

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических
наук Филатова Максима Алексеевича на тему:
«Культивирование овариальных фолликулов млекопитающих с целью
получения зрелых ооцитов»
по специальности: 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология»

Актуальность темы исследования.

Диссертационная работа Филатова Максима Алексеевича посвящена актуальной проблеме – разработке методов культивирования *in vitro* овариальных фолликулов и ооцитов млекопитающих и техники оценки их состояния.

В настоящее время медико-биологическая проблема возможности оценки состояния ооцитов и фолликулов, состояния фолликулярного пула (резерва) в яичниках у человека, у млекопитающих животных только начинает оцениваться как важнейшая практическая и теоретическая задача в медицине и в ветеринарии. Вследствие высокой частоты нарушений ооцит-фолликулярной системы (при патологии репродукции женского организма, у человека и млекопитающих животных), необходимость решения проблемы механизмов развития ее патологии, в том числе - определения негативных последствий факторов окружающей среды на ооцит-фолликулярный аппарат и через него на здоровье и жизнь плода и новорожденного, выходит на передний план репродуктологов и животноводов. Актуальность поставленной и решаемой темы не вызывает сомнения.

Согласно современным научным представлениям, проблема фертильности женского организма и ее аномалии имеют многофакторную этиологию, риск развития нарушений фолликулов и ооцитов включает многие причины. Наследственная предрасположенность к ним обусловлена мутациями и полиморфными вариантами целого ряда генов, а также -

межгенными взаимодействиями, которые реализуются в болезнь при определенных условиях внешней среды. Информация, накопленная в научной литературе, разнообразна и противоречива, что связано и с особенностями исследования данной проблемы у разных видов, в разных популяциях и группах, с различиями в критериях оценки и при формировании исследуемых выборок. С учетом высокой социальной, медицинской и биологической актуальности изучаемой соискателем проблемы, работа представляет несомненный интерес для медиков и биологов широкого профиля.

Цель исследования – разработать систему культивирования вторичных преантральных овариальных фолликулов *in vitro*, способную обеспечить рост фолликулов и получение зрелых ооцитов, а также разработать систему оценки качества ооцитов и фолликулов.

Цель исследования четко сформулирована и направлена на разработку техники культивирования фолликулов (и их ооцитов), определения критериев оценки состояния ооцитов (функционального, морфологического, по референсным генам).

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций очевидны. Гормональная стимуляция овуляции с последующей криоконсервацией ооцитов и затем – их размораживанием, оплодотворением *in vitro* и трансплантацией эмбриона женщине, или – криоконсервация ткани яичника с фолликулами с последующей их трансплантацией женщине - методы (подходы), имеющие клинические ограничения. М.А.Филатов обратился к возможности культивирования ткани яичника или единичных фолликулов для получения зрелых ооцитов, физиологически компетентных к оплодотворению, (имплантации) и дальнейшему развитию (на модели мышей линии C57Bl/6J, разного возраста). Автором получены данные, имеющие теоретическое и

практическое значение. Соискатель разработал систему культивирования овариальных фолликулов (мыши) *in vitro* в условиях трехмерного микроокружения в альгинатном гидрогеле, что позволило получать зрелые, способные к оплодотворению, ооциты. Разработаны также новые подходы к оценке эффективности культивирования *in vitro* фолликулов (и ооцитов), оценки уровня экспрессии ряда ключевых генов (методом количественной ПЦР в режиме реального времени), контролирующих формирование и функционирование ооцитов: кодирующих белки - субъединицы MPF-комплекса, некоторых элементов MAP-киназного пути, а также гена *ErbB* (кодируемый им белок участвует в регуляции трансляции в ооцитах).

С применением различных математических подходов Филатов М.А. получил новую информацию об оптимальных генах сравнения (референсные гены), функционирующих в ооцитах млекопитающих. Помимо методов световой и электронной трансмиссионной и растровой микроскопии, был применен метод цейтраферной микрофотосъемки с целью исследования состояния морфологии ооцитов после культивирования *in vitro* фолликулов яичника. Статистический анализ полученных соискателем данных был проведен с применением соответствующих критериев. Используемые соискателем методы исследования позволили получить уникальную информацию: о возможностях культивирования *in vitro* фолликулов и результатах детального анализа оценки морфологического, генного и функционального состояния ооцитов (после культивирования преантральных фолликулов *in vitro*).

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации и их достоверность.

Проблема функционирования женской фертильности относится к одной из первостепенных как в репродуктивной медицине, так и в ветеринарии, животноводстве. Выдвинутые Филатовым М.А. положения на защиту

обоснованы, что подтверждают выводы, имеющие теоретическое и практическое значение для репродуктивной биологии и медицины, для специалистов-репродуктологов. Соискателем разработан трехступенчатый протокол культивирования *in vitro* в альгинатном геле преантральных фолликулов мыши. Установлено, что в 74% случаев ооциты таких фолликулов возобновляют мейоз, и в 45% ооцитов выделяется редукционное тельце. У ооцитов, полученных из фолликулов, прошедших культивирование *in vitro* в альгинатном геле и ооцитов, аспирированных из фолликулов яичников неполовозрелых мышей выявлено: меньший диаметр и сниженную способность к созреванию, по сравнению с ооцитами, аспирированными от половозрелых мышей.

Отсутствует разница по уровню экспрессии генов, кодирующих белки - субъединицы MPF-комплекса между ооцитами от мышей трех экспериментальных групп (из фолликулов в культуре *in vitro*, от фолликулов половозрелых и неполовозрелых мышей). Выявлена разница по уровню экспрессии генов: *Erap*, *Ccnh* - ниже в ооцитах культивируемых фолликулов (в сравнении с таковыми из фолликулов половозрелых и неполовозрелых животных), уровень экспрессии гена *Mos* ниже в ооцитах от неполовозрелых мышей (по сравнению с половозрелыми). Результаты данной части исследования свидетельствуют о том, что выявление причин аномального развития ооцитов из фолликулов неполовозрелых мышей и ооцитов из культивируемых фолликулов *in vitro* могут способствовать дальнейшему совершенствованию техники культивирования фолликулов (и ооцитов) *in vitro*, что является фактором повышения возможности терапии infertility, связанной с нарушением динамики созревания ооцитов и их способности к оплодотворению.

Научные положения, выводы и практические рекомендации обоснованы и соответствуют материалам, представленным в диссертации.

Объем исследования представляется достаточным для получения статистически значимых результатов, а методическая часть соответствует основным требованиям, предъявляемым к научным исследованиям.

Автор использовал современные методы диагностики, наблюдения и статистической обработки данных. Исследование включало комплекс лабораторно-инструментальных, в том числе молекулярно-генетических исследований с использованием современных методов, в частности, анализа полиморфизма генов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Значимость результатов диссертации для науки и практики, возможные пути их использования

Представленная диссертационная работа имеет несомненный научный и практический интерес.

Полученные автором результаты вносят вклад в процесс накопления данных о динамике роста и созревания ооцитов в растущих фолликулах и участия определенных генов в развитии преовуляторных ооцитов в фолликулах, а также обеспечивают более глубокое понимание о вкладе определенных генов в развитие ооцита и фолликула.

Выявленные в работе ассоциации могут быть использованы в практике биомедицинских исследований, репродуктивной медицины, ветеринарии и животноводства, а также в образовательном процессе у студентов-медиков, биологов, ординаторов и специалистов с высшим медицинским и биологическим образованием для демонстрации возможности культивирования фолликулов и использования затем созревающих ооцитов в исследовательской и практической работе.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа Филатова Максима Алексеевича построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, главы

Материалы и методы, главы результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 16 информативными таблицами и 38 рисунками (в том числе - коробчатыми диаграммами), детально отражающими обсуждаемые в тексте вопросы. Использованная литература современна и включает 488 источников, в том числе 8 – русскоязычных и 480 - англоязычных.

Во **Введении**, занимающим 10 страниц текста, автором обоснована актуальность научного исследования, отражена степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи, отражена научная новизна, практическая и теоретическая значимость диссертационной работы, сформулированы положения, выносимые на защиту, отражены степень внедрения результатов исследования и сведения об апробации результатов исследования, публикациях по теме исследования, объеме и структуре диссертации, личном вкладе автора в работу.

В обзоре литературы, изложенном на 108 страницах текста, проведен анализ большого объема (488 публикаций) научной литературы по теме исследования, освещены вопросы о методах, используемых при осуществлении процедур по сохранению фертильности в женском организме, о распространенности изучаемых форм патологии, современные знания о структуре яичника, фолликулов и их микроокружения, ооцитов, классификация фолликулов, способах выделения овариальной ткани из организма, возможностях ее криоконсервации, культивирования *in vitro* (с детальным описанием разного типа сред) и сокультивирования, способов оценки эффективности этих методов, трансплантации овариальной ткани. Приведены сведения о регуляторных механизмах оогенеза и фолликулогенеза, о роли некоторых генов, вовлеченных в развитие и созревание ооцитов и фолликулов. Обзор выполнен на профессиональном уровне, что свидетельствует о компетентности соискателя по обсуждаемой в

работе теме, сложной и необходимой для успешного дальнейшего развития теории и практики репродуктивной медицины и биологии.

В главе 3 **Материалы и методы** приведено обоснование использования реактивов и оборудования при проведении данного исследования. Детально обосновано использование лабораторных мышей (линии C57BL/6J) разных возрастов и пола, приведено описание получения биоматериала для экспериментов (и овариальных фолликулов, и ооцитов на определенных стадиях их созревания, и сперматозоидов для ЭКО) и культивирование фолликулов и ооцитов (при использовании различных компонентных составов культуральной среды). Приведено описание молекулярно-биологического анализа используемых образцов, а также – технического использования цейтраферной микрофотосъемки и методов электронной микроскопии, статистической обработки полученных в исследовании результатов.

Глава 4 посвящена собственным **Результатам** исследования и **обсуждению**. Эта глава представляет основную часть работы.

В главе приведена характеристика состояния овариальных фолликулов, выделенных механическим способом. Отмечено, что при световой микроскопии не различимы клетки теки, окружающие фолликулы, но их присутствие необходимо, поскольку они способствуют осуществлению фолликулами синтеза гормонов. Подчеркивают технику выбора сред для выполнения культивирования овариальных фолликулов *in vitro*. Установлено, что в присутствии альгинатного гидрогеля создаются лучшие условия для развития и созревания ооцитов овариальных фолликулов. В главе приведены данные анализа состояния ооцита и фолликула и активность исследованных вариантов генов трех исследованных подгрупп.

При **Обсуждении полученных результатов** соискатель подробно анализирует и сопоставляет полученные данные, в том числе с таковыми других исследователей. В работе наглядно показано влияние на развитие изученных ооцитов и фолликулов (у мышей) их гормонального состояния

(половозрелые или неполовозрелые животные). Еще одним достоинством работы является разработанная математическая модель анализа данных, а также выявление участия некоторых генов в оогенезе и фолликулогенезе.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации. Автореферат оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует содержанию диссертации и дает полное представление об основных положениях диссертации.

Основные положения диссертации достаточно полно отражены в 16 научных работах, из которых 7 статей по теме диссертации опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus, PubMed) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М.В.Ломоносова по специальности 03.03.05 – Биология развития, эмбриология.

В целом, диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне, написана квалифицированно и аккуратно оформлена. Принципиальных замечаний по содержанию работы, положений и выводов нет. Встречающиеся в тексте опечатки единичны (например, стр.24. – «небольшие фолликулы»...). Тип фолликула следует указывать по соответствующей классификации: примордиальные, первичные, вторичные, и т.д. Все гормоны в тексте указаны на русском языке в сокращенном виде, при этом лютеинизирующий гормон везде указан латинскими буквами (LH).

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена

согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Филатов Максим Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор,

Главный научный сотрудник,

Лаборатория генетики нарушений репродукции

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»

Курило Любовь Федоровна

Контактные данные;

Тел.: 7(499) . e-mail: @med-gen.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.00.11 – Эмбриология и гистология

Адрес места работы:

115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1,

«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова»

лаборатория генетики нарушений репродукции

Тел.: 7(499) 6129869. e-mail: reprotlab@med-gen.ru

Подпись главного научного сотрудника ФГБНУ «МГНЦ» Курило Л.Ф.
удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ «МГНЦ имени академика Н.П.Бочкова»

Кандидат медицинских наук Воронина Екатерина Сергеевна

