

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, зав. лабораторией функциональной экологии наземных животных Института экологии растений и животных УрО РАН В.Л. Вершинина на диссертационную работу Брусенцева Евгения Юрьевича «Основные подходы к созданию криобанка эмбрионов и гамет хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*) и воздействие факторов роста в их преимплантационном развитии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.04 –

зоология

Методы криоконсервации являются в настоящее время важным разделом современной репродуктивной биологии, поскольку эти технологии являются необходимым звеном в развитии криобанков эмбрионов и семени, и представляют собой новые технологии сохранения редких и исчезающих видов диких млекопитающих. Для семейства *Cricetinae* эти подходы разработаны недостаточно. По этим причинам, перспективность и актуальность диссертационного исследования Е. Ю. Брусенцева бесспорна.

Целью работы было: разработка подходов к созданию криобанка эмбрионов и семени для сохранения генетических ресурсов *Cricetinae* и изучение воздействия факторов роста на преимплантационные зародыши хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus*, Pallas, 1773 и *P. campbelli*, Thomas, 1905)..

Содержание данной работы связано с вопросами расширения новых подходов в криоконсервации преимплантационных эмбрионов и семени *Cricetinae* и создании криобанков генетических ресурсов млекопитающих. Разработанные методы и подходы могут быть использованы для сохранения и восстановления численности редких и исчезающих видов, прежде всего, *Cricetinae*. Изучены особенности репродукции и раннего развития хомячков джунгарского и Кэмпбелла, что имеет как теоретическую ценность для зоологии, так и практическое значение для оптимизации их разведения в неволе, а также в целом, при организации криобанков.

Работа Е. Ю. Брусенцева представляет собой рукопись общим объемом 111 страниц, иллюстрирована 9 таблицами и 16 рисунками. Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы из 319 источников (в том числе 288 на иностранных языках) и приложений.

По теме диссертации Е. Ю. Брусенцева опубликовано 5 статей, из которых 3 в отечественных рецензируемых изданиях, 2 статьи в рецензируемых зарубежных изданиях

(все в журналах, рекомендованных ВАК РФ), а также 3 тезисов в сборниках конференций. В работах отражены все основные положения и выводы диссертации. Результаты исследований неоднократно обсуждались на международных, всероссийских, региональных симпозиумах, конференциях и совещаниях.

Во введении автором аргументировано обосновывается проблематика диссертационного исследования, грамотно сформулированы цели и задачи исследования, а также основные положения, выносимые на защиту.

В Главе 1 Е. Ю. Брусенцевым проводится обзор и анализ современного уровня разработанности методов сохранения генетических ресурсов и криоконсервация эмбрионов млекопитающих.

Глава 2 посвящена подробной характеристике материалов и методов работы. Материалом диссертационного исследования служили экспериментальные животные. 21 взрослая самка джунгарского хомячка (*Phodopus sungorus*) и 16 взрослых самок хомячков Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*) в возрасте от 11 до 13 месяцев, которые были использованы в качестве доноров эмбрионов. Эпидидимальное семя было получено от 5 взрослых самцов джунгарского хомячка и 6 взрослых самцов хомячков Кэмпбелла в возрасте от 2 до 4 месяцев. Все эмбрионы, используемые в этом исследовании, были собраны от естественно спаренных животных. Гибридных самок F1, использованных в экспериментах по переносу эмбрионов, получали в результате скрещивания самок хомячков Кэмпбелла с самцами джунгарских хомячков.

В ходе экспериментов проведено получение, замораживание и оттаивание эпидидимального семени. Замораживание семени проводилось с применением трех различных комбинаций криопротекторов: 1) 18 % раффинозы и 3 % обезжиренного сухого молока, 2) CaniPlus Chill (Minitube, Germany) или 3) CaniPlus Freeze (Minitube, Germany). Жизнеспособность интактных и после процедуры замораживания-оттаивания сперматозоидов оценивали посредством двойной окраски флуорохромами SYBR Green I и йодистым пропидием (PI) с последующей конфокальной микроскопией. Преимплантационные эмбрионы хомячков рода *Phodopus* на стадии дробления замораживались с помощью программного замораживателя CL 8800 (CryoLogic, Australia) с использованием 1.5 М этиленгликоля (ЭГ), в качестве криопротектора без добавок, либо в сочетании с 0.1 М сахарозой, а также классическую программу замораживания преимплантационных эмбрионов с модификацией. После замораживания соломины с эмбрионами помещали в жидкий азот. После процедур замораживания-оттаивания оценка жизнеспособности эмбрионов выполнена методом двойного окрашивания флуоресцеином

диацетатом и пропидия йодидом. Культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов проводилось в разных средах с добавлением или без добавления гранулоцитарного-макрофагального колониестимулирующего фактора – GM-CSF rat (Sigma, 2 нг/мл), либо эпидермального ростового фактора – EGF rat (Sigma, 10 нг/мл). Жизнеспособность эмбрионов оценивали по их развитию через 24 часа культивирования *in vitro* при помощи инвертированного микроскопа DM IL LED (Leica microsystems, Germany) перед культивированием, после 24 часов, и после 48 часов культивирования *in vitro*. Трансплантацию эмбрионов джунгарского хомячка и эмбрионов хомячка Кэмпбелла после процедур замораживания-оттаивания проводили при помощи переноса в рога матки гибридных самок-реципиентов после 24-х часового культивирования в R1ECM.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов Statistica V. 8.0 (StatSoft, Inc). Все основные положения и выводы работы обоснованно аргументированы. Автором выполнена вся математическая обработка первичного материала, сформулированы все выводы и положения работы.

В Главе 3 содержатся сведения по криоконсервации сперматозоидов и эмбрионов хомячков джунгарского и Кэмпбелла, и проверка их жизнеспособности после оттаивания *in vitro* и *in vivo*

Характеристики интактного эпидидимального семени двух видов при их сходстве по общему плану строения и соотношении отдельных частей показали, что доля нормальных сперматозоидов в семени джунгарского хомячка и хомячка Кэмпбелла не отличается (хотя доля погибших сперматозоидов была больше у джунгарского хомячка, чем у хомячка Кэмпбелла).

Сперматозоиды двух исследованных видов близки морфологически, как по общему плану строения, так и по соотношениям отдельных частей: длине хвоста, длине и ширине шейки, размеру головки и другим характеристикам.

Помимо морфологически нормальных сперматозоидов встречались и аномальные формы. Е.Ю. Брусенцевым проведен анализ вариантов отмеченных аномалий. Спектр аномалий сперматозоидов достаточно широк и включает в себя повреждения головки, акросомы, шейки, хвоста и различные сочетанные дефекты. Так, при анализе типичных повреждений сперматозоидов в интактных образцах эпидидимального семени джунгарского хомячка и хомячка Кэмпбелла наблюдается достоверное отличие ( $P < 0.05$ ) по доле аномалий хвоста.

Результаты исследований содержат новые сведения, дающие представление о том, что в интактных образцах эпидидимального семени у обоих видов хомячков доля живых

сперматозоидов согласно методу двойного окрашивания SYBR Green I + PI не превышает 30%.

Важным результатом, полученным Е. Ю. Брусенцевым при морфологическом анализе сухих мазков эпидидимального семени джунгарского хомячка после процедур замораживания и оттаивания стало то, что при реализации протокола с использованием смеси рафинозы с сухим молоком, практически все сперматозоиды имеют грубые повреждения, а доля нормальных сперматозоидов была наиболее низкой и составляла немногим более 3 %. В то время как при использовании криопротектора CaniPlus Chill с модификацией сперматозоиды обоих видов демонстрируют большую сохранность клеточных структур, доля сперматозоидов с нормальной морфологией составляла 40–70%.

Анализ особенностей повреждений структуры сперматозоида показал, что во всех проведенных экспериментах наиболее уязвимой при замораживании-оттаивании частью сперматозоида хомячка является акросома.

Впервые Е. Ю. Брусенцеву убедительно удалось показать, что доля живых сперматозоидов при применении CaniPlus Freeze была достоверно выше, однако при этом была выше и доля мертвых сперматозоидов, при этом доля гибнущих сперматозоидов была выше при применении CaniPlus Chill. Процент жизнеспособного семени после криоконсервации с применением CaniPlus Chill и CaniPlus Freeze для хомячков Кэмпбелла составил 2-4 %, а для джунгарского хомячка при использовании CaniPlus Chill – около 7 %

Представляют интерес сведения о замораживании, криоконсервации и оттаивании эмбрионов хомячков рода *Phodopus*, которые, свидетельствуют, что добавление сахарозы в криопротективную смесь улучшает результаты замораживания-оттаивания.

Еще одним важным результатом, полученным автором при оценке жизнеспособности преимплантационных эмбрионов путем культивирования *in vitro* стало то, что скорость развития в среде R1ЕСМ (содержащей гентамицин и стрептомицин) была выше, чем в среде НЕСМ.

Сведения о воздействии факторов роста на развитие преимплантационных эмбрионов хомячков рода *Phodopus* показали, что большинство эмбрионов этих видов успешно переживает криоконсервацию, и такие эмбрионы способны к последующему развитию *in vitro* после их оттаивания. Новым результатом было то, что в выбранной дозе GM-CSF стимулирует развитие *in vitro* эмбрионов джунгарского хомячка, достоверно повышая образование бластоцист.

Оценка жизнеспособности эмбрионов обоих из исследуемых видов путем их развития *in vivo* показала возможность успешной трансплантации эмбрионов после

криоконсервации и культивирования *in vitro*. Таким образом, Е.Ю. Брусенцеву впервые на грызунах удалось показать, что межвидовые гибриды являются реципиентами для трансплантации эмбрионов видов принимающих участие в гибридизации (джунгарского хомячка и хомячков Кэмпбелла).

Обсуждение полученных результатов приведено Е.Ю. Брусенцевым в главе 4. Автор отмечает, что сведения по особенностям репродукции хомячков рода *Phodopus*, полученные в ходе выполнения работы, сходны с наблюдениями других исследователей и хорошо укладывается в пределы, отмечаемые для данных видов. Также в главе перечислены основные этапы проведенных автором исследований с оценкой их инновационной и практической значимости.

Следует особо подчеркнуть, что при криоконсервации эпидидимального семени, криобанкировании преимплантационных эмбрионов, культивировании *in vitro* преимплантационных эмбрионов, использовании факторов роста при развитии преимплантационных эмбрионов *in vitro*, трансплантации эмбрионов, автором получены новые важные и перспективные для использования в практике результаты, которые могут быть применены для сохранения редких видов и представляют большой интерес для специалистов, работающих в области криобанкирования. Впервые заморожены семя и преимплантационные эмбрионы мохноногих хомячков и проведено культивирование ранних эмбрионов *in vitro*. Благодаря проведенным исследованиям автором модифицирован протокол программного замораживания и криопротекторной смеси, что повысило жизнеспособность сперматозоидов и эмбрионов. Полученные уникальные данные позволили Е. Ю. Брусенцеву не только существенно расширить имеющиеся представления о криоконсервации преимлантационных эмбрионов и семени *Cricetinae* и организации криобанков генетических ресурсов млекопитающих, но и создать криобанк эмбрионов и семени хомячков джунгарского и Кэмпбелла.

Имеется небольшое замечание по стилю изложения. Так, на странице 52 (Глава 2) автор использует неудачные словосочетания «самки Кэмпбелла» и «джунгарские самцы», являющиеся профессиональным жаргоном. Есть также ряд вопросов. Чем обусловлен выбор объекта исследований – 2 вида рода *Phodopus*? Имеются ли отличия спектров аномалий сперматозоидов в интактных образцах эпидидимальной спермы и после криоконсервации или различие только в их общей частоте? Насколько отличается уровень постимплантационных потерь в интактной группе от экспериментальных?

Автор в своем исследовании показал хорошее знание затронутых в диссертации практических и теоретических вопросов и специальной литературы. Достаточный объем

