах при оплодотворении и необходимо для их функциональной активации.

Уникальные результаты представленного исследования позволили соискателю разработать новую прикладную *методику* отбора сперматозоидов с наилучшим оплодотворяющим потенциалом при помощи внеклеточных

везикул фолликулярной жидкости, основанную на фундаментальном биологическом процессе дифференциального хемотаксиса.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Диссертационная работа Сысоевой А.П. безусловно обладает большой ценностью для науки и для практической медицины, так как представленные данные получены впервые на биологическом материале человека. Результаты работы могут быть использованы в дальнейших научных исследованиях и в клинической практике, так как являются фундаментальными и значительно расширяют имеющиеся знания о дистантном взаимодействии половых клеток, а также способствуют лучшему пониманию общих закономерностей процессов оплодотворения человека в условиях *in vitro*.

Важно отметить выявленное соискателем достоверно значимое увеличение показателей подвижности и гиперактивации сперматозоидов после сокультивирования с внеклеточными везикулами доноров фолликулярной жидкости молодого репродуктивного возраста, а также, роль высокого уровня везикулярного прогестерона, по сравнению со старшей возрастной группой женщин, что может указывать на перспективу использования донорских везикул фолликулярной жидкости в клинической практике. Полученные данные липидного и протеомного анализа внеклеточных везикул открывают новые возможности для более глубокого изучения молекулярных и клеточных основ оплодотворения человека, неизвестных до настоящего времени.

Полученные автором результаты можно использовать в учебном процессе для преподавания на кафедрах клеточной биологии и эмбриологии раздела по эмбриологии млекопитающих, в том числе и человека, а также для обучения в рамках циклов повышения квалификации по клинической эмбриологии, для расширения понимания процессов подготовки сперматозоидов перед оплодотворением.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Общий объем исследованного биологического материала, использование комплекса классических и современных методов морфологического, молекулярно-генетического и метаболомного анализа, грамотное использование соответствующих методов статистического исследования, детально описанные результаты работы позволяют утверждать, что научные положения и выводы, изложенные в диссертации А.П. Сысоевой, достоверны и заслуживают доверия. Сформулированные задачи работы в полной мере соответствуют поставленной цели. Диссертационная работа имеет качественные иллюстрации, информативные таблицы и диаграммы, которые дополняют текст исследования, делая полученные результаты наглядными и доступными для понимания.

Личный вклад автора заключался в самостоятельном планировании и проведении исследования, в анализе результатов их статистической обработки, а также в обобщении и сравнении их с данными современной литературы, в написании и подготовке публикаций.

Основные положения диссертационной работы Сысоевой А.П. доложены на многих российских и международных конференциях, в том числе, на ежегодной европейской конференции по репродуктивной медицине ESHRE – 2022 и в 2023 году в виде устного доклада на ESHRE – 2023.

Результаты исследования внедрены в практическую работу эмбриологов Отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова и включены в учебный процесс на курсах повышения квалификации врачей-гинекологов и клинических эмбриологов в Научно-образовательном центре ВРТ им. Фредерика Паулсена ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» МЗ РФ, в лабораторную практику, учебный и научный процессы ГБУЗ МО «Московского областного научно-исследовательского института акушерства и гинекологии» и ГБУЗ «ГБУ №31

им. академика Г.М. Савельевой» Департамента здравоохранения города Москвы.

Оценка оформления и содержания диссертации

Диссертация написана по классической схеме, стандартно (привычно) структурирована и состоит из введения, обзора литературы, разделов материалы и методы, результаты исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 124 литературных источника отечественных и зарубежных авторов, и приложения. Работа составлена логично, написана грамотным русским языком, читается с интересом. Диссертация представлена на 141 странице машинописного текста, иллюстрирована 32 рисунками, 3 таблицами.

Введение имеет аргументированные цель и задачи работы, грамотно сформулированы положения, выносимые на защиту, подробно описана актуальность исследования. Выполненный в диссертации литературный обзор дает полное теоретическое представление по теме диссертации, обозначены исторические научные предпосылки и основные тенденции исследуемой проблемы с позиции фундаментальных основ и практического применения. В главе «Материалы и методы» подробно и последовательно описаны все применяемые (более 9) методы исследования в диссертационной работе, которые дают возможность положительно судить о воспроизводимости и достоверности результатов.

Результаты работы представлены текстом, диаграммами и микрофотографиями высокого качества. Числовые данные представлены корректно с соответствующим статистическим анализом. Из полученных результатов логично следуют выводы и положения, выносимые соискателем на защиту. Глава по обсуждению полученных данных является подробным анализом выявленных уникальных результатов и закономерностей, установленных в ходе исследования. На их основе соискатель выдвигает важные научные предположения и обозначает новые направления теоретических и практических научных исследований в данной области.

Обширный список литературных источников свидетельствует о полноте понимания исследуемой проблемы соискателем. Заключение логично подводит к четким и структурированным выводам диссертации, которые, в свою очередь, полностью соответствуют поставленным задачам.

По материалам диссертации опубликовано 10 научных трудов, из них 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК РФ, 5 публикаций в российских и зарубежных сборниках научных трудов, а также, по результатам диссертационной работы получены два патента на изобретение (Патент № 2801339 и Патент № 2801117).

Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации и соответствует требованиям п. 25 Положения о присуждении ученых степеней.

Принципиальных возражений по диссертационной работе Сысоевой Анастасии Павловны нет. В отзыве могут быть отмечены следующие замечания: а) В тексте соискатель пишет либо: акросомальная мембрана (и другие компоненты акросомы), либо акросомная. Правильнее писать только – акросомная. б) не все сокращения, приведенные и использованные в тексте, отмечены в Списке сокращений (стр. 4-6) (например: ВAM – внутренняя акросомная мембрана, с.24; MBT – мультивезикулярные тельца, с.29 и др.).

в) на странице 35 не указаны авторы (ссылки на их публикации), о которых А.П.Сысоева пишет: «...снижение параметров эякулята многие авторы связывают... с приобретенными заболеваниями половой системы».

г) стр. 37 – «набухание» **хвоста** сперматозоида.... корректнее – жгутика.

д) стр. 39 –«... получение ... материала проводилось...», «доноры ...обследовались ...», стр. 40, 41, 45 и так далее – в ряде ситуаций и при построении предложений не надо употреблять возвратную частицу «ся».

е) стр.46 – «идентификация липидов производилась...»

« деионизованная вода...» – правильное – деионизированная...

ж) стр.32 –«...взаимодействия ВВ и других клеток...» – надо – и других **ТИПОВ** клеток.

В целом, эти замечания не снижают высокой ценности, значимости полученных А.П.Сысоевой результатов работы, важной научной, уникальной информации об участии внеклеточных везикул фолликулярной жидкости при оплодотворении ооцита сперматозоидом.

Указанные замечания носят рекомендательный характер для дальнейшей научно-исследовательской работы автора. Замечания не влияют на общую положительную научную оценку представленной кандидатской диссертации.

Заключение

Диссертационная работа А.П. Сысоевой на тему «Влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на морфофункциональные характеристики мужских половых клеток», выполненная под руководством доктора биологических наук Макаровой Н.П., является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена крайне актуальная научная задача – впервые установлено взаимодействие внеклеточных везикул фолликулярной жидкости со сперматозоидами человека, их влияние на характеристики подвижности, гиперактивации, изменение состояния мембраны мужских гамет во время приобретения ими оплодотворяющей способности (при запуске капацитации и начале акросомной реакции), а также показана прямая взаимосвязь оказываемого эффекта от возраста женщины. Представленные результаты исследования значительно обогащают понимание межклеточных и молекулярных процессов оплодотворения у человека, давая возможность применить полученные знания в разработке методов селекции сперматозоидов, максимально приближенных к естественным условиям женского репродуктивного тракта.

Результаты диссертационного исследования Сысоевой А.П. имеют теоретическое и большое научно-практическое значение для цитологии,

гистологии, клеточной биологии, эмбриологии, а также, молекулярной биологии.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов представленное диссертационное исследование Сыроевой Анастасии Павловны соответствует требованиям пп. 9-14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология.

Официальный оппонент:

Любовь Федоровна Курило

главный научный сотрудник
лаборатории генетики нарушений репродукции
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр
имени академика Н.П. Бочкова», доктор биологических наук,
профессор, заслуженный деятель науки РФ

Курило

01.12.2023

Подпись Курило Любови Федоровны
заверяю

Екатерина Сергеевна Воронина

Ученый секретарь ФГБНУ
«Медико-генетический научный центр
имени академика Н.П. Бочкова»,
кандидат медицинских наук



Е.С. Воронина