

ОТЗЫВ

председателя диссертационного совета на диссертацию Аси Генриковны Давидьян на тему: «Особенности функционирования ядрышкового организатора в растущих ооцитах представителей Sauropsida», представленную на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология

Актуальность диссертационной работы Аси Генриковны Давидьян не вызывает сомнений. На частном примере двух представителей группы Sauropsida (домашняя курица *Gallus g. domesticus* и красноухая черепаха *Trachemys scripta*) Ася Генриковна рассматривает важнейшие общебиологические проблемы, такие как реализация наследственной информации в проэмбриогенезе, функционирование рибосомных генов в ооцитах животных, организация рибосомных генов у позвоночных, проблемы биологического разнообразия и эволюции в связи с организацией и работой в оогенезе белоксинтезирующего аппарата.

Хочу с самого начала отметить, что в связи с обозначенными выше проблемами Ася Генриковна получила важные новые результаты, которые должны повлиять на существующие представления и (хотелось бы) войти в обзорную и учебную литературу. Во-первых, она показала полное сходство в функционировании рибосомных генов в ооцитах у взрослых и неполовозрелых кур, тем самым устранив серьезные противоречия в старых экспериментальных данных и отсутствии обоснованных гипотез на эту тему (обзор: Koshel et al., 2016). Во-вторых, ею, вместе с соавторами, впервые обнаружен и подробно исследован функциональный ген 5S рРНК внутри межгенного спейсера рибосомных повторов у представителей Позвоночных и тем самым опровергнуто общепринятое представление о том, что у высших эукариот повторы 45S и 5S генов всегда локализованы в разных районах генома. В-третьих, Ася Генриковна расширила и систематизировала данные о существовании разных стратегий амплификации рибосомных генов в ооцитах животных. Считаю перечисленное главными достижениями рецензируемой работы.

Диссертация А.Г. Давидьян изложена на 104 страницах на русском и 95 страницах на английском языках и включает Введение, 4 главы (в том числе Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ), Выводы, Список сокращений, Благодарности и Список литературы. По результатам работы опубликовано 4 статьи в журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus. Материал работы проиллюстрирован 37-ю рисунками, список литературы насчитывает 267 источников.

Во Введении четко обозначены актуальность работы, цель исследования, 5

конкретных задач и 5 положений, которые автор выносит на защиту. В этом же разделе уделено внимание новизне результатов работы, а также теоретическому и практическому значению проведенного исследования, перечислены 4 опубликованные статьи и целая серия докладов, сделанных по материалам работы. Очевидно, что личный вклад автора явился определяющим в этой работе.

Глава 1, «Обзор литературы» занимает 28 страниц и содержит 3 подраздела. В этой главе последовательно рассмотрены краткая история изучения и значение ядрышка как важнейшей многофункциональной внутриядерной структуры, в которой происходит синтез и формирование элементов белоксинтезирующей машины – рибосом, показана роль ядрышкообразующих районов хромосом в формировании ядрышка. Подробно описаны особенности структуры ядрышка, роль составляющих его компонентов в формировании рибосом, особенности синтеза, структуры и функциональная роль всех четырех рибосомных РНК, на основе которых формируются большая и малая субъединицы рибосом у эукариот. Специальный раздел главы посвящен функционированию рибосомных генов и ядрышкам в оогенезе. Здесь подробно описаны этапы дифференциации ооцитов, типы оогенеза и особенности функционирования рибосомных генов при разных типах оогенеза. Особое внимание уделено феномену амплификации рДНК ядрышкового организатора и проблеме баланса 45S и 5S рибосомных РНК в ооцитах с увеличенной дозой рДНК ядрышковых организаторов в следствие ее амплификации. Специальный раздел обзора посвящен особенностям функционирования рибосомных генов в ооцитах птиц и рептилий, показана противоречивость соответствующих данных по птицам и недостаточность информации по оогенезу рептилий, в частности ближайших к птицам отрядов Testudines и Crocodilia. Следует отметить, что глава написана на основе анализа большого числа литературных источников, включая самые современные публикации, хорошо структурирована, читается легко и с большим интересом.

Глава 2 посвящена описанию материала исследования и примененных в нем методов. Изложенный здесь материал свидетельствует о высокой профессиональной квалификации диссертанта и владении им важнейших для современных исследований в области молекулярной биологии развития и клеточной биологии методов. В работе использован целый комплекс разнообразных методов и подходов. Микрохирургические манипуляции под стереомикроскопом использовали для выделения ооцитов из яичника, для освобождения их от фолликулярного эпителия и для выделения ядер из ооцитов. Высокоразрешающая иммунофлуоресцентная микроскопия и FISH использованы для анализа как выделенных ядер и внутриядерных структур, так и криосрезов яичников.

Применены методы выделения ДНК и РНК из клеток и тканей, обратной транскрипции, количественной ПЦР, фракционирования лизатов тканей в градиенте сахарозы и анализа полисомных профилей. Ценным представляется владение Асей Генриковной навыками биоинформатического и компьютерного анализа. Именно это позволило получить важные результаты, касающиеся встроенных в IGS черепах генов 5S РНК, их функциональной значимости и филогенетического анализа.

Глава 3 объединяет результаты исследования и их обсуждение. В рецензируемой работе такое объединение представляется логически оправданным. Глава подразделена на две неравноценные части. В первой части приведены и обсуждены все результаты, полученные при исследовании ооцитов курицы. Вторая, бóльшая по объему, часть посвящена исследованию ооцитов и рибосомных генов черепахи. Выбор объектов оправдан тем, что по имеющимся в литературе данным в группе Sauroptera тип оогенеза курицы казался ближе к оогенезу ящериц и других представителей Squamata, чем к оогенезу близких птицам отрядов крокодилов и черепах, с которыми птиц объединяют в одну кладу Archelosauria. А.Г. Давидьян исследовала поведение ядрышкообразующего района в ооцитах кур разных возрастных групп и убедительно показала практически полное сходство в особенностях функционирования рибосомных генов в ооцитах цыплят и несушек. Как я отметила выше, этот результат устраняет противоречия в ранних исследованиях оогенеза птиц и возможные гипотезы, возникавшие на их базе. Значение его для понимания биологии развития птиц неоспоримо, надо надеяться, что он получит широкое признание.

Раздел, посвященный рибосомным генам в ооцитах черепах и крокодилов, больше и по объему, и по содержанию. Это объясняется отсутствием в литературе подробной информации об организации рибосомных генов и всесторонних исследований оогенеза у представителей этой группы. Все экспериментальные данные А.Г. Давидьян получила на примере красноухой черепахи *Trachemys scripta*, однако, анализ базы общедоступных геномных данных в NCBI позволил ей сделать обобщения, касающиеся отрядов Testudines и Crocodilia. По данным этого исследования опубликовано две полноценные статьи в высокорейтинговых международных журналах (одна из них – в журнале с IF=16,24), где Ася Генриковна первый автор. Впервые проанализирована структура рибосомного повтора в геномах этих животных и описан встроенный в антисмысловую последовательность межгенного спейсера IGS функциональный ген 5S рРНК. На полном анализе данных показано, что это уникальный пример среди позвоночных и крайне редкий случай среди остальных высших Eukaryota. Анализ последовательности обнаруженной встройки NOR-5S рДНК выявил в ней регуляторные элементы для РНК-

полимеразы III. Наибольшей заслугой диссертанта следует признать подробное экспериментальное обоснование синтетической активности гена NOR-5S рРНК только в ооцитах и встраивание транскриптов NOR-5S рДНК в рибосомы на поздних этапах оогенеза. Ася Генриковна полагает, что обнаружение NOR-5S рРНК во фракции полисом из крупного ооцита указывает на ее участие в специфическом синтезе белков в ооцитах поздних стадий развития, и предполагает роль транскриптов этого гена для создания запасов материнских РНК и/или белков. В этой главе интересной представляется гипотеза, содержащая аргументы в пользу возникновения вставки 5S рДНК в антисмысловую нить IGS у Archelosauria и вторичного исчезновения ее у предков птиц.

Глава 4, «Заключение» посвящена сравнительно-эволюционному анализу функционирования рибосомных генов в оогенезе позвоночных. Особое внимание уделено различающимся стратегиям формирования источников материнских рРНК для раннего развития в группе Sauropsida: птицы и ящерицы (поступление из фолликулярных клеток) versus черепахи и крокодилы (амплификация рибосомных генов в ооците). Проведенное исследование показало также, как по-разному решается проблема выравнивания дозы генов 45S и 5S рРНК в ооцитах рептилий (черепах и крокодилов), с одной стороны, рыб и амфибий, с другой. Филогенетическая схема, иллюстрирующая сделанные обобщения, наглядна и убедительна. Этот раздел еще раз демонстрирует профессиональную зрелость диссертанта.

Выводы не дублируют Заключение, они соответствуют решаемым в диссертации задачам, хорошо сформулированы и адекватны результатам проведенного исследования.

В целом, впечатление о рецензируемой диссертации очень хорошее. Она выполнена на высоком международном уровне, оригинальность и достоверность полученных данных, а также обоснованность сделанных в работе выводов сомнений не вызывают. Текст диссертации четко структурирован, стилистически хорошо написан, содержит очень мало опечаток.

У меня возникла лишь пара замечаний, которые никак не влияют на оценку работы:

1. Данные, полученные с использованием программы Амира, как результат кажутся избыточными. Они демонстрируют организацию яичника, в частности, градиент созревающих ооцитов в нем, и скорее могли бы быть отнесены к характеристике материала исследования. Мелкие ооциты все равно исследовали на отдельных срезах.
2. Чтобы окончательно подтвердить отсутствие амплификации рибосомных генов, даже на очень низком, рудиментарном, уровне, подобно тому, как это описано для ящерицы *Podarcis sicula* (Motta et al., 1991), хотелось бы видеть эксперименты по выявлению

белка PCNA или включению EdU в ядрах мелких ооцитов *Gallus g. domesticus*.

Диссертация Аси Генриковны Давидьян на тему: «Особенности функционирования ядрышкового организатора в растущих ооцитах представителей Sauropsida» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Ася Генриковна Давидьян заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Председатель диссертационного
совета, доктор биологических
наук, профессор,
профессор кафедры
микробиологии биологического
факультета СПбГУ



Елена Викторовна Ермилова

Дата 25.04.2022