

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова  
Российской академии наук  
(ИОГен РАН)

ул. Губкина, д. 3, г. Москва, ГСП-1, 119991  
Тел.: (499) 135-62-13, (499) 135-20-41  
Факс: (499) 132-89-62

E-mail: iogen@vigg.ru  
http: www.vigg.ru

05.06.2019

№ 92-02-13/311

На № \_\_\_\_\_

"УТВЕРЖДАЮ"

Директор Федерального  
Государственного бюджетного  
Учреждения Института общей  
генетики им Н.И. Вавилова РАН,  
д.б.н. А.М. Куряевцев

5 июня 2019 г.

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ**

о научно-практической ценности диссертации Лаврентьевой Елены Андреевны  
«Молекулярно-биологическая характеристика предшественников ядрышек в  
ранних зародышах мыши и особенности их движения на стадии зиготы»,  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертационное исследование Лаврентьевой Елены Андреевны посвящено изучению  
молекулярного состава предшественников ядрышек в преимплантационных эмбрионах и  
особенностей их движения на стадии зиготы.

**Актуальность исследования.** Исследование механизмов, регулирующих раннее  
развития эмбрионов млекопитающих животных и человека, поиск маркеров развития  
яйцеклеток и ранних эмбрионов являются одними из самых актуальных направлений  
современной биологии развития, востребованных репродуктивной медициной.

В качестве наиболее адекватной и доступной модели развития ооцитов и эмбрионов  
человека признана лабораторная мышь (Курило, 2012). В пронуклеусах зигот человека и  
мыши происходит формирование предшественников ядрышек, которые лишены  
типовых структурных субдоменов ядрышек (фибрillлярных центров, плотного

фибриллярного компонента и гранулярного компонента) и образованы плотноупакованным материалом неизвестной природы. До сих пор открытым оставался и вопрос о присутствии РНК в предшественниках ядрышек. Ближайшими аналогами предшественников ядрышек зигот являются ядрышко-подобные тельца в предовуляторных ооцитах млекопитающих, которые используют в качестве модели для сравнения с предшественниками ядрышек зигот. Главной особенностью ранних эмбрионов млекопитающих является отсутствие в них классических ядрышек, характерных для соматических клеток. Качество ооцита определяет его способность к оплодотворению. Основным признаком качества ооцита является его общая морфология, оценка которой не требует применения инвазивных методов исследования, однако не всегда является достаточной для определения причин нарушения способности ооцита к развитию. В этом отношении дополнительные критерии оценки положения и поведения ядра в предовуляторном ооците, а также выяснение молекулярно-биологических характеристик предшественников ядрышек в ранних зародышах мыши и особенностей их движения на стадии зиготы представляются весьма актуальными задачами исследования.

#### Новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации.

В работе выполнен анализ состава предшественников ядрышек в эмбрионах мыши на последовательных стадиях эмбрионального развития до имплантации с помощью окрашивания флуоресцентными красителями, метода иммуноцитохимии, флуоресцентной гибридизации *in situ*. С помощью белок- и РНК-связывающих красителей ФИТЦ и пиронина Y, впервые показано, что в предшественниках ядрышек зигот содержатся белки, но практически отсутствуют РНК. С помощью оптимизированных условий фиксации и постфиксационной обработки зародышей иммуноцитохимическими методами впервые показано, что в предшественниках ядрышек зигот содержатся ключевые белки ядрышка, участвующие в раннем (фибрилларин) и позднем (NPM1/B23, нуклеолин/C23) процессинге рРНК. Однако в предшественниках ядрышек зигот отсутствуют транскрипционный фактор РНК полимеразы I UBF и рибосомные белки RPL26 и RPS10. С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* впервые определена локализация рРНК в предшественниках ядрышек на разных стадиях развития преимплантационных эмбрионов мыши. Показано, что предшественники ядрышек зигот содержат только следовые количества 28S рРНК, появление новосинтезированной рРНК на их поверхности начинается на стадии двухклеточного эмбриона после активации транскрипции рДНК. Доказано явление слияния предшественников ядрышек зигот и их ближайших аналогов – ядрышко-подобных телец предовуляторных ооцитов мыши *in vitro*. Впервые показана

возможность перехода NSN-типа конфигурации хроматина предовуляторных ооцитов в SN-тип *in vitro*. Показано, что многоядрышковые предовуляторные ооциты SN-типа способны к завершению мейотического созревания. Описана динамика движения ядер предовуляторных ооцитов мыши с разной конфигурацией хроматина и положением ядра. Установлено, что дополнительным критерием компетентности к созреванию может служить подвижность ядра и ядрышко-подобного тельца предовуляторного ооцита.

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Для решения поставленных задач, в работе использован комплекс современных методов клеточной биологии: культивирование эмбрионов и предовуляторных ооцитов, прижизненные наблюдения за ооцитами и зиготами методом цайтраферной видеосъемки, методы цито- и иммуноцитохимии, метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, конфокальная сканирующая лазерная микроскопия. Количество проанализированных эмбрионов и ооцитов является достаточным для получения достоверных результатов. Проведена адекватная статистическая обработка данных. Все это позволило автору в полном объеме охарактеризовать молекулярный состав предшественников ядрышек в зиготах и на более поздних стадиях преимплантационного развития. Также была проведена сравнительная характеристика динамики движения предшественников ядрышек в зиготах и ядрышко-подобных телец в предовуляторных ооцитах мыши. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций сомнений не вызывают.

**Значимость для науки и практики полученных результатов.** Полученные данные дополняют и систематизируют существующие представления о функциях предшественников ядрышек в раннем эмбриогенезе млекопитающих. Результаты работы могут быть использованы для изучения молекулярного состава и динамики поведения предшественников ядрышек других видов млекопитающих, в том числе человека.

**Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов работы.** Полученные в работе теоретические данные о молекулярном составе предшественников ядрышек в преипланационных эмбрионах мыши и особенностях динамики их движения в зиготе рекомендуются для использования при проведении практических занятий в высших учебных заведениях биологического и медицинского профиля.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация построена по традиционному плану. Текст диссертации изложен на 137 страницах машинописного текста, содержит 32 рисунка, 5 таблиц. Список литературы содержит 239 российских и зарубежных источника. Рисунки представлены главным образом монтажами, включающими микрофотографии высочайшего качества.

Во «Введении» охарактеризовано состояние изучаемой проблемы, четко определены цели и задачи исследования, обосновано его актуальность, оценена научная и практическая значимость и новизна полученных результатов.

«Обзор литературы» полно отражает последние достижения в исследовании развития женских половых клеток, раннего эмбрионального развития млекопитающих, слияния генетического материала при оплодотворении, активации зиготического генома, анализ молекулярного состава предшественников ядрышек в преимплантационных эмбрионах мыши. В свете развития представлений о роли архитектоники ядра в дифференцировке половых клеток и зиготы, особый интерес представляют разделы обзора, касающиеся участия предшественников ядрышек в пространственной организации хромосом в одноклеточных эмбрионах и в формировании хромоцентров.

Раздел "Материалы и методы" содержит детальное описание использованных современных цитологических методов, в том числе культивирование фибробластов NIH/3T3, проведенное для последующего контроля специфичности антител и FISH-зондов, особенности прижизненных наблюдений за ооцитами и зиготами методом цейтраферной видеосъемки и иммуноцитохимии, конфокальной сканирующей лазерной микроскопии. Разработанные автором протоколы исследований могут служить образцами для проведения практикумов и исследований на кафедрах клеточной биологии и эмбриологии ВУЗов, а также для оценки качества ооцитов и ранних эмбриональных клеток в практике репродуктивной медицины.

Материал раздела "Результаты" строго систематизирован, блестяще иллюстрирован, изложен четко и полно отражает полученные результаты. Раздел «Обсуждение» относительно небольшой, что оправдано, так как материал частично обсуждается в разделе "Результаты" и далее обобщен в "Заключении" и "Выводах".

**Личный вклад автора.** Соискатель самостоятельно проанализировал отечественную и зарубежную литературу по теме исследования, детально охарактеризовал молекулярный состав предшественников ядрышек в ранних эмбрионах мыши, проанализировал особенности динамики движения предшественников ядрышек зигот и ядрышко-подобных телец и ядер предовуляторных ооцитов мыши. Автор самостоятельно провел анализ и статистическую обработку полученных данных и подготовил к печати публикации.

Автореферат и публикации в полном объеме отражают задачи и полученные результаты исследования. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, из них 3 статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет.

**Заключение.** Диссертационная работа Лаврентьевой Е.А. «Молекулярно-биологическая характеристика предшественников ядрышек в ранних зародышах мыши и особенности их движения на стадии зиготы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, выполненная под руководством д.б.н. профессора Зацепиной О.В. является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача - характеристика молекулярного 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 важное научно-практическое значение для клеточной биологии, цитологии, 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.

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН (ФГБУН ИОГен), протокол № 4 от 4 июня 2019 г.

Зав. лабораторией цитогенетики  
ФГБУН ИОГен РАН,

д. б. н., по специальности 03.00.15 – генетика, профессор

 — О.Л. Коломиец

Подлинность подписи Оксаны Леонидовны Коломиец подтверждаю

11999, Российская Федерация, Москва, ул. Губкина, 3  
Тел.: (499)135-62-13

[iogen\(at\)vigg.ru](mailto:iogen(at)vigg.ru)

Ученый Секретарь  
ФГБУН ИОГен РАН, д.б.н., профессор

