



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2
Тел. (499)196-0000, Факс (499)196-0221, E-mail: img@img.ras.ru

26.02.15 № 12318/63
На № _____

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Института
молекулярной генетики Российской
академии наук, член-корреспондент
РАН

С.В. Костров

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук о научно-практической значимости диссертации Павлюченковой Светланы Михайловны на тему: «Изучение закономерностей развития мужских половых клеток и клеток Сертоли у мышей после различных экспериментальных воздействий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.05 — Биология развития, эмбриология.

Актуальность темы выполненного исследования. Рецензируемая диссертационная работа С.М. Павлюченковой посвящена одной из центральных проблем эмбриологии и биологии развития – экспериментальному изучению процессов сперматогенеза у высших организмов. С теоретической точки зрения развитие таких исследований способствует лучшему пониманию фундаментальных механизмов, лежащих в основе процессов размножения (пролиферации), роста и созревания мужских половых клеток, клеточных основ регенерации, а также роли так называемых вспомогательных нишеобразующих

клеток Сертоли в организации и функционировании сперматогенной ткани. В практическом плане интенсивные и всесторонние исследования системы дифференцировки сперматогенных клеток, являющейся частью системы репродукции, которая обеспечивает непрерывность процесса передачи наследственных признаков из поколения в поколение, играют важную роль в накоплении точных знаний о причинах мужского бесплодия, а также в оценках репродуктивных рисков, возникающих в условиях постоянно возрастающего давления на живые системы вредных (повреждающих) факторов окружающей среды.

В этой связи можно с уверенностью говорить о том, что диссертационная работа С.М.Павлюченковой, как явствует из самого названия работы, поставленных в ней цели и задач, актуальна и представляет большой научный интерес. Безусловная ценность этой работы состоит в том, что все представленные в ней результаты оригинальны и получены впервые.

О структуре диссертации и содержании работы.

Диссертация изложена по общепринятой научной схеме. Текст работы, занимающий 151 страницу, состоит из Введения, 3 основных глав, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает в себя 293 источника, из которых 47 отечественных.

В первой главе под названием «Обзор литературы» приведены и проанализированы практически все необходимые сведения, позволяющие читателю легко войти в тематику диссертационной работы, в курс всех обсуждаемых в ней вопросов. Отдельный раздел «Обзора литературы» посвящен анализу данных литературы, касающихся биологических эффектов наноматериалов, что вполне оправдано, поскольку в последние годы такие исследования занимают важное место в биологической науке.

Вторая глава посвящена методической части работы. Из нее хорошо видно, что для решения поставленных задач автором использован хорошо подобранный комплекс цитологических, морфогистологических, цитогенетических,

иммуноцитохимических методов, методы культивирования, а также уникальный и хорошо оправдавший себя метод деконденсации ядерного хроматина *in vitro*, позволяющий обнаруживать скрытые дефекты в организации ДНП-комплекса в зрелых сперматозоидах млекопитающих. При этом существенно отметить, что в каждом конкретном случае примененные методы были адекватны тем задачам, которые решались автором в ходе выполнения настоящего исследования.

В третьей главе работы С.М. Павлюченковой, включающей в себя изложение собственных результатов исследований, можно выделить несколько направлений:

- 1) создание новых экспериментальных моделей сперматогенеза,
- 2) комплексное изучение поведения соматических, терминально дифференцированных клеток Сертоли, выделенных из семенников половозрелых мышей, в условиях культивирования,
- 3) опыты по эктопической трансплантации сперматогенной ткани,
- 4) изучение последствий влияния наночастиц (в частности, ультрамалых наночастиц золота) на организацию ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах мышей.

О научной новизне и значимости полученных результатов

К наиболее важным и интересным результатам, во многом носящим приоритетный характер, можно отнести следующие:

Впервые очень подробно и на разных уровнях изучена динамика деструктивных и восстановительных процессов, протекающих в сперматогенной системе у мышей после интратестикулярного введения им модельного мутагена дипина или физиологического раствора. (Надо отметить, что в исследованиях такого плана химические вещества обычно входят в прямой контакт с изучаемой клеточной системой, не подвергаясь сильным метаболическим превращениям). Показано, что в обоих случаях - как в контроле, так и в опыте - выявленные в ходе эксперимента количественные, морфогистологические и генетические нарушения развивающихся мужских половых клеток в целом носили обратимый

характер. Однако, несмотря на внешнее улучшение структуры сперматогенного эпителия, восстановления количественного состава и цитогенетического статуса развивающихся половых клеток продукция сперматозоидов с нарушенной организацией ДНП-комплекса продолжалась, о чем говорит неспособность большинства ядер гамет полностью деконденсироваться после обработки в тиоловом реагенте дитиотреитоле. На эти, полученные автором, результаты, несомненно, должны обратить внимание не только специалисты, занимающиеся фундаментальными исследованиями сперматогенеза, но и практикующие врачи-androлоги.

Большое значение имеют полученные автором результаты о том, что уже в первые дни культивирования высокодифференцированные, митотически инертные клетки Сертоли индивидуализируются и разделяются на два основных типа клеток. Одни из них имеют типичную организацию ядер, которая обычно наблюдается в клетках Сертоли в условиях *in vivo*; кроме того, среди этих клеток с большой частотой встречались клетки, содержащие ядра с тетраплоидным и октаплоидным содержанием ДНК, а также много двуядерных клеток, клеток с хромосомными и ядерными аномалиями. Этот необычный и очень важный результат особо следует отметить, поскольку, судя по данным литературы, в норме в семенниках взрослых организмов такое поведение клеток Сертоли практически никогда не отмечалось. Что касается клеток Сертоли другого типа, то в условиях культивирования морфология их ядер существенно изменялась, и, как показал цитофотометрический анализ, содержание ДНК в них варьировала от 2С до 4С, эти клетки нормально делились и способны были образовывать фокусы роста. Факт появления в культуре двух типов КС, различающихся по пролиферативной стратегии, установлен впервые. Автор справедливо интерпретирует полученный результат, как возможное проявление гетерогенности популяции высокодифференцированных клеток Сертоли в семенниках взрослых животных.

Этот раздел работы С.М.Павлюченковой не исчерпывался изучением поведения клеток Сертоли в условиях культивирования. Но был дополнен трансплантационными экспериментами, впервые показавшими, что после помещения под капсулу почки мышей суспензии клеток Сертоли, культивировавшихся в течение 12 дней *in vitro*, образовывались канальцеподобные структуры, содержащие вполне жизнеспособные клетки Сертоли, морфологически не отличимые от клеток Сертоли в семенниках половозрелых животных. Также впервые установлено, что аналогичную способность образовывать новые семенные каналцы проявили недифференцированные клетки Сертоли, выделенные из семенников 3-х дневных мышат. В другой серии эксперимента было показано, что после трансплантации под капсулу почки фрагментов семенника или отдельных канальцев, взятых от мутагенизированных дипином животных, семенные каналцы и содержащиеся в них клетки Сертоли не обнаруживали никаких признаков глубоких нарушений на протяжении длительного времени (10 нед). Анализируя эти впервые полученные результаты в контексте с данными литературы, автор приходит, возможно, к единственно правильному заключению, что пролиферация КС, активация их к делениям могут выступать как один из главных факторов, определяющих способность к развитию и регенерации сперматогенной системы, в том числе и в эктопических условиях. В этой связи видится большая перспектива для дальнейших экспериментальных исследований биологии клеток Сертоли.

В ряд важных и чрезвычайно интересных можно поставить также результаты, полученные автором в процессе изучения вопроса, связанного с выяснением последствий влияния ультрамалых наночастиц золота на сперматогенные клетки различных типов как *in vivo*, так и *in vitro*. Причем особое место здесь должны занять факты, которые впервые установили, что наночастицы золота при прямом взаимодействии с гаметам (опыты *in vitro*) сильно нарушают структуру плотно упакованного хроматина этих клеток, которая, как известно, обладает высокой устойчивостью к действию многих, самых разнообразных химических и

физических факторов. Поскольку в последние годы исследованиям генетических и биологических эффектов наночастиц золота уделяют пристальное внимание в силу открывающихся больших перспектив их использования в биомедицинских исследованиях, в диагностике и лечении злокачественных новообразований и как средств доставки лекарственных веществ к местам назначения, результаты исследований С.М. Павлюченковой имеют большое значение. Эти результаты свидетельствуют о потенциальной способности ультрамалых наночастиц золота при определенных условиях отрицательно влиять на наследственные структуры. Кроме того, исходя из полученных данных, автором было сделано заключение о том, что использованный в работе метод деконденсации ядерного хроматина спермиев *in vitro* может оказаться весьма эффективным при оценке наноматериалов на сперматотоксичность.

Диссертационная работа С.М.Павлюченковой многопланова и выполнена на высоком научном уровне, написана хорошим литературным языком, богато иллюстрирована высококачественными рисунками и микрофотографиями, что существенно облегчает восприятие экспериментального материала, цифровой материал статистически корректно обработан и представлен в таблицах и на графиках, выводы находятся в полном соответствии с поставленными в работе задачами.

Замечания по работе:

1. Во «Введении» говорится об опасности использования продуктов нанотехнологий для живых систем. Но не обосновано, почему в работе выбор пал именно на наночастицы золота, причем ультрамалых размеров.
2. Не ясно, почему в экспериментах с наночастицами золота в качестве контроля был использован физиологический раствор. Логично было бы использовать среду, в которой содержались эти частицы.
3. Не понятно отношение автора к одному из очень интересных наблюдений работы – длительному существованию в условиях эктопического

культивирования канальцев, содержащих только клетки Сертоли. Каковы свойства этих клеток?

4. На стр. 33 автор пишет: “... А в 2010 году была показана пролиферативная активность в культуре клеток Сертоли человека”, но при этом, почему то ссылается на работу, опубликованную в 2004.

5. К недостаткам автореферата следует отнести неоправданно большой раздел, содержащий описание материалов и методов исследования. Он мог бы быть более лапидарным и освободить место для лучшего представления иллюстративного материала.

Сделанные замечания в целом не умаляют достоинства настоящей диссертационной работы, содержащей новые интересные и ценные факты.

Заключение

Диссертационная работа Павлюченковой Светланы Михайловны «Изучение закономерностей развития мужских половых клеток и клеток Сертоли у мышей после различных экспериментальных воздействий» соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, согласно п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842, а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.05 — Биология развития, эмбриология.

Результаты настоящей работы заслушаны и обсуждены на заседании Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики ИМГ РАН (протокол № 2 от 25 февраля 2015 г.).

Зам. директора ИМГ РАН, профессор

(В.З. Тарантул)

Личную подпись В.З. Тарантула удостоверяю
Ученый секретарь ИМГ РАН,
кандидат биологических наук

(Л.Е. Андреева)

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Полное наименование ведущей организации	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук Сокращенное название: ФГБУН ИМГ РАН
Фамилия, имя, отчество, ученое звание руководителя ведущей организации	Костров Сергей Викторович, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН
Фамилия, имя, отчество, ученое звание заместителя руководителя ведущей организации	Мясоедов Николай Федорович, академик РАН, заместитель директора по научной работе
Фамилия, имя, отчество, ученое звание сотрудника, составившего отзыв ведущей организации	Тарантул Вячеслав Залманович, доктор биологических наук, профессор

индекс	123182
объект	Российская Федерация
город	Москва
улица	Площадь академика И.В.Курчатова
дом	2
телефон	8(499)1960000, 8(499)1960006
e-mail	img@img.ras.ru
Web-сайт	www.img.ras.ru

Ведущая организация подтверждает, что соискатель не является ее сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с ее сотрудниками.

Список основных публикаций в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет сотрудников ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук, имеющих отношение к теме диссертации Павлюченковой Светланы Михайловны «Изучение закономерностей развития мужских половых клеток и клеток Сертоли у мышей после различных экспериментальных воздействий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Arseniev E.L., Kuzmin I.V., Manuilova E.S., Novosadova E.V., Murkin E.V., Pavlova G.V., Tarantul V.Z., Grivennikov I.A. The Production and Characteristics of a Mouse's Embryonic Stem Cell Lineage, Transfected by the Glia Neurotrophic Factor and Gene Fused with the Green Fluorescent Protein Gene // *Acta naturae*. Park Media Ltd. 2009. Apr. 1(1), C. 109-114.

Евдокимов В.В., Туровецкий В.Б., Каменский А.А., Андреева Н.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние регуляторных пептидов на параметры эякулята человека // *Андрология и генитальная хирургия*. 2013. № 3. С. 38-43.

M.A. Radzig, V.A. Nadtochenko, O.A. Koksharova, J. Kiwi, V.A. Lipasova, I.A. Khmel. Antibacterial effects of silver nanoparticles on Gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, v. 102, 300-306.

Kibanov M.V., Kotov A.A., Olenina L.V. Multicolor fluorescence imaging of whole-mount *Drosophila* testes for studying spermatogenesis // *Anal. Biochem.* 2013, v. 436, 55-64.

Носов Г.А., Кибанов М.В., Оленина Л.В. Динамические характеристики герминальной гранулы piNG тельца в семенниках *Drosophila melanogaster*. Молекулярная биология, 2014 г., т.48, N5, 805-813.

S. Shpiz, S. Ryazansky, I. Olovnikov, Y. Abramov, A. Kalmykova. Euchromatic transposon insertions trigger production of novel pi- and endo-siRNAs at the target sites in the *Drosophila* germline, *PLOS Genetics*, 10:e1004138, 2014.

Ученый секретарь ИМГ РАН,
кандидат биологических наук

Л.Е. Андреева