

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.204.02
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ХИРУРГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Б.В. ПЕТРОВСКОГО»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от «28» декабря 2023 г. № 16
о присуждении Сысоевой Анастасии Павловне, гражданке Российской
Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на морфофункциональные характеристики мужских половых клеток» по специальности 1.5.22 – Клеточная биология принята к защите 25 октября 2023 года, протокол № 13, диссертационным советом 24.1.204.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (119991, Москва, Абрикосовский пер., д. 2), сайт организации www.med.ru в соответствии с приказом Минобрнауки России № 833/нк от 12 июля 2022 г.

Соискатель Сысоева Анастасия Павловна, 17 марта 1994 года рождения, в 2015 г. окончила бакалавриат и в 2017 г. магистратуру Биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова по направлению 06.04.01 «Биология». В 2017 г. была принята на работу эмбриологом, младшим научным сотрудником в лабораторию эмбриологии Отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр

акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России), где работает по настоящее время. Диссертация выполнена в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Научный руководитель: Макарова Наталья Петровна – доктор биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология, 03.03.05 – Биология развития, эмбриология; ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова Института репродуктивной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Официальные оппоненты: 1. **Курило Любовь Федоровна**, доктор биологических наук, профессор, Заслуженный деятель науки Российской Федерации, Главный научный сотрудник лаборатории генетики нарушений репродукции Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»; 2. **Боголюбов Сергей Владимирович**, кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник лечебно-диагностического отделения вспомогательных репродуктивных технологий Государственного научного центра Российской Федерации Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии»), дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации г. Самара, в своем положительном отзыве, подписанном Шурыгиной Оксаной Викторовной, доктором медицинских наук, доцентом, профессором кафедры гистологии и эмбриологии ФГБОУ ВО

СамГМУ Минздрава России указала, что диссертация Сысоевой А.П. соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология, а сам автор достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология.

Соискатель имеет по теме диссертации 10 опубликованных работ, из них в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, утвержденный Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации – 5 работ, индексируемых в базе данных Scopus и Web of Science Core Collection (3 публикации как первый автор, 2 – в соавторстве), и два Патента на изобретение №2801339, №2801117. Общий объем публикаций 58 страниц.

Наиболее значимые работы:

1. Влияние экстраклеточных везикул фолликулярной жидкости на морфофункциональные характеристики сперматозоидов человека / А.П. Сысоева, Н.П. Макарова, Д.Н. Силачев, Н.Н. Лобанова, Ю.А. Шевцова, Е.Е. Брагина, Е.А. Калинина, Г.Т. Сухих // Клеточные технологии в биологии и медицине – 2021. - №3. – С. 176-185.
2. Влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости с различным профилем миРНК на функциональные свойства сперматозоидов человека / А. П. Сысоева, О.С. Непша, Н. П. Макарова, Д. Н. Силачев, Н. Н. Лобанова, А. В. Тимофеева, Ю. А. Шевцова, Е. Е. Брагина, Е. А. Калинина // Клеточные технологии в биологии и медицине – 2022. – №2 - С.117-126.
3. Роль внеклеточных везикул семенной плазмы в изменении морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека / А.П.

Сысоева, Н.П. Макарова, Е.Е. Краевая // Клиническая и экспериментальная морфология – 2021. – Т. 10. - №4. С. 5-13.

4. Терапевтические возможности внеклеточных везикул в репродуктивной медицине / Е.Е. Краевая, Н.П. Макарова, А.П. Сысоева, Е.А. Калинина, Д.Н. Силачев // Акушерство и гинекология – 2021. №7. – С. 5-9.

5. Внеклеточные везикулы фолликулярной жидкости: клинические аспекты и молекулярная биология / Довгань А.А., Ахмедова З.Ф., Сысоева А.П., Зингеренко Б.В., Романов Е.А., Силачев Д.Н., Макарова Н.П., Калинина Е.А. Акушерство и гинекология. 2023. № 6. С. 38-43.

Недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, отсутствуют.

На автореферат поступили отзывы от: 1. Кандидата биологических наук, заведующей лабораторией раннего эмбриогенеза отдела репродуктологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» (г. Санкт-Петербург) **Комаровой Евгении Михайловны**; 2. Кандидата медицинских наук, старшего научного сотрудника Отдела биоэнергетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова (г. Москва) **Сергеева Олега Владимировича**.

Отзывы положительные, критических замечаний в отзывах по представленной работе нет. Отзывы содержат информацию об актуальности настоящего исследования, новизне полученных результатов и значимости их для науки и практики. Отмечено, что диссертационная работа выполнена в полном объеме на высоком научном и методологическом уровне, выводы диссертации достоверны, соответствуют поставленным задачам и в полном объеме отражают результаты исследования.

Выбор ведущей организации обоснован тем, что Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего

образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации в течение многих лет является одним из ведущих учреждений страны по изучению проблем репродукции человека, эмбриологии и генетики, а также внедрению научных результатов в клиническую практику. Сотрудники Ведущей организации имеют актуальные публикации по теме кандидатской диссертации Сысоевой А.П., в том числе в области отбора и улучшения функциональных характеристик мужских половых клеток.

Выбор официальных оппонентов обоснован тем, что **Курило Любовь Федоровна**, доктор биологических наук, профессор, Заслуженный деятель науки Российской Федерации, главный научный сотрудник лаборатории генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» является признанным выдающимся экспертом мирового уровня, изучающим фундаментальные аспекты репродуктивной биологии млекопитающих, в том числе, человека; **Боголюбов Сергей Владимирович**, кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник лечебно-диагностического отделения вспомогательных репродуктивных технологий ГНЦ РФ ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации является авторитетным и ведущим специалистом, практикующим клиницистом в области мужской фертильности и бесплодия. Сфера научных интересов С. В. Боголюбова включает в себя изучение морфологии, цитологии, динамики развития и функционирования сперматозоидов человека, генетические и спермиологические особенности мужчин с бесплодием.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их широкой известностью в области фундаментальной биологии размножения человека, клеточной биологии, цитологии и прикладной клинической эмбриологии, а также наличием соответствующих

научных публикаций в рецензируемых изданиях за последние 5 лет по тематике, близкой представленной к официальной защите диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем морфологического и молекулярно-генетического исследований решена актуальная научная задача – установлено влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на изменение подвижности и гиперактивации, а также морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека в условиях *in vitro*. **Разработана** новая идея, обогащающая научную концепцию о высокоспецифичной селекции сперматозоидов внутри женского репродуктивного тракта при естественном оплодотворении; на основе полученных результатов **предложен** новый метод отбора сперматозоидов с помощью дифференциального хемотаксиса *in vitro* для усовершенствования эмбриологического этапа программ вспомогательных репродуктивных технологий; **доказано**, что совместное культивирование мужских гамет с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости достоверно улучшает характеристики подвижности, гиперактивации и подготовку сперматозоидов к оплодотворению, и данные процессы напрямую зависят от возраста женщины; **введено** новое представление об особенностях взаимодействия внеклеточных везикул женщин разного репродуктивного возраста со сперматозоидами, а также, в составе внеклеточных везикул фолликулярной жидкости **впервые обнаружены** специфические молекулы, предположительно участвующие в активации капацитации, гиперактивации и подготовке сперматозоидов к оплодотворению в репродуктивных путях женщины.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что полученные данные комплексного клинико-морфологического и молекулярно-генетического исследования расширяют понимание не только процессов оплодотворения человека на клеточном и молекулярном уровне, но и снижения репродуктивного потенциала с возрастом. Кроме того, полученные фундаментальные биологические данные могут быть

использованы для формулирования новых научных гипотез и внедрения в клиническую практику.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы комплексы существующих базовых методов исследования, в том числе морфологические, цитологические, морфометрические, метаболомные (анализ протеома и липидома внеклеточных везикул), молекулярно-генетические, статистические. **Изложены** доказательства, что классические методы подготовки спермы (swim up и центрифугирование в градиенте плотности) недостаточно эффективны для получения популяций сперматозоидов с наиболее высоким оплодотворяющим потенциалом, так как выделение только живых и подвижных сперматозоидов не является физиологическим и не моделируются строгими процессами отбора сперматозоидов в женских репродуктивных путях; **представлены и научно обоснованы** новые данные об особенностях взаимодействия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости с мужскими половыми клетками, **выявлен** характер и механизм взаимодействия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости с мембраной сперматозоида, а также **установлено** достоверное изменение характера их подвижности и гиперактивация. Впервые **проведена комплексная оценка** значимых характеристик (концентрации и размеров), липидного и протеомного состава внеклеточных везикул и их изменения, связанные с возрастом женщины, которые в свою очередь, могут влиять на взаимодействие со сперматозоидами и приобретение ими оплодотворяющей способности в маточных трубах; **проанализированы** миРНК (*mir-21-5p*, *mir-888-5p*, *mir-424-3p*, *mir-214-3p*, *mir-190b5p*, *mir-134-5p*), играющие значимую роль в функционировании и возрастных изменениях репродуктивной системы женщин. **Впервые установлено**, что прогестерон, главный хемоаттрактант сперматозоидов млекопитающих, может находиться в фолликулярной жидкости не только в свободном состоянии, но и связанным с везикулами; **проведена модернизация** существующего понимания фундаментальных процессов взаимодействия гамет, подхода к «выбору» ооцитом единственного

сперматозоида для оплодотворения и **разработаны** эффективные методы с использованием очищенных фракций внеклеточных везикул фолликулярной жидкости для улучшения исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий с мужским фактором бесплодия, приближенных к естественным условиям оплодотворения.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики: данные диссертационного исследования, доказывающие положительный эффект на морфофункциональные характеристики сперматозоидов человека (подвижность, гиперактивацию и приобретение оплодотворяющей способности) после совместного культивирования с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости, были обсуждены и успешно внедрены в практическую работу и образовательный процесс следующих высших учебных заведений и научно-исследовательских институтов: Отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель – профессор, д.м.н. Калинина Е.А.), Научно-образовательный центр ВРТ им. Фредерика Паулсена (директор Института репродуктивной медицины – д.м.н., профессор Назаренко Т.А.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» МЗ РФ (директор — академик РАН Сухих Г.Т.), ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» (руководитель отделения репродуктологии – член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор Краснопольская К.В.), ГБУЗ «ГБУ №31 им. академика Г.М. Савельевой» Департамента здравоохранения города Москвы (руководитель Центра вспомогательных репродуктивных технологий ГКБ №31 им. академика Г.М. Савельевой – д.м.н., профессор Яворовская К.А.).

Оценка достоверности результатов исследования выявила: использованы репрезентативные группы пациентов, а также современные методики сбора и анализа полученных результатов. Результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана их воспроизводимость, использованы современные приборы и специализированные программы:

автоматический клеточный анализатор CASA (computer-assisted sperm analysis) (MICROPTIC, Испания), фазово-контрастный микроскоп Leica Leitz DM1L (Leica Microsystems, Германия), ультрамикротом Reichert-Jung Ultracut E (Reichert Scientific, США), просвечивающий электронный микроскоп JEM-1011 (JEOL, Япония), оборудованного камерой Orius SC1000 W (Gatan, Inc., США), конфокальный микроскоп ZEISS LSM 710 (Zeiss, Германия), прибор для анализа траектории частиц NanoSightLM10 (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания), жидкостной хроматограф Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Германия), соединенный с масс-анализатором Maxis Impact qTOF с электрораспылительной ионизацией источником ионов (Bruker Daltonics, Германия), ВЭЖХ-система Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), соединенная с масс-спектрометром TIMS TOF Pro (Bruker Daltonics, США).

Статистическая обработка результатов исследования выполнена при помощи программ Microsoft Office Excel 2016 (США), Statistica 10.0. (StatSoft Inc., США).

Теория исследования построена на известных данных о том, что в репродуктивной системе внеклеточные везикулы играют важную роль в созревании мужских и женских гамет, процессах оплодотворения, эмбриогенезе и имплантации, и одной из важнейших функций внеклеточных везикул является транспорт биологически активных молекул: различных белков, липидов, мРНК и миРНК. Роль внеклеточных везикул в межклеточной коммуникации указывает на их прямое участие в дистантном взаимодействии гамет, механизмах привлечения яйцеклеткой сперматозоида, селекции наиболее перспективного сперматозоида, а также в молекулярных и структурных изменениях, происходящих в маточных трубах женщины *in vivo*; **идея базируется** на комплексном клинико-морфологическом, молекулярно-генетическом и метаболомном анализе внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин разных возрастных групп, специфике их взаимодействия со сперматозоидами человека и изменения их морфофункциональных

характеристик, приводящих к активации оплодотворяющей способности мужских гамет. **Использовано** сравнение собственных результатов с данными, полученными ранее другими исследователями и авторитетными рабочими группами в области клеточной биологии, биологии размножения и изучения участия и регуляторной роли внеклеточных везикул в организме млекопитающих, в том числе, человека, опубликованными в российских и зарубежных научных журналах. Анализировались публикации, посвященные изучению состава, функциям, участию в регуляторных и патологических процессах внеклеточных везикул, а также результаты современных морфологических, цитологических, гистологических и молекулярных исследований особенностей взаимодействия внеклеточных везикул с различными органами-мишенями, в том числе, в репродуктивной системе. **Установлено совпадение** части полученных результатов с данными, представленными в независимых источниках по изучаемой тематике, в частности, о влиянии внеклеточных везикул различных репродуктивных жидкостей на достоверное улучшение характеристик подвижности и оплодотворяющей способности сперматозоидов на экспериментальных животных моделях (мышей, кошачьих, крупного рогатого скота, лошадей, свиней).

Личный вклад соискателя состоит в анализе литературы и определении научной проблемы, планировании исследования, проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, статистическом анализе данных, интерпретации результатов и подготовке публикаций по выполненной работе.

В ходе защиты диссертации критических замечаний высказано не было. Соискатель Сысоева А.П. ответила на все задаваемые ей в ходе заседания вопросы.

На заседании 28 декабря 2023 г. диссертационный совет принял решение: за решение научной задачи – установление влияния внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на изменение подвижности и

гиперактивации, а также морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека в условиях *in vitro*, присудить Сысоевой А.П. ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки), участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 18, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель

диссертационного совета 24.1.204.02

член-корр. РАН, д.м.н., профессор

Людмила Михайловна Михалёва



Ученый секретарь

диссертационного совета 24.1.204.02,

к.б.н.

Тихонова Наталия Борисовна

«29» декабря 2023 г.