

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
(ФАНО РОССИИ)**

**Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт биофизики клетки
Российской академии наук
(ИБК РАН)**

142290, Пушкино
Московской обл., ул. Институтская, 3
Для телеграмм: Пушкино, Биофизика
E-mail: admin@icb.psn.ru
Телефон: (4967) 73-05-19
Факс: (4967) 33-05-09
http://www.icb.psn.ru
ОКПО 02699694, ОГРН 1025007773581
ИНН/КПП 5039001069/503901001

06.10.16 № 12306 /01-1-2171

На № _____ от _____



О Т З Ы В

Ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биофизики клетки Российской академии наук
о диссертационной работе Брусенцева Евгения Юрьевича на тему:
**«Основные подходы к созданию криобанка эмбрионов и гамет хомячков
рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*) и воздействие факторов роста
в их преимплантационном развитии»,**
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.04 – Зоология.

Актуальность.

Усиление антропогенного давления на окружающую среду и ускорение темпов исчезновения видов животных и растений, наблюдающиеся в последние десятилетия, обусловили развитие современных технологий сохранения исчезающих видов. Одним из направлений таких современных технологий является разработка методов криоконсервации репродуктивного материала животных (в частности криоконсервации гамет и преимплантационных эмбрионов млекопитающих) с целью их длительного сохранения в криоколлекциях и криобанках. К настоящему времени репродуктивный

материал нескольких десятков видов млекопитающих уже успешно криоконсервирован. Однако универсальной методики криоконсервации материала различных видов не существует. Разработка метода криоконсервации и длительного хранения в криобанке репродуктивного материала нового вида требует учета видовой специфики репродуктивной биологии, а также изучения резистентности клеток этого вида животных к используемым криопротекторам и к режимам замораживания-оттаивания.

До настоящего времени не удавалось успешно заморозить семя или преимплантационные эмбрионы мохноногих хомячков, а также культивировать их ранние (дробящиеся) эмбрионы *in vitro*. В тоже время, эти животные являются перспективным видом лабораторных грызунов. Поэтому работа Брусенцева Евгения Юрьевича, посвященная разработке подходов к созданию криобанка эмбрионов и гамет хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*) и изучению воздействия факторов роста в их преимплантационном развитии, несомненно, является своевременной и актуальной.

Научная новизна

Диссертанту впервые удалось успешно криоконсервировать эпидидимальное семя хомячков рода *Phodopus*: джунгарского (*P. sungorus*) и Кэмпбелла (*P. campbelli*). Было показано, что фирменные криозащитные среды (CaniPlus Freeze и CaniPlus Chill), разработанные для криоконсервации семени сельскохозяйственных животных, могут быть успешно использованы для замораживания семени хомячков рода *Phodopus*.

Впервые осуществлена криоконсервация эмбрионов хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*). Продемонстрирован стимулирующий эффект фактора роста GM-CSF на развитие криоконсервированных ранних эмбрионов в процессе их культивирования *in vitro* после размораживания.

Проведены успешные трансплантации криоконсервированных эмбрионов джунгарского хомячка и хомячка Кэмпбелла гибридным самкам-реципиентам. Эти эксперименты также были проведены впервые.

Научная и практическая значимость

Диссертантом получены новые знания о репродуктивной биологии хомячков рода *Phodopus*. Расширены знания об особенностях культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов этих видов млекопитающих, получены новые данные о положительном воздействии фактора роста GM-CSF на развитие эмбрионов в процессе культивирования. Кроме этого, рассматриваемая работа имеет и вполне реальное практическое значение. Во-первых, разработка методов криоконсервации семени и ранних зародышей хомячков джунгарского и Кэмпбелла, а также создание криобанка их репродуктивного материала позволяет перевести процесс разведения этих лабораторных животных на принципиально другой технологический уровень. Во-вторых, полученные данные об успешной трансплантации криоконсервированных эмбрионов двух видов хомячков рода *Phodopus* гибридной самке-реципиенту дают дополнительные возможности для создания современных вспомогательных репродуктивных технологий для сохранения редких и исчезающих видов млекопитающих. Данные о возможности межвидовой трансплантации сохраненных в криобанке эмбрионов (в данном случае гибридным самкам-реципиентам) дают надежду на принципиальную допустимость восстановления исчезнувшего вида млекопитающих, если репродуктивный материал этих животных сохранен в генетическом криобанке.

Содержание диссертационной работы

Диссертация написана в хорошем научном стиле по традиционному плану и состоит из нескольких глав.

Во введении сформулированы цель и задачи, обоснованы актуальность работы, новизна и практическая значимость исследования.

Раздел, посвященный анализу научной литературы, включает большое число цитируемых публикаций (библиографический указатель составлен из 319 источников, из них 31 отечественный и 288 зарубежных). В обзоре уделено большое внимание рассмотрению репродуктивных технологий и технологий сохранения генетических ресурсов лабораторных животных. Рассмотрена роль криобанков в современной системе сохранения и воспроизведения ресурсов лабораторных животных. Большое внимание уделено обзору теоретических основ криоконсервации и витрификации, а также методов оценки состояния заморожено-оттаянного биологического материала. Подробно рассмотрены конкретные методы криоконсервации семени и ранних эмбрионов лабораторных млекопитающих, методы культивирования эмбрионов млекопитающих *in vitro* и способы оптимизации культивирования эмбрионов.

В главе «Материалы и методы» описан весь методический арсенал, использованный в работе. Подробно описаны методы криоконсервации эпидидимального семени хомячков рода *Phodopus* и методы оценки состояния сперматозоидов до и после криоконсервации. Приведено подробное описание методических приемов получения, замораживания и оттаивания преимплантационных эмбрионов хомячков двух видов: джунгарского и Кэмпбелла. Описано применение методов оценки состояния криоконсервированных эмбрионов (метод двойного окрашивания флуоресцеин диацетатом и пропидия йодидом, культивирование эмбрионов *in vitro*, трансплантация эмбрионов самкам-реципиентам).

Глава диссертации, посвященная изложению результатов проведенного исследования, состоит из 9 подразделов. Условно их можно объединить в две группы. К первой из них можно отнести эксперименты по изучению морфологических характеристик сперматозоидов двух видов хомячков рода *Phodopus*, опыты по замораживанию этих сперматозоидов с использованием различных криозащитных сред, эксперименты по оценке жизнеспособности сперматозоидов до и после криоконсервации. Полученные данные свидетельствуют, что жизнеспособность даже свежезвлеченных сперматозоидов исследуемых видов хомячков относительно невелика. Основные криповреждения наблюдались в акросомах. Наиболее успешно процедура замораживания-оттаивания проходила при использовании фирменных криозащитных сред CaniPlus Freeze и CaniPlus Chill.

Ко второй группе относятся эксперименты по криоконсервации преимплантационных эмбрионов хомячков джунгарского и Кэмпбелла, и оценка их жизнеспособности после оттаивания *in vitro* и *in vivo*. Получены данные, свидетельствующие об успешной криоконсервации ранних эмбрионов исследуемых видов хомячков. Оптимальную криозащиту оказывал ЭГ в сочетании с сахарозой. Культивирование отогретых эмбрионов *in vitro* показало высокую способность к развитию криоконсервированных эмбрионов. Особый интерес представляют впервые полученные данные о стимулирующем к развитию эффекте фактора роста GM-CSF на эмбрионы хомячков, культивируемых *in vitro*. Не меньший интерес представляют успешные эксперименты по трансплантации криоконсервированных эмбрионов самкам-реципиентам. Криоконсервированные на стадии 4 клеток эмбрионы после размораживания были доведены до стадии морулы в культуре, а затем успешно трансплантированы приемным самкам. Полученные результаты свидетельствуют, что

криоконсервированные эмбрионы хомячков обоих видов джунгарского и Кэмпбелла успешно развивались в организме гибридных между этими видами самках до рождения.

В заключении автор подводит итоги основным результатам диссертационной работы. Выводы сформулированы четко и отражают полученные в диссертации результаты.

Таким образом, представленная к защите работа содержит новые экспериментальные данные по криоконсервации эпидидимального семени и ранних эмбрионов двух видов хомячков рода *Phodopus*: джунгарского (*P. sungorus*) и Кэмпбелла (*P. campbelli*), результаты оценки *in vitro* и *in vivo* состояния криоконсервированного материала.

Замечания к диссертации

При всех неоспоримых достоинствах в диссертации имеются некоторые недостатки. При оценке жизнеспособности криоконсервированных сперматозоидов диссертант использовал морфологических анализ и двойную окраску флуорохромами SYBR Green 1 + PI. В тоже время такой общепринятый показатель жизнеспособности сперматозоидов, как их подвижность, не был проанализирован. Кроме того, в работе имеются стилистические погрешности, а также имеют место единичные опечатки. Указанные замечания, разумеется, не снижают общей высокой оценки данной диссертационной работы.

Представление результатов в научной печати

По материалам диссертации опубликовано 3 научные статьи в рецензируемых отечественных журналах, 2 статьи в рецензируемых зарубежных изданиях (все 5 в журналах, рекомендованных ВАК) и тезисы в 3 сборниках трудов конференций.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Автореферат отражает основное содержание диссертации. Подходы, методические приемы и полученные результаты могут быть использованы при изучении механизмов криозащиты репродуктивного материала животных и разработке подходов к созданию криобанков в Учреждениях академии наук: в Институте биофизики клетки РАН, Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институте общей генетики РАН, Институте цитологии РАН

Заключение

Диссертационная работа 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» соответствует критериям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.04 – Зоология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании научного семинара Лаборатории криобиологии и биофизики воды 4 октября 2016 года (Протокол №11).

Ведущий научный сотрудник Лаборатории
криобиологии и биофизики воды ИБК РАН
кандидат биологических наук

Утешев Виктор Константинович

Информация для контактов:

142290, МО, г. Пущино, ул. Институтская 3, ИБК РАН

8-906-744-8718; uteshev-cryobank@mail.ru

Подпись
Удостоверяю

