

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
ЗАВАЛЬНОЙ ЕВГЕНИИ ГЕНРИХОВНЫ

«ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *PIWI* В ПРОЦЕССЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО
СОСТАВА ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA*
FRAUDATRIX»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.22. Клеточная биология

Регенерация представляет собой процесс воссоздания взамен полностью утраченного органа либо частично поврежденного участка отдельного органа или организма. Это событие широко распространено в царстве животных, однако способность к регенерации у представителей разных типов животных выражена по-разному. Так, например, губки способны восстанавливать организм из небольшой группы соматических клеток, а кишечнополостные и плоские черви могут регенерировать целую особь из небольшого фрагмента тела, в то время как у млекопитающих механические повреждения сопровождаются лишь заживлением раны и формированием рубца. В этом плане иглокожие и, в частности, голотурии предоставляют редкую возможность исследовать процессы восстановления некоторых внутренних органов, поскольку обладают уникальной способностью к избавлению от них в процессе стресс-индуцированной эвисцерации с последующей полной регенерацией утраченных органов и тканей. В данном случае выбранный объект исследования голотурия *Eupentacta fraudatrix* является очень удобной биологической моделью для изучения многих процессов регенерации. Это доступный вид голотурий, широко распространенный в прибрежных водах Японского моря. Этих животных относительно легко собирать и содержать в лабораторных условиях, и они обладают всеми необходимыми свойствами регенерации утраченных органов. Кроме того, благодаря многолетним интенсивным научным исследованиям, проводимым в Национальном научном центре морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, этот вид голотурий довольно хорошо и всесторонне охарактеризован. Проведены детальные цитологические, морфометрические и гистологические, а также молекулярно-биологические и генетические исследования

процессов регенерации, которые заложили основу для дальнейшего более детального анализа молекулярных механизмов восстановительных морфогенезов.

Этой голотурии, как и многим другим представителям класса морских огурцов, присуща удивительная способность к частичному избавлению от своих внутренних органов в ответ на какой-либо раздражитель с их последующей полной регенерацией. Удаляющиеся при этом клетки целомической жидкости, главным образом целомоциты, являясь “эволюционным прототипом” клеток иммунной системы теплокровных животных, выполняют у голотурий прежде всего защитные функции в борьбе с инфекциями и инвазиями. Однако во многом остается не выясненным вопрос о том, каким же образом происходит восстановление популяции данного типа клеток целомической жидкости в процессе регенерации и какие именно клетки голотурий являются их предшественниками. Обнаружение надежного молекулярного маркера таких клеток-предшественниц позволило бы уверенно отследить их локализацию и судьбу в процессе регенерации, а также помогло бы оценить степень их вовлеченности в создание нового пула целомоцитов.

В качестве одного из главных претендентов на такой молекулярный маркер соискатель справедливо выбрал белок Piwi и кодирующий его ген *piwi*, входящий в группу характерных для стволовых клеток генов. В свете последних данных этот белок выполняет функции защиты генома первичных половых и стволовых клеток зародышевой линии. Кроме того, он обнаруживается в соматических плюрипотентных стволовых клетках, вовлеченных в регенерацию ряда беспозвоночных животных, что может косвенно указывать на его функциональное участие в данном процессе.

Конкретные задачи диссертационной работы связаны, прежде всего, с установлением самого факта наличия гена *piwi* и белка Piwi у голотурии *E. fraudatrix*. Основываясь на данных транскриптомного анализа, диссертант запланировал и охарактеризовал его доменную структуру и проследил гомологию с белками Piwi у представителей разных систематических групп животных. Для решения задачи по обнаружению белка Piwi в различных тканях и клетках голотурии был разработан дизайн пептида для иммунизации и получены в достаточном количестве специфические поликлональные антитела против данного белка. Это позволило, в свою очередь, идентифицировать клетки, синтезирующие белок Piwi, в составе

целомической жидкости голотурии *E. fraudatrix* и исследовать их поведение в ходе восстановления целоцитов после эвисцерации, а также локализовать Piwi-позитивные клетки в тканях голотурии. Помимо этого, автор диссертационной работы исследовал динамику экспрессии гена *piwi* в целоцитах и стенке тела голотурии в процессах восстановления после эвисцерации.

Следует отметить, что диссертационное исследование Е.Г. Завальной носит ярко выраженный междисциплинарный характер. Наряду с традиционными в этой области морфометрическими и гистологическими методами исследования соискатель успешно применил разнообразные самые передовые и информативные биохимические, физико-химические, молекулярно-биологические и генетические экспериментальные подходы. В арсенал автора вошли такие приемы как метод проточной цитометрии и сортировки клеток, ПААГ-электрофорез и последующий вестерн-блоттинг с применением антител к белку Piwi, метод МАЛДИ масс-спектрометрии для идентификации белка Piwi, методы иммуоцитохимии, электронной иммуоцитохимии, конфокальная и электронная микроскопия, ПЦР в реальном времени и цифровая капельная ПЦР, а также применение филогенетического анализа, выполненного на основе результатов поиска нуклеотидных последовательностей в транскриптоме *E. fraudatrix*, соответствующих генам *piwi*, анализа белковых доменов и проведения множественного выравнивания и реконструкции филогенетических отношений.

На основании полученных данных об изменении клеточного состава популяций целоцитов в процессе регенерации у голотурии установлено, что именно низкодифференцированные ювенильные клетки являются источником основных линий дифференцировки иммунокомпетентных клеток целомической жидкости. В результате проведенных исследований в тканях голотурии *E. fraudatrix* обнаружен ген *piwi* и кодируемый им белок Piwi. Использование специфических антител против белка Piwi, а самого белка в качестве молекулярного маркера, позволило сделать ряд ключевых открытий в данном исследовании. Так, было показано, что белок Piwi уверенно обнаруживается в половых и соматических клетках голотурии, причем белок присутствует только в мужских гонадах голотурии, в то время как в ткани женских гонад он не идентифицируется. Кроме того, это позволило локализовать Piwi-позитивные клетки в тканях стенки тела голотурии, а также

обнаружить субпопуляцию Piwi-позитивных клеток, принадлежащих к ювенильным целомцитам. Это послужило основанием для оценки, составления общей схемы и представления общей картины изменения численного и качественного состава клеток в ходе эвисцерации и последующей регенерации и их вовлечения в процесс восстановления субпопуляций клеток целомической жидкости. Наконец, впервые изучено изменение во времени экспрессии двух маркерных генов *piwi* и *seali* в клетках и тканях голотурии после эвисцерации. Полученные данные по динамике активности этих генов позволяют предположить, что оба гена вовлечены в восстановительные процессы в соматических тканях голотурии на ранних этапах регенерации.

Диссертация оформлена по традиционной схеме, изложена на 111 страницах, состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов работы, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Демонстрационный материал представлен 2 таблицами и содержит 20 графических рисунков, микрофотографий и схем.

Литературный обзор целиком охватывает рассматриваемую в диссертации проблему и включает подробное описание механизмов регенерации главным образом у иглокожих. Помимо этого он дает ясное представление о структуре и функции гена *piwi* и кодируемого им белка Piwi и их роли в качестве потенциальных молекулярных маркеров в зародышевых и соматических клетках. Обзор литературы основан на скрупулезном анализе и цитировании 297 источников, хорошо и логично написан, читается с большим интересом. Автор сгруппировал материал так, чтобы подготовить читателя к детальному пониманию и восприятию собственных экспериментальных данных. Применяемые в исследовании разнообразные методы и экспериментальные подходы соответствуют поставленным в диссертационной работе целям и задачам, используются корректно и квалифицированно, что обеспечивает достоверность полученных результатов. Данные этих методов используются весьма квалифицированно и рационально, без приведения избыточной информации.

Стоит отметить, что как квалификационная работа, эта диссертация находится на весьма высоком уровне и по праву может относиться к типу работ, выполняемых на стыке различных научных направлений, относящихся к категории т.н. life science – науке о жизни. Удачным мне кажется разделение описания и оценки полученных

результатов на два отдельных раздела «Результаты» и «Обсуждение». Это позволяет довольно быстро ориентироваться в большом массиве представленных данных и четко соотносить анализ полученных результатов с соответствующими экспериментальными значениями.

Диссертация написана хорошим языком и представляет не только научный труд, но и отличное литературное произведение. В заслугу Евгении Генриховне можно отнести написание «Заключения». В этом разделе автору удалось в сжатой форме предельно четко еще раз сформулировать всю суть проделанного исследования, просуммировать и подытожить полученные результаты и спрогнозировать будущие исследования.

В целом диссертация Е.Г. Завальной не содержит каких-либо ошибок или неточностей. Следует отметить некоторые неудачные фразы и небольшие упущения. Так, на мой взгляд, название диссертации не совсем полно отражает круг решаемых в данном исследовании задач. Упор сделан только на экспрессию гена *piwi*, хотя большая часть работы посвящена белку Piwi.

В некоторых случаях (в том числе и в разделе «Содержание», стр. 2) метод МАЛДИ масс-спектрометрия неверно называется МАЛДИ спектрометрия.

Некоторые абзацы в тексте диссертации состоят лишь из одного предложения (например, стр. 16, стр. 25), что является нежелательным.

На стр. 31 указано, что осадок целоцитов промывали в 1 мл mQ, что является лабораторным слэнгом и обозначает качество очистки используемой H₂O системой Milli-Q компании Millipore.

На мой взгляд, вместо термина «буфер» (стр. 31–33, например) желательно употреблять термин «буферный раствор». Тогда аббревиатура термина «фосфатно-солевой буферный раствор» будет выглядеть как «ФСБР».

Стр. 33 и 47 – не указано, кто и где проводил МАЛДИ масс-спектрометрию. Не описано, как идентифицировали белки и не представлены данные масс-спектрометрического секвенирования для установления структуры белка Piwi в тотальных лизатах целоцитов и мужских гонад. Эти сведения, включая спектры, можно было бы разместить в дополнительном разделе «Приложения», например.

Стр 77. – «...уровни *piwi* в целоцитах...» является неправильным изречением. Правильно – «уровни экспрессии гена *piwi*».

На рисунке 8А лучше было бы выделить зоны (гейтирование) субклеточных популяций, выбранных для сортировки, что облегчило бы понимание логики выбора и разделения клеток.

При прочтении диссертации возникло несколько вопросов. Так, в разделе 3.5 представлены результаты локализации Piwi+ клеток в целомической жидкости и тканях голотурии через 4 и 24 часа после эвисцерации. Непонятно – обнаруживаются ли эти клетки у интактных животных?

В разделе «3.6 Анализ динамики экспрессии генов *piwi*» описывается исследование уровня экспрессии гена в целомотитах путем проведения и последующего анализа данных методом ПЦР. Совпадают ли эти данные с результатами, полученными при иммуноцитохимическом выявлении белка Piwi в этих клетках?

В диссертации не встречаются сведения о времени, необходимом для полной регенерации внутренних органов голотурии *E. fraudatrix* после эвисцерации. В связи с этим не совсем понятно, чем обусловлен максимальный временной интервал изучения белка Piwi в 24 часа при исследовании клеток и тканей и 7 суток при исследовании экспрессии гена *piwi* в этих же объектах?

Однако все эти замечания не носят принципиальный характер. В целом работа Евгении Генриховны Завальной является серьезным исследованием, проведенным на современном уровне и демонстрирующим высокую квалификацию автора.

По материалам диссертации опубликовано 2 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ. Результаты диссертационной работы были представлены на международных и российских конференциях. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Заключение

Диссертационная работа «Экспрессия гена *piwi* в процессе восстановления клеточного состава целомической жидкости голотурии *Eupentacta fraudatrix*» соответствует основным квалификационным критериям (пункты 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции от 11 сентября 2021

года), а ее автор Евгения Генриховна Завальная заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

17.05.2023

Доктор биологических наук,
чл.-корр. РАН,
заведующий лабораторией
биоиспытаний и механизма действия
биологически активных веществ
ТИБОХ ДВО РАН

 Дмитрий Львович Аминин

Адрес организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук
690022, г. Владивосток, просп. 100-летия Владивостоку, д. 159.
Тел.: (423) 231-99-32
E-mail: daminin@piboc.dvo.ru

Подпись Д.Л. Аминина заверяю:

Ученый секретарь ТИБОХ ДВО РАН, к.х.н. 

 К.Л. Борисова

