

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**Кандидата медицинских наук Боголюбова Сергея Владимировича на диссертационную работу Сыроевой Анастасии Павловны «Влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на морфофункциональные характеристики мужских половых клеток» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология**

**Актуальность выбранной темы.** Изучение особенностей оплодотворения человека, в частности, взаимодействия гамет в репродуктивных путях и изменения морфофункциональных характеристик сперматозоидов, в настоящее время является крайне актуальной темой, так как до сих пор полностью не описаны биологические особенности процессов размножения человека. Растущее число случаев бесплодия, связанного с мужским фактором, требует поиска новых подходов к отбору перспективных сперматозоидов на эмбриологическом этапе программ экстракорпорального оплодотворения.

Классические методы подготовки эякулята в программах вспомогательных репродуктивных технологий (swim up и центрифугирование в градиенте плотности) широко используются в настоящее время, однако, не всегда бывают достаточны для получения наиболее качественных сперматозоидов. В связи с этим стоит вопрос о поиске новых методов селекции сперматозоидов, наиболее приближенных к этапам отбора внутри женского репродуктивного тракта. Представленная диссертационная работа А.П. Сыроевой исследует фундаментальные биологические процессы взаимодействия гамет и активации сперматозоидов в репродуктивных путях женщины при участии внеклеточных везикул фолликулярной жидкости, что ранее не было описано у человека. Последние данные о роли внеклеточных везикул в репродуктивной системе млекопитающих, их участии во множестве процессов гамето-, эмбриогенеза, а также созреванию и подготовке сперматозоидов к оплодотворению, позволили автору создать крайне

актуальные наработки, как для фундаментальной биологии размножения человека, так и для клинической практики.

**Новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации.** В диссертационной работе А.П. Сысоевой представлены новые данные о влиянии и взаимодействии внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на важнейшие функциональные характеристики сперматозоидов, такие как, гиперактивация, капацитация и запуск акросомной реакции, необходимые для активации клеточных и молекулярных процессов оплодотворения. Автором впервые показано, что специфика и качество взаимодействия внеклеточных везикул и сперматозоидов напрямую зависит от возраста женщины и состава самих везикул. Описан широкий метаболомный профиль внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин разных возрастных групп, что дает возможность по-новому взглянуть как на возможные причины ухудшения репродуктивного потенциала с возрастом, так и на разработку новых подходов для его лечения в клинической практике. Благодаря полученным данным автору удалось разработать эффективную методику для получения популяций сперматозоидов с наиболее высоким оплодотворяющим потенциалом, так как выделение только живых и подвижных сперматозоидов, как при классических методах, не является физиологическим и не моделируются процессами отбора сперматозоидов в женских репродуктивных путях.

**Значимость для науки и практики полученных автором результатов.** Диссертационное исследование А.П. Сысоевой является значимой работой как для фундаментальной биологии размножения и клеточной биологии, так и для клинической практики при выполнении программ вспомогательных репродуктивных технологий. Результаты представленной работы являются уникальными, так как впервые получены на биологическом материале человека с соблюдением всех необходимых этических норм и протоколов. Взаимодействие внеклеточных везикул фолликулярной жидкости с мембраной сперматозоидов – крайне сложный для визуализации процесс,

однако в данной работе широко представлены микрофотографии указывающие, что внеклеточные везикулы связываются с мембраной функционально важных частей сперматозоидов для передачи различных молекул, активирующих подготовку к оплодотворению. Показанное положительное влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин молодого возраста на показатели подвижности, активацию сперматозоидов и их подготовку к оплодотворению, в сравнении с везикулами женщин старшего репродуктивного возраста, во многом проясняет факторы бесплодия, количество которых увеличивается с возрастом.

Необходимо отметить и значимые результаты сравнения концентрации прогестерона, связанного с везикулами женщин разных возрастных групп: в группе женщин репродуктивного возраста уровень везикулярного прогестерона оказался в 6,6 раз выше, чем в группе везикул женщин старшего репродуктивного возраста. Различия в липидном составе везикул, также, коррелируют с возрастом донора фолликулярной жидкости. Полученные данные метаболомного анализа дают возможность приступить к разработке новых методов улучшения качества сперматозоидов и их отбора для совершенствования эмбриологического этапа программ экстракорпорального оплодотворения.

**Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Обоснованность достоверности результатов представленной работы подтверждается достаточным количеством набранного материала исследования, использованием современных микроскопических, метаболомных и молекулярно-генетических методов, адекватной статистической обработкой полученных данных. Сформулированные задачи работы в полной мере соответствуют поставленной цели. Полученные результаты работы позволяют обосновать сформулированные положения и выводы. Выдвинутые научные положения и выводы диссертации по итогам работы не вызывает сомнений.

Основные положения диссертационной работы доложены на российских (конгрессы РАРЧ 2021, 2022; «Мать и Дитя-2022»; «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике», ЛАБРИН–2022; Всероссийском конгрессе «Право на жизнь – 2023»), на международных конференциях (КАРМ–2022, Астана) 2023) и на ежегодной европейской конференции по репродуктивной медицине ESHRE – 2022 (Милан, 2022) и в 2023 году в виде устного доклада на ESHRE – 2023 (Копенгаген, 2023).

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе эмбриологов Отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова и в учебном процессе 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 и научный процесс ГБУЗ МО «Московского областного научно-исследовательского института акушерства и гинекологии» и в лабораторную практику, учебный и научный процесс ГБУЗ «ГБУ №31 им. академика Г.М. Савельевой» Департамента здравоохранения города Москвы.

**Оценка оформления и содержания диссертации.** Диссертация построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, главы с описанием полученных собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и изученной научной литературы, включающего 124 литературных источника, и приложения. Работа представлена на 141 странице машинописного текста, иллюстрирована 32 рисунками, 3 таблицами. Во введении обоснована актуальность диссертационного исследования, грамотно сформулирована цель, основные задачи работы и представлены положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы автор подробно рассматривает классические фундаментальные научные данные, а также новейшие исследования из области клеточной биологии, физиологии, молекулярной биологии и протеомики. Представленный в обзоре объем данных в полной мере обосновывает научно-

исследовательскую и практическую релевантность проблемы, поставленной в диссертационной работе. В обзоре подробно описаны сведения о структуре и функциональных характеристиках сперматозоидов человека, а также их особенности и роль в процессе движения в женском репродуктивном тракте при естественном оплодотворении, известные на данный момент. Существенный объем обзора посвящен описанию открытия, происхождения, структуре, функциям и составу внеклеточных везикул в биологических жидкостях организма млекопитающих, в том числе и фолликулярной жидкости. Большинство научных работ, представленных в обзоре описывают экспериментальные животные модели, однако автору удалось найти и резюмировать малочисленные опубликованные исследования на материале человека, которые в большей степени описывали участие внеклеточных везикул в процессах гаметогенеза и имплантации. Отдельного внимания заслуживает очень подробное и тщательное описание материалов и методов, что предполагает высокую воспроизводимость результатов. Представление результатов работы дано текстом и проиллюстрировано высококачественными микрофотографиями и пояснительными диаграммами. Числовые данные представлены корректно с соответствующей статистической оценкой. Из полученных результатов логично следуют выводы и положения, выносимые автором на защиту. В главе «Обсуждение результатов» приведено достаточное количество литературных источников, выдвинуты интересные научные гипотезы и логические заключения, позволяющие глубже убедиться в новизне и научно-исследовательской перспективе представленной диссертационной работы. В данном разделе автором предпринята успешная попытка синтеза и интеграции полученных знаний для создания целостной картины поставленной проблемы работы.

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 (3 статьи как первый автор, 2 в соавторстве), а также, 5 публикаций в российских и зарубежных сборниках научных трудов. По

результатам диссертационной работы получены два патента (Патент № 2801339 от 07.08.2023 и Патент № 2801117 от 02.08.2023 года) на изобретение.

Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации и соответствует требованиям п. 25 Положения о присуждении ученых степеней. Принципиальных замечаний по существу представленной работы.

В отзыве могут быть отмечены следующие пожелания, в том числе к дальнейшему перспективному развитию научного исследования:

1. Целесообразно увеличить выборку случаев с тяжелой патозооспермией, в том числе астенозооспермией, и добавить группу пациентов, у которых сперматозоиды были получены путем биопсии яичка, и проверить эффект сокультивирования с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости на сперматозоиды.

2. Обращает на себя внимание слишком сжатое обсуждение липидного и протеомного состава внеклеточных везикул фолликулярной жидкости относительно оказываемого эффекта на активацию сперматозоидов.

3. В качестве вопроса хотелось бы узнать, проводили ли оплодотворение ооцитов сперматозоидами после отбора описанным в диссертации методом дифференциального хемотаксиса? Если да, как это регламентировалось с точки зрения показаний и этики, и был ли обнаружен эффект на эмбриологическом этапе программы ВРТ (увеличивалась ли частота оплодотворения, количество бластоцист к 5-6 дню культивации)?

Указанные замечания не имеют принципиального характера, носят рекомендательный характер для дальнейшей работы по этому направлению исследования. Замечания не влияют на общую положительную оценку представленной диссертационной работы.

**Заключение.** Диссертационная работа Сысоевой А.П. «Влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на морфофункциональные характеристики мужских половых клеток», выполненная под руководством д.б.н. Макаровой Н.П. является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача – на биологическом материале человека

показаны особенности дистантного взаимодействия гамет, опосредованные внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости и клеточные и молекулярные закономерности активации оплодотворяющей способности сперматозоидов человека, что может расширить фундаментальные знания биологии размножения человека и дать толчок к разработке новых подходов к совершенствованию эмбриологических этапов программ вспомогательных репродуктивных технологий. Результаты диссертационного исследования имеют большое научно-практическое значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии, эмбриологии и молекулярной биологии, а также имеют перспективы по внедрению в клиническую практику.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов представленная диссертационная работа Сыроевой А.П. соответствует требованиям пп.9-14 Постановление Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. № 842 в редакции от 28.08.2017 г. №1024, 01.10.2018 №1168, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология.

**Официальный оппонент:**

доцент, в.н.с. лечебно-диагностического отделения  
вспомогательных репродуктивных технологий  
ГНЦ РФ ФГБУ «Национального медицинского  
исследовательского центра эндокринологии» МЗ РФ,  
к.м.н. (специальность 14.00.40 – Урология)

С.В. Боголюбов

Подпись Боголюбова С.В. заверяю

Ученый секретарь,

доктор медицинских наук, главный научный сотрудник,  
ГНЦ РФ ФГБУ «Национального медицинского  
исследовательского центра эндокринологии» МЗ РФ

Дзеранова Л.К.

« 14 » апреля 2023 г.