

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Фроловой Вероники Сергеевны

**на тему: «Морфофункциональная организация серотонинергической системы в
ооцитах и ранних эмбрионах мыши»**

по специальности 1.5.23 – «Биология развития, эмбриология»

Диссертация Фроловой В.С. посвящена комплексному исследованию структурно-функциональной организации серотонинергической системы в оогенезе и на доимплантационных стадиях развития мыши. Тематика работы находится на пересечении нескольких активно развивающихся направлений современной биологии развития — изучения неклассических (несинаптических) функций нейротрансмиттеров в раннем эмбриогенезе, анализа метаболической автономности зародыша и исследования эпигенетических механизмов регуляции. Актуальность исследования обусловлена как фундаментальной значимостью понимания роли серотонина в донервных этапах онтогенеза, так и клинической востребованностью данных о влиянии препаратов группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина на раннее развитие. Именно в этом направлении и были сосредоточены усилия диссертанта, и именно это направление связано с высокой актуальностью представленной работы.

Диссертация Фроловой В.С. состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Структура работы представляется логичной и обоснованной, поскольку последовательное изложение материала — от анализа компонентного состава системы к исследованию её функциональной активности и, наконец, к оценке эпигенетических последствий — позволяет читателю проследить логику развития исследования на всех его этапах.

Литературный обзор представляет собой достаточно полный и критический анализ как общих сведений о нейротрансмиттерах и серотонинергической системе, так и их роли в процессах клеточной дифференцировки, онкогенеза, физиологии женской репродуктивной системы и, что наиболее важно, в эмбриональном развитии животных. Отдельные разделы посвящены анализу серотонинергической системы в оогенезе, в процессах дробления и межбластомерного взаимодействия, а также в бластоцисте млекопитающих. Такой широкий охват материала обоснован необходимостью продемонстрировать место настоящего

исследования в контексте современных представлений о несинаптических функциях трансммиттеров, и автору это в полной мере удаётся.

Глава «Материалы и методы» в первую очередь демонстрирует богатый методический арсенал диссертанта, включающий разнообразные подходы: иммуногистохимический анализ, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию, высокоэффективную жидкостную хроматографию с электрохимической детекцией, количественную ПЦР в реальном времени, Вестерн-блоттинг, а также серию фармакологических экспериментов с использованием резерпина, флуоксетина, паргилина, серотонина, 5-НТР и цистамина. Большинство методов описано весьма подробно, однако описание параметров оптических систем микроскопов представляется недостаточно полным, что особенно существенно, поскольку на этих методах основана значительная часть работы. В частности, остаётся неясным, каким образом нормировали сигнал при конверсии изображений из 16 в 8 бит и чем была обусловлена необходимость снижения битности, поскольку такая процедура может приводить к потере информации. Кроме того, метод анализа радиального распределения интенсивности сигналов иммунофлуоресценции, результаты которого представлены на ряде рисунков, в главе «Материалы и методы» не описан вовсе: не указано, проводился ли анализ профилей или концентрических секторов, каким образом рассчитывались значения (среднее или интегральная флуоресценция) и как устанавливалась стартовая точка отсчёта. Хотелось бы также увидеть более строгий статистический анализ результатов измерений.

Глава «Результаты» состоит из нескольких частей. Результаты излагаются в логичной последовательности: от анализа источников серотонина в ранних эмбрионах к исследованию компонентного состава серотонинергической сигнальной системы, затем к анализу функциональной активности VMAT2 и MAO-A и, наконец, к оценке влияния повышенного уровня серотонина на жизнеспособность эмбрионов и эпигенетические модификации хроматина. Автор использует разнообразные модельные системы: ооциты на стадиях GV и МП, зиготы, двухклеточные эмбрионы, морулы и бластоцисты. Следует отметить, что процедуры получения и обработки эмбрионов, описанные в материалах и методах, уже упоминаются в разделе результатов как само собой разумеющееся, однако их следовало бы отдельно включить в результаты ввиду их трудоёмкости и важности для всего исследования в целом. Характер взаимодействия компонентов серотонинергической системы оценивался по изменению интенсивности иммунофлуоресцентного сигнала, а влияние фармакологических воздействий анализировали по изменению сигнала в экспериментальных группах. Данный

подход представляется весьма информативным, однако по конкретным результатам и их интерпретации у меня возникли некоторые вопросы.

Прежде всего, обращает на себя внимание несогласованность между текстом и иллюстративным материалом. В тексте на стр. 69 утверждается, что уровень иммунореактивности у эмбрионов экспериментальной группы оказался на 43,03% выше в клетках ВКМ и на 43,40% выше в клетках трофэктодермы по сравнению с контролем (Рис. 11А-Г). Однако на цитируемом рисунке 11Г рост составляет более чем двукратный. Какая из этих оценок является корректной? Аналогичным образом, на рис. 13Г данные графиков радиального распределения серотонина противоречат изображениям: в GV-ооцитах практически не видно градиента «периферия–центр», тогда как график демонстрирует более крутой профиль, чем у зиготы. Не является ли это ошибкой? Кроме того, на рис. 16А сигнал DAPI разительно отличается от всех предыдущих панелей. Если это результат автоконтраста и данные настройки были использованы повсеместно, возникают сомнения в корректности количественного анализа флуоресценции.

Во-вторых, ряд утверждений представляется недостаточно обоснованным. На стр. 77 указано, что иммунореактивные структуры «строго концентрировались в узком кортикальном слое толщиной порядка 4 мкм, вероятно ассоциируясь с самой плазмолеммой». Это представляется слишком смелым предположением, поскольку слой толщиной 4 мкм является весьма удалённым от плазмалеммы. На стр. 81 утверждается, что серотонин визуализировался в виде точечных гранулярных структур, характерный размер которых совпадал с таковым для иммунопозитивных кластеров VMAT2 (Рис. 30), что указывает на возможность депонирования серотонина в везикулах. Предположение о депонировании серотонина в VMAT2-везикулах на основании сходства размеров сигналов представляется слишком смелым на данном уровне разрешения, тем более что количественный анализ не приведён; корректнее было бы анализировать колокализацию при двойной окраске. На стр. 92 утверждается, что цитоплазматический сигнал H3Q5seg отражает серотонилирование «пула свободных растворимых гистонов» или «цитозольных белковых предшественников гистона H3, выступающих мишенями для трансклутаминаз». Что автор понимает под предшественниками гистона H3? Помимо этого, утверждение о наличии пула свободных растворимых гистонов в цитоплазме быстро делящихся клеток требует серьёзной проверки, в нынешнем виде это только спекуляция. На стр. 93 указано, что «избыточное поступление серотонина в клетки эмбриона может стимулировать эпигенетические перестройки в хроматине». Для такого

утверждения необходимо анализировать как минимум изменение сигнала H3Q5ser непосредственно на хроматине.

В-третьих, обращают на себя внимание проблемы статистической обработки. На стр. 71 указано: «наблюдалась выраженная тенденция к повышению уровня экспрессии мРНК гена *Ddc* у эмбрионов... ($p = 0,0530$)». На самом деле порог значимости превышен, и обычно это служит поводом к отвержению гипотезы о различиях между выборками. На стр. 86 утверждается: «При этом прослеживается чёткая динамика увеличения интенсивности флуоресцентного сигнала от стадии зиготы к стадии бластоцисты». Однако количественных данных для подкрепления последнего утверждения не приведено. На стр. 87 указано: «Несмотря на наличие белка МАО-А уже на стадии зиготы, выраженная каталитическая активность начинает проявляться на более поздних этапах». Наличие или отсутствие активности моноаминоксидазы в зиготе не проиллюстрировано. Также следует при интерпретации данных учитывать локализацию МАО-А и серотонина — очевидно, что в везикулах серотонин защищён от деградации. Поэтому важно было бы показать распределение МАО-А на стадии двух бластомеров, где наблюдается выраженный градиент серотонина.

В-четвёртых, вызывает озабоченность вопрос специфичности антител. Антитела к VMAT2, использованные в работе для количественного иммуноцитохимического анализа, дают значительную неспецифику в ядре, что подтверждено сравнением с альтернативной сывороткой. Однако не могут ли они давать неспецифику и в цитоплазме? Что тогда реально измеряется? Контролей на это нет. Аналогичным образом, на рис. 10–11 создаётся ощущение, что сигнал в экспериментальных эмбрионах накапливается в ядрышках, но из-за неудачной комбинации цветов на RGB-изображениях это трудно оценить. Лучше было бы дать разделение по каналам флуоресценции, как сделано на рис. 13–14.

Помимо этого, есть ряд мелких замечаний, касающихся стиля изложения и оформления. На рис. 10–11 данные количественного анализа представлены относительно контроля: хорошо было бы дать абсолютные значения, так легче сравнивать разные эксперименты, а также учитывать вариабельность внутри контрольной группы.

Тем не менее, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.23 – «Биология развития,

эмбриология» (по биологическим наукам), а также критериям, определённым пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Фролова Вероника Сергеевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.23 – «Биология развития, эмбриология».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
Заведующий отделом,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского
МГУ имени М.В.Ломоносова

Киреев Игорь Игоревич

17.09.2026

Контактные данные:

тел.: 7(929)5658053, e-mail: iikireev@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

Адрес места работы: 119234, г. Москва, р-н. Ленинские Горы, д.1. стр.40

МГУ имени М.В.Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского

Тел.: +74959395528; e-mail: kireev@belozersky.msu.ru

Подпись сотрудника НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского И.И.Киреева удостоверяю:
руководитель/кадровый работник

17.09.2026