

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Кузьминой Татьяны Ивановны на
диссертационную работу Становой Алии Константиновны «Влияние
температуры инкубирования *in vitro* эмбрионов мышей на
доимплантационное развитие и фенотип потомков», представленную к
защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности

1.5.5 – Физиология человека и животных (биологические науки)

Актуальность избранной темы. Внедрение инновационных эмбриотехнологий в биомедицину, ветеринарию, практику животноводства имеет важное значение для решения проблем бесплодия у человека, интенсификации селекционного процесса в животноводстве, тиражирования особей с редактированным, согласно поставленным задачам, геномом (Ferré L. B., 2020; Chen, P.R.;2021; Chi et al., 2021; Zhang X. et al., 2021). Особо следует отметить в свете последних достижений молекулярной генетики использование системы CRISPR-Cas9 для редактирования генома животных, в том числе свиней, органы которых наиболее подходят для ксенотрансплантации (Taylor-Robinson A.W. and Van Huong Do, 2016; Ryu, 2018; Niemann H., Petersen B., 2016; Sjunnesson Ylva, 2020). Успехи в развитии эмбриотехнологий за последние десятилетия несомненны. Достижения основаны на решении ряда фундаментальных проблем физиологии, репродуктивной биологии. Необходимость углубления знаний механизмов, детерминирующих формирование зрелой яйцеклетки, раннего развития зародышей определяется, прежде всего, гетерогенностью популяции используемых в клеточных репродуктивных технологиях донорских ооцитов, низкими результатами их оплодотворяемости, выходом эмбрионов на стадии бластоцисты, эпигенетическими рисками, спровоцированными неадекватностью условий созревания ооцитов и культивирования доимплантационных эмбрионов *in vitro* условиям *in vivo*

(Daxinger L. et al., 2012; Ventura-Juncá P. et al.; 2015; Roy M.-C. et al. 2017). Этот факт свидетельствует, по мнению многих ученых, о необходимости углубления знаний в области фундаментальных основ раннего развития особей (Smith L. C., et al. ; 2015, Galli C., 2017). В технологии экстракорпорального созревания ооцитов и развития эмбрионов животных, в т.ч. человека, используются различные среды, состав которых обеспечивает получение из донорских ооцитов до 40% эмбрионов на стадии бластоцисты. С 90-х годов этот показатель не претерпел изменений (Sirard M.A. 2018; Ferré L. B., 2020). Совершенствование технологии получения эмбрионов *in vitro* зиждется на познании механизмов, вовлеченных в формирование и развитие доимплантационных зародышей. Множество факторов детерминирует успех или неудачу получения доимплантационных зародышей вне организма. Создание протоколов экстракорпорального созревания, оплодотворения, культивирования эмбрионов, адекватно отражающих условия формирования и развития доимплантационных зародышей вне организма обеспечит высокий выход биологически полноценных особей. Проблема также представляется высоко актуальной в связи с представленными в течение последних 10 лет результатами многих исследований по мониторингу показателей жизнеспособности животных (не исключая и человека), рожденных в результате использования клеточных репродуктивных технологий, в которых причины атипий (LOS syndrome – синдром рождения потомства с повышенным весом) у исследуемых особей анализируются с точки зрения эпигенетических рисков, связанных с режимом, в т.ч. температурным, культивирования гамет и ранних зародышей (Daxinger L. et al., 2012, Ventura-Juncá P. et al. , 2015.Roy M.-C. et al. 2017). Все вышесказанное свидетельствует о высокой актуальности темы диссертационной работы Становой Алии Константиновны.

Научная новизна исследований. При выполнении диссертационной работы автором были получены новые результаты, значительно

дополняющие имеющиеся знания в исследуемой области. Проведен сравнительный мониторинг показателей двигательной активности, продолжительности сна, потребления воды и корма, потребления кислорода, выделения углекислого газа, оценен дыхательный коэффициент у особей, полученных в результате моделирования протоколов экстракорпорального культивирования доимплантационных эмбрионов с учетом температурного режима. В результате комплексного анализа морфокинетики развившихся в условиях различных температур инкубирования эмбрионов показано, что температура инкубирования в первые 24 часа влияет на такие показатели, как:

- скорость слияния пронуклеусов;
- скорость достижения эмбрионами стадий 2-х, 4-х и 8-и клеток;
- число клеток трофэктодермы и общее число клеток бластоцисты;
- отношение внутриклеточной массы и трофэктодермы;
- средний уровень и дисперсию общего метилирования ДНК в ядрах эмбрионов;
- число рожденных потомков.

В тоже время выявлено, что температура инкубирования не оказывает влияния на массу потомков, полученных при переносах эмбрионов на 2-х клеточной стадии

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют имеющиеся знания о влиянии температуры культивирования на начальные этапы формирования доимплантационных эмбрионов *in vitro*. Автором обоснованно подверглась проверке гипотеза «тихого эмбриона» и смоделирован температурный режим, согласно имеющимся сведениям доимплантационного развития эмбрионов мышей *in vivo* и результатам собственных исследований. Полученные данные и предложенные пути модификации этапов (температурный режим) технологии получения эмбрионов мышей *in vitro*, несомненно, повлекут за

собой цикл исследований эмбриотехнологов, связанных с повышением эффективности технологии получения эмбрионов животных других видов (в том числе и Homo sapiens) in vitro.

Общая характеристика работы, завершенность и качество ее оформления. Диссертационная работа Становой А.К. структурно представлена разделами: введение; обзор литературы; материалы и методы; результаты; обсуждение, включающее подразделы заключение и выводы; список сокращений; список литературы. Список цитированной литературы включает 233 источника. Работа изложена на 102 страницах печатного текста, иллюстрирована 19 рисунками и 14 таблицами.

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

Глава «Обзор литературы» начинается кратким экскурсом в историю становления и развития достижений в области клеточных репродуктивных технологий. В каждом последующем разделе главы автор скрупулезно анализирует имеющиеся сведения по обозначенным в целях диссертационной работы проблемам, обосновывая необходимость исследования сформулированных нерешенных задач. Обзор литературы достаточно полно охватывает имеющиеся публикации в рамках тематики исследования, информативен, хорошо структурирован.

Во второй главе диссертации детально описаны дизайн экспериментов и использованные методы исследования. Впечатляет набор высокоинформативных методов, использованных автором при выполнении исследований: хирургические; эмбриологические; цитологические; иммунофлуоресцентные; time-lapse микроскопия. Работа выполнена с

использованием оборудования последнего поколения. Все представленные в диссертационной работе методы, адекватны поставленным задачам.

В третьей главе описаны результаты исследования по разделам. Автором последовательно анализируются морфокинетические этапы развития эмбрионов мышей, начиная с зиготы. В следующем разделе анализируются эффекты температур инкубирования в первые 24 часа на общее метилирование ДНК. Заключительные разделы диссертации логично представлены анализом данных о влиянии температур на серию фенотипических признаков развившихся особей. 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 разделе «Заключение» в краткой форме резюмируются итоги собственных результатов, проводится их анализ и сравнение с данными литературы. 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, подтверждается достаточным количеством экспериментальных животных, полученных и пересаженных эмбрионов, грамотным формированием экспериментальных групп, в соответствии с задачами исследования, использованием при выполнении экспериментов высокоинформативных методов.

Результаты, представленные в диссертации А.К.Становой, обсуждены на трех научных конференциях, автором опубликовано 3 научные 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, однако, следует отметить ряд неточностей и некорректно представленных данных в тексте диссертации.

Так, на странице 66 в табл.2 «Эффективность оплодотворения при ЭКО: доля эмбрионов, прошедших первое дробление (%)», автор в последней колонке ошибочно пишет: **% зигот от 2-х клеточных эмбрионов.**

В тексте диссертации часто встречается фраза: «Полученные результаты могут быть использованы **в сельском хозяйстве**». Следует откорректировать и расширить выше обозначенную фразу, т.к., скорее всего, автор имеет ввиду использование предложенных подходов к коррекции одного из этапов культивирования доимплантационных эмбрионов мышей, как модельных животных, на основе изменения температурного режима путем модификации протоколов экстракорпорального культивирования доимплантационных эмбрионов животных (в том числе и Homo Sapience) имитацией температурного режима адекватного режиму *in vivo*.

В разделе «Задачи» следует конкретизировать понятие **«условия развития вне материнского организма».**

В форме научной дискуссии, хотелось бы услышать аргументацию и уточнения автора, представившего в разделе **«Положения, выносимые на защиту» пункт:** «Условия культивирования влияют на энергетический фенотип потомков». Какие условия культивирования и какие показатели «энергетического фенотипа» потомков имеет ввиду автор. Чем обосновывает автор выбор подопытных животных - аутбредной линии мышей CD1? Почему трансфер эмбрионов самкам-реципиентам производили на стадии 2-х клеток, а не на стадии бластоцисты?

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

Несмотря на представленные выше замечания, работа Становой А.К. , несомненно, соответствует уровню кандидатской диссертации и обладает высоким уровнем теоретической и практической значимости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Алии Константиновны Становой «Влияние температуры инкубирования *in vitro* эмбрионов мышей на доимплантационное развитие и фенотип потомков», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных (биологические науки) - является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение проблем, сопутствующих совершенствованию этапов клеточных репродуктивных биотехнологий в биомедицине, ветеринарии, животноводстве – получены новые знания об особенностях влияния температурных режимов на формирование доимплантационных эмбрионов мышей, что будет способствовать разработке новых подходов к снижению эпигенетических рисков у особей животных, полученных в результате вспомогательных репродуктивных технологий. 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,

