

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Кузьминой Татьяны Ивановны на диссертационную работу Окозуб Светланы Васильевны «Раннее развитие и криоконсервация ооцитов и эмбрионов малых кошек (*FELIDAE:FELINAE*): влияние внутриклеточных липидов», представленную к защите в диссертационный совет при Институте систематики и экологии животных СО РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12–Зоология

**Актуальность избранной темы.** Сохранение генетических ресурсов и рациональное использование животных является неотъемлемой частью зоологической, биотехнологической, сельскохозяйственной наук. По данным международного союза охраны природы 27% видов млекопитающих находятся под угрозой исчезновения (МСОП, 2023). Из 6200 пород животных, относящихся к 40 видам, внесенных в банк данных ФАО/ЕАЖ, более 30% мировых генетических ресурсов домашних животных находятся на грани вымирания. Криоконсервация гамет и эмбрионов имеет преимущества перед традиционными методами сохранения видов, а именно: возможность транспортировки на большие расстояния; легкость обмена генетическим материалом между популяциями; высокая степень надежности; сведение до минимума эффекта генетического дрейфа и инбридинга; обеспечение сохранения видов в случае эпидемий, экологических и социальных катастроф; использование отдаленной гибридизации; создание коллекции биологических материалов для фундаментальных исследований в медицине и животноводстве. Криоконсервация ооцитов и создание криобанков женских гамет и эмбрионов значительно расширяют возможности эмбриотехнологий. Ооциты млекопитающих чрезвычайно чувствительны к гипотермии, и успехи в замораживании женских гамет не столь убедительны, как в криоконсервации мужских гамет и эмбрионов. До настоящего времени число потомков, полученных из криоконсервированных

ооцитов животных разных видов, за исключением человека, незначительно. Исключение представляют феноменальные достижения доктора Kuwayama в получении потомства у человека из витрифицированных ооцитов (M.Kuwayama, 2010). Причины таких высоких результатов кроются в ряде методических приемов и специфики технологии экстракорпорального созревания и оплодотворения ооцитов *in vitro* у человека. Липидом ооцита – важный интрацитоплазматический компартмент представлен и визуализируется в клетке, как липидные капли. Липидные капли имеют уникальную архитектуру, включающую гидрофобное ядро нейтральных липидов, в том числе триглицеридов, и окружающий его фосфолипидный монослой, «усеянный» специфическим набором белков (Olzmann J.A., Carvalho P., 2019). Липидные капли образуются при возникновении избытка жирных кислот, поглощении экзогенных жирных кислот или из продуктов биосинтеза жирных кислот *denovo*, которые в дальнейшем преобразуются в триглицериды (Hershey V.J. et al., 2020). Внутриклеточные липиды, хранящиеся в липидных каплях, необходимы как энергетический источник для роста и созревания ооцитов. Исследования последних лет показывают, что липидные капли очень динамичные органеллы. Они подвижны, меняют свою форму, объем и локализацию в ооплазме, а также взаимодействуют с другими органеллами. Показано, что липидные капли играют важную роль в энергетическом метаболизме во время созревания яйцеклетки, оплодотворения и раннего эмбрионального развития, а также в криотолерантности ооцитов и эмбрионов (Kilwein M.D., Welte M.A., 2019, Khan R. et al., 2021). Содержание липидных капель в ооцитах и эмбрионах млекопитающих отличается у разных видов и даже особей. В настоящее время широко известно негативное влияние повышенного содержания липидов в донорских ооцитах, приводящее к низкому уровню оплодотворяемости женских гамет (Milaković I. et al., 2008, Gadea J. et al. 2020). Высокое содержание липидов в ооцитах и эмбрионах домашних кошек позволяет использовать их гаметы и доимплантационные зародыши в

качестве информативной модели для понимания роли липидома при созревании и оплодотворении яйцеклеток, а также при развитии эмбрионов, что позволит подойти к решению ряда актуальных проблем репродуктивной биологии, в том числе клеточной и генетической инженерии, а также к созданию криобанков редких и исчезающих пород и видов животных.

Знание фундаментальных основ эбрио- и крио- технологий позволяет использовать накопленный в этой области опыт и концентрировать усилия исследователей на познании механизмов регулирования процессов, детерминирующие фертильность и криотолерантность репродуктивных клеток и эмбрионов млекопитающих.

Обоснованно выбранная автором модель для исследования и четко поставленные диссертантом цель и задачи, в ракурсе обозначенных выше проблем, определили высокую актуальность диссертационной работы С.В. Окотруб, как для фундаментальной науки, так и для решения практических задач.

**Научная новизна исследований.** При выполнении диссертационной работы автором были получены новые результаты, значительно дополняющие имеющиеся знания в исследуемой области.

Впервые получены данные о распределении липидов внутри липидных гранул нативных и размороженных ооцитов домашней кошки (*Felis silvestris catus*), охарактеризован состав внутриклеточных липидов после направленной модификации в ооцитах и доимплантационных эмбрионах при воздействии ненасыщенной линолевой кислоты или насыщенной стеариновой кислоты. Автором исследованы фазовые переходы липидов при охлаждении ооцитов и полученных *in vitro* доимплантационных эмбрионов как без воздействий, так и при модификации липидного состава. Оценена эффективность модификации липидного состава на показатели фертильности ооцитов и раннее развитие доимплантационных эмбрионов домашней кошки. В результате сравнительного мониторинга показателей фертильности ооцитов (оценка статуса хроматина) и компетенции к

развитию доимплантационных эмбрионов с использованием комплекса методов (экстракорпоральное созревание и оплодотворение ооцитов, спектроскопия, флуоресцентный анализ и др.) идентифицированы эффекты жирных кислот на структурирование липидома ооцитов и ранних зародышей домашней кошки в условиях сверхнизких температур, что позволило модернизировать состав культуральных сред для созревания ооцитов, согласно поставленным задачам.

#### **Теоретическая и научно-практическая ценность работы.**

Полученные автором результаты расширяют имеющиеся фундаментальные знания о влиянии сверхнизких температур на преобразование хроматина (динамика мейоза), показатели фертильности и раннее развитие зародышей животных на примере модели криоконсервации домашней кошки. Выявлены особенности мейотического созревания, формирования зигот и эмбрионов при воздействии различных условий культивирования и сверхнизких температур. Практическим результатом является модификация протоколов замораживания женских гамет и эмбрионов домашней кошки на основе полученных данных об особенностях влияния насыщенных и ненасыщенных жирных кислот на структурирование липидов в исследованных объектах. Работа вносит фундаментальный вклад в понимание роли липидов при охлаждении и криоконсервации ооцитов и доимплантационных эмбрионов видов семейства кошачьих. Показано, что направленное изменение степени ненасыщенности внутриклеточных липидов преимплантационных эмбрионов домашней кошки при определенных условиях их культивирования сопровождается повышением их криотолерантности. В завершении раздела «Обсуждение результатов исследований» автор формулирует практические предложения о возможных путях коррекции протоколов культивирования доимплантационных эмбрионов для повышения эффективности этапов технологии криоконсервации и создания криобанков с целью сохранения генетического разнообразия диких представителей кошачьих, в том числе разводимых в неволе представителей малых кошек (*Felinae*).

**Общая характеристика работы, завершенность и качество ее оформления.** Диссертационная работа Окотруб С.В. структурно представлена оглавлением, введением, обзором литературы, описанием методов и результатов исследования, обсуждением, выводами, списком сокращений, и библиографическим списком цитируемой литературы, включающим 239 источников, из них 11 отечественных и 228 зарубежных. Работа изложена на 173 страницах печатного текста, содержит 20 рисунков и 12 таблиц.

Во введении имеются все необходимые подразделы, представлена актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, четко отражена научная новизна исследования, его теоретическая и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор (44 страницы) достаточно полно охватывает имеющиеся публикации в рамках тематики исследования, согласно поставленным задачам, информативен, хорошо структурирован, иллюстрирован 5 рисунками.

Во второй главе диссертации детально описан дизайн экспериментов. В соответствии с текстом, представленном в данном разделе можно заключить, что работа была проведена с использованием комплекса методов на современном оборудовании, что значительно повысило информативность и достоверность полученных автором результатов. В диссертационной работе использованы адекватные методы статистического анализа, которые позволили выявить достоверные различия между ранжированными группами по контролируемым параметрам.

В третьей главе описаны результаты исследования по разделам. В разделе 3.1 представлены данные исследований по модификации внутриклеточных липидов и роли липидов в развитии и криоконсервации ооцитов домашней кошки. Анализируются экспериментальные данные поглощения дейтерированных жирных кислот ооцитами и их распределение

внутри липидных гранул, влияния модификации липидного состава ооцитов на температуру фазового перехода липидов, развития ооцитов *in vitro* и эффективности их криоконсервации. В разделе 3.2. описаны результаты направленной модификации внутриклеточных липидов и исследования их роли в развитии и криоконсервации преимплантационных эмбрионов домашней кошки, включая подразделы о влиянии модификации липидного состава эмбрионов на температуру фазового перехода липидов, развитии эмбрионов *in vitro* и эффективности их криоконсервации. Разделы главы 3 иллюстрированы рисунками и таблицами.

Грамотный анализ экспериментальных данных обосновывает формирование научных положений и выводов, позволяет идентифицировать новизну исследования.

В обсуждении в краткой форме изложен анализ собственных результатов, проведено их сравнение с литературными данными, сделаны необходимые обобщения. Работа завершается выводами, которые носят конкретный характер, опираются на анализ полученных автором 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, женских гамет и доимплантационных эмбрионов, грамотным формированием экспериментальных групп, в соответствии с задачами исследования, для оценки особенностей структурирования липидома и показателей фертильности ооцитов исследованных животных, подвергшихся воздействию сверхнизких температур. В исследовании использован комплекс современных высокоинформативных методов: биотехнологических (технология экстракорпорального созревания и оплодотворения ооцитов);

криобиологических; цитологических; биофизических (флуоресцентная микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния света или Рамановская спектроскопия). Эксперименты выполнены на высокотехническом оборудовании последнего поколения и проанализированы с использованием адекватных методов статистического анализа, документированы репрезентативными изображениями объектов исследования.

Результаты, представленные в диссертации С.В. Окотруб, обсуждены на трех международных научных конференциях, автором опубликовано 5 научных статей в рецензируемых отечественных и международных журналах, входящих в базу данных Web of Science и Scopus, рекомендованных ВАК, и 4 тезиса в сборниках трудов конференций.

#### **Замечания по диссертационной работе.**

В тексте диссертации имеются неудачные выражения и опечатки, но они не мешают общему восприятию материалов диссертации.

Принципиальных замечаний к диссертации и автореферату не имеется. В качестве научной дискуссии, хотелось бы услышать аргументацию автора по следующим вопросам:

Как справедливо отмечает автор в обзоре литературы, существуют несколько подходов к криоконсервации биологических объектов, в частности, медленное замораживание и витрификация.

Почему автор использовал в своих исследованиях технологию медленного замораживания женских гамет и доимплантационных эмбрионов?

Ваше видение возможности корректирующего влияния насыщенных и ненасыщенных жирных кислот на трансформацию липидома в условиях витрификации ооцитов и эмбрионов малых кошек? На чем основывался выбор рабочей концентрации использованных в ваших экспериментах насыщенных и ненасыщенных жирных кислот

В свете полученных вами данных о роли липидов в приобретении криотолерантности женских гамет и эмбрионов малых кошек, какие результаты могут быть рекомендованы для разработки способов повышения эффективности криотехнологий у других видов животных?

Ваше видение механизмов корректирующего действия на липидом ооцитов и доимплантационных эмбрионов насыщенных и ненасыщенных жирных кислот и перспектив дальнейших исследований по модернизации этапов технологии криосохранения репродуктивных клеток и ранних зародышей малых кошек.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Окозуб Светланы Васильевны «Раннее развитие и криоконсервация ооцитов и эмбрионов малых кошек (*FELIDAE:FELINAE*): влияние внутриклеточных липидов», выполненная под руководством доктора биологических наук Амстиславского Сергея Яковлевича и представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12– Зоология, является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение задач, имеющих важное значение для сохранения генофонда редких и исчезающих видов животных и расширения знаний фундаментальных механизмов функционирования липидома женских гамет и эмбрионов в условиях сверхнизких температур с целью создания эффективных моделей их криоконсервации. 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 заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12–Зоология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук (генетика - 03.02.07),  
профессор (генетика - 03.02.07),  
главный научный сотрудник,  
заведующая лабораторией биологии развития  
ВНИИГРЖ – филиала ФГБНУ  
«ФИЦЖ– ВИЖ им. Л.К. Эрнста»

Т.И. Кузьмина

Подпись Кузьминой Т.И. заверяю



Личную подпись: *Кузьмина Т.И.*  
Удостоверяю:  
Начальник ОК ВНИИГРЖ  
Подпись: *Тарасов Е.И.*



ВНИИГРЖ – филиала ФГБНУ  
«ФИЦЖ– ВИЖ им. Л.К. Эрнста»  
196601, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин,  
Московское шоссе, д. 55а  
Тел.(812) 451-76-63, (812) 451-65-19 (доб. 121);  
факс: (812) 465-99-89, spbvniigen@mail.ru