

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертационной работе Рагаевой Дианы Сергеевны на тему « **Влияние вспомогательных репродуктивных технологий на постнатальный онтогенез гипертензивных крыс линии НИСАГ**», представленную в диссертационный совет Д 001.014.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.03.01 – физиология**

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) широко используют как на лабораторных животных для создания криобанков гамет и эмбрионов, трансгенных линий, получения эмбриональных стволовых клеток и других экспериментальных целей, так и в медицине для лечения бесплодия у человека. Однако, исследований отдаленных последствий применения таких технологий на формирование фенотипа потомства, что особенно важно для медицины, недостаточно. Что касается исследований влияния ВРТ на проявление гипертензивного фенотипа, то таких работ еще меньше. Неоптимальные условия оплодотворения и культивирования вне материнского организма могут привести к нарушению процессов эпигенетического программирования и привести к стойким изменениям фенотипа потомков. Оценка состояния здоровья детей, рожденных в программах ВРТ, является сложной задачей. В связи с этим, моделирование ВРТ на лабораторных животных является уникальным инструментом для удаления искажающих факторов и подбора оптимальных контрольных групп.

В современном мире все более ярко проявляется тенденция к откладыванию материнства на более поздние сроки, при которых возрастает частота проявлений хронических заболеваний, в частности, гипертонической болезни (ГБ). Линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) была выведена с целью исследования связи генетических факторов и факторов окружающей среды, в особенности эмоционального стресса. На крысах линии НИСАГ и крысах линии Wistar

ранее проводились эксперименты по эмбриотрансферу, в которых было показано замедление развития артериальной гипертензии (АГ) и ее смягчение при переносе эмбрионов от гипертензивной линии реципиенту с нормальным артериальным давлением (АД). Однако, влияние культивирования эмбрионов исследовано не было.

Таким образом, диссертационная работа Рагаевой Дианы Сергеевны, посвященная изучению влияния ВРТ на потомков в ходе их постнатального онтогенеза на модели гипертензивных крыс линии НИСАГ, является весьма актуальной и оригинальной. Задачи исследования полностью соответствуют заявленной цели, а используемые методы адекватны.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Научная новизна представленной работы не вызывает сомнения. В работе впервые была исследована динамика АД во время беременности у крыс НИСАГ, при этом было обнаружено снижение систолического АД к окончанию срока беременности. Впервые были исследованы созревание нейромоторных рефлексов и динамика массы тела в раннем постнатальном онтогенезе и показано, что крысы линии НИСАГ, характеризуются повышенной исследовательской и локомоторной активностью и сниженной тревожностью. Впервые было получено живое потомство крыс линии НИСАГ после культивирования эмбрионов *in vitro* и последующего переноса эмбрионов реципиенту. Исследовано влияние переноса эмбрионов на физиологические и поведенческие признаки потомков: у потомков после переноса эмбрионов независимо от наличия или отсутствия культивирования наблюдался усиленный рост массы тела в раннем постнатальном онтогенезе по сравнению с потомками, воспитанными биологической матерью; при этом по достижении потомками зрелости, масса тела не отличалась между группами; формирование неонатальных рефлексов и реакций было модифицировано незначительно; локомоторная и исследовательская активность потомков, воспитанных суррогатной матерью, была снижена. Было показано, что плотность нейронов в областях CA2 и DG гиппокампа

была снижена у крыс, рожденных из культивированных *in vitro* эмбрионов. Показано, что краткосрочное культивирование эмбрионов в искусственной среде от стадии морулы до стадии бластоцисты в течение 24 часов достоверно снижало величины систолического АД у самцов крыс линии НИСАГ в возрасте трех месяцев и в возрасте пяти месяцев медианная величина систолического АД у самцов НИСАГ оказалась ниже гипертензивного порога (150 мм рт.ст.).

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты диссертационной работы Рагаевой Д.С. вносят существенный вклад в понимание механизмов влияния ВРТ на формирование гипертензивного фенотипа на примере крыс линии НИСАГ. Выявление феномена снижения систолического АД у крыс, эмбрионы которых на преимплантационной стадии культивировали *in vitro*, создает предпосылки к дальнейшему исследованию механизмов регуляции АД в раннем онтогенезе и может послужить разработке новых подходов к лечению и профилактике развития гипертонической болезни с использованием современных методов ВРТ. Результаты исследования включены в спецкурс «Репродуктивная биология и репродуктивные технологии», который читается для студентов бакалавриата факультета естественных наук Новосибирского Государственного Университета.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И ОБОСНОВАННОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Достоверность и обоснованность полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, подтверждены ее высоким научно-методическим уровнем. Работа с животными была выполнена на базе ЦКП «SPF-виварий ИЦиГ СО РАН», отвечающего международным стандартам GMP и GLP. В работе автором использован широкий набор современных

методов исследования. Для сравнительной оценки результатов автор использовала адекватные методы статистического анализа, применяла корреляционный и факторный анализ. Количество использованных животных достаточно для получения статистически значимых результатов.

Все изложенное выше позволяет считать, что представленные Рагаевой Д.С. результаты достоверны, а научные положения и выводы, в основу которых были положены полученные результаты, полностью обоснованы.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Представленная диссертация Рагаевой Д. С. состоит из классических разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы, список цитируемой литературы. Работа изложена на 102 страницах печатного текста, содержит 18 рисунков и 3 таблицы. Библиографический указатель литературы включает 293 источника, из них 38 отечественных и 255 зарубежных.

Обзор литературы разделен на три части и занимает примерно четверть объема диссертации. В первой части приводятся данные по эпидемиологии и патогенезу артериальной гипертензии, модели артериальной гипертензии на животных и дается подробная характеристика крыс линии НИСАГ. Вторая часть посвящена технологиям ВРТ для лечения бесплодия человека. Описаны история возникновения и особенности проведения экстракорпорального оплодотворения, интрацитоплазматической инъекции сперматозоида, отдаленные эффекты применения ВРТ. В третьей части приводится подробное описание влияния модификации материнской среды как инструмента изучения генетически обусловленных признаков на лабораторных животных. Обзор литературы содержит четыре рисунка и таблицу, производит хорошее впечатление и достаточно полно отражает современное состояние проблемы.

В главе 2 “Материалы и методы” приводится подробное описание животных и экспериментальных групп, используемые методы

репродуктивной биологии (вазэктомия, получение преимплантационных эмбрионов, культивирование эмбрионов *in vitro*, методы переноса эмбрионов в матку), методы экспериментальной физиологии и методы изучения поведенческих характеристик. Были использованы методы гистологического анализа мозга и иммуногистохимический метод изучения нейрогенеза в гиппокампе крыс. Отдельная часть посвящена использованным в работе статистическим методам анализа экспериментальных данных: использовались параметрические и непараметрические критерии: t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни; дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки для межгруппового сравнения; критерий Краскелла-Уоллиса с последующим апостериорным критерием Данна для межгруппового сравнения; анализ качественных признаков проводился через исследование их частот посредством таблиц сопряженности с использованием критерия согласия χ^2 (критерия Пирсона); при работе с малыми выборками применяли критерий Фишера.

Глава 3 «Результаты исследования» разбита на три части. Первая часть посвящена формированию гипертензивного фенотипа крыс линии НИСАГ, рожденных естественным путем. В ней последовательно описываются результаты сравнительного анализа крыс линий НИСАГ и WAG от рождения, 1-25 дней после рождения и взрослые животные (три месяца). Во второй части приведены результаты по влиянию повышенного артериального давления у крыс линии НИСАГ во время беременности на репродукцию. В третьей части главы представлены результаты применения репродуктивных технологий на формирование гипертензивного фенотипа крыс линии НИСАГ.

В главе 4 «Обсуждение результатов» проводится последовательный анализ полученных результатов, их сравнение с ранее полученными данными других авторов. Глава написана грамотным научным языком, понятно и позволяет проследить всю логику исследования.

В заключительной части диссертации автором сформулированы 4

вывода, которые логично и аргументировано следуют из анализа результатов выполненного научного исследования и полностью соответствуют поставленным задачам.

Материалы диссертационного исследования были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях. По результатам диссертации опубликованы 9 работ, включая 6 научных статей в рецензируемых российских и международных журналах, входящих в список журналов, рекомендованных ВАК, а также в международные базы данных Web of Science и Scopus. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Принципиальных замечаний по содержанию работы нет. Однако есть некоторые замечания редакционного характера, так, например разное написание сокращения систолического и диастолического АД в тексте диссертации (САД и ДАД) и в тексте автореферата (сАД и дАД), наличие некоторых несогласованных предложений и пропущенных запятых. Нумерация таблиц и рисунков должна быть сквозная по всему тексту диссертации. Однако, в главе 3 “РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ” нумерация начинается заново. Указанные замечания не повлияли на общее хорошее впечатление о данной работе.

Также, в порядке дискуссии, хотелось бы уточнить: 1) как проявляется генетическая предрасположенность к гипертензии при беременности; 2) есть ли специальные лабораторные модели животных для исследования гипертензии, вызванной беременностью?

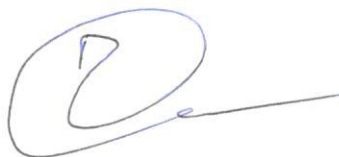
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Рагаевой Д. С. является законченной научно-исследовательской работой, выполненной на высоком методическом уровне. Полученные результаты являются новыми и оригинальными. Выводы хорошо обоснованы и соответствуют поставленным в работе задачам. Автореферат логично отражает основное содержание диссертации. Материал диссертации соответствует указанной специальности.

Таким образом, диссертация Рагаевой Дианы Сергеевны «**Влияние вспомогательных репродуктивных технологий на постнатальный онтогенез гипертензивных крыс линии НИСАГ**» по своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости полностью соответствует пунктам 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 N 748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024, от 01.10.2018 N 1168) предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности **03.03.01 – физиология.**

Официальный оппонент

Доктор биологических наук,
Заведующая лабораторией
Лазерной биофизики
ФГБУН Институт лазерной
физики СО РАН



О. П. Черкасова

630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева 15Б, Институт лазерной физики СО РАН,
e-mail: o.p.cherkasova@gmail.com, телефон: 8(965)823-11-92.

« 6 » сентября 2021 г.



Вед. учен. Оп

Зураф - Т.А. Зурафова
06.09.2021

