

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора сільськогосподарських наук, професора Шарана М.М. на дисертаційну роботу Зюзюн Ази Богданівни «Цитоморфологічні особливості ооцит-кумуляюсних комплексів та ембріонів сільськогосподарських тварин за умов культивування *in vitro*» подану до спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Актуальність теми дисертаційної роботи. Для забезпечення прискореного розмноження цінних генотипів, збереження генетичних ресурсів зникаючих порід і видів тварин створенням банків генетичного матеріалу необхідний постійний розвиток методів репродуктивної біотехнології у тваринництві, зокрема одержання ембріонів *in vitro*, їх кріоконсервування та трансплантація.

У сучасних умовах для збільшення кількості видів тварин, від яких можна ефективно використовувати генетичний матеріал у програмах запліднення *in vitro*, трансгенезу і клонування, потрібно застосовувати нові методичні підходи біотехнології відтворення, а саме: культивування незрілих ооцитів, вилучених із яєчників тварин, запліднення їх поза організмом і отримання повноцінних ембріонів на доімплантаційних стадіях. Для результативності проведення робіт з репродуктивної біотехнології необхідне використання новітніх методів генетики, клітинної біології та ембріології в умовах детального вивчення особливостей раннього ембріогенезу ссавців *in vitro*.

Для встановлення закономірностей генетичних процесів у ранньому ембріогенезі ссавців важливим є проведення морфологічного та цитогенетичного аналізу гамет і ембріонів тварин на ранніх етапах розвитку в умовах *in vitro*, що забезпечує об'єктивну оцінку їх біологічної повноцінності.

У зв'язку з цим актуальним є визначення цитогенетичних і морфологічних особливостей ооцит-кумуляюсних комплексів окремих видів сільськогосподарських тварин і вдосконалення методів отримання ембріонів в умовах *in vitro*.

Про актуальність дисертаційної роботи свідчить і те, що вона була виконана у межах досліджень Інституту розведення і генетики тварин НААН за двома завданнями 2006-2010 рр. (№№ держреєстрації 0107U00515 і 0107U005152) та двома завданнями 2011-2015 рр. (№№ держреєстрації 0111U003288 і 0111U003289).

Наукова і практична цінність отриманих результатів та їх вірогідність.

Уперше встановлено оптимізуючу дію наноматеріалів на основі високодисперсного кремнезему на середовища для дозрівання та формування ембріонів кролів і свиней *in vitro*, удосконалено умови культивування ооцит-кумулюсних комплексів кролів, свиней і кіз та отримання *in vitro* доімплантаційних ембріонів кролів та свиней. Вперше в Україні доведена можливість культивування *in vitro* незрілих ооцитів кіз з метою їх дозрівання до стадії мейозу метафази II, а також досліджено цитогенетичні особливості ооцитів кролів та кіз в динаміці їх культивування *in vitro*.

Вірогідність результатів досліджень підтверджена як кількістю використаних у експериментах зразків і тварин, так і наглядним матеріалом у вигляді рисунків і таблиць, а також статистичним аналізом отриманих даних і вірогідними різницями між середніми арифметичними значеннями.

Практична цінність результатів дисертаційної роботи полягає в розробленні методів комплексного морфологічного та цитогенетичного аналізу ооцит-кумулюсних комплексів самок сільськогосподарських тварин різних видів, що забезпечує підвищення рівня запліднення ооцитів та збільшення ефективності розвитку ембріонів *in vitro*. Дисертантом запропоновано удосконалену методику отримання і дозрівання ооцитів кролів, свиней та кіз поза організмом, що підвищує якість ембріонів, одержаних *in vitro*.

Рекомендації для використання результатів та висновків роботи.

Отримані дисертантом результати мають важливе значення для науки і практики. Результати досліджень, висновки і практичні пропозиції можуть

використовуватись у практичній роботі лабораторій репродуктивної біотехнології для об'єктивної оцінки біологічної повноцінності гамет і ембріонів тварин на ранніх етапах розвитку в умовах *in vitro*, а також у вищих навчальних закладах у курсах лекцій і лабораторно-практичних занять з дисципліни "Біотехнологія".

Оформлення дисертаційної роботи. Дисертаційна робота викладена на 178 сторінках комп'ютерного тексту і включає «Вступ» та розділи: «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати власних досліджень», «Аналіз і узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Пропозиції виробництву», «Додатки» та «Список використаних джерел». Дисертація ілюстрована 35 таблицями, 72 рисунками та 2 додатками. Список використаної літератури включає 237 джерел, з яких 198 – латиницею.

Вступ дисертаційної роботи написаний чітко і лаконічно, відповідно до вимог. У ньому обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету і завдання досліджень, наведено зв'язок робіт із науковими програмами, висвітлено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, інформовано щодо особистого внеску здобувача та апробації результатів досліджень.

Огляд літератури викладено на 22 сторінках тексту, що становить 14,7 відсотка від обсягу основної частини дисертації. Він складається з 3 підрозділів, у яких проведено аналіз літературних джерел за темою дисертації та подана інформація щодо стану розроблення методів дозрівання ооцитів поза організмом, проблеми капацитації спермійів, запліднення яйцеклітин поза організмом та отримання ембріонів *in vitro*, а також застосування нанотехнології у репродуктивній біотехнології та особливості методів дозрівання ооцитів поза організмом і отримання ембріонів *in vitro* у кролів, свиней та кіз.

Інформативний і аналітичний огляд літератури дав можливість дисертанту повністю сформулювати мету та поставлені завдання наукових досліджень. Опрацювання і аналітичне осмислення вітчизняних та зарубіжних джерел

літератури свідчить про те, що Зюзюн А.Б. добре обізнана з науковою інформацією щодо своєї теми дисертаційної роботи.

Зауваження до огляду літератури.

- На с.24 відсутнє пояснення складу середовища SOF – BSA – AA.
- Бажано подати узагальнення до розділу з мотивацією вибору напрямів досліджень.

Розділ «**Матеріали і методи досліджень**» описано чітко на 13 сторінках, він містить 6 підрозділів, у яких, відповідно до мети роботи, наведена загальна схема досліджень, висвітлені детальні схеми окремих експериментів та методики. Все це свідчить, що дисертант добре володіє методами досліджень, які підібрані таким чином, щоб повністю досягнути як в загальному мети дисертаційної роботи, так і вирішення кожного зокрема завдання.

Зауваження до розділу 2.

1. Вважаю недоцільним наведення енциклопедичного опису порід кролів, свиней і кіз у підрозділі 2.1 (стор. 33-38).
2. Підрозділ 2.3 доцільно було б назвати “Підготовка спермійів і ооцитів до запліднення *in vitro*”, оскільки наведено і методику підготовки ооцитів.
3. Потребують уточнення наступні моменти методики:
 - за якими критеріями відбирали ооцити для *in vitro* запліднення?;
 - яка тривалість культивування зигот? (дисертант вказує 4-8 діб, очевидно є розбіжності за видами тварин);
 - з якою періодичністю оцінювали ембріони;
 - яка методика приготування еструсної сироватки корів.

Результати власних досліджень (Розділ 3) відповідають схемі досліджень і завданням дисертаційної роботи та поділяються на окремі частини, які об'єднуються за викладеним матеріалом. Розділ викладений на 90 сторінках (60,0 %) та складається з 3 підрозділів, які, відповідно до мети та методів досліджень, висвітлюють результати експериментів.

Зокрема, у першому підрозділі викладено результати морфологічних і цитогенетичних досліджень формування ембріонів кролів *in vitro*. Дисертантом проведено вивчення та удосконалення всіх елементів методу запліднення ооцитів кролів *in vitro*. Так, наведено результати цитоморфологічних досліджень ооцит-кумулюсних комплексів кролиць, одержаних із яєчників у різні фази естрального циклу, в період статевого дозрівання та статевозрілих тварин.

Встановлено оптимальний час та видові особливості культивування ОКК кролиць, удосконалено середовища для дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів і ембріонів кролів застосуванням наноматеріалу ВДК/D-галактозаміну та ВДК t°C200, що дозволило підвищити результативність отримання ембріонів кролів *in vitro*.

Другий підрозділ представлений результатами морфологічних і цитогенетичних досліджень формування *in vitro* ембріонів свиней. Зокрема, проведено аналіз дозрівання *in vitro* ооцит-кумулюсних комплексів свиней порід велика біла, ландрас і миргородська, а також висвітлено особливості формування *in vitro* ембріонів свиней цих порід. Особливої уваги заслуговують результати удосконалення середовища для культивування ооцитів і ембріонів свиней *in vitro* застосуванням наноматеріалу ВДК/N-галактози. Дисертантом доведено, що додавання наноматеріалу в середовище для культивування ембріонів забезпечує отримання в умовах *in vitro* більшої кількості ембріонів свиней розвинутих до передімплантаційних стадій.

У третьому підрозділі висвітлено результати морфологічної і цитогенетичної оцінки популяцій ооцит-кумулюсних комплексів кіз. Зокрема, наведено глибокий аналіз популяцій ооцит-кумулюсних комплексів, вилучених із яєчників кіз на різних фазах статевого циклу і доведено, що як джерело ооцитів доцільнішим є використання яєчників кіз на стадії фолікулярного росту, оскільки з них можна вилучити більше придатних до культивування поза організмом ооцитів і вірогідно меншу кількість дегенерованих гамет. Також визначено

оптимальні умови для дозрівання *in vitro* ооцит-кумулюсних комплексів кіз (тривалість культивування, удосконалене середовище), які мають перспективи для отримання ембріонів поза організмом.

Слід відзначити, що розділ результатів власних досліджень вдало ілюстрований великою кількістю фотографій яєчників, ооцитів, ембріонів і цитогенетичних препаратів, що покращує враження від дисертаційної роботи.

Зауваження до розділу 3.

- У підрозділі 3.1.1 на с.45-46 наведено літературні дані, які бажано перенести у літературний огляд.
- На с.47 некоректне речення “Збуджена паруванням залоза внутрішньої секреції гіпофіз...”.
- У підрозділі 3.1.3 на с.63 потребує пояснення, чим зумовлена така значна розбіжність тривалості культивування ооцитів *in vitro* (від 6 до 24 год).
- У підрозділі 3.1.5 на с.69-70 наведено літературні дані, які бажано перенести у літературний огляд.
- На с.71 дисертант робить узагальнення про «позитивний вплив ВДК/D-галактозаміну на мейотичне дозрівання ооцитів...». Інформативнішим було б узагальнення «під впливом ВДК/D-галактозаміну підвищується ефективність мейотичних перетворень ооцитів, що характеризується...».
- У підрозділі 3.1.6 на с.72 некоректно вказувати назви препаратів PMSG (слід ГСЖК) і hCG (слід ХГ).
- На с.73 автор невірно інтерпретує результати табл. 3.17, вказуючи на незначну перевагу *in vitro* отримання ооцитів кролиці, оскільки кількість морфологічно нормальних ОКК, які досягли розвитку метафази II, були майже однаковими – 89,0 і 88,5 %.
- На с.76 некоректне висловлювання «перебування сперміїв у середовищі» (слід «культивування сперміїв...»).

- Фото 3.26 на с.85 невдале, оскільки з усіх ембріонів, які характеризує дисертант, добре видно тільки одну морулу.
- При вивченні додавання ВДК/D-галактозаміну до культурального середовища не вказано, чи контролювали рН і осмотичний тиск, які є вкрай важливими для гамет і ембріонів і могли б пояснити «оптимізацію середовища», на яку вказує дисертант.
- У кінці кожного підрозділу результатів власних досліджень слід зазначити посилання на власні статті.

В розділі 4 «Аналіз і узагальнення результатів досліджень», викладеному на 13 сторінках, дисертант, посилаючись на джерела літератури (там, де це можливо), аналізує результати власних досліджень. Автор аргументовано і логічно доводить можливість отримання *in vitro* в лабораторних умовах біологічно повноцінних ембріонів кролів і повноцінно дозрілих яйцеклітин кіз. Повнота аналізу підтверджена наведеними у розділі діаграмами, які глибоко розкривають взаємозв'язок між досліджуваними показниками.

За результатами досліджень зроблено 8 висновків і 3 пропозиції виробництву.

Зауваження до розділу 4.

- На с.144 друге речення третього абзацу повторює третій абзац на с.143.

Список використаних джерел розміщений за абеткою. Імпонує те, що 157 або понад 66 % джерел цитованої літератури за останні 15 років, що вказує на володіння сучасними науковими даними.

Зауваження до списку використаних джерел.

Необхідно коректувати оформлення окремих джерел: 3, 15, 43, 45, 66, 74, 88, 100, 105, 120, 127, 144, 159, 160, 195, 203, 217.

Зауваження в цілому до дисертації.

Після номера таблиці крапка не ставиться.

Тавтологія: с. 31, 110.

Русизми: даний... – впродовж тексту,

складає – с.46, 71, 104,
 в якості – с.46, 62
 спарювання – с. 46,
 більш швидкий – с. 10, 110,
 найбільш великі – с.37,
 шляхом... розсічення – с. 38, 126
 сама видатна – с. 37,
 по групам – с. 121,

Невдалі (некоректні) вислови:

на Україні – с. 34,
 на фолікулярній (лютеїновій) фазі – впродовж тексту,
 напряду залежить – с. 31.

Граматичні помилки: с. 11, 12, 14-16, 18-20, 27, 28, 30, 31, 39, 60, 109,
 111, 125, 128, 145.

Технічні помилки: с. 28, 46, 50, 56, 60, 62, 72, 86, 102, 109, 144.

Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій сформульованих в дисертації. Дисертація Зюзюн А.Б. є самостійною і завершеною науковою працею, яка є підсумком власних досліджень за період 2007-2015 років, її зміст відповідає спеціальності 03.00.20 – біотехнологія з біологічних наук. Експериментальна робота виконана методично правильно, на достатній кількості матеріалу та тварин, висновки аргументовані і впливають з результатів досліджень. Правильний вибір схем та методик досліджень, інтерпретація отриманих результатів вказує на те, що дисертант володіє ними досконало і повністю досягнув поставленої у роботі мети.

Відповідність змісту автореферату основним положенням дисертації. Автореферат у повному обсязі відображає матеріали дисертаційної роботи. Основні положення, висновки, пропозиції виробництву є ідентичними в дисертації та авторефераті.

Публікації основних результатів дисертації. Основні положення дисертації викладені у повному обсязі в 24 наукових працях, з них 12 наукових статей, 5 статей у фахових виданнях, затверджених ДАК МОН України, 2 – в іноземних наукових журналах.

Висновок. Дисертаційна робота Зюзюн Ази Богданівни «Цитоморфологічні особливості ооцит-кумулюсних комплексів та ембріонів сільськогосподарських тварин за умов культивування *in vitro*» є завершеною науковою працею, за актуальністю, вірогідністю одержаних результатів, науковою новизною та практичною цінністю відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів № 567 від 24 липня 2013 року, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Завідувач лабораторії біотехнології відтворення
Інституту біології тварин НААН,
доктор сільськогосподарських наук, професор

 — Шаран М.М.

Підпис Шарана М.М. засвідчую:

Провідний фахівець відділу кадрів,
кандидат сільськогосподарських наук





Невоструєва І.В.