



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института проблем экологии и
эволюции им. А.Н. Северцова
Российской академии наук
член-корр. РАН, д.б.н. С.В. Найденов

«24»



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Окотруб Светланы Васильевны
«РАННЕЕ РАЗВИТИЕ И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ООЦИТОВ И
ЭМБРИОНОВ МАЛЫХ КОШЕК (FELIDAE: FELINAE): ВЛИЯНИЕ
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЛИПИДОВ», представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12. Зоология.

Решение вопросов сохранения редких и исчезающих видов животных является одной из приоритетных задач современной биологии. Примерно половина видов семейства Felidae относятся к редким видам, а 12 из них находятся на грани исчезновения или считаются исчезающими. При этом размножение редких видов кошачьих даже в условиях неволи зачастую затруднено. Один из перспективных подходов к сохранению генетического разнообразия таких видов – криоконсервация гамет и преимплантационных эмбрионов. Такой подход может позволить не утратить ценный генетический ресурс видов, находящихся на грани исчезновения. Создание банков генетических ресурсов может позволить решить проблему с воспроизводством потомства редких видов кошачьих и сохранить популяции этих животных. Однако, на данный момент, нет универсального, а главное эффективного протокола криоконсервации ооцитов и эмбрионов кошачьих. Считается, что липиды, которые в большом количестве присутствуют в цитоплазме ооцитов и преимплантационных эмбрионов представителей семейства кошачьих, повышают чувствительность клеток к охлаждению и криоконсервации. Модифицирование липидного состава клеток в культуре *in vitro* с целью изменения степени ненасыщенности липидов может минимизировать негативные последствия криоконсервации ооцитов и эмбрионов, богатых внутриклеточными липидами. Разработка

универсального и эффективного протокола позволит создавать банки с генетическим ресурсом, пригодным для использования при вспомогательных репродуктивных технологиях. Диссертационная работа Светланы Васильевны Окотруб выполнена именно в этом направлении. Светлана Васильевна приводит детальное исследование роли внутриклеточных липидов при криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих с использованием домашней кошки в качестве экспериментальной модели, используя все современные методы исследования этих параметров и предлагает свой подход к оптимизации протокола криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов.

Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 173 страницах печатного текста, содержит 20 рисунков и 12 таблиц. Библиографический указатель литературы включает 239 источников, из них 11 отечественных и 228 зарубежных.

Первая глава диссертационной работы, обзор литературы, хорошо демонстрирует современное состояние дел в исследовании криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих. С.В. Окотруб убедительно показала, что роль внутриклеточных липидов в развитии ооцитов и эмбрионов кошачьих изучена крайне слабо, а модификация протоколов замораживания для гамет и преимплантационных эмбрионов, богатых внутриклеточными липидами, является актуальной задачей, позволяющей повысить эффективность криоконсервации генетического материала исчезающих видов млекопитающих, в частности, представителей семейства Felidae.

Глава имеет 5 подразделов. В первом подразделе приводится описание семейства Felidae и охранный статус видов. Описываются вспомогательные репродуктивные технологии, применяемые для сохранения генетического разнообразия кошачьих. Показана значимость криобанка эмбрионов и гамет для сохранения редких видов млекопитающих. Описаны применяемые существующие протоколы криоконсервации ооцитов и эмбрионов различных видов кошачьих и показана их эффективность. Второй подраздел посвящен описанию роли липидов в преимплантационном развитии млекопитающих. Показано, что липидные гранулы играют важную роль при созревании ооцитов и развитии преимплантационных эмбрионов различных видов млекопитающих. В третьем подразделе подробно описана роль липидов в процессе замораживания ооцитов и эмбрионов. Приведено сравнение эффективности криоконсервации ооцитов и эмбрионов с различным содержанием внутриклеточных липидов. Показано, что чем больше липидов

содержится в ооцитах и эмбрионах, тем хуже протекает их криоконсервация. В четвертом подразделе описаны способы воздействия на состав внутриклеточных липидов с целью улучшения результатов криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих.

Вторая глава диссертационной работы посвящена детальному описанию материалов и методов исследования. Работа была проведена с использованием современных методов и на большой выборке, что говорит о репрезентативности исследования. Общее число самок домашней кошки для экспериментальной работы составило 171 особь, самцов – 9 особей. Число ооцитов во всех экспериментальных блоках составило 380, число эмбрионов – 286. С.В. Окотруб подробно описан дизайн эксперимента, методика получения ооцитов и сперматозоидов у домашних кошек, модификация липидного состава ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки. Подробно описаны протоколы криоконсервации и дальнейшего анализа ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки. Подробность изложения всех используемых методов и протоколов позволяет любому исследователю полностью воспроизвести данное исследование.

Третья глава диссертации посвящена собственным результатам. Приведен подробный анализ данных о направленной модификации внутриклеточных липидов и исследовании роли липидов в развитии и криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки. Показано, что дейтерированные жирные кислоты проникают в липидные гранулы ооцитов домашней кошки и распределяются внутри них равномерно при комнатной температуре, тогда как при охлаждении до -25°C более насыщенные липиды располагаются по периферии липидных гранул, а более ненасыщенные липиды располагаются по центру липидных гранул. Воздействие ненасыщенной линолевой кислоты в ходе культивирования *in vitro* приводит к увеличению, а насыщенной стеариновой кислоты к снижению степени ненасыщенности внутриклеточных липидов в преимплантационных эмбрионах, но не влияет на степень ненасыщенности липидов ооцитов домашней кошки. Показано, что добавление ненасыщенной линолевой или насыщенной стеариновой кислот в процессе созревания ооцитов и культивирования преимплантационных эмбрионов домашней кошки не влияет на их развитие *in vitro* при физиологических температурах. Добавление линолевой кислоты в культуральную среду приводит к снижению температуры фазового перехода липидов в преимплантационных эмбрионах (на 5°C), но не в ооцитах домашней кошки при их охлаждении. Добавление стеариновой кислоты в культуральные среды приводит к повышению температуры фазового перехода липидов как в ооцитах (на 11°C), так и в

эмбрионах домашней кошки ($>20^{\circ}\text{C}$). Добавление линолевой кислоты в культуральную среду не влияет на эффективность криоконсервации ооцитов, но приводит к повышению эффективности криоконсервации преимплантационных эмбрионов домашней кошки, которую оценивали по увеличению числа интерфазных ядер в поздних морулах. Добавление стеариновой кислоты в культуральную среду не влияет на эффективность криоконсервации ооцитов, но приводит к снижению эффективности криоконсервации эмбрионов, которую оценивали по снижению как общего числа ядер, так и интерфазных ядер, а также по увеличению процента фрагментированных ядер.

С.В. Окотруб демонстрирует очень высокий уровень анализа полученных результатов и знания изучаемой проблематики.

Четвертая глава диссертационной работы посвящена обсуждению полученных результатов. В этой главе соискатель подробно обсуждает полученные в ходе проведенной работы результаты, опираясь на последние исследования в данной области. Подробно обсуждается подтверждение гипотезы о том, что степень ненасыщенности липидов играет важную роль в криоустойчивости ооцитов и эмбрионов домашней кошки, в которую Светлана Васильевна внесла существенный вклад. Полученные результаты являются важными для понимания роли липидов в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки и могут быть применены для разработки новых протоколов криоконсервации эмбрионов редких видов кошачьих.

Раздел Заключение суммирует все полученные автором результаты, а Выводы соответствуют поставленным задачам.

Хотя диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне и в результате ее получены очень важные результаты, она не лишена замечаний и недостатков. Так, например, в главе Обзор литературы отсутствует сравнительное описание репродуктивной биологии домашней кошки и других представителей семейства кошачьих. При этом автор пишет, что данное исследование интересно прежде всего для разработки протоколов криоконсервации эмбрионов редких видов кошачьих, а домашнюю кошку часто используют как модельный вид для совершенствования методов вспомогательных репродуктивных технологий. Однако без сравнительного анализа сложно оценить обоснованность выбора модельного вида для исследования. Создается ощущение, что домашняя кошка как модельный вид выбрана исключительно из-за доступности материала. Остается непонятным, насколько полученные результаты можно экстраполировать на другие виды кошачьих, учитывая межвидовые различия в особенностях размножения.

В главе Материалы и методы С.В. Окотруб на страницах 76-77 описывает протоколы криоконсервации эмбрионов домашней кошки. Протоколы криоконсервации с добавлением линолевой и стеариновой кислот сильно различаются между собой. Однако Светлана Васильевна нигде не упоминает, чем обусловлены такие различия в методах криоконсервации эмбрионов и как это могло сказаться на полученных результатах?

Нельзя не отметить, что текст диссертации очень перегружен аббревиатурами, что сильно затрудняет чтение и понимание диссертационной работы.

Следует отметить также выбор специальности, по которой предполагается защита диссертационной работы С.В. Окотруб. Работа «РАННЕЕ РАЗВИТИЕ И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ МАЛЫХ КОШЕК (FELIDAE: FELINAE): ВЛИЯНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЛИПИДОВ» представлена на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12. Зоология. Если рассматривать зоологию в широком понимании, то конечно эмбриология является частью зоологии. При этом, хотя постановка задачи, безусловно, определяется зоологической проблематикой, диссертационная работа, по крайней мере, на 90% выполнена в рамках эмбриологии и криобиологии. Учитывая специфику данной работы (исследование биохимических и биофизических процессов при криоконсервации), на наш взгляд, для адекватной оценки диссертационной работы было бы целесообразно присутствие в диссертационном совете специалистов эмбриологов, физиологов и криобиологов.

Несмотря на указанные замечания, представленная диссертация производит весьма благоприятное впечатление и характеризует автора как состоявшегося специалиста, глубоко разбирающегося в проблеме исследований, способного решать теоретические и практические задачи на высоком методологическом уровне. Исследование С.В. Окотруб вносит существенный вклад в понимание роли липидов в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки. Новые результаты, полученные автором, достоверны и не только отвечают на поставленные вопросы, но и задают новые темы для исследований в этом направлении. Выявленные недостатки не влияют на результаты исследования, а замечания легко могут быть устранены и носят, в основном, редакторский характер.

Основные положения диссертации отражены в 5 научных работах, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК, из них 3 в рецензируемых отечественных изданиях, 2 статьи в рецензируемых зарубежных изданиях.

Диссертационная работа Окотруб Светланы Васильевны по содержанию, актуальности, новизне, практической ценности полученных результатов соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного

постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 Зоология.

Отзыв на диссертацию и автореферат заслушан, обсужден и утвержден на заседании лаборатории поведения и поведенческой экологии млекопитающих Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН), протокол заседания №3 от 20 апреля 2023 г: присутствовали на заседании 12 человека, результат голосования – «ЗА» – 12 человек, против и воздержавшихся – нет.

Отзыв составил:

старший научный сотрудник
лаборатории поведения и поведенческой
экологии млекопитающих ИПЭЭ РАН
кандидат биологических наук

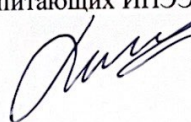
erofeevamariva@yandex.ru



Ерофеева Мария Николаевна

председатель заседания лаборатории,
заведующий лабораторией поведения и
поведенческой экологии млекопитающих ИПЭЭ РАН
академик РАН

rozhnov-v-2015@yandex.ru



Рожнов Вячеслав Владимирович

Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института проблем экологии и
эволюции им. А.Н. Северцова
Российской академии наук (ИПЭЭ РАН)

Адрес: Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33

Телефон: 8 (495) 633-09-22

E-mail: admin@sevin.ru

Сайт организации: www.sev-in.ru