

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

Вопрос сохранения женской фертильности является одним из краеугольных вопросов современных вспомогательных репродуктивных технологий. К сожалению, число различных онкологических и иных заболеваний, лечение которых подразумевает применение агрессивной терапии, влияющей на состояние половых клеток, велико. Таким образом, наиболее перспективными представляются методы, позволяющие изолировать половые клетки и их предшественники из тела пациентки на период лечения. Диссертационная работа Филатова Максима Алексеевича посвящена изучению возможности применения одного из методов по сохранению женской фертильности: культивированию овариальных фолликулов *in vitro* с последующим получением зрелых ооцитов. Главным преимуществом данного подхода является то, что все процедуры, связанные с получением зрелых ооцитов, происходят *in vitro*, то есть вне тела. Также системы культивирования овариальных фолликулов *in vitro* возможно использовать не только в качестве прикладных технологий, позволяющих получать ооциты для последующего оплодотворения, но также и в качестве тест-систем для определения воздействия различных веществ на процессы фолликуло- и оогенеза.

Научная новизна полученных результатов

В диссертационной работе Филатова М.А. рассмотрена новая трёхступенчатая система культивирования овариальных фолликулов в трёхмерной системе альгинатного гидрогеля. Применение данной системы позволяет получать зрелые, способные к оплодотворению ооциты.

В работе впервые был проведен комплексный анализ уровней экспрессии генов, отвечающих за протекание мейотического деления (*Ccnb*, *Cdk1*, *Ccnh*, *Wee2*, *Mos*), в ооцитах, полученных в результате культивирования овариальных фолликулов *in vitro*. Также были исследованы уровни экспрессии гена *Epub*, отвечающего за регуляцию трансляции в ооцитах и ранних эмбрионах млекопитающих.

Особую ценность представляет раздел работы, посвящённый выбору референсных генов в ооцитах. Данные об оптимальных референсных генах имеют большое значение как в контексте прикладных, так и фундаментальных исследований.

Использованные в работе методы микроскопии (световой, а также различных видов электронной микроскопии) позволили получить новые сведения о различиях в динамике мейоза в ооцитах, полученных *in vivo* и *in vitro*, а также о состоянии овариальных фолликулов до и после культивирования *in vitro*.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов

Результаты, представленные в работе, были получены с помощью актуальных методов исследования, соответствующих общемировому уровню. Так, в работе были использованы методы световой и электронной микроскопии (в частности, конфокальной, растровой и просвечивающей), был применён метод количественной ПЦР для определения референсных генов, а также уровней экспрессии ряда целевых генов в ооцитах мыши. Также был разработан комплексный подход с применением математических

методов анализа для определения оптимальных референсных генов в исследуемых образцах.

Полученные в ходе работы данные грамотно статистически обработаны с использованием соответствующих статистических критериев. Воспроизводимость представленных данных подтверждена в независимых экспериментах. Результаты проиллюстрированы с помощью рисунков и таблиц, статистически обработаны и не вызывают сомнений в их достоверности. По результатам работы опубликовано 10 статей в научных журналах, в том числе 7 из них опубликованы в рецензируемых журналах из списка международных баз цитирования, таких как Web of Science, Scopus и Pubmed. Результаты работы были представлены на международных конференциях.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации.

Автореферат оформлен в соответствии с принятыми требованиями, соответствует содержанию диссертации и в полной мере раскрывает основные положения диссертации.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и включает в себя семь разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Работа изложена на 255 страницах, содержит 16 таблиц, 38 рисунков. Представлен внушительный список литературы, состоящий из 488 источников (8 русскоязычных и 480 иностранных).

В главе «Введение» содержатся главы, посвящённые актуальности работы, новизне. Также в данной главе приведены необходимые сведения:

сформулированы цель и задачи работы, указаны положения, выносимые на защиту.

В главе «Обзор литературы» представлен обширный анализ данных литературы по теме исследования. В обзоре литературы затронуты как классические работы конца и середины прошлого столетия, так и современные работы. В списке литературы указаны 27 работ, опубликованных за последние три года по тематике исследования. Таким образом, автор проделал значительную работу по изучению и обобщению данных литературы, иллюстрируя тем самым высокий уровень владения теоретическими аспектами исследования.

Особого внимания заслуживает раздел, посвящённый механизмам мейотического созревания ооцита, снабжённый наглядными схематичными иллюстрациями, что делает доступным понимание сложных молекулярных каскадов, происходящих в ооците при его созревании. Представленный обзор литературы в полной мере раскрывает актуальность поставленной проблемы и иллюстрирует научную значимость исследования.

В главе «Материалы и методы» приведены подробные описания поставленных экспериментов, ясно описаны процедуры выделения овариальных фолликулов, их инкапсуляции в альгинатный гидрогель, а также варианты культивирования образцов *in vitro*. Подробно описаны протоколы окрашивания и подготовки проб для молекулярно-биологического анализа. Особого внимания заслуживает применение автором метода цейтраферной микрофотосъёмки ооцитов для наблюдения за процессами мейотического созревания в яйцеклетках.

Глава «Результаты и обсуждение» представляет собой тщательно выполненный анализ всех этапов работы. В данном разделе автор подробно разбирает этапы культивирования фолликулов и ооцитов на морфологическом, цитологическом и молекулярно-генетическом уровнях, что позволяет получить комплексную картину происходящих событий, происходящих при созревании ооцитов *in vivo* и *in vitro*.

В главе «Заключение» автор подводит итог выполненного исследования, а также приводит дальнейшие перспективные направления развития данной сферы науки. Выводы, сделанные в ходе исследования, полностью соответствуют поставленной цели и задачам. Положения, выносимые на защиту, убедительно подтверждены результатами диссертационного исследования.

Принципиальных замечаний по работе нет, она выполнена на высоком научном уровне и структурированно написана. Встречающиеся в тексте работы опечатки и неточности в оформлении единичны. Необходимо отметить некоторые наиболее значимые из них. Например, на страницах 51-52 приводится описание уровней экспрессии ряда генов в образцах: «...наблюдается избыточное увеличение экспрессии таких генов как *Star* (регулирующего внутриклеточный транспорт холестерина, необходимого для синтеза половых гормонов), *Cyp11a1* (отвечающего за превращение холестерина в прегненолон), *Hsd3b1*...», в данном случае наименования генов необходимо приводить курсивом. Также в ходе работы была использована базовая среда для культивирования клеток – α MEM, также эта среда многократно упоминается в разделе «Обзор литературы», однако ни в тексте, ни в списке сокращений не приводится полная расшифровка данной аббревиатуры: α -Minimal Essential Medium.

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 медицинских наук,
руководитель отделения
репродуктологии

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Краснопольская Ксения Владиславовна

07.11.2019

Контактные данные:

тел.: 7(495) , e-mail: [@gmail.com](#)

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

14.00.01 – Акушерство и гинекология

Адрес места работы:

101000, г. Москва, улица Покровка, 22 А

«Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», отделение репродуктологии

Тел.: 7(495)9804029; e-mail: [deti222@mail.ru](#)

Подпись сотрудника

ГБУЗ МО «МОНИИАГ»

Краснопольской К.В. удостоверяю:

*Уполномоченный секретарь
ГБУЗ МО МОНИИАГ*



И.Г. Макарьев

07.11.2019