

## 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**

Изучению процессов эмбриогенеза в настоящее время уделяется пристальное внимание. Эти исследования не только имеют большое теоретическое значение, но и важны для развития методов практической репродуктивной медицины и геномного редактирования, которым требуется наличие достоверных критериев "правильного" прохождения всех стадий эмбриогенеза.

Диссертация Лаврентьевой Е.А. выполнена на преимплантационных эмбрионах мыши и посвящена изучению молекулярного состава предшественников ядрышек в преимплантационных эмбрионах мыши и особенностей динамики их движения на стадии зиготы в сравнении с ядрышко-подобными тельцами предовуляторных ооцитов.

Ядрышко является одной из наиболее изученных структур эукариотической клетки. «Классическое» функционально активное ядрышко высших эукариот имеет трехкомпонентную организацию, основными структурными элементами которой являются фибрillлярные центры, плотный фибрillлярный компонент и гранулярный компонент. Основной функцией ядрышка является участие в биогенезе рибосом. В настоящее время также известно, что оно имеет ряд других важных «неканонических» функций. Однако в клетках некоторых организмов, а также на определенных стадиях клеточного цикла «классические» ядрышки в ядрах отсутствуют. В частности, в пронуклеусах одноклеточного эмбриона после его формирования выявляются предшественники ядрышек, имеющие вид крупных, оптически плотных сферических структур. По мере развития зиготы, количество предшественников ядрышек в каждом пронуклеусе уменьшается, однако динамика этого процесса до сих пор оставалась неизвестной, плохо изучен и молекулярный состав предшественников ядрышек. Поэтому значительная часть работы Е.А.Лаврентьевой посвящена изучению компонентного состава предшественников ядрышек, динамики и причин уменьшения числа предшественников ядрышек в пронуклеусах зигот мыши.

Изучение морфологии предовуляторного ооцита мыши - финальной стадии развития ооцита внутри фолликула и особенностей динамики движения предшественников ядрышек на стадии зиготы в сравнении с ядрышко-подобными тельцами предовуляторных ооцитов представляет значительный интерес для определения критериев компетентности к завершению созревания ооцита и дальнейшему оплодотворению, а также для отбора материала в практике репродуктивной медицины.

Таким образом, тема исследований диссертации Е.А. Лаврентьевой актуальна не только для решения фундаментальных вопросов клеточной биологии и биологии развития, но и для практической репродуктивной медицины.

использованы современные методы клеточной биологии, такие как культивирование эмбрионов и предовуляторных ооцитов, метод цейтраферной видеосъемки ооцитов и зигот, цито- и иммуноцитохимический анализ фиксированных эмбрионов, флуоресцентная гибридизация *in situ*, конфокальная сканирующая лазерная микроскопия. Количество проанализированных эмбрионов и ооцитов является достаточным для получения достоверных результатов. На основании полученных результатов сделаны выводы, соответствующие поставленным задачам. Результаты исследования докладывались на шести Всероссийских и международных конференциях. Представленные в диссертации микрофотографии и графики, отражающие результаты экспериментов, не вызывают сомнений. Положения, выносимые на защиту, соответствуют сформулированным цели и задачам исследования. Выдвинутые научные положения, выводы и рекомендации правомерны и сомнений не вызывают.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Результаты, полученные в работе, расширяют существующие знания о молекулярном составе и функциях предшественников ядрышек в раннем эмбриогенезе млекопитающих. Подходы, использованные в работе, являются базовыми для анализа молекулярного состава и динамических характеристик ядрышковых производных в эмбрионах и ооцитах млекопитающих других видов, в том числе человека для стандартизации критериев компетентности ооцитов к созреванию. Результаты исследования могут быть использованы для проведения научно-практических занятий в высших учебных заведениях биологического и медицинского профиля.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

### **Личный вклад**

Эксперименты по определению молекулярного состава предшественников ядрышек в ранних эмбрионах мыши и анализ особенностей динамики движения предшественников ядрышек зигот по сравнению с ядрышко-подобными тельцами в предовуляторных ооцитах мыши выполнены лично Е.А. Лаврентьевой. Е.А. Лаврентьева самостоятельно проанализировала отечественную и зарубежную литературу по теме исследования, описала результаты экспериментов и выводы из них.

### **Содержание работы**

Диссертационная работа построена по стандартной схеме, изложена на 137 страницах машинописного текста и дополнена иллюстративным материалом (32 рисунка, 5 таблиц). Текст диссертации состоит из списка сокращений,

введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, и библиографического списка в количестве 239 источников.

Во «Введении» Е.А. Лаврентьева описывает цель работы, приводит список задач, которые планировалось решить в данном исследовании, а также кратко перечисляет новые результаты, которые были получены.

В литературном обзоре автор дает подробный анализ современного состояния проблемы. Обзор написан очень четко, ясно, понятно. Автором приводятся современные данные о протекании биогенеза у мышей, дан обзор имеющихся в настоящее время сведений о структуре, составе и функциях предшественников ядрышек. Недостатком обзора является отсутствие описания современных представлений о структуре, составе и функциях «классических» ядрышек эукариот, а также о функциях и распределении в таких ядрышках ключевых ядрышковых белков, которые изучались в работе Е.А. Лаврентьевой. На мой взгляд, это важно, так как белки ядрышек имеют множество функций, не связанных непосредственно с биогенезом рибосом, но которые могут реализовываться в предшественниках ядрышек. Например, реорганизация хроматина в NSN- и SN ядрышках может быть связана с участием белков ядрышка в ремоделинге хроматина.

В «Материалах и методах» подробно описаны оборудование и методики, использованные автором в работе. Приведены подробные протоколы опытов, достаточные для проведения аналогичных экспериментов другими исследователями. Автор владеет всеми описанными методами, все основные эксперименты выполнены лично автором.

Первая часть раздела «Результаты» посвящена описанию оптимальных условий выявления РНК и белков в фибробластах мыши NIH/3T3 с помощью флуоресцентных красителей, антител к ядрышковым белкам и зондов к пРНК. Автор показала, что для выявления ядрышковых белков с помощью антител наиболее информативными являются методы, предполагающие или фиксацию образцов параформальдегидом с последующей обработкой протеиназой К или фиксацию образцов 70%-ным этанолом. Для выявления белков Е.А. Лаврентьева использовала метод окрашивания препаратов с помощью ФИТЦа. На этот метод ею в составе авторского коллектива получен патент. В связи с этим желательно было бы подробнее описать этот запатентованный метод, в частности, какие у него преимущества по сравнению с другими методами, насколько сложно подобрать оптимальные условия окрашивания, может ли он использоваться для количественной оценки содержания белка.

Во второй части раздела «Результаты» автор приводит результаты экспериментов по выявлению РНК и белков в зрелых ооцитах и эмбрионах мыши до имплантации с помощью окрашивания пиронином У и ФИТЦ, по выявлению

pРНК и ядрышковых белков в предшественниках ядрышек. Для выявления pРНК в эмбрионах мыши Е.А. Лаврентьева применила метод FISH. Важно отметить, что в этих экспериментах были использованы зонды к разным участкам 47S пре-pРНК мыши, что позволило выявить области локализации непроцессированной pРНК, 28 S pРНК и новосинтезированной пре-pРНК (зонд 5'ETS).

В экспериментах по локализации ядрышковых белков автору удалось показать, что в предшественниках ядрышек зигот мыши присутствуют фибрillарин, NPM1/B23, нуклеолин, но отсутствуют транскрипционный фактор РНК полимеразы I UBF и рибосомные белки RPL26 и RPS10. Отмету, что эти важные данные не могли быть получены при стандартных протоколах иммуноцитохимического окрашивания.

В третьей части экспериментального раздела Е.А Лаврентьева с помощью цейтраферной видеосъемки проанализировала динамику движения ядрышко-подобных телец GV ооцитов мыши и движение многочисленных ядрышко-подобных телец в составе ооцита. Показано, что скорости движения этих ядрышковых производных совпадают. Впервые получены прямые доказательства слияния ПЯ, которое происходит за 10-20 мин. Эти результаты автор сравнила с движением других высокоподвижных органелл - ядер в GV ооцитах NSN- и SN-типа. На основании полученных данных сделан вывод о том, что обязательным критерием жизнеспособности GV ооцитов является подвижность их ядра, которая должна сохраняться вплоть до распада, т.е. перехода на стадию GVBD – следующую стадию развития ооцита, а длительная иммобилизация ядра является признаком гибели GV ооцита.

При сравнении средней скорости движения ПЯ, ЯПТ и наиболее жизнеспособных GV-ооцитов SN типа Е.А.Лаврентьева показала, что скорость SN-ооцитов значительно превышает скорость движения ЯПТ и ПЯ. Более низкую скорость движения ПЯ и ЯПТ Е.А. Лаврентьева кратко объясняет менее развитой системой актиновых филаментов внутри ядра по сравнению с цитоплазмой. Мне кажется, что вопросу о механизмах движения ПЯ, ЯПТ и GV-ооцитов SN следовало больше уделить внимания в обсуждении и/или литобзоре.

В качестве замечания к данной главе скажу, что измеренная средняя скорость является скорее оценкой снизу, так как, по-видимому, Е.А. Лаврентьева никак не учитывала непрямолинейность траектории и наличие возвратно-поступательного движения объектов.

В описании фаз движения ядрышковых производных и ядер автор приводит неоправданно точные значения времени. Например, на стр 95 «Наиболее заметное смещение ядра относительно предыдущего положения наблюдалось через 90 мин после начала съёмки», или на стр96 «ядро ооцита движется с периферии по направлению к центру, достигая наиболее центрального положения на 120

минуте». Из этого непонятно, существует и если да, то каков разброс измерений фаз движения по времени в разных ооцитах.

В «Обсуждении» Е.А. Лаврентьева провела подробный анализ полученных результатов с учетом современных литературных данных. В частности, сравнение ПЯ и ЯПТ, проведенное автором, показало, что имеющаяся в литературе точка зрения о сильном сходстве ЯПТ и ПЯ неверна: ЯПТ ооцитов содержит молекулярные составляющие, необходимые для раннего эмбрионального развития, которые пассивно переносятся из ооцита в зиготу, а в ПЯ зигот они отсутствуют. Данные Е.А. Лаврентьевой показывают, что такими составляющими могут быть рибосомные белки, фактор транскрипции UBF и рРНК.

Сравнительная характеристика состава ЯПТ в GV ооцитах мыши SN-типа и ПЯ эмбрионов на стадии зиготы наглядно показана автором на рис. 32. Я бы только добавил в эту схему данные по NSN ооцитам и более четко разделил использованные в этой схеме собственные и литературные данные. На основании полученных данных Е.А. Лаврентьевой предложена модель трансформации предшественников ядрышек зигот в нормальные ядрышки.

Выводы, сделанные в диссертации, хорошо обоснованы. Однако все результаты получены автором на эмбрионах мыши. В связи с этим интересно было бы узнать, все ли полученные автором выводы могут быть перенесены на человека?

Диссертация хорошо оформлена, прекрасно иллюстрирована, написана хорошим литературным языком. Тем не менее, в тексте встречаются опечатки и досадные неточности в оформлении рисунков. В частности, на рис. 17 нет описания обозначения я и \*, нет головок стрелок на рис 17б. На рис.22 неудачно изменен масштаб в совмещенных фото е и и, не указано, что обозначает звездочка \*. Имеются неточности в подписях к рис 27, 30, 31.

В автореферате и опубликованных работах в полном объеме 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.

Выводы основаны на большом фактическом материале и логично вытекают из результатов, полученных лично автором. Указанные выше замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы.

Принципиальных замечаний по диссертации не имею.

## **Заключение**

Диссертация Е.А. Лаврентьевой является законченной научно-квалификационной работой. На основании выполненных исследований, автором решена актуальная научная задача – дана характеристика молекулярно-биологического состава предшественников ядрышек преимплантационных эмбрионов мыши и динамики 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 03.00.03 – молекулярная биология, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Адрес: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Тел.: 8(499)135-98-04; 8(499)135-23-11

E-mail: popenko@eimb.ru;

Попенко Владимир Иванович

Подпись Попенко В.И. заверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН Бочаров А.А.

03 июня 2019г

## печать

