

## Отзыв официального оппонента

доктора биологических наук Назаровой Галины Григорьевны 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

**Актуальность.** Актуальность диссертационного исследования обусловлена стремительным развитием вспомогательных репродуктивных технологий и необходимостью решения проблем, связанных с возможным неблагоприятным воздействием сигналов искусственного микроокружения на стабильность пренатального развития, течение и исход беременности, фенотип взрослого потомства. Одним из путей снижения подобных рисков может быть максимальное приближение условий культивирования эмбрионов к естественным, в том числе, температурным. Согласно сведениям литературы, от температурных условий развития в доимплантационный период может зависеть рост и дифференцировка клеток, экспрессия генов, жизнеспособность эмбрионов. Влияние температурных условий в период раннего развития на реализацию плодовитости и фенотипические признаки взрослого потомства изучено недостаточно и важно для решения проблем репродуктивной медицины и физиологической экологии человека и животных.

**Новизна и научно-практическая значимость.** Предимплантационные эмбрионы млекопитающих развиваются в температурном градиенте по мере продвижения к матке по яйцеводам. Основная задача диссертационного исследования заключалась в выяснении слабоизученного влияния температурной динамики в первые сутки после оплодотворения на эмбриональное и постнатальное развитие. В результате хорошо спланированных экспериментов обнаружены значимые эффекты повышения или понижения температуры при прохождении первого дробления на морфокинетические характеристики 4-х и 8-ми клеточных эмбрионов, рост и дифференцировку клеток при формировании бластоцисты, успешность протекания беременности у самок-реципиентов, фенотип взрослых потомков. Новые сведения о влиянии температуры в период первого дробления на последующее доимплантационное развитие, вероятность имплантации и фенотип потомства важны для совершенствования вспомогательных репродуктивных технологий и понимания долгосрочных эффектов условий раннего развития на физиологические функции

животных. Температурный фактор значим и для естественно протекающей беременности, поэтому выяснение возможных эффектов температуры, обусловленных изменением климата, инфекциями, термогенным действием психогенного стресса, необходимо для решения задач репродуктивной медицины и физиологии.

**Содержание и оформление диссертации.** Структура и оформление работы соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа изложена на 123 страницах, содержит «Введение», главы «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение», а также «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы» (233 источника), 19 рисунков и 14 таблиц. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Во «Введении» определена актуальность темы диссертации, сформулирована гипотеза, цель, задачи работы, их новизна, методы и способы решения поставленных задач, обозначен личный вклад автора, представлены защищаемые положения, обоснована теоретическая и практическая значимость полученных результатов, приведен список из 6 опубликованных работ автора по теме диссертации, из них 3 статьи опубликованы в журналах, входящих в международные базы научного цитирования Web of Science и Scopus.

В главе «Обзор литературы» изложена история возникновения и развития вспомогательных репродуктивных технологий, отражено их состояние на современном этапе. Обобщена информация о физико-химических условиях, необходимых для успешного культивирования эмбрионов млекопитающих. Проанализированы литературные сведения о влиянии процедуры ЭКО на доимплантационное развитие, вероятность родов, состояние здоровья и фенотип потомства. Дан обзор новейших методов оценки нормального развития, жизнеспособности и имплантационного потенциала эмбрионов по морфокинетическим, физиологическим, генетическим и цитогенетическим характеристикам. Охарактеризованы особенности метаболизма доимплантационных эмбрионов на разных стадиях доимплантационного развития. Проанализированы сведения литературы об эпигенетическом репрограммировании в раннем онтогенезе и его значении для нормального развития и возникновения патологических состояний.

В главе «Материалы и методы» представлена подробная информация об условиях содержания экспериментальных животных (мыши SPF статуса аутбредной линии CD1) и приведена схема эксперимента. Дано описание использованных методов (получение



ооцитов, сперматозоидов, экстракорпоральное оплодотворение, определение скорости слияния пронуклеусов, оценка числа и размера бластомеров, соотношения числа клеток внутренней клеточной массы и трофэктодермы, определение уровня общего метилирования ДНК, индукция псевдобеременности и перенос эмбрионов самкам-реципиентам, мониторинг спонтанной активности потомства). Исследование выполнено с использованием современного оборудования (микроскоп Lionheart FX (Biotek, США), система PhenoMaster (TSE Systems, Германия) для мониторинга метаболизма, поведения и физиологических параметров лабораторных животных в условиях домашней клетки.

В главе «Результаты» изложены результаты диссертационного исследования. С помощью метода непрерывной высокочастотной покадровой съемки (Time-lapse) было установлено достоверное положительное влияние температуры инкубирования на скорость слияния пронуклеусов и скорость завершения первого дробления. Установлено достоверное влияние температуры инкубирования зиготы на скорость второго, третьего дробления и эмбриональную смертность. Показано, что синхронность второго и третьего дробления зависит от размера бластомеров после прохождения первого дробления. С увеличением размера бластомеров двухклеточных эмбрионов синхронность следующих дроблений возрастает. От температуры инкубирования в первые 24 ч после оплодотворения зависит рост и клеточная дифференцировка на этапе формирования бластоцисты, поскольку общее число клеток и соотношение клеток трофэктодермы и внутренней клеточной массы достоверно различалось в экспериментальных группах. Температура инкубирования в первые 24 часа после оплодотворения повлияла на уровень общего метилирования ДНК у 4-х и 8-ми клеточных эмбрионов. Средний уровень метилирования был значительно выше у эмбрионов групп 35 °С и 37 °С по сравнению с группами 39 °С и контролем, что указывает на то, что температура на самых ранних этапах онтогенеза может влиять на эмбриональный эпигеном. После 24-часового культивирования в разных температурных режимах 2-х клеточные эмбрионы переносили самкам-реципиентам. Установлено, что температура инкубирования 39°С. существенно снижает число новорожденных. Результаты фенотипирования взрослых потомков показали, что температурные условия на этапе первого дробления отражаются на двигательной и пищевой активности, показателях энергетического обмена.

В «Обсуждении» анализируется соответствие полученных результатов гипотезам исследования. С использованием сведений литературы автор делает вывод о позитивном влиянии снижения метаболизма культивируемых эмбрионов в первые сутки после оплодотворения на следующие этапы эмбрионального развития.

В «Заключении» Алия Константиновна обобщает основные результаты диссертации, подчеркивает их новизну, значение для науки и практики. Выявленные эффекты важны для совершенствования протоколов вспомогательных репродуктивных процедур и понимания механизмов онтогенетической пластичности.

#### **Замечания и вопросы:**

1. Таблица 2 неудачно озаглавлена «Эффективность оплодотворения...». В этой таблице приведены данные о прохождении первого дробления при культивировании оплодотворенных яйцеклеток в разных температурных режимах.
2. Установлено достоверное влияние температуры инкубирования зиготы на скорость второго, третьего дробления и эмбриональную смертность. На основании каких критериев определяли жизнеспособность эмбрионов для расчета эмбриональной смертности?
3. Рис. 12. – нет легенды.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Становой Алии Константиновны на тему «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 является законченной научно-квалификационной работой. Научные положения, выносимые на защиту, и выводы обоснованы. Полученные результаты имеют важное значение для развития научных знаний в области репродуктивной медицины, физиологии человека и животных. Диссертационная работа соответствует требованиям пунктов 9-14 Положения о порядке получения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (в редакции от 01.10.2018 г., с изменениями от 26.05.2020 г.), 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 (биологические науки).

Официальный оппонент

д.б.н. ведущий научный сотрудник  
лаборатории структуры и динамики  
популяций животных Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки «Институт  
систематики и экологии животных  
Сибирского отделения Российской  
академии наук (ИСиЭЖ СО РАН)

Назарова Галина Григорьевна

Адрес места работы

Институт систематики и экологии  
животных СО РАН (ИСиЭЖ СО РАН),  
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе,  
11. Телефон: +7(383) 170973, email:  
office@eco.nsc.ru

Подпись Назаровой Г.Г.  
заверяю.

*Статья в журнале филологический  
Вурнава М.В. 22.01.2024*

22 января 2024 г.

