

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию **Лаврентьевой Елены Андреевны**

«Молекулярно-биологическая характеристика предшественников ядрышек в ранних зародышах мыши и особенности их движения на стадии зиготы»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 — клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность темы выполненной работы. Диссертация Лаврентьевой Е.А. посвящена актуальной проблеме — определению молекулярного состава предшественников ядрышек в преимплантационных эмбрионах мыши и особенностей динамики их движения на стадии зиготы в сравнении с ядрышко-подобными тельцами предовуляторных ооцитов.

Предшественники ядрышек лишены типичных структурных компартментов ядрышек (фибриллярных центров, плотного фибриллярного компонента и гранулярного компонента) и образованы плотноупакованным материалом неизвестной структуры. С помощью классических методов фиксации и подготовки клеток для иммуноцитохимии не удалось выявить в составе предшественников ядрышек ни одного белка, характерного для ядрышек соматических клеток. Не решенным также оставался вопрос присутствия РНК в предшественниках ядрышек. На стадии ранней зиготы в каждом пронуклеусе образуется несколько (до 10 штук) предшественников ядрышек. До сих пор оставалась невыясненной причина уменьшения числа предшественников ядрышек к поздней зиготе, не рассматривалась подробно динамика их движения.

Ближайшими морфологическими аналогами предшественников ядрышек в зиготе являются ядрышко-подобные тельца в предовуляторных

GV ооцитах. Особенности поведения нескольких ядрышко-подобных телец в предовуляторных ооцитах не рассматривались в современной литературе.

Научная новизна работы. Общая природа материала предшественников ядрышек была выявлена с помощью белок- и РНК-связывающих красителей ФИТЦ и пиронина Y. Далее автор поставила перед собой задачу показать ключевые белки ядрышка в составе предшественников ядрышка преимплантационных эмбрионов мыши. Такая постановка вопроса потребовала использовать модифицированные протоколы фиксации с ферментативной обработкой. В разных условиях фиксации и постфиксационной обработки методом иммуноцитохимии впервые показано, что предшественники ядрышек зигот содержат белки ядрышка, которые являются маркерами основных стадий биогенеза рибосом. Впервые описана локализация рРНК в предшественниках ядрышек на разных стадиях развития преимплантационных эмбрионов мыши методом FISH. С помощью метода цейтраферной видеосъемки показано слияние предшественников ядрышек зигот и ядрышко-подобных телец предовуляторных ооцитов мыши *in vitro*. Доказана возможность перехода NSN-типа конфигурации хроматина предовуляторных ооцитов в SN-тип *in vitro*. Показано, что характер динамики движения ядер предовуляторных ооцитов мыши с разной конфигурацией хроматина может служить дополнительным признаком их предрасположенности к завершению созревания.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Лаврентьева Е.А. удачно систематизировала имеющуюся литературу по теме исследования и грамотно сформулировала цели и задачи. В работе ею были использованы современные методы клеточной биологии и микроскопии. Изучение молекулярного состава предшественников ядрышек было проведено с помо-

щью различных протоколов фиксации и подготовки эмбрионов мыши для иммуоцитохимического исследования и автору удалось получить четкие и доказательные результаты на таком сложном объекте, как эмбрион. Примененный метод прижизненной видеосъемки дал диссертанту возможность получить новые интересные данные, касающиеся морфологических изменений эмбрионов и ооцитов. Положения, выносимые на защиту, соответствуют сформулированным цели и задачам исследования. Достоверность полученных данных обеспечена достаточным объемом выборок и статистической обработкой полученных результатов.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Представленная в работе молекулярно-биологическая характеристика предшественников ядрышек логично дополняет существующие представления о молекулярном составе и функциях предшественников ядрышек в раннем эмбриогенезе млекопитающих. Результаты, полученные автором в процессе анализа динамических характеристик ядрышковых производных и ядер важно использовать при отборе ооцитов, компетентных для созревания и дальнейшего оплодотворения *in vitro*. Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора диссертации четко сформулирован на стр. 16 и заключался в анализе отечественной и зарубежной литературы, проведении исследования, анализе и интерпретации полученных данных, формулировке научных положений и выводов, подготовке и публикации статей по результатам исследования, выступлении на научных конференциях.

Диссертация Лаврентьевой Елены Андреевны построена по традиционному плану. Работа иллюстрирована 32 рисунками хорошего каче-

ства, содержит 5 таблиц. Список цитируемой литературы включает 239 источников. В автореферате и опубликованных работах отражены основные положения диссертации. По материалам работы опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 – в журналах, из Перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук.

Однако, после прочтения диссертации у меня осталось несколько вопросов, касающихся как методик, использованных диссертантом, так и некоторых принципиальных аспектов работы:

1. Насколько использование пары ФИТЦ-пиронин Y дифференциально окрашивают соответственно белки и РНК? Это классические красители, однако в последние годы по ним были получены новые данные. Так, с помощью FRET, было показано, что пиронин Y, кроме РНК, хорошо связывается, например, с альбуминами. А FITC не является классическим красителем для определения суммарного уровня белков в клетке. Насколько точно можно говорить в этом случае именно о дифференциальном окрашивании?

2. В разделе 3.2 представлены морфологические различия, выявленные на периферии проядрышек ядер бластомеров. Диссертант связывает это с накоплением в данной области РНК эмбрионального происхождения после активации генома эмбриона. Мой вопрос заключается в следующем: проводились ли какие-нибудь эксперименты для доказательства этого утверждения: например, блокирование активации генома зародыша или другие экспериментальные подходы?

3. Почему при описании стадии зиготы были выбраны именно эти три периода, с какими морфологическими или молекулярно-генетическими особенностями связан именно этот выбор временных периодов?

4. Достаточно большой раздел диссертации посвящен динамике ядра в ооците. В связи с этим у меня возникло два вопроса. Первый – методический: как производилась иммобилизация ооцитов и не могут ли эти небольшие, по-существу, движения ядра быть просто артефактами, связанными с передвижением всего ооцита на плоской поверхности? И второй вопрос: Есть ли какие-нибудь предположения, как эти движения ядра связаны с состоянием цитоскелета ооцита?

Однако эти замечания не являются принципиальными и несколько не снижают высокое качество работы.

Заключение

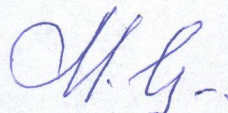
Диссертация Лаврентьевой Е.А. является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена актуальная научная задача - охарактеризован молекулярно-биологический состав предшественников ядрышек преимплантационных эмбрионов мыши и динамика их движения на стадии зиготы в сравнении с ядрышко-подобными тельцами предовуляторных ооцитов.

Результаты диссертационного исследования имеют большое теоретическое и практическое значение для клеточной биологии и эмбриологии.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов работа Лаврентьевой Е.А. соответствует требованиям п.9-14 Постановление Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. №842 в редакции от 28.08.2017 г. № 1024, 01.10.2018 1168 предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, а автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Доктор биологических наук по специальности 03.00.05– биология развития, эмбриология, профессор кафедры эмбриологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
Биологический факультет МГУ
+7 495 939 35 25, +7 495 939 14 62
info@mail.bio.msu.ru



Семенова М.Л.

Подпись Семеновой М.Л. заверяю

Декан биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Академик РАН

М.П.Кирпичников



23 мая 2019 года

*С отзывом ознакомлена 23 мая 2019
Лафетова Елена Игоревна*

