

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.

Диссертационная работа Бредова Дениса Владимировича проведена в русле пионерных исследований морфомеханики и механозависимости биологического формообразования, которые инициировал и возглавлял Лев Владимирович Белоусов. Очень приятно видеть продолжение и дальнейшее развитие на кафедре эмбриологии МГУ этого междисциплинарного направления исследований взаимосвязи между паттерном механических сил эмбриональных клеточных полей, морфогенетическими движениями клеток, формированием их ансамблей и последующим морфогенезом – направления, которое уже приобрело широкое признание как важное, актуальное и перспективное, обладающее несомненной теоретической и потенциально практической значимостью.

Поэтому актуальность темы диссертационного исследования Дениса Владимировича Бредова, которое посвящено экспериментальному изучению влияния механической силы на клеточные перегруппировки зародыша лягушки *Xenopus laevis* на стадии гастрюлы, весьма очевидна. Ранее Л.В. Белоусовым, его учениками и сотрудниками была экспериментально показана сопряженность нормальных морфогенетических процессов в раннем развитии с формированием специфического поля механических напряжений. Различными исследованиями в мире и в России была выявлена механозависимость экспрессии некоторых существенных для раннего развития генов, делений клеток, их подвижности и перестройки клеточных контактов. Однако зависимость движений и перегруппировок клеток от

механических напряжений в ткани оставалась практически неизученной. В связи с этим автором диссертационного, научно-квалификационного исследования Д.В. Бредовым была поставлена цель работы: охарактеризовать взаимосвязь между механической силой и клеточными перегруппировками в тканях гастрюлы амфибии *Xenopus laevis*. Итак, актуальность темы данного исследования обусловлена необходимостью восполнить пробел в наших знаниях о фундаментальных закономерностях регуляции морфогенетических процессов, и анализ работы позволяет сделать вывод о том, что цель научно-квалификационной работы успешно достигнута.

Научная новизна.

Ключевой научной гипотезой работы Д.В. Бредова послужила идея о регуляции механической силой частоты клеточных перегруппировок, компенсирующих избыточную деформацию эмбриональной ткани. В результате проведенных Д.В. Бредовым исследований, включавших как наблюдения *in vivo*, так и эксперименты с применением установки для контролируемой деформации эксплантатов эмбриональных тканей, впервые продемонстрировано, что в тканях с наибольшими значениями механических напряжений наблюдается большее число клеточных перегруппировки. В диссертационном исследовании впервые показано существование взаимосвязи между механическими силами физиологической амплитуды и интенсивностью перегруппировок клеток эмбриональной ткани.

Научная и практическая значимость.

Научно-теоретическая и практическая значимость диссертационного исследования Д.В. Бредова состоят в том, что полученные им результаты расширяют понимание фундаментальных клеточных механизмов ответа на механические воздействия и роли механических сил в регуляции морфогенетических процессов. Работа представляет перспективную основу для дальнейшего экспериментального исследования клеточных и молекулярных механизмов механозависимости. Установка, целенаправленно созданная для контролируемого одноосевого растяжения эмбриональных

тканей, может стать инструментальной основой для будущего углубленного изучения клеточных и молекулярных механизмов, регулирующих формирование клеточных ансамблей в ответ на действие механической силы, а также послужить для биомедицинских и биоинженерных исследований механозависимой дифференцировки клеток и тканей.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.

Обоснованность общих научных положений, заключений и выводов диссертационного исследования Д.В. Бредова обеспечена анализом литературных данных, четкой постановкой цели и задач работы, релевантностью и корректностью примененных методов, хорошо разработанным анализом полученных статистически значимых результатов. Материалы диссертационной работы опубликованы в рецензируемых журналах и были представлены на трех научных конференциях. Автореферат в сжатом виде отражает основные разделы диссертации. Таким образом, данная диссертация по обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверности и новизне полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Новизна исследования в более широком контексте биологии развития несомненная, поскольку активные движения клеток и их ансамблей формируют строение развивающегося организма. Механическое натяжение, способное включать экспрессию некоторых ключевых для эмбриогенеза генов, органично встроено в морфогенетические поля зародыша.

Структура диссертации.

Диссертационная работа Д.В. Бредова построена по достаточно традиционной схеме, материал изложен последовательно, обстоятельно и логично. Текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены в

соответствии с требованиями ГОСТ. Во введении убедительно обоснована актуальность диссертационной работы, ясно сформулированы ее цели и задачи. В обзоре литературных данных представлено современное состояние исследования проблемы механозависимости морфогенеза. Достаточно полно отражены экспериментальные данные мировой науки и теоретические представления, связывающие механическую напряженность и внешнее механическое воздействие с ответом клетки, сведения о клеточных механизмах морфогенетических перемещений в процессе гаструляции *Xenopus laevis*.

Для достижения поставленной цели автор использовал современные методологические подходы экспериментальной эмбриологии, микроскопической техники, а также методы молекулярной биологии. В частности, использовано окрашивание фибриллярного актина родамин-фаллоидином, инъекции мРНК мембранного и ядерного маркёров в эмбрионы на стадиях двух-четырёх бластомеров. Для экспериментов по искусственной деформации применены микрохирургические операции с изоляцией фрагментов эмбриональной ткани. Несомненное достижение диссертационной работы Д.В. Бредова – использование целенаправленно разработанного метода контролируемого автоматизированного растяжения эмбриональной ткани для исследования роли механических сил в регуляции перегруппировок клеток. Оригинальную запатентованную авторскую установку для точного одноосевого растяжения с инкубационной камерой, содержащей эксплантат, монтировали на лазерный сканирующий конфокальный микроскоп и осуществляли цейтраферную съёмку. Затем проводился морфометрический анализ кадров цейтраферной съёмки с использованием ряда морфометрических показателей и статистический анализ полученных данных с помощью релевантных методов обработки.

Методический раздел диссертации вместе с главой о результатах исследования полностью убеждают в новизне, современности, оригинальности и адекватности поставленным задачам методов, разработанных и применённых

Д.В. Бредовым, вызывая уважение к нему как высококвалифицированному и изобретательному экспериментальному эмбриологу. Такой подход позволил диссертанту получить много новых данных в экспериментальной работе по изучению влияния механических сил на клеточные перестройки эмбрионов.

Многообразные, тщательно проведенные Д.В. Бредовым наблюдения и эксперименты включают исследования частоты перегруппировок клеток в регионах интактной гастролы *Xenopus laevis*, различающихся по величине механических напряжений; распределения механических напряжений в супрабластопоральной области с помощью анализа микродеформаций ткани; эксперименты по искусственной деформации эксплантатов крыши бластоцеля гастролы с применением оригинального авторского инструментария и анализ влияния деформации на перегруппировки клеток.

Частоту клеточных перегруппировок оценивали с помощью подсчета "клеточных розеток", наличие которых свидетельствует об активной перестройке межклеточных контактов. В работе впервые было показано, что плотность клеточных розеток достоверно выше в супрабластопоральной области, которая является наиболее механически напряжённым регионом гастролы, чем в крыше бластоцеля, т.е. частота клеточных перегруппировок в эмбриональной ткани зависит от значений механических напряжений. Клетки розеток при их перегруппировке выстраиваются вдоль линий действия механической силы, релаксируя механические напряжения.

Впервые было выполнено детальное картирование механических напряжений внутри супрабластопоральной области с помощью анализа динамики микродеформаций ткани на последовательных кадрах цейтраферной съемки. Впервые экспериментально проверена гипотеза о влиянии механических сил на перегруппировки клеток с использованием автоматизированной установки для контролируемой деформации эмбриональной ткани. Полученные результаты подтверждают гипотезу о регуляторной роли механических сил в процессе клеточных перегруппировок, позволяющей поддерживать подвижность клеток в ткани

на необходимом стабильном уровне, что обеспечивает устойчивость морфогенетических процессов в ходе эмбрионального развития.

Полученные данные дают численное экспериментальное подтверждение координирующей роли механических сил в регуляции морфогенетических процессов. Наряду с молекулярно-генетическими механизмами регуляции развития, поле механических сил координирует коллективные движения клеток, обеспечивая устойчивость морфогенетических процессов и поддерживая нормальный ход эмбриогенеза; изменения конфигурации поля механических напряжений могут лежать в основе нарушений эмбриогенеза.

Результаты диссертационной работы обладают высокой степенью достоверности. 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. Обсуждение полученных данных достаточно строгое и логичное.

По материалам работы опубликованы 3 печатные работы (с соавторами) в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова и индексируемых WoS и RSCI: одна статья в журнале *Biosystems* (2018) и две статьи в журнале *Онтогенез* (2021, 2022; журнал переводится как *Russian Journal of Developmental Biology*), а также тезисы двух Российских конференций и одной международной. Опубликовано 1 патент Российской Федерации.

Денису Владимировичу Бредову принадлежит основная роль в формулировке целей и задач исследования, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке данных, подготовке тезисов, публикаций и патента по теме исследования.

Научная новизна, актуальность и значимость работы, представляющей собой законченное научное исследование, несомненны. Диссертационная

работа характеризуется четким, ясным изложением и достаточно полным обсуждением полученных результатов. Д.В. Бредов освоил, разработал и применил сложный комплекс методик, хорошо владеет материалом и проблематикой исследования. Его диссертация, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по актуальности темы, методическому уровню, объему проведенных исследований и полученных данных, их научной новизне и значимости является завершенным научным исследованием, выполненным на хорошем современном уровне.

Замечания и вопросы.

При общей высокой оценке научной-квалификационной работы Л.В. Бредова возникает лишь некоторое, возможно, необоснованное, сожаление об отсутствии экспериментальной проверки долговременных эффектов механического воздействия на дальнейшее эмбриональное развитие целого зародыша *Xenopus laevis*. Разумеется, такая проверка лежит вне пределов данной диссертационной работы и предполагала бы совершенно иное по цели и методологической основе исследование.

Сожаление вызывает и отсутствие на данный момент публикации Л.В. Бредова без соавторов, хотя его ведущая роль в диссертационной работе несомненна.

Вместе с тем это лишь сожаление и, возможно, пожелание, никак не умаляющее 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:

Доктор биологических наук, профессор,
Ведущий научный сотрудник лаборатории экологии и морфологии морских беспозвоночных
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской Академии Наук»

Исаева Валерия Васильевна

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.00.11 – «Эмбриология, гистология и цитология»

Адрес места работы:

119071, Москва, Ленинский пр., д. 33,
ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, экологии и морфологии морских беспозвоночных.

Тел.: +7 (499) 135-18-78; e-mail: vv_isaeva@mail.ru

Подпись сотрудника ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН

В.В. Исаевой удостоверяю: