

## ОТЗЫВ

143900, г. Балашиха,  
просп. Энтузиастов, д. 12  
официального оппонента доктора медицинских наук, профессора  
~~Рудаковой Елены Борисовны~~ на диссертационную работу Шаминой  
Марии Александровны на тему: «Оптимизация лечения бесплодия у  
пациентов с повторным отсутствием имплантации эмбриона на  
основании оценки профиля экспрессии малых некодирующих РНК»,  
представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских  
наук по специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология.

### Актуальность исследования

В настоящее время бесплодие считается глобальной проблемой здравоохранения, затрагивающей примерно 15% пар во всем мире. В связи со стремительным развитием вспомогательных репродуктивных технологий большинству бесплодных пар удается преодолеть бесплодие и достичь наступления беременности. При этом процент пар с неоднократными неудачными попытками ЭКО остается на достаточно высоком уровне. Одним из основополагающих факторов успеха программ ВРТ являются компетентные женские и мужские гаметы, обеспечивающие формирование и развитие качественного эмбриона. При отсутствии влияния вмешивающихся факторов, качество эмбриона влияет на вероятность наступления беременности и роды здоровым плодом. Определение качества гамет и эмбриона производится на основании визуальной оценки их морфологических качеств, что является недостаточно точным методом диагностики. В связи с этим ученые занимаются активным поиском маркеров качества гаметогенеза, а также оценкой их влияния на имплантационный потенциал эмбриона и вероятность наступления беременности. Среди значительного числа потенциальных маркеров, особое внимание уделяют малым некодирующим РНК, в частности микроРНК и пивиРНК. В многочисленных исследованиях было показано их влияние на фертильность пар, в связи с их непосредственным влиянием на протеомный профиль, а также их участием во многих клеточных процессах.



В последнее десятилетие ученые выявили ключевую роль малых некодирующих РНК в развитии и функционировании яичников. Взаимосвязь мнкРНК с различными доброкачественными гинекологическими патологиями, злокачественными новообразованиями женских репродуктивных органов подтверждается большим количеством научных работ. В связи с этим в последние годы исследователи начали изучать влияние данных молекул на нарушение оогенеза, а также их влияние на последующий эмбриогенез. Было показано, что малые некодирующие РНК дифференциально экспрессируются в фолликулярной жидкости у пациенток в зависимости от стадии развития ооцита, а также возраста пациенток. В ходе исследований было установлено, что ключевые малые некодирующие РНК в фолликулярной жидкости определяют дальнейшее формирование и созревание бластоцисты, а также ее морфологическую характеристику.

В последние годы всё чаще причиной не наступления беременности является мужской фактор, в связи с чем углубленное исследование состава семенной плазмы является достаточно перспективным направлением. В ряде последних исследований определена различная экспрессия малых некодирующих РНК на разных стадиях сперматогенеза, а также выявлены различия в профилях экспрессии малых некодирующих РНК при различных нарушениях сперматогенеза. В связи с этим ученые пришли к выводу, что изменение профиля экспрессии малых некодирующих РНК в семенной плазме может привести к нарушениям сперматогенеза и последующему аномальному развитию эмбриона.

Учитывая, что малые некодирующие РНК секретируются эмбрионами в их окружающую среду, изучение профиля данных молекул в культуральной среде для прогнозирования наступления беременности представляется актуальной задачей. Исследователями было показано, что малые некодирующие РНК регулируют функцию многих генов-мишеней, пониженная или повышенная регуляция которых в свою очередь может определять эмбриогенез. Роль мнкРНК в преимплантационном развитии



эмбриона от момента материнско-зиготического перехода до образования бластоцисты была подтверждена многочисленными исследованиями, которые указывают на динамический дифференциальный уровень экспрессии малых некодирующих РНК во время преимплантационного эмбриогенеза на различных этапах развития.

Исходя из вышеизложенного, актуальность темы диссертационного исследования, выполненного Шаминой М.А., представляет большой научный интерес. Поиск и изучение новых молекулярно-биологических маркеров бесплодия в группе пациенток с неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе является своевременным и актуальным, поскольку позволит усовершенствовать алгоритмы проводимых программ ВРТ с целью повышения их эффективности.

### **Достоверность полученных результатов**

Цель исследования сформулирована четко: «Индивидуализация программ вспомогательных репродуктивных технологий у бесплодных пар с неудачными попытками в анамнезе на основании оценки профиля экспрессии малых некодирующих РНК, регулирующих гамето- и эмбриогенез.» Цель достигается решением 6 задач в грамотно построенном проспективном сравнительном исследовании, проведенном в два этапа с достаточным для получения достоверных результатов количеством включенных в него пациентов и образцов биологического материала: на первом этапе- 108 супружеских пар, обратившихся по поводу бесплодия с трубно-перитонеальным и мужским фактором в отделение ВРТ и 103 образца фолликулярной жидкости, 52 образца эякулята и 135 образцов среды культивирования бластоцист- на втором этапе. Кроме стандартных клиничко-лабораторных и эмбриологических методов исследования пациентов и эмбрионов было проведено современное высокотехнологичное исследование молекулярно-биологического профиля фолликулярной жидкости, семенной плазмы и культуральной среды эмбрионов с определением экспрессии малых



некодирующих РНК. Статистическая обработка полученных результатов проведена на самом современном уровне с использованием скрипт, написанных на языке R, и программы RStudio с построением моделей логистической регрессии, PLS-DA и др. Все это позволяет не сомневаться в достоверности полученных результатов. В результате проведенного исследования получены новые данные важные как для науки, так и для практического здравоохранения.

### **Научная новизна**

Диссертационная работа Шаминой М.А. имеет безусловную научную новизну. В рамках диссертационной работы на достаточной выборке супружеских пар было изучено влияние малых некодирующих РНК на гаметогенез и последующий эмбриогенез в программах ВРТ.

Определены ключевые варианты малых некодирующих РНК, уровень экспрессии которых коррелирует с качеством оогенеза, сперматогенеза и имплантационным потенциалом получаемой бластоцисты хорошего/отличного качества.

Впервые представлен неинвазивный метод прогнозирования качества эмбриона и его имплантационного потенциала с использованием профиля экспрессии ключевых малых некодирующих РНК, секретлируемых в культуральную среду на стадии бластоцисты, и совпадающего с профилем малых некодирующих РНК фолликулярной жидкости и семенной плазмы.

### **Практическая значимость**

Диссертационная работа Шаминой Марии Александровны, помимо теоретического интереса, имеет важное практическое значение. На основании полученных результатов, автором был разработан алгоритм ведения бесплодных пар с неоднократными неудачными попытками ВРТ в анамнезе на основании сочетанного определения уровня экспрессии малых некодирующих



РНК в фолликулярной жидкости, семенной плазме и культуральной среде бластоцисты.

Разработанный алгоритм позволит оптимизировать программы ВРТ у пациентов с неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

Практические рекомендации являются перспективными для применения в клинической практике, широко используются врачами отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. Кулакова» Минздрава России.

### **Оценка содержания диссертации**

Диссертационная работа Шаминой М.А. изложена на 144 страницах компьютерного текста, имеет стандартную структуру, состоит из четырех глав (введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственного исследования), обсуждения, заключения, выводов и практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа написана доступным литературным языком и иллюстрирована 20 таблицами и 23 рисунками. Все разделы диссертационной работы содержат необходимые материалы, что отражает целостность и законченность проделанной работы. Список литературы включает 140 источников, среди которых 15 работ отечественных авторов и 125 работ зарубежных авторов. Диссертация выполнена на достаточном объеме выборки, статистическая достоверность полученных автором результатов не вызывает сомнений. Название диссертации точно отражает суть работы.

В литературном обзоре автором подробно описаны основные факторы бесплодия у супружеских пар, а также влияние таких эпигенетических факторов на развитие бесплодия, как малые некодирующие РНК. Особое внимание уделено непосредственному влиянию изменения профиля экспрессии данных молекул на качество оогенеза и сперматогенеза.



Глава 2 «Материалы и методы» посвящена описанию дизайна исследования. Представлены критерии включения/невключения и исключения в исследование, подробно изложены и описаны основные методы диагностики, использованные в диссертационной работе (общеклинические, инструментальные, лабораторные, включая метод глубокого секвенирования и количественной ОТ-ПЦР в реальном времени). Объем выборки достаточен, использованные в работе методы статистической обработки данных современны и не вызывают сомнений в достоверности полученных автором результатов.

В главе 3 «Результаты исследования» проведен анализ клинико-анамнестических данных пациенток, включенных в исследование, а также параметры эмбриологического этапа в циклах ВРТ у данных супружеских пар. Особое внимание уделено изучению влияния малых некодирующих РНК, обнаруженных в фолликулярной жидкости, семенной плазме и культуральной среде эмбриона, на гаметогенез, последующий эмбриогенез и, соответственно, репродуктивные исходы. Были выявлены ключевые малые некодирующие РНК, профиль экспрессии которых связан с качеством оогенеза и сперматогенеза. Установлено, что белковые продукты генов-мишеней данных малых некодирующих РНК участвуют в основных процессах раннего эмбриогенеза, четкая координация которых в клеточном пространстве и времени обеспечивает правильное развитие эмбриона. Дисбаланс уровня экспрессии выделенных мнкРНК может привести к нарушению биологических процессов, ведущих к формированию качественных эмбрионов. Полученные результаты позволили сформулировать алгоритм проведения программ ВРТ у бесплодных пар с неудачными попытками на основании уровня экспрессии малых некодирующих РНК в фолликулярной жидкости/семенной плазме и среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества.

В главе 4 «Обсуждение полученных результатов» автором проводится обобщение и обсуждение результатов диссертационной работы, сравнение с



данными современной литературы по изучаемой теме, где она показала свою эрудицию и великолепное владение материалом.

Диссертация содержит 6 выводов, которые четко и последовательно вытекают из основного материала, полностью отражают содержание диссертации, соответствуют поставленным задачам и определяют положения, выносимые на защиту.

Автореферат отражает основные положения диссертации, содержит актуальность и степень разработанности темы исследования, цель, задачи исследования, научную новизну и практическую значимость, методологию исследования, основные положения, выносимые на защиту. В автореферате подробно описаны материалы и методы исследования, изложены результаты диссертационной работы, выводы и практические рекомендации, представлен алгоритм проведения программ ВРТ у бесплодных пар с неудачными попытками в анамнезе, разработанный на основании полученных результатов.

По содержанию и оформлению диссертационной работы принципиальных замечаний нет. Общая оценка работы положительная.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Шаминой Марии Александровны на тему: «Оптимизация лечения бесплодия у пациентов с повторным отсутствием имплантации эмбриона на основании оценки профиля экспрессии малых некодирующих РНК», выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Калининой Елены Анатольевны и кандидата биологических наук Тимофеевой Анжелики Владимировны, является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором решена научная задача по изучению влияния малых некодирующих РНК на фертильность супружеских пар, вероятность наступления беременности и, как следствие, репродуктивные исходы.

Научная новизна, практическая значимость и достоверность полученных автором результатов исследования позволяет считать, что



диссертационная работа Шаминой М.А. соответствует требованиям пункта 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), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология.

**Официальный оппонент:**

Доктор медицинских наук,  
профессор,  
заслуженный врач РФ, профессор  
кафедры АГиП НЦ ФМБА  
им. А. И. Бурназяна ФМБА  
России, научный консультант  
отделения вспомогательных  
репродуктивных технологий ГБУЗ  
МО «Московский областной  
перинатальный центр»  
143900, Московская область,  
г. Балашиха, ш. Энтузиастов, д.12.  
Тел.8(498)520-10-95  
e-mail:doctor\_rudakova@mail.ru

Рудакова Елена Борисовна

28.12.2012

**Подпись д. м. н., профессора Е. Б. Рудаковой заверяю:**

Заместитель главного врача  
по кадрам ГБУЗ МО  
«Московский областной  
перинатальный центр»



Самбрицкая Татьяна Сергеевна

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной перинатальный центр» (ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр»)143900, Московская область, г. Балашиха, ш. Энтузиастов, д.12 Телефон 8 (495) 529-50-13. E-mail: morc02@mail.