

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Зюзюн Ази Богданівни «**ЦИТОМОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ ТА ЕМБРІОНІВ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН ЗА УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO***», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Наразі одним із важливих напрямів сучасної біотехнології тварин є одержання ембріонів *in vitro* та їх кріоконсервування, що дає можливість прискорено розмножувати цінні генотипи та зберігати генетичні ресурси зникаючих порід і видів тварин шляхом створення генетичних банків. Одним із способів тут є культивування незрілих ооцитів, вилучених із яєчників забитих тварин, їх запліднення поза організмом і отримання повноцінних ембріонів на доімплантаційних стадіях. Біологічну повноцінність гамет і ембріонів тварин на ранніх етапах розвитку в умовах *in vitro* можливо оцінити за їх морфологічного та цитогенетичного аналізу. Це дозволяє також виявити особливості перебігу генетичних процесів у ранньому ембріогенезі ссавців. В Україні такі дослідження проводяться явно недостатньо. Тому роботу А.Б. Зюзюн, присвячену визначенню цитогенетичних і морфологічних особливостей ооцит-кумулюсних комплексів деяких видів сільськогосподарських тварин та вдосконалення методів отримання ембріонів в умовах *in vitro* слід визнати важливою та актуальною як з практичного боку, так і для подальшої розробки фундаментальних основ біотехнології тварин.

Дисертаційну роботу побудовано за традиційним типом. Вона складається із вступу, чотирьох розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. На початку роботи наведено перелік умовних скорочень. Текст зі списком літератури (237 джерел), ілюстраціями (72 рисунки та 35 таблиць), трьома додатками у вигляді копій актів впровадження викладено на 179 сторінках машинопису.

У вступі коротко обґрунтовується актуальність теми; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; наведено мету і завдання досліджень; дано коротке визначення об'єкта, предмета та методів дослідження; викладено наукову новизну одержаних результатів та їхнє практичне значення; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію роботи та публікації результатів досліджень.

Розділ 1 «Отримання ембріонів сільськогосподарських тварин *in vitro*» — це огляд літератури, в якому детально проаналізовано результати досліджень та наявні відомості з особливостей дозрівання ооцитів різних тварин поза організмом, з особливостей розвитку ембріонів сільськогосподарських тварин в умовах *in vitro*, зокрема кролів та свиней. Розглянуто також літературні дані з існуючих біотехнологічних методів у козівництві. В цілому огляд літератури написано лаконічно, але в ньому достатньо повно висвітлено останні експериментальні дані з питань, що мають відношення до теми дисертації. Огляд свідчить про ґрунтовні знання автором сучасного стану в даній галузі досліджень, критичне відношення до опублікованих результатів, здатність вичленувати і узагальнити головне з масиву розрізнених літературних відомостей, чітко викласти стан та перспективи досліджень, а також коротко і зрозуміло обґрунтувати актуальність, роль та значення власного дослідження у контексті накопичених світовою наукою знань.

У розділі 2 “Матеріали і методи досліджень” наведено принципову схему досліджень, чітко та ясно охарактеризовано дослідні об'єкти та розмір вибірки (тваринний матеріал — гамети та ембріони трьох видів сільськогосподарських тварин: 2 порід кролів, 3 порід свиней і кіз); коротко описано методики отримання ооцитів із яєчників тварин та їх культивування, підготовки сперматозоїдів до запліднення *in vitro*, культивування *in vitro* ембріонів, особливості приготування препаратів для цитогенетичного аналізу та особливості проведення такого аналізу, а також статистичної обробки отриманих результатів. Підкреслено ті модифікації методів, які були

застосовані автором для підвищення ефективності досліджень. У цілому було використано сучасні методи, за допомогою яких отримано коректні результати, адекватні стосовно поставлених задач дослідження.

Розділ 3 «Результати власних досліджень» складається з трьох підрозділів. У першому з них (підрозділ 3.1) наведено результати морфологічних та цитогенетичних досліджень формування ембріонів кролів *in vitro*. Вилучені у кролів із яєчників на різних фазах статевого циклу ооцит-кумулюсні комплекси (ОКК) автор класифікувала за цитоморфологічними ознаками і поділила їх на 4 групи. Найвищий відсоток, майже 87%, придатних до подальшого розвитку *in vitro* ОКК всіх морфологічних груп отримано із яєчників на фолікулярній фазі. Автор порівняла дві породи кролів: сірий велетень і метелик. За морфоцитологічними характеристиками і рівнем дозрівання *in vitro* ооцити, вилучені із яєчників кролиць двох різних порід не відрізнялись. В результаті спільного культивування *in vitro* ооцитів кролиць породи метелик із сперматозоїдами самців цієї ж породи у 78,8% відбулось запліднення, а серед ооцитів, вилучених із яєчників кролиць породи сірий велетень внаслідок запліднення *in vitro* отримано 89,9% зигот. Порівнянням цитоморфологічних характеристик одержаних *in vivo* і одержаних *in vitro* ембріонів встановлено біологічну повноцінність останніх – 89% їх дозрівало до метафази II. Після запліднення *in vitro* 68,4% даних ооцитів розвинулись до стадії 2-4 клітинних ембріонів і 15,8% до стадії ранніх морул. Автор також встановила, що 24 години є оптимальним за тривалістю періодом культивування *in vitro* гамет кролів. Автор також показала, що додавання до середовища для культивування наноматеріалу ВДК/D-галактозаміну у концентрації позитивно впливало на динаміку мейотичного дозрівання *in vitro* ооцитів кролів, внаслідок чого вихід дозрілих *in vitro* ооцитів у дослідній групі збільшився на 11,4% порівняно з таким показником у контрольній. Додавання наноматеріалу ВДК t°C200 також позитивно вплинуло на формування та розвиток ембріонів: у досліді отримано

достовірно більшу кількість ембріонів, які розвинулись до передімплантаційних стадій.

У розділі 3.2 «Морфологічні та цитогенетичні дослідження формування *in vitro* ембріонів свиней» наведено результати дослідження і аналізу змін в ядрах ооцитів з відновленням мейозу *in vitro*, характерні для переходу з профазі мейозу I до наступних стадій мейотичного дозрівання. Досліджено популяцію ооцитів, вилучених із яєчників свиней порід ландрас і велика біла, встановлено їх неоднорідність і гетерогенність за структурою хроматину. Встановлено, що ооцити перебувають на різних стадіях розвитку. Не виявлено впливу породи свиней на якість і кількість вилучених незрілих ооцитів і їх здатність до відновлення мейотичного розвитку *in vitro*. Рівень дозрівання *in vitro* ооцитів, вилучених з яєчників свинок порід ландрас і велика біла склав 87,5%. Не встановлено достовірної різниці у кількості ембріонів у результаті запліднення поза організмом дозрілих в умовах *in vitro* ооцитів, отриманих із фолікулів яєчників свинок обох порід. Автор обґрунтовано підкреслює, що нею доведено доцільність використання ооцит-кумулюсних комплексів свиней порід ландрас і велика біла в репродуктивних технологіях *in vitro*. Досліджуючи вплив наноматеріалів на дозрівання *in vitro* ОКК свиней, автор встановила, що додавання ВДК/N-галактози у середовище для культивування сприяє збільшенню кількості ооцитів, що дозріли до стадії метафази II до 84,2%. Повноцінність дозрівання підтверджує високий рівень формування ембріонів у дослідній групі та їх розвиток до стадії морули. Додавання наноматеріалу ВДК t °C 200 підвищувало кількість ембріонів, що досягли *in vitro* стадії ранньої морули.

У розділі 3.3 «Морфологічна та цитогенетична оцінка популяцій ооцит-кумулюсних комплексів кіз» наведено результати вивчення кіз двох порід (зааненської, ламанча), у яких вилучено і проаналізовано за цитоморфологічними характеристиками 527 ООК. Популяції ооцитів залежно від стану кумулюса та ооплазми розподіляли на чотири групи. Морфологічною оцінкою ОКК встановлено, що придатних до культивування

(I-ї – III-ї груп) ооцитів із яєчників на стадії фолікулярного росту вилучено на 15,9 % більше, ніж із яєчників на лютеїновій фазі. Автор вважає, що як джерело ооцитів доцільно використовувати яєчники кіз на фазі фолікулярного росту, оскільки з них можна вилучити більше придатних до культивування поза організмом ооцитів і достовірно меншу кількість дегенерованих гамет. Автор дослідила вплив тривалості культивування ооцитів кіз *in vitro* – 24, 27 і 30 годин. Оптимальним виявилось 27-годинне культивування, після нього більшість (52,7 %) ООК, вилучених із яєчників кіз, відновили мейоз і досягли метафази II.

Важливим і цікавим є розділ 4 «Аналіз технології отримання ембріонів сільськогосподарських тварин *in vitro* (обговорення отриманих результатів досліджень)». Це досить детальний, усесторонній і глибокий узагальнюючий аналіз результатів досліджень. Підсумком цього аналізу є наступні добре підтверджені власним експериментальним матеріалом твердження автора «...отримані результати аналізу джерел ооцитів для отримання повноцінних ембріонів свідчать, що такий підхід придатний як для отримання і консервування ооцитів цінних тварин, які закінчили свій життєвий цикл, так і для накопичення генетичного матеріалу у вигляді ооцитів тварин зникаючих і автохтонних порід сільськогосподарських видів.» (с. 139) та «Успішні розробки оптимальних методів запліднення *in vitro* незрілих ооцитів сільськогосподарських тварин можуть знайти своє практичне використання для біотехнологічних лабораторій у таких напрямках: а) довготривале збереження генетичного матеріалу зникаючих порід і видів сільськогосподарських тварин і використання їх у селекційному процесі у перспективі; б) тиражування цінних генотипів сільськогосподарських тварин і використання їх у селекційних програмах розвитку певної породи; в) отримання біологічно повноцінних ембріонів тварин для експериментальної бази репродуктивної медицини.» (с.147). З цими положеннями я цілком погоджуюсь як з повністю підтвердженим узагальнюючим висновком,

зробленим автором на основі власного експериментального матеріалу, отриманого сучасними методами досліджень.

У цілому експериментальний матеріал викладено чітко, лаконічно і логічно, основні результати достатньо підтверджено оригінальними та якісними ілюстраціями, зокрема, унікальними фотографіями та схемами. У процесі викладу автор ретельно і критично аналізує власні результати, робить у процесі опису коректні заключення та підсумки. Обговорення та узагальнення проведено чітко, на високому професійному рівні, із залученням літературних даних по всьому тексту дисертації, воно свідчить про те, що автор своїм дослідженням зробила істотний внесок у подальший розвиток новітніх напрямів досліджень у галузі біотехнології сільськогосподарських тварин.

Висновки роботи нові, обґрунтовані, логічно впливають з експериментальних даних. Вони викладені досить чітко, лаконічно та ясно. Пропозиції виробництву теж виглядають важливими і корисними.

Зауважень щодо наукової частини рецензованої дисертаційної роботи, які б негативно впливали на її оцінку, у мене немає. Проте у мене викликала здивування відсутність патентів та авторських свідоцтв за результатами дослідження, значна частина яких (результатів), на мою думку, є патентоспроможною. Якщо говорити прямо, то відсутність запатентованих розробок для дисертаційної роботи у галузі «БІОТЕХНОЛОГІЯ», на мою думку, є істотним недоліком.

Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, слід визнати її як завершене самостійне дослідження, що є актуальним, виконане на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та новизною висновків. За обсягом та рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота «Цитоморфологічні особливості ооцит-кумулясних комплексів та ембріонів сільськогосподарських тварин за умов культивування *in vitro*» заслуговує

позитивної оцінки. Вона відповідає сучасному рівню біотехнологічних досліджень і вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №657 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор – **Зюзюн Аза Богданівна** – заслуговує присудження їй пошукового наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Автореферат достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації, основні експериментальні дані опубліковано в наукових виданнях у вигляді 24 наукових праць, з них 5 статей у фахових виданнях у галузі біологічних наук, 2 статті - в іноземних наукових журналах та 5 тез доповідей у матеріалах конференцій.

Зав. відділом генетики клітинних популяцій
Інституту молекулярної біології та генетики НАН України,
член-кореспондент НАН України,
доктор біол. наук, професор



В.А. Кунах

Підпис *Кунах В. А.*
посвідчується
Зав. кабінетом І. Мейсєва