

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Бредова Дениса Владимировича
на тему: «Влияние механической силы на клеточные перегруппировки в
гастрюляции амфибии *Xenopus laevis*»
по специальности 1.5.23– «Биология развития, эмбриология»

Актуальность избранной темы. Работа Бредова Дениса Владимировича посвящена изучению механизмов взаимосвязи между морфогенезом и клеточными перемещениями под воздействием механических сил, возникающих при формировании осевых структур эмбриона. Целью диссертационной работы является установление закономерностей и взаимосвязей между механической силой и клеточными перегруппировками в эмбриональных тканях. Была выдвинута гипотеза о том, что механическая сила, действующая на эмбриональную ткань в ходе морфогенетических процессов, приводит к повышению частоты клеточных перегруппировок, и это позволяет компенсировать деформацию эмбриональной ткани под действием механической силы. Объектом исследования диссертационной работы являлись эмбрионы *Xenopus laevis* на стадиях ранней и средней гастрюлы. Выяснение механизмов регуляции процессами клеточных перегруппировок как в интактных эмбрионах на стадии гастрюлы, так и в растянутых на созданной автором установке эксплантатах из клеток крыши бластоцеля является актуальной фундаментальной проблемой биологии развития.

Научная новизна. В рамках диссертационного исследования впервые продемонстрировано, что в тканях, характеризующихся большими значениями механических напряжений, наблюдается большее число клеток, вовлечённых в перегруппировки. В диссертационном исследовании впервые показано существование взаимосвязи между механическими силами физиологической амплитуды, интенсивностью перегруппировок клеток

эмбриональной ткани и межиндивидуальной изменчивостью частоты клеточных перегруппировок.

Научная и практическая значимость. Работа представляет основу для дальнейшего экспериментального исследования молекулярных и клеточных механизмов ответа ткани на действие механических сил. Полученные результаты расширяют наше понимание роли механических сил в регуляции морфогенетических процессов. Эти результаты могут стать основой для дальнейшего углубленного изучения молекулярных механизмов, регулирующих перегруппировки клеток в ответ на действие механической силы. Практически значимым результатом работы является создание установки для контролируемого одноосевого растяжения эмбриональных тканей. Эта установка может быть использована в биомедицинских исследованиях, посвященных механозависимой дифференцировке клеток.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна. Результаты диссертационной работы обладают высокой степенью достоверности. Для достижения этого автором работы был проведён глубокий анализ научной отечественной и зарубежной литературы, позволивший сформировать первоначальные гипотезы. Для проверки гипотез были проведены серии независимых научных экспериментов, включающие в себя необходимое число экспериментальных точек и повторностей, а также необходимое число экспериментальных животных. Полученные данные были обработаны с помощью статистического анализа с использованием адекватных критериев, что позволило получить статистически значимые результаты. Частоту клеточных перегруппировок оценивали подсчетом "клеточных розеток", представляющих собой апексы контактирующих клеток, границы которых пересекаются в одной точке. Наличие розеток в ткани свидетельствует о том, что её клетки активно перегруппировываются: редуцируют старые межклеточные контакты и формируют новые, меняя своих

соседей. В работе впервые было показано, что плотность клеточных розеток достоверно выше в супрабластопоральной области гастролы, чем в крыше бластоцеля. Тем самым показано, что частота клеточных перегруппировок в эмбриональной ткани зависит от значений механических напряжений.

В работе впервые было выполнено детальное картирование механических напряжений внутри супрабластопоральной области. Эта задача была выполнена с помощью анализа динамики микродеформаций ткани на последовательных кадрах центрифужной съемки.

Кроме этого, в работе впервые экспериментально проверили гипотезу о влиянии механических сил на перегруппировки клеток с использованием разработанной и запатентованной автором исследования установки для контролируемой деформации эмбриональной ткани (патент РФ RU2723726C1). Полученные при помощи созданного прибора результаты подтверждают гипотезу о регуляторной роли механических сил в процессе клеточных перегруппировок.

Структура диссертации. Работа написана по традиционной схеме, содержит 95 страниц, 22 рисунка и 8 таблиц. Она состоит из введения, разделов: «Обзор литературных данных», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение» и выводов. Список используемой литературы содержит 84 источника.

Во введении автор обосновывает актуальность темы исследования, на основе изучения научной литературы анализирует степень разработанности темы исследования, формулирует цель работы и задачи исследования, описывает научную новизну, практическую значимость работы и её достоверность. Формулирует основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы, посвящен анализу имеющихся сведений о роли механических сил в регуляции движений клеток движений клеток,

регистрации механических сил в раннем развитии и анализу имеющихся в мировой литературе данных о молекулярных механизмах реакции клеток на механические силы. Содержание обзора тесно связано с темой работы, тема исследования автором раскрыта полностью и свидетельствует о знании автором изучаемой проблемы, умении систематизировать и критически анализировать научные данные. Обзор написан грамотным лаконичным языком, проиллюстрирован схемами из цитируемых работ.

В разделе «Материалы и методы» автор подробно описывает использованные в работе экспериментальные подходы и методы для получения результатов в соответствии с поставленными задачами. В этом разделе уделено внимание таким классическим методам эмбриологии как получение и микроинъекции в эмбрионы, микрохирургические манипуляции и окрашивание на F-актин, а так же подробно рассмотрена работа на созданной установке для искусственной деформации эксплантатов. Особенно хочу отметить высокий уровень статистического анализа полученных измерений.

Раздел «Результаты» состоит из 10 частей. Прежде всего в результатах хотелось бы отметить создание установки для контролируемой одноосевой деформации эмбриональных тканей, позволившей провести исследование взаимосвязи между механической силой и перегруппировкой клеток в растянутых эмбриональных тканях. Кроме этого, в работе Бредова Д.В. получен ряд принципиально важных новых данных. Например, работе впервые было выполнено детальное картирование механических напряжений внутри супрабластопоральной области. Эта задача была выполнена с помощью анализа динамики микродеформаций ткани на последовательных кадрах цейтраферной съемки. Было показано, что частота перегруппировок клеток достоверно выше в супрабластопоральной области эмбриона, которая является наиболее механически напряжённым регионом, ткань которого вовлечена в морфогенетические процессы, связанные с коллективными движениями клеток.

Результаты, полученные в работе, являются базой для дальнейших исследований молекулярных механизмов регуляции процессов морфогенеза в зависимости от возникающих механических напряжений. Особая ценность для фундаментальных исследований состоит в том, что полученные данные дают численное экспериментальное подтверждение координирующей роли механических сил в регуляции морфогенетических процессов. Наряду с молекулярно-генетическими механизмами регуляции развития, механические силы поддерживают нормальный ход эмбриогенеза, а нарушения конфигурации поля механических напряжений может лежать в основе возникновения его патологий.

Замечания и вопросы. К диссертации имеются следующие замечания:

- 1) К очевидным недостаткам работы следует отнести малый размер выборок. Особенно это касается раздела работы, посвященного съемкам эмбрионов *in vivo*: в анализ, в итоге, были включены данные только по одному эмбриону. В результате этот раздел носит, скорее, описательный характер - не было возможности выявить наиболее общие закономерности динамики перегруппировок клеток и охарактеризовать её изменчивость.
- 2) Вызывает некоторые вопросы дизайн эксперимента по искусственному растяжению эксплантатов крыши бластоцеля. Не подсчитана частота клеточных перегруппировок у интактных эмбрионов той же кладки, зафиксированных непосредственно перед началом эксперимента (т.е. перед изоляцией фрагментов ткани). Также отсутствуют данные по эксплантатам, только что вырезанным из крыши бластоцеля. В результате осталось неизвестным, каково же исходное состояние эксплантатов, и как на них влияет изоляция, которая сама по себе является экспериментальным воздействием. Из работ Л. В. Белоусова и его коллег мы знаем, что вырезанный фрагмент ткани очень быстро (за минуты) активно изменяет форму, в т.ч. подворачивает края. В частности, такой подворот должен приводить к растяжению поверхностных клеток в краевой области

эксплантата и, таким образом, стимулировать формирование розеток. Эта часть эксперимента могла бы дать интересную информацию о поведении клеток, но, к сожалению, осталась "за кадром". Без какого-либо анализа и последующего обсуждения остались также особенности пространственное распределение плотности розеток в "растянутых" и "не растянутых" эксплантатах.

Также очень не хватает дополнительных повторностей, которые позволили бы оценить вклад в результаты эксперимента межкладочной изменчивости.

- 3) Из всех разделов текста диссертации самым слабым является Обсуждение. Хотелось бы видеть в нём более полное сопоставление собственных данных Д.В. Бредовым с литературными данными о перегруппировках клеток в разных модельных системах. В этом разделе автор злоупотребляет пересказом полученных данных в ущерб их анализу.
- 4) Из методических недостатков работы можно упомянуть отсутствие прямых измерений механических напряжений. Это можно было бы сделать с помощью FRET-зонда (упоминается в обзоре литературы, на странице 16). Однако, справедливо и то, что такие эксперименты методически очень сложны, а измерение механических напряжений не было включено в задачи диссертационного исследования.
- 5) Из более мелких недостатков работы стоит упомянуть излишне громоздкие (и/или не всегда понятные) подписи к рисункам (например, рис. 13) и некоторый недостаток иллюстративного материала. Хотелось бы видеть больше конкретных примеров клеточных перегруппировок у интактных эмбрионов и эксплантатов.

Вместе с тем, 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, определенным пп. 2.1-2.5

Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Бредов Денис Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.23– «Биология развития, эмбриология».

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук,
Старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ
эмбриогенеза
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук» (ИБХ РАН)

Мартынова Наталья Юрьевна

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.00.03 – «Молекулярная биология»

Адрес места работы:

117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7,
ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
лаборатория молекулярных основ эмбриогенеза.
Тел.: +7 (495) 336-86-11; e-mail: martnat61@gmail.com

Подпись сотрудника ИБХ им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
Н.Ю. Мартыновой удостоверяю: