

УТВЕРЖДАЮ

Директор федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и
репродуктологии им. Д.О. Отта»,
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
_____ Коган И.Ю.
«30» _____ 2024 года



ОТЗЫВ

ведущей организации федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» о научно-практической значимости диссертации Савостиной Гузель Венеровны: «Оптимизация вспомогательных репродуктивных технологий на основании селективного переноса зуплоидного эмбриона с учетом профиля экспрессии малых некодирующих рибонуклеиновых кислот в культуральной среде эмбрионов», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология.

Актуальность темы выполненной диссертации

Одной из нерешенных задач репродуктивной медицины является повышение эффективности методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Частота наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) на сегодняшний день составляет 30 – 40% и не имеет тенденции к увеличению. Важнейшим условием для успешной имплантации в программах ВРТ является выбор эмбриона с оптимальным имплантационным потенциалом. Вместе с тем

существующие в настоящее время методы оценки качества эмбрионов не позволяют со достоверной уверенностью гарантировать наступление беременности и родов живым здоровым плодом.

В обычной клинической практике отбор эмбрионов для переноса по-прежнему основывается главным образом на морфологической оценке с многочисленными наблюдениями в течение развития эмбриона от пронуклеарной стадии зиготы до бластоцисты. Такие системы оценки слабо коррелируют с частотой наступления беременности. Хотя морфологическая оценка признана в высшей степени субъективной, произвольной и неудовлетворительной, она быстра, неинвазивна, проста в проведении в рутинной практике и действительно позволяет исключить те эмбрионы, которые имеют самый неблагоприятный прогноз на имплантацию. Дополнительным методом оценки качества эмбриона является оценка его генетического статуса с использованием метода ПГТ-А. Выполнение преимплантационного генетического тестирования эмбриона – научно обоснованно и несомненно результативно.

Первая успешная попытка преимплантационной генетической диагностики, проведенная в 1990 году, включала анализ только половых хромосом и совершила настоящий бум в сфере репродуктивной медицины. По мере непрерывного усовершенствования методов генетической диагностики стало возможным проведение преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на анеуплоидии (ПГТ-А) по всем хромосомам. В настоящее время ПГТ-А является единственным методом, позволяющим с высокой диагностической значимостью идентифицировать анеуплоидные эмбрионы в рутинной клинической практике ВРТ. Согласно утвержденным клиническим рекомендациям показаниями к ПГТ-А являются: старший репродуктивный возраст женщины, привычное невынашивание беременности, повторные неудачные попытки имплантации и тяжелая патозооспермия у партнера. Однако, результаты программ ЭКО с ПГТ-А в данных группах пациентов неоднозначны. Несмотря на то, что плоидность

эмбрионов является одним из главных предикторов имплантационного потенциала эмбрионов, значительная часть эуплоидных эмбрионов не имплантируется в полость матки. Возможно, причина кроется в инвазивной технике биопсии трофэктодермы или получении ложных результатов, в связи с высокой частотой хромосомного мозаицизма в эмбрионах человека. Тем не менее последние фундаментальные исследования демонстрируют, что раннее эмбриональное развитие и способность эмбриона к имплантации определяется не только нормальным хромосомным набором, но и сложнейшей эпигенетической регуляцией, в рамках которой важные функции выполняют малые некодирующие РНК, а именно: поддержание стабильности генома, регуляция материнско-зиготического перехода, деления и дифференцировки клеток в процессе эмбриогенеза и др. На сегодняшний день крайне мало исследований направленных на изучение особенностей экспрессии эмбрионами малых некодирующих РНК как потенциальных маркеров компетентности бластоцисты. Тогда как поиск перспективного прогностического метода оценки имплантационного потенциала эмбрионов является чрезвычайно актуальным. На фоне стремительно развивающихся «омиксных технологий» анализ профиля малых некодирующих РНК в культуральных средах эмбрионов может способствовать пониманию механизмов эпигенетической регуляции раннего эмбриогенеза, оптимизировать селективный перенос и улучшить исходы программ ВРТ.

Все вышеизложенное легло в основу настоящего исследования Савостиной Г.В., направленного на изучение новых неинвазивных маркеров плоидности и имплантационного потенциала эмбрионов, а именно малых некодирующих РНК в культуральной среде бластоцист.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертационной работы Савостиной Г.В. заключается в разработке вспомогательного неинвазивного метода оценки генетического статуса и имплантационного потенциала эмбрионов по уровню экспрессии определенных комбинаций малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбрионов. Проанализирован профиль экспрессии пивиРНК в культуральных средах эмбрионов с различным хромосомным статусом и исходами программ ВРТ. Идентифицированы пивиРНК, статистически значимо коррелирующие с плоидностью и имплантационным потенциалом эмбрионов. Представлены актуальные данные о частоте образования анеуплоидных эмбрионов в различных группах пациентов, продемонстрированы особенности структуры анеуплоидий у женщин старшего репродуктивного возраста по сравнению с пациентами остальных групп. По результатам сравнительного анализа исходов программ ЭКО/ICSI с ПГТ-А и без ПГТ-А определено влияние результатов ПГТ-А на исходы программ ВРТ у женщин старшего репродуктивного возраста, пациенток с привычным невынашиванием беременности, женщин с повторными неудачными попытками имплантации и супружеских пар с тяжелыми нарушениями сперматогенеза.

Достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций

Достоверность научных выводов, положений и рекомендаций, сформулированных в диссертации, обусловлена адекватно построенным дизайном исследования, достаточным количеством клинического материала и не вызывает сомнений. Методы исследования, использованные в работе, современны, адекватны поставленным задачам и высокоинформативны. Обработка данных и интерпретация результатов, полученных в ходе

исследования, произведена с использованием современных методов статистического анализа, включая построение прогностических моделей с использованием программы RStudio путем поэтапного включения и исключения мнкРНК-предикторов качества эмбриона в соответствии с их вкладом в модель.

Результаты молекулярно-биологических исследований получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов, использованы современные приборы и специализированные программы анализа: выделение мнкРНК из образцов культуральных сред эмбрионов колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen), идентификация всех имеющихся пивиРНК в образцах культуральных сред эмбрионов проводилась методом глубокого секвенирования, валидация данных секвенирования – методом количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. ПГТ-А эмбрионов проводили методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения (англ. next generation sequencing, NGS) с использованием наборов ReproSeq (Thermo Fisher Scientific, США).

Положения, выносимые на защиту, научно обоснованы, в полной мере соответствуют цели и задачам. Выводы и практические рекомендации закономерно вытекают из задач и результатов, полученных на каждом этапе исследования.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки
Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология (п. 1, п. 4).

Значимость полученных результатов для науки и практики

Научная значимость диссертационной работы Савостиной Г.В. заключается в идентификации ключевых маркеров плоидности и

имплантационного потенциала эмбрионов по уровню экспрессии пивирНК в культуральной среде эмбрионов. Белковые продукты выявленных пивирНК не только контролируют стабильность генома, за счет подавления активности «прыгающих генов», но и регулируют формирование веретена деления, а значит правильное расхождение хромосом к полюсам клетки во время клеточного деления. Именно правильная сегрегация хромосом/хроматид в процессе митотического и мейотического делений обеспечивают нормальный хромосомный набор дочерних клеток. В рамках настоящего исследования показано, что у женщин старше 35 лет частота анеуплоидных эмбрионов не просто значительно превышает показатели женщин остальных групп, но и сама структура анеуплоидий свидетельствует о более выраженных нарушениях сегрегации хромосом, которые в большинстве своем представляют множественные нарушения по 3-м и более хромосомам.

Практическую значимость диссертационной работы определяют разработанные модели логистической регрессии, позволяющие идентифицировать эмбрионы с нормальным хромосомным набором, а также дифференцировать эуплоидные эмбрионы по их способности к имплантации. Специфичность данных моделей составляет 93% и 100%, что указывает на их высокую диагностическую значимость. Разработанный прогностический метод оценки качества бластоцисты отвечает основополагающим критериям, а именно: высокая разрешающая способность, неинвазивность, стабильность биомаркеров в окружающей среде, оптимальная трудоемкость и стоимость технологического процесса. Предложенный алгоритм оценки качества эмбрионов позволяет оптимизировать селективный перенос эмбриона, основываясь на данных результатов ПГТ-А и эпигенетических РНК-маркеров и выбрать наиболее перспективный для переноса эмбрион.

Структура и оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционной схеме, изложена на 171 странице компьютерного текста, иллюстрирована 17 таблицами и 10

рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, выводов и практических рекомендаций, а также списка сокращений. Библиографический список включает 264 источника литературы, 23 отечественных и 241 зарубежных. Оформление диссертации соответствует требованиям ВАК РФ.

Во введении научно обоснована актуальность и обозначена степень разработанности избранной темы, обоснованы цель и задачи, изложена научная новизна и практическая значимость работы, методология и методы исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту. Описан личный вклад автора, внедрение в клиническую практику и апробация полученных результатов.

Первая глава состоит из 4 подглав, проиллюстрирована 2 рисунками и традиционно включает обзор литературы «Современные методы оценки имплантационного потенциала эмбрионов в программах ВРТ». Подробно представлен анализ мировой литературы о проблеме выбора эмбриона с оптимальным имплантационным потенциалом. Основной акцент сделан на поиске потенциальных эпигенетических маркеров качества бластоцисты. Представленный обзор свидетельствует, что автор в полном объеме владеет изучаемой научной темой и демонстрирует способность к анализу и обобщению материала.

Вторая глава «Материал и методы исследования» состоит из 4 подглав, проиллюстрирована 2 таблицами. Представлены дизайн исследования, критерии включения и исключения, описаны методики клинических, эмбриологических, лабораторных и молекулярно-биологических методов исследования. Главу завершает описание методов статистического анализа.

Третья глава посвящена результатам собственных исследований и включает характеристику клинико-anamнестических и лабораторных

параметров включенных пациенток, анализ результатов ПГТ-А и исходов программ ВРТ с ПГТ-А и без ПГТ-А у женщин старшего репродуктивного возраста, пациенток с привычным невынашиванием беременности, повторными неудачными попытками имплантации и тяжелой патозооспермией у партнера. Приведены результаты анализа малых некодирующих РНК в культуральных средах эуплоидных эмбрионов с различным имплантационным потенциалом и анеуплоидных эмбрионов. Выявлены пивиРНК статистически значимо коррелирующие с плоидностью и имплантационным потенциалом бластоцист. Описаны функции белковых продуктов, выявленных РНК. Разработаны модели логистической регрессии для определения качества бластоцисты по уровню экспрессии профиля малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбрионов. Глава проиллюстрирована 8 рисунками и 16 таблицами.

Четвертая глава «Обсуждение» является аналитическим итогом диссертационной работы. Детально представлены собственные результаты, проведена оценка с клинических позиций, сопоставление с данными и мнением других авторов. Глава изложена в дискуссионном плане с корректными ссылками на литературные источники.

Представленные в **заключении** выводы и практические рекомендации закономерно вытекают из полученных данных и отражают задачи исследования. Объем исследований достаточен, полученные результаты достоверны, выводы обоснованы. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации и в полной мере отражает полученные результаты.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую работу научно-клинического отделения вспомогательных репродуктивных технологий им. Ф. Паулсена ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Теоретические положения, сформулированные в

диссертационном исследовании, могут быть использованы в учебном процессе системы высшего медицинского образования и последипломного образования, а также для разработки информационных материалов и продолжения научных исследований по специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология.

Заключение

Диссертационная работа Савостиной Гузель Венеровны на тему «Оптимизация вспомогательных репродуктивных технологий на основании селективного переноса эуплоидного эмбриона с учетом профиля экспрессии малых некодирующих рибонуклеиновых кислот в культуральной среде эмбрионов» является законченной самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, которая содержит новое решение научной задачи, актуальной для акушерства и гинекологии – прогнозирование результатов программ ВРТ на основании селективного переноса эмбриона по результатам ПГТ-А и профиля экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбрионов.

Диссертация Савостиной Гузель Венеровны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология, согласно пункту 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 26.10.2023г. №1786), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Отзыв о научно-практической значимости диссертации Савостиной Гузель Венеровны на тему «Оптимизация вспомогательных репродуктивных технологий на основании селективного переноса эуплоидного эмбриона с учетом профиля экспрессии малых некодирующих рибонуклеиновых кислот в культуральной

среде эмбрионов» заслушан, обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» «30» января 2024 (протокол № 2).

Заведующий отделом репродуктологии,
доктор медицинских наук
(3.1.4 – акушерство и гинекология),
профессор

 Тапильская
Наталья Игоревна

старший научный сотрудник
лаборатории раннего эмбриогенеза
отдела репродуктологии
кандидат биологических наук
(1.5.7 – генетика)

 Лесик
Елена Александровна

Подпись доктора медицинских наук, профессора Тапильской Н.И. и кандидата биологических наук Лесик Е.А. «заверяю»

Ученый секретарь
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»,
кандидат медицинских наук

 Пачулия
Ольга Владимировна

« 30 » января 2024 года



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

Адрес организации: 199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3

Телефон: +7 (812) 679-55-51

Адрес электронной почты: iagmail@ott.ru