

Министерство науки и высшего
образования Российской Федерации
(Минобрнауки России)
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИНЦ РАН)**

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-35-41,
эл. адрес: cellbio@incras.ru; <http://www.incras.ru/>
ИНН 7802030531, КПП 780201001
УФК по г. Санкт-Петербургу (Отдел № 3, ИНЦ РАН), л/с
20726Ц41010, Северо-Западное ГУ Банка России
р/с 40501810300002000001, БИК 044030001

"УТВЕРЖДАЮ"

Директор

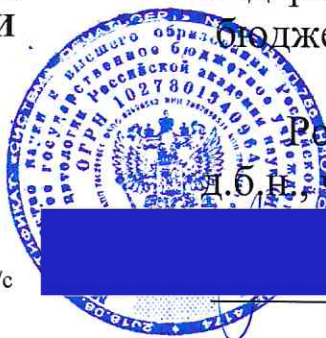
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

Института цитологии

Российской академии наук,

д.б.н., член-корреспондент РАН

А.Н.Томилини



"10".05.2023 № 12316-806-159

"10" 05.05.2023 2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **Завальной Евгении Генриховны** на тему:
**"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".

Актуальность темы диссертационной работы.

Иглокожие относятся к базальной группе нехордовых вторичноротых, являющейся сестринской для Chordata. Благодаря повышенной способности к восстановлению утраченных частей тела и органов, представители этой группы служат модельными объектами при изучении регенерации, демонстрируя большое разнообразие возможных механизмов, включающих участие стволовых клеток или же преобладание процессов дедифференцировки/трансдифференцировки специализированных клеток. Этот факт открывает перспективы для применения полученных знаний для решения задач эволюционной и регенеративной биологии

Эвисцерация, одна из форм аутономии, является уникальным защитным механизмом, голотурий, или морских огурцов, при котором в ответ на стресс животные выбрасывают часть своих внутренних органов. Этот процесс сопряжен с потерей значительного объема целомической жидкости (ЦЖ) с содержащимися в ней клетками – целомоцитами. Целомоциты представляют собой гетерогенную популяцию клеток, населяющих целомическую полость. Целомоциты считаются главным компонентом иммунной системы иглокожих. Кроме того, их функции связывают с газообменом, питанием и выделением. Вопрос о типах клеток ЦЖ и их функциях, а также о клеточных источниках восстановления целомоцитов окончательно не решен.

Голотурии являются наиболее продвинутой группой иглокожих в плане молекулярных исследований. Тем не менее, отсутствие молекулярных маркеров

отдельных типов клеток и, в особенности клеток, претендующих на роль стволовых, является совершенно необходимым для эффективных исследований механизмов регенерации. Выявление гена *piwi* и характеристика его экспрессии в клетках полового пути и соматических клетках голотурии *Eupentacta fraudatrix* представляется несомненно важным и актуальным, поскольку этот консервативный белок служит для защиты генома первичных половых клеток от деятельности мобильных генетических элементов и, кроме того, у многих исследованных организмов ген экспрессируется также в соматических мультипотентных, чаще плюрипотентных, стволовых клетках, вовлеченных в регенерацию. Благодаря привлечению к исследованиям *piwi* неклассических объектов молекулярной биологии, таких как губки или оболочники, более очевидной ставится связь гена с регенерацией.

Цель диссертации Завальной Е.Г. - изучение механизма восстановления клеточного состава ЦЖ голотурии *E. fraudatrix* после эвисцерации с использованием гена *piwi* и продукта его активности – белка Piwi, в качестве молекулярных маркеров стволовых клеток. Работа представляется несомненно актуальной для понимания фундаментальных механизмов регенерации. Выявленное участие стволовых клеток в регенерации у голотурии открывает перспективы применения полученных знаний для решения задач регенеративной биологии.

Научная новизна исследования, достоверность и обоснованность научных результатов

Работа имеет высокий уровень новизны. Впервые в тканях голотурии *E. fraudatrix* обнаружен ген *piwi* и продукт его активности – белок Piwi. Установлено, что экспрессия *piwi* характерна как для половых, так и для соматических клеток голотурии. Показано, что активность гена в половых клетках ограничивается лишь мужской линией.

Анализ динамики клеточных популяций целомоцитов в ходе репаративной регенерации показал, что источником наиболее представленных типов клеток ЦЖ являются низкодифференцированные ювенильные клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, причем, среди них обнаружена субпопуляция Piwi-позитивных клеток.

Использование белка Piwi в качестве маркера мульти-/плюрипотентности позволило идентифицировать в составе стенки тела голотурии *E. fraudatrix* пул Piwi-позитивных

Диссертация построена по традиционному плану, она изложена на 111 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 рисунками, включает 2 таблицы и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Последний включает 297 наименований, из них 290 на английском языке.

В обзоре литературы, занимающем 14 стр, рассматриваются механизмы регенерации и особенности регенерации у иглокожих, обсуждаются молекулярные маркеры стволовых клеток, в частности Piwi приводится

структура и рассматриваются гипотезы о механизме действия Piwi-пиРНК комплекса, приводится литература о функциях Piwi в клетках зародышевой линии и в соматических клетках. Обзор написан хорошим языком, читается с удовольствием, опечатки практически отсутствуют.

Глава «**Материалы и методы**» позволяет оценить соискателя как специалиста высокого уровня, владеющего широким спектром цитологических, биохимических и молекулярно-биологических методов и методами биоинформатики. Подробное описание методов дает возможность их воспроизведения.

Глава «**Результаты**» занимает 25 страниц. Экспериментальный материал хорошо иллюстрирован и документирован. Достоверность результатов экспериментов подтверждается их воспроизводимостью, использованием современных методов исследования. Анализ полученных данных корректно проведен с помощью методов статистического анализа. Основные результаты получены автором самостоятельно. Результаты опубликованы в 5 работах, в том числе в 2 статьях из списка рецензируемых журналов, индексируемых Scopus/Web of Science и входящих в список изданий, рекомендованных ВАК. и доложены на нескольких международных и российских симпозиумах.

Заключение соответствует обобщению полученных результатов, а выводы – задачам. Автореферат отражает основное содержание работы.

Значимость результатов для науки и практики

В представленной работе успешно решены поставленные задачи, Работа имеет фундаментальное значение для развития представлений об эволюции механизмов регенерации в ряду вторичноротых животных и способствует пониманию механизмов, лежащих в основе процесса регенерации целомоцитов иглокожих. Полученные в результате исследования данные могут быть использованы для решения задач регенеративной медицины.

При прочтении диссертации возникли вопросы и замечания.

Вопросы

1. Каким образом проводился отбор образцов тканей стенки тела для иммуноцитохимии? Каков размер образцов, из какой части стенки тела отбирали, выявляются ли принципиальные различия для образцов, отобранных их разных частей тела?
2. Сколько других белков (и каких) помимо Piwi выявлено в вырезанной из геля полосе методом Малди масс-спектрометрии? **Стр 47**
3. В обсуждении на стр 76 Вы предполагаете наличие разных по уровню потенции клеток-предшественников в тканях стенки тела *E. fraudatrix*. По Вашему утверждению, в пользу этого говорит наличие в составе соединительной ткани тандемов Piwi-позитивных клеток, что является следствием процесса асимметричного митоза, характерного для стволовых клеток (Gilbert, 2010).

Каким образом расположение меченых клеток парами (тандемами) может свидетельствовать в пользу асимметричного митоза? Это может предполагать только недавно завершившийся митоз.

4. Измерение экспрессии *piwi* в целомочитах и стенке тела, выполненные двумя методами, ПЦР в реальном времени и Капельной цифровой ПЦР, показали очень высокую корреляцию. Пожалуйста, сравните эти два метода, их **преимущества и недостатки**.
5. Вестерн-блот анализ с использованием антител против белка *Piwi* выявил этот белок в тканях мужских гонад. Зависит ли от пола животного присутствие *Piwi* в целомочитах и стенке тела?

Замечания

В целом, работа написана очень хорошим литературным языком, однако, встречаются отдельные неточности в цитировании оригинальных работ и неудачные выражения, например:

1. Во Введении и на стр 15-16 Обзора литературы вводится понятие об основных механизмах регенерации, морфаллаксисе и эпиморфозе со ссылкой на первоисточник

Morgan T.H. Regeneration. NY: Macmillan. 1901. 316 p. В оригинале это определение звучит так

At present there are known two general ways in which regeneration may take place, although the two processes are not sharply separated, and may even appear combined in the same form. In order to distinguish broadly these two modes I propose to call those cases of regeneration in which a proliferation of material precedes the development of the new part, "epimorphosis." The other mode, in which a part is transformed directly into a new organism, or part of an organism without proliferation at the cut-surfaces, "morphallaxis."

«В настоящее время известны два общих пути регенерации, хотя эти два процесса не разделены резко и даже могут казаться объединенными в одной и той же форме. Чтобы в общих чертах различать эти два способа, я предлагаю называть такие случаи регенерации, при которых пролиферация материала предшествует развитию новой части, «эпиморфозом». Другой способ, при котором часть трансформируется непосредственно в новый организм или часть организма без пролиферации на поверхностях среза, называется «морфаллаксис».

Автор расширил предложенные Морганом понятия со ссылкой на оригинал, что несколько меняет смысл:

Стр 15

«Регенеративный механизм, при котором резидентные стволовые клетки мигрируют непосредственно в область регенерации и дифференцируются в функциональные клетки, получил название «морфаллаксис» (Morgan, 1901».

Стр16

«Механизм, включающий дедифференцировку, пролиферацию и повторную дифференцировку для регенерации поврежденных тканей называется эпиморфозом (Morgan, 1901)».

2. Стр 7

«Предполагается, что в ЦЖ присутствует популяция циркулирующих стволовых клеток, способных давать начало всем типам целомоцитов (Eliseikina, Magarlamov, 2002; Candia-Carnevali, 2006; Xing et al., 2008; Candia-Carnevali et al., 2009; Sharlaimova et al., 2021).»

Например, в *Sharlaimova et al., 2021* не говорится о присутствии в ЦЖ популяции циркулирующих стволовых клеток, способных давать начало всем типам целомоцитов, а о малодифференцированных клетках целомического эпителия, способных давать начало некоторым типам целомоцитов.

3. Текст в разделе Благодарности в диссертации (стр 17) и Автореферате различается

4. В конце Литобзора отсутствует заключение

5. стр 47. «Иммуноблоттинг белковых экстрактов целомоцитов также показал наличие в них белка Piwi, представленного в виде тонкой полосы, идентифицирующейся на грани чувствительности метода» (рис. 7).

На рис 7 видно, что полоса не тонкая, а широкая, едва видная

6. Стр 53

3.4 Динамика численности целомоцитов в целомической жидкости после эвисцерации

Рис 11 автор говорит о количестве клеток в ЦЖ у интактных и регенерирующих животных, хотя по оси абсцисс отложены концентрации клеток с размерностью *количество клеток/мл*.

Стр 11 «регенераторной медицины»

Правильно – регенеративной медицины

Очевидно, что сделанные замечания не принципиальны и не снижают общую положительную оценку диссертации, а поставленные вопросы носят дискуссионный характер. Автор демонстрирует высокую квалификацию и прекрасное владение материалом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа “Экспрессия гена Piwi в процессе восстановления клеточного состава целомической жидкости голотурии *Eupentacta fraudatrix*” является самостоятельной научно-квалификационной работой и по содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, практической и теоретической значимости полученных результатов полностью 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, Завальная Евгения Генриховна, заслуживает

присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. - "Клеточная биология".

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре Группы «Биоресурсная коллекция культур клеток позвоночных» – фундаментально-прикладные исследования ИНЦ РАН __3__ мая 2023 года, протокол № 1.

Отзыв подготовлен старшим научным сотрудником Группы «Биоресурсная коллекция культур клеток позвоночных» – фундаментально-прикладные исследования (рук. д.б.н. Полянская Г.Г.) Центра коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» (рук. к.б.н. Кольцова А.М.) ИНЦ РАН кандидатом биологических наук Ольгой Александровной Петуховой и главным научным сотрудником Лаборатории некодирующей ДНК ИНЦ РАН доктором биологических наук, профессором Ольгой Игоревной Подгорной.

Старший научный сотрудник
Группы «Биоресурсная коллекция культур клеток позвоночных» –
фундаментально-прикладные исследования
ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных»
ИНЦ РАН,
кандидат биологических наук
e-mail: petukhova@yandex.ru

О.А.Петухова

Главный научный сотрудник
Лаборатории некодирующей ДНК
ИНЦ РАН
доктор биологических наук, профессор
e-mail: opodg@yahoo.com

О.И.Подгорная

Подписи к.б.н. Петуховой О.А и д.б.н., проф. Подгорной О.И. - заверяю

Ученый секретарь
ИНЦ РАН
кандидат биологических наук



И.И. Тюрьева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук. Адрес: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., д. 4; тел.: 8(812) 297-35-41; e-mail: cellbio@incras.ru; сайт: <http://www.incras.ru>