

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Кузьминой Татьяны Ивановны на диссертационную работу Рагаевой Дианы Сергеевны «Влияние вспомогательных репродуктивных технологий на постнатальный онтогенез гипертензивных крыс линии НИСАГ», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность избранной темы. Стремительно ворвавшиеся в конце прошлого века в практику биомедицины, животноводство, ветеринарию эмбриотехнологии, явившиеся результатом углубления фундаментальных исследований в области физиологии, генетики, клеточной биологии и разработки оборудования последнего поколения позволили подойти к решению важнейших проблем репродуктивной медицины, получению элитных особей в животноводстве, созданию криобанка гамет для сохранения генофонда млекопитающих. Вспомогательные репродуктивные технологии играют важную роль в решении проблем бесплодия у человека, а также определяют успех в эффективном развитии животноводства, поскольку они позволяют значительно увеличить количество особей с выдающимися хозяйственно-полезными признаками. Помимо этого клеточные технологии в сочетании методами клонирования, трансгенеза, в том числе редактирование генома, обещают модернизировать этапы репродуктивных технологий у различных видов животных. Знание фундаментальных основ репродукции млекопитающих позволяет использовать накопленный в этой области опыт и сконцентрировать усилия исследователей на познании механизмов регулирования процессов, детерминирующих фертильность особей, решение которых обеспечит дальнейшее совершенствование биотехнологий репродукции. Более чем 40-летний опыт использования вспомогательных репродуктивных технологий у человека, включающих многоступенчатую технологию экстракорпорального созревания ооцитов, их оплодотворение, культивирование полученных эмбрионов и их пересадка позволил кардинально подойти к решению

проблемы мужского и женского бесплодия и получить многомиллионное потомство. Известно, что материнская и неонатальная заболеваемость и смертность у пациенток, прибегших к зачатию с помощью ВРТ, значительно выше, чем при обычном зачатии. В обзоре, представленном в этом году Chih et al. (BMC Pregnancy and Childbirth.2021, 21:449, Department of Public Health Sciences, Queen's University, Ontario,), проведен мета анализ 405920 беременностей с учетом различных показателей патологии и убедительно доказано, что беременность после ЭКО / ИКСИ имеет высокий риск патологий, а последствия ВРТ могут отражаться на уровне показателей артериального давления. Однако, до настоящего времени, исследований отдаленных последствий применения репродуктивных технологий (ЭКО, ИКСИ, генотипирование эмбрионов) на реализацию генотипа в онтогенезе, формирование фенотипа потомства, что особенно важно для медицины, недостаточно. Особенно следует отметить малое число исследований механизмов реализации эффектов ВРТ на проявление гипертензивного фенотипа. Неадекватные *in vivo* условия экстракорпорального созревания ооцитов, их оплодотворения и культивирование доимплантационных эмбрионов могут провоцировать нарушение процессов эпигенетического программирования и приводить к изменениям фенотипа потомков. Т.о., обоснованно выбранная автором модель для исследования (линия гипертензивных крыс НИСАГ - наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия) и четко поставленные диссертантом задачи, в ракурсе обозначенных выше проблем, определили высокую актуальность диссертационной работы Д.С. Рагаевой, как для фундаментальной науки, так и для решения в дальнейшем практических задач.

Научная новизна исследований. При выполнении диссертационной работы автором были получены новые результаты, значительно дополняющие имеющиеся знания в исследуемой области.

В работе впервые получено потомство крыс линии НИСАГ, развившихся из эмбрионов, прокультивированных в синтетических средах и

подвергшихся процедуре эмбриотрансфера. У полученного потомства было исследовано формирование неонатальных рефлексов, которое в целом не отличалось от такового у крыс НИСАГ, рожденных без применения технологий, однако у взрослых потомков отмечены отличия поведенческих признаков, в т.ч. снижение локомоторной и исследовательской активности. Выявлено снижение плотности нейронов в областях CA2 и DG гиппокампа у крыс, рожденных из культивированных *in vitro* эмбрионов.

В результате скрупулезного исследования автором обнаружено, что краткосрочное культивирование эмбрионов от стадии морулы до стадии бластоцисты в течение 24 часов приводило к достоверному снижению показателей систолического АД у самцов крыс линии НИСАГ в возрасте трех месяцев; эффект сохранялся на протяжении как минимум двух месяцев, а в возрасте пяти месяцев медианная величина систолического АД у самцов НИСАГ оказалась ниже гипертензивного порога.

Проведен сравнительный мониторинг показателей артериального давления беременных самок линий НИСАГ и WAG, а также впервые охарактеризованы особенности фертильности линий и раннего постнатального развития потомков, выявлены характерные черты поведения, присущие крысам линии НИСАГ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют имеющиеся знания о влиянии условий культивирования эмбрионов на фенотип потомства, а именно, на становление гипертензивного фенотипа на примере крыс линии НИСАГ. Кроме того, в диссертационной работе Д.С. Рагаевой охарактеризованы те периоды этапы онтогенеза крыс НИСАГ, которые ускользали из поля зрения исследователей, а именно – неонатальный период, а также, собственно беременность, что имеет практическое значение в плане характеристики этой модели гипертензии, а также теоретическое значение для понимания формирования гипертензивного статуса в свете гипотезы DOHaD (developmental origins of health and disease)

Важным как теоретическим, так прикладным результатом, является выявление феномена снижения систолического АД у крыс, подвергшихся экстракорпоральному культивированию в доимплантационный период, что обуславливает необходимость и возможность исследования механизмов эпигенетической регуляции АД в раннем онтогенезе при использовании предложенной автором модели.

Практическим результатом является получение новых оригинальных данных о влиянии этапов репродуктивных технологий (культивирование преимплантационных эмбрионов) на формирование гипертензивного фенотипа, которые могут внести вклад в разработку новых подходов к снижению рисков развития гипертонической болезни, в т.ч. и при моделировании состава сред, используемых в процедурах ЭКО.

Общая характеристика работы, завершенность и качество ее оформления. Диссертационная работа Д.С.Рагаевой логично построена, текст грамотно изложен, включает введение, обзор литературы, главу, в которой представлено описание материалов и методов исследования, главу с изложением собственных исследований, обсуждения результатов, выводы и библиографический список. Список цитированной литературы включает 293 источника, из них 38 отечественных. Работа изложена на 102 страницах печатного текста, иллюстрирована 18 рисунками и 3 таблицами.

Во введении имеются все необходимые подразделы, представлена актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, четко отражена научная новизна исследования, его теоретическая и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту, приводятся сведения об апробации работы.

Литературный обзор достаточно полно охватывает имеющиеся публикации в рамках тематики исследования, согласно поставленным задачам, информативен, хорошо структурирован, включает таблицу, иллюстрирован 4 рисунками, что способствует лучшему восприятию текста обзора и свидетельствует о высокой профессиональной подготовке автора.

Во второй главе диссертации детально описаны дизайн экспериментов и особенности применения в работе эмбриологических и физиологических методов исследования. По описаниям в данном разделе можно заключить, что работа была проведена с использованием комплекса методов на современном оборудовании, что значительно повысило информативность и достоверность полученных автором результатов. В диссертационной работе использованы адекватные методы статистического анализа, которые позволили выявить достоверные различия между ранжированными группами по ряду физиологических и поведенческих характеристик.

В третьей главе описаны результаты исследования по разделам. В разделе 3.1 приведено межлинейное сравнение гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс WAG по ряду параметров: репродуктивным характеристикам, артериальному давлению, поведению и плотности нейронов в гиппокампе. В разделе 3.2 приведено сравнение динамики артериального давления во время беременности у гипертензивных и нормотензивных крыс. В разделе 3.3 описываются результаты экспериментов по применению ВРТ на модели гипертензивных крыс НИСАГ. Разделы главы 3 иллюстрированы рисунками и таблицами. Полученные результаты убедительно демонстрируют наличие полученного фактического материала.

Грамотный анализ экспериментальных данных обосновывает формирование научных положений и выводов, позволяет идентифицировать новизну исследования.

В обсуждении в краткой форме изложен анализ собственных результатов, проведено их сравнение с литературными данными, сделаны необходимые обобщения. Работа завершается выводами, которые носят конкретный характер, опираются на анализ данных и соответствуют результатам.

Автореферат написан по требуемой форме, содержит всю необходимую информацию и соответствует содержанию диссертации.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций. Достоверность и обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в работе не вызывает сомнений и подтверждается достаточным количеством экспериментальных животных, грамотным формированием экспериментальных групп, в соответствии с задачами исследования, для оценки физиологических параметров в динамике онтогенеза (артериальное давление); и комплексом современных методов исследований, включающих сочетание эмбриотехнологических и физиологических методик.

Результаты, представленные в диссертации Д.С. Рагаевой, обсуждены на трех научных конференциях, автором опубликовано 6 научных статей в рецензируемых отечественных и международных журналах, входящих в базу данных Web of Science и Scopus.

Замечания по диссертационной работе

Принципиальных замечаний к диссертации и автореферату не имеется.

В качестве научной дискуссии, хотелось бы услышать аргументацию автора: чем обусловлен выбор в качестве линии для исследования крыс конкретно с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией?

Автор также указывает, что в работе были использованы животные SPF-статуса. Чем автор объясняет преимущества использования животных SPF-статуса при проведении исследований?

Желательно, чтобы автор резюмировал завершение исследования, тезисно представив свое видение перспектив дальнейшей разработки темы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Д.С. Рагаевой ««Влияние вспомогательных репродуктивных технологий на постнатальный онтогенез гипертензивных крыс линии НИСАГ», выполненная под руководством доктора биологических наук Амстиславского Сергея Яковлевича и представленная на

соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология - является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение задач, имеющих важное значение для репродуктивной медицины – получены новые фундаментальные знания о влиянии репродуктивных технологий на формирование гипертензивного фенотипа, которые могут внести свой вклад в разработку новых подходов к снижению рисков развития гипертонической болезни. По актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности основных положений, представленных результатов и сделанных на их основе выводов диссертационная работа отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г., с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ №335 от 21 апреля 2016 г. «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней» предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор,
Главный научный сотрудник,
Заведующая лабораторией биологии развития
ВНИИГРЖ – филиала ФГБНУ
«ФИЦЖ– ВИЖ им. Л.К. Эрнста»

Т.И. Кузьмина

Подпись Кузьминой Т.И. заверяю

Подпись: <i>Кузьмина Т.И.</i>
заверяю ученый секретарь ВНИИГРЖ
<i>Мирошникова О.В. (Мирош)</i>
Подпись

20.09.2021г.