

«УТВЕРЖДАЮ»  
ВРИО директора  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института  
физиологии им. И.П. Павлова  
Российской академии наук  
д.б.н. Мошонкина Т.Р.



23 января 2024г.

**ОТЗЫВ**  
ведущей организации  
на диссертационную работу Становой Алии Константиновны  
«Влияние температуры инкубирования *in vitro* эмбрионов мышей на  
доимплантационное развитие и фенотип потомков»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.5. – физиология человека и животных  
(биологические науки)

#### **Актуальность темы исследования**

Изучение приспособительных реакций организма к условиям внутриутробной среды на преимплантационной стадии развития- новое и практически неисследованное направление физиологии адаптаций, возникшее в связи с распространением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), в частности, процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

В последние годы процедура ЭКО находит все большее применение в репродуктологии человека и используется в практике разведения лабораторных и сельскохозяйственных животных. Наряду с индивидуальными генетическими и физиологическими факторами риска родителей, сама процедура ЭКО может влиять на развитие потомков и приводить к негативным последствиям, о чем свидетельствует статистика заболеваемости у рожденных после применения ЭКО. К патологическим последствиям можно отнести пороки развития, генетические патологии, социально значимые заболевания, такие как диабет, сердечно-сосудистые и нейропсихические заболевания, нарушения обмена веществ и метаболический синдром.

Условия культивирования эмбрионов вне материнского организма на ранних доимплантационных стадиях являются критичными для последующего развития организма, поскольку в этот период происходят динамические изменения, репрограммирование генома и эпигенома, модификации протеома и метаболома. Несмотря на значительные усилия исследователей, направленные на приближение лабораторных условий культивирования к естественным, добиться этого достаточно сложно из-за необходимости учитывать множество динамичных факторов внутренней среды репродуктивных путей женского организма. Их тщательное исследование является актуальным и крайне важным для получения здорового потомства и устранения срочных и отдаленных негативных последствий.

Одним из ключевых и критических для развития на доимплантационном этапе факторов является температура, влияющая не только на протекание химических реакций и метаболические процессы, но и на состояние хроматина клеток развивающегося организма. При проведении процедуры ЭКО важно не просто поддерживать температуру внутренней среды на постоянном уровне, но учитывать градиент температур, соответствующий изменениям внутри материнского организма. Исследованию влияния градиента температур на целый ряд характеристик доимплантационного развития эмбрионов и морфофизиологические показатели потомков в возрасте от 3-х недель с использованием лабораторных животных - мышей аутбредной линии CD1 и посвящена чрезвычайно актуальная и востребованная работа А.К. Становой.

#### **Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации**

А.К. Станова впервые исследовала влияние разной температуры культивирования *in vitro* в первые 24 часа после оплодотворения с последующим переносом эмбрионов в стандартные температурные условия (37 °С) на их доимплантационное развитие и морфофункциональные характеристики в более поздние периоды онтогенеза (от 3-х до 24 недель постнатального развития), что позволило получить новые данные о характере изменений развития в результате процедуры ЭКО в зависимости от температурных условий доимплантационной стадии.

Автором разработан экспериментальный подход создания разного градиента температур при инкубировании эмбрионов в течение первых 24 часов после оплодотворения. Исследование А.К. Становой является первым, в котором были произведены эмбриональные подсадки самкам-реципиентам.

Впервые показано, что температура инкубации в первые 24 часа развития влияет на среднее число рожденных потомков в помете.

Выводы диссертационной работы являются новыми и расширяют представления о влиянии градиента температур на особенности доимплантационного развития эмбрионов и фенотип рожденных потомков.

**Теоретическая и практическая значимость результатов, полученных автором диссертации, рекомендации по использованию результатов и выводов**

Диссертационная работа А.К. Становой вносит несомненный вклад в развитие малоисследованного направления физиологии адаптаций- изучение приспособительных реакций организма к условиям внутренней среды на крайне чувствительной к внешним воздействиям доимплантационной стадии развития и отдаленных последствий этих влияний. Подобные исследования востребованы в настоящее время в связи с активным использованием процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), которая требует усовершенствования методов и условий культивирования эмбрионов во избежании негативных влияний на развитие и здоровье рожденных потомков.

Результаты диссертационной работы А.К. Становой расширяют представления о влиянии температурного градиента при инкубировании в первые 24 часа после оплодотворения на параметры доимплантационного развития,-скорости слияния пронуклеусов в зиготе и достижения эмбрионами 2-х, 4-х и 8-и клеточных стадий, морфологию доимплантационных эмбрионов, уровень общего метилирования ДНК, а также метаболический и энергетический фенотип потомков, что имеет как теоретическое так и практическое значение .

Результаты работы могут быть использованы для оптимизации протоколов ЭКО и практически реализованы при разведении лабораторных и сельскохозяйственных животных. Кроме того, полученные результаты должны привлечь внимание практикующих репродуктологов в центрах репродукции для исследования затронутых в диссертации вопросов у человека, поскольку



оплодотворение яйцеклеток и последующее культивирование эмбрионов *in vitro* в условиях эмбриологической лаборатории- ключевой этап ЭКО и у человека.

Теоретические выводы исследования могут быть использованы в курсах лекций и руководствах для студентов биологических и медицинских специальностей ВУЗов.

### **Структура, краткое содержание и общая оценка диссертационной работы**

Диссертационная работа Становой А.К. общим объемом 123 страницы построена по традиционному плану и включает следующие разделы: Введение (13 с.), Обзор литературы (31 с.), Материал и методы исследования (10 с.), Результаты (17 с.), Обсуждение результатов (16 с.), Выводы (5), Заключение (2 с.), Список сокращений (1 с.). Список использованной литературы (233 источника). Результаты представлены в 14 таблицах и на 19 рисунках.

Все экспериментальные исследования выполнены лично автором, их достоверность сомнений не вызывает.

Во введении представлено обоснование актуальности темы диссертационной работы, ее теоретическая и практическая значимость, научная новизна, сформулированы цель и задачи исследования, изложены основные использованные методы, приведены положения, выносимые на защиту, указаны конференции, на которых были доложены результаты работы и список публикаций по теме диссертации.

В обзоре литературы автор обстоятельно рассматривает вопросы, связанные с применением ВТР в медицине и в практике животноводства, описывает особенности протекания беременности при использовании подобных технологий, стадии доимплантационного развития эмбрионов и его основные параметры и характеристики (морфокинетические параметры, варианты дробления, соотношение внутриклеточной массы и трфэктодермы, энергетический метаболизм). Отдельный раздел посвящен дальнейшим стадиям развития и характеристикам фенотипа потомков после использования ВТР. Достаточное внимание в обзоре литературы уделено процессам эпигенетического репрограммирования. Подробно описаны условия культивирования эмбрионов и основные факторы, которые необходимо учитывать при проведении этого этапа ЭКО (состав культуральных сред, содержание газов, показатель кислотности pH, температурные условия). Обзор



свидетельствует о хорошем знании автором литературы по изучаемой проблеме, выстроен последовательно и логично.

Глава «Материал и методы» состоит из трех разделов. Первый содержит информацию о линии мышей, используемой в работе, условиях содержания животных. Во втором разделе достаточно подробно описаны схемы экспериментов и экспериментальные процедуры. В качестве методов получения эмбрионов были использованы экстракорпоральное оплодотворение и культивирование *in vitro*. Для исследования характеристик доимплантационных эмбрионов автор применяла методы Time-lapse микроскопии; дифференциального окрашивания бластоцисты и иммунофлуоресцентного окрашивания эмбрионов. Для получения потомков и изучения их морфофункциональных характеристик были использованы метод переноса эмбрионов в воронку яйцевода, используемый впервые, а также последующие стандартные процедуры взвешивания потомков и слежения за спонтанной активностью, потреблением воды, корма, кислорода, выделения углекислого газа, измерением дыхательного коэффициента. Представлено достаточно полное описание всех используемых в работе методов, включая статистические. Методы адекватны поставленным задачам и современны.

Глава «Результаты» хорошо структурирована и состоит из 9-ти разделов, иллюстрирована большим количеством таблиц и рисунков, включающих диаграммы и микрофотографии. В главе последовательно представлены результаты оценки всех исследуемых параметров преимплантационного развития эмбрионов, численные показатели рожденных потомков и показатели их веса от момента отъема от матерей до возраста 24 недели, характеристики их двигательной активности, метаболического и энергетического обмена. А.К. Станова убедительно продемонстрировала, что температурный градиент как от высоких значений к низким, так и обратный при инкубировании эмбрионов положительным образом влияет на определенные характеристики доимплантационного и последующего развития. Так, слияние пронуклеусов и достижение 2-х клеточной стадии происходило быстрее у эмбрионов группы 39 °С и было медленным у группы 35 °С. На более поздних стадиях развития средний уровень метилирования был значительно выше в клетках эмбрионов групп 35 °С и 37 °С, по сравнению с альтернативными. Было бы интересно в дальнейшем выявить, в каких именно генах происходит

повышение уровня метилирования.

В группе 35 °С эмбрионы имели наибольшее отношение числа клеток внутриклеточной массы и трофэктодермы. Показано позитивное влияние снижения интенсивности метаболизма, поскольку на доимплантационном этапе эмбрионы группы 35 °С по некоторым критериям отстают от других групп, однако превосходят группу 39 °С по числу рожденных потомков, что сравнимо с группой 37 °С. И по ряду морфофункциональных характеристик потомки группы 35 °С были наиболее близки к контролю.

Полученные результаты обоснованы и достоверны.

В главе «Обсуждение» А.К. Станова обобщает полученные данные в контексте современных представлений, в том числе приоритетных и оригинальных исследований дестабилизации развития в результате ЭКО лаборатории генетики лабораторных животных ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН)». Обсуждение отражает свободное владение литературой и компетентность автора.

**Выводы (5)** сформулированы корректно и резюмируют основные результаты диссертации.

**Автореферат** построен по стандартной схеме, полностью отражает содержание диссертации, иллюстрации наглядно демонстрируют результаты работы.

#### **Публикации по теме диссертации**

Результаты работы опубликованы в трех научных статьях, из которых две статьи – в журнале International Journal of Molecular Sciences квартиля Q1 международной базы цитирования WoS, а также представлены на трех международных и всероссийских научных конференциях (тезисы докладов опубликованы). Публикации автора отражают основное содержание работы.

#### **Замечания**

1. В качестве небольшого замечания следует отметить неудачное название пп. 3.7. «Подсадки эмбрионов самкам-реципиентам» в главе «Результаты», поскольку в этом разделе речь идет о количественных показателях, и не только подсаженных эмбрионов, но и рожденных потомков.
2. В главе «Обсуждение результатов» излишним представляется повтор

описания применяемого автором экспериментального подхода, обоснования выбора температур, перечисления анализируемых признаков (с.84-85).

### **Вопросы:**

1. Может ли наблюдаться генотип-специфичность параметров доимплантационного развития *in vitro* у стандартных линий мышей.
2. По какой причине анализировали морфофункциональные показатели только самцов и не учитывали самок.

Незначительные замечания не являются принципиальными, вопросы носят дискуссионный характер и не снижают высокого качества и научной ценности диссертационной работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа А.К. Становой «Влияние температуры инкубирования *in vitro* эмбрионов мышей на доимплантационное развитие и фенотип потомков», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. – физиология человека и животных (биологические науки) является законченным самостоятельным научным исследованием, в основе которого лежит крайне актуальная по содержанию и спектру задач, объемная экспериментальная работа, выполненная на высоком научном и методическом уровне. Автор получила важные результаты, расширяющие представления о влиянии температурного градиента при инкубировании в первые 24 часа после оплодотворения на параметры доимплантационного развития, скорости слияния пронуклеусов в зиготе и достижения эмбрионами 2-х, 4-х и 8-и клеточных стадий, морфологию доимплантационных эмбрионов, уровень общего метилирования ДНК, а также метаболический и энергетический фенотип потомков.

Выводы хорошо обоснованы, результаты опубликованы в 3-х статьях в рецензируемых высокорейтинговых научных журналах и обсуждены на конференциях.

Таким образом, по содержанию, уровню выполнения исследований, актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (с



последующими редакциями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Станова Алия Константиновна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных.

Отзыв рассмотрен, обсужден и одобрен на расширенном заседании лаборатории генетики высшей нервной деятельности с представителями Отдела физиологии и патологии высшей нервной деятельности ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН 15 января 2024 года.

Отзыв составила директор ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, главный научный сотрудник лаборатории генетики высшей нервной деятельности ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, д.б.н. Дюжикова Наталья Алековна (специальность 03.03.01- физиология), e-mail: [dvuzhikova@infran.ru](mailto:dvuzhikova@infran.ru).

тел.: +79214399623

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (ИФ РАН)

Адрес: 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6,

Тел.: 8(812)3280701, 8(812)3281301,

8(813)7072501

Веб-сайт: <http://www.infran.ru>

E-mail: [Pavlov.institute@infran.ru](mailto:Pavlov.institute@infran.ru)


Директор ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН,  
Главный научный сотрудник  
лаб. генетики высшей нервной деятельности  
ФГБУН Института физиологии  
им. И.П. Павлова РАН

Подпись Дюжиковой Н.А. заверяю

Ученый секретарь

ФГБУН Института физиологии

 д.б.н. Дюжикова Н.А.

 к.б.н. Петропавловская Е.А.

