

ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации **Марии Владиславовны Становой**
**«Целомоциты пескожила *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta): морфология и
иммунные функции»** на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности **1.5.12 – «зоология»**.

Диссертация Марии Владиславовны Становой – это научно-квалификационная работа, выполненная по актуальной, злободневной теме подключения молекулярных методик к решению задач зоологии. Наш совет рассмотрел немало очень хороших диссертаций, выполненных по актуальным темам, на современном научном уровне. Но рецензируемая диссертация от них отличается принципиально, так как в ней видна картина не современной, а будущей зоологии, которой она станет вскоре. Та экспансия молекулярных методов, которая происходила до сих пор в очень ограниченной области зоологии – филогенетике – по сути осуществлялась в рамках традиционных парадигм. А диссертация Марии Владиславовны – это другое, это первое появление в нашем совете направления, в котором возникнут совершенно другие парадигмы, и они изменят зоологию принципиально, намного сильнее, чем молекулярная филогенетика изменила теорию эволюции и систематику.

В диссертации содержится решение задачи, имеющей значение для развития зоологии, как того требует пункт 2.1 «Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова» (далее – «Положения...»), именно – разработки методики исследования иммунного ответа у беспозвоночных. Диссертация описывает новые научные результаты (по морфологии и ультраструктуре целомоцитов пескожила, развитию клеточного ответа на введение в полость тела посторонних веществ и частиц, поли(А) РНК в целомоцитах пескожила, по доменной архитектуре почти 100 белков, предположительно вовлеченных в иммунный ответ, их сходству с гомологами других животных и предположительным партнерам по функциональным связям), формулирует положения, выносимые на защиту, обладает внутренним единством (всесторонне исследуется определенный объект – целомоциты пескожила вне и в ходе иммунного ответа), то есть выполняет условие п. 2.2 «Положения...». Основные результаты опубликованы, а публикации, число которых по загадочной причине «Положение...» регламентирует, достигают в числе установленного «Положением...» порога, то есть требования пп. 2.3 и 2.4

выполнены. В диссертации записано о личном вкладе соискателя, т.е. требование п. 2.5 «Положения...» выполнено, а оценить точность записи – прерогатива научного руководителя и соавторов; оппонент же, согласно п. 3.7 «Положения...», не может быть соавтором и по этой причине не может знать реальный вклад соавторов; т.о., «Положение...» вынуждает оппонента оценивать диссертацию по п. 2.5 формально, что я здесь и делаю. Диссертация оформлена без нарушений требований п. 3.1 «Положения...». Все формальные требования «Положения...» к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук я нашел выполненными, а диссертацию – соответствующей критериям «Положения...».

Пункт 3.8 «Положения...» ставит вопрос о степени обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации, их достоверности и новизне. Об иммунном ответе беспозвоночных известно недостаточно. Представленные в диссертации данные о клеточном ответе пескожила новые, достоверность описания наблюдений не вызывает сомнения, тем более они хорошо документированы фотографиями и другими материалами. Начальные стадии ответа связаны с распластыванием и агрегацией целоцитов. Эти процессы описаны для разных способов индукции и выглядят не только достоверной стадией, но обязательной общей чертой начала иммунного ответа. Обнаруженный качественный сдвиг в наборе субъединиц протеасомы при воспалении сопутствует проходящей клеточной дифференцировке и указывает на важные способы регуляции протеома, для наблюдения которых еще нет столь удобных средств, как учет мРНК (например, можно представить деградацию протеасомой модифицированных белков, которые при новой клеточной дифференцировке нужны в том же количестве, но с другим типом модификации, что обойдется без явных сдвигов в транскриптом). Для пескожила в базе данных NCBI депонировано на сегодня около 400 белков, из них половина – от Марии Владиславовны, но в диссертации сообщается о 28693 предсказанных белках пескожила. Формально объем знаний увеличивается в 100 раз, но это качественно иной уровень – он позволяет судить не только об отдельных белках, но функционально связанных комплексах, о физиологии. Повторяю о почти 100 белках, для которых впервые (по кДНК) установлена первичная структура и доменная архитектура, предсказаны функции, найдены гомологи у других животных. Все результаты диссертации получены с использованием современных и ультрасовременных методик

(СЭМ и ТЭМ, оптическая DIC и лазерная конфокальная микроскопия, прижизненные наблюдения поведения клеток, гистологическое, иммуноцитохимическое окрашивание, вестерн-блоттинг, молекулярные методы работы с РНК, конструирование библиотек кДНК, высокопроизводительное секвенирование, биоинформационные методы).

Транскриптомные данные обработаны известными и разнообразными компьютерными программами, что обеспечивает обоснованность, «достоверность» положений и выводов диссертации на уровне современных требований науки. Последнее существенно, особенно в применении к «морфологической» части диссертации. Так, на стр. 7 в рамках «Положений, выносимых на защиту», автор выделяет пять морфологически отличных типов амебоцитов (ювенильные, мелкие амебоциты (гранулоциты) с псевдоподиями, шнуровидные амебоциты, распластывающиеся веретеновидные амебоциты, распластывающиеся вакуолизированные амебоциты округлой формы). На стр. 56 сообщается о трех «разновидностях» одних только веретеновидных целомоцитов. На стр. 57 предложен признак для распознавания «третьего основного типа целомоцитов» – распластывающихся: ярко окрашенные в живых клетках включения. Но в следующем абзаце читаем, что эти клетки «иногда не имеют включений в цитоплазме». Кроме того, на стр. 57 записано: «Третий основной тип целомоцитов представлен клетками различного размера и формы». Этот тезис, кажется не очень согласуется с выносимым на защиту положением о пяти типах целомоцитов, из которых два типа распластывающихся целомоцитов отличаются как раз по форме («веретеновидные» и «амебоциты округлой формы»). На стр. 68 записано: «На основании анализа наших данных можно выделить три типа целомоцитов, которые регистрируются всеми использованными методами». На стр. 59, после описания различных осложнений при идентификации типов целомоцитов, следует вывод о двух достоверно различимых типах («В целом можно заключить, что использование разных способов окраски позволяет достоверно различить типы целомоцитов с плотно или слабо прокрашиваемой цитоплазмой»). На итоговом рисунке 66 изображено 10 визуально отличающихся типов клеток, а в подписях к этому рисунку обозначены шесть типов. Остается под вопросом сколько типов и разновидностей целомоционов выявляется у пескожила по внешнему виду: десять, восемь, шесть, пять, три или два. Сопоставление с классификациями других авторов показывает сходные проблемы, возникающие у всех авторов. Это неопределенность, обусловленная методическим уровнем науки. По данному вопросу напрашивается

применение микрофлюидики (10X) для разделения клеток, благо в целоме они находятся в основном во взвеси с минимальным числом агрегатов – бича метода 10X, с последующим секвенированием и кластеризацией транскриптомов отдельных клеток. К сожалению, такой путь не пройти за счет одной усидчивости, без специального финансирования. Он разрешил бы вопрос о действительном, а не мнимом числе типов клеток в целоме пескожила вне иммунного ответа, но на главном вопросе – о клеточном ответе, забуксовал бы из-за необходимости отделить от субстрата распластавшиеся клетки и диссоциировать агрегаты, с чего начинается, как показывает диссертация, иммунный ответ.

О достоверности проведенного транскриптомного анализа свидетельствуют прекрасные показатели BUSCO по высокой полноте и низкой фрагментированности сборки, а это, в свою очередь, свидетельствует о высоком, я бы даже сказал завидном методическом уровне молекулярно-биологической части работы. Эти результаты выводят пескожила в число немногих видов кольчатых червей и Spiralia в целом, детально охарактеризованных на уровне транскриптома, и будут полезны многим коллегам, интересующимся не только иммунитетом беспозвоночных, но самыми разными вопросами зоологии. Автором проведен впечатляющий поиск белков-кандидатов на участие в иммунном ответе, найдено большое их число, для них восстановлена доменная архитектура и проведено сравнение с охарактеризованными белками других животных. На фоне высококачественной биоинформационной обработки озадачивает дизайн эксперимента, не предусматривавший контроль – транскриптом не индуцированных целоцитов. Это существенно облегчило бы по дифференциальной экспрессии поиск кандидатов и дополнило бы доказательство их участия в иммунном ответе не только сходством с охарактеризованными белками животных других типов, но и фактом индукции. Полезны бы были контроли и другого вида – транскриптомы 1-2-3 видов тканей, предположительно не включенных в иммунный ответ. Структурное сходство белков на современном уровне нашего понимания все же, по большей части, приходится рассматривать как косвенный указатель функции. Мария Владиславовна пишет о сложности предсказания функции по структуре на примере Toll-подобных рецепторов *Crassostrea gigas* (стр. 38), но при планировании собственного эксперимента не озаботилась получением подсказок в дополнение к первичным структурам. В результате у пескожила ею открыта система

активации комплемента при помощи тиоэфир-содержащих белков (ТЕР), а вот самих эффекторных белков, содержащих консервативные домены С3 (центральный компонент системы комплемента) и МАСРФ (мембраноатакующий комплекс), которые должны активироваться, не найдено. Это ставит под вопрос существование системы комплемента и функции ТЕР у этого червя. Далее, судя по описанному в диссертации клеточному поведению, иммунный ответ пескожила на зимозан (клеточные стенки дрожжей) и липополисахариды клеточной стенки бактерий отличается (раздел 4.2). Одновременное использование индукторов с заведомо неодинаковой реакцией на них экономно для скорейшего выявления полного списка мишеней, но отдельное использование было бы информативнее. На стр. 54 приведены титры целомоцитов, но не гамет в целом, о которых только сказано, что они отличаются по сезонам. Возникает вопрос: внесли ли гаметы вклад в полученный транскриптом и какой он. Впрочем, при реализованном дизайне эксперимента (без контролей) этот вопрос несущественный: все равно вся тяжесть биоинформационной обработки падала на сравнение первичных структур, который проведен очень грамотно, на современном научном уровне.

Сильной стороной представленного в диссертации транскриптомного анализа является значительная выборка из пяти индивидов. Она была объединена, это, по-видимому, стало одним из факторов прекрасных показателей BUSCO. Но затем, похоже, Мария Владиславовна забыла о сборной природе полученного ею транскриптома. Она высказывает предположение об индивидуальном полиморфизме как причине изоморф липополисахаридсвязывающего белка (LPS) (стр. 65) и рецепторов опознавания паттерна (pattern recognition receptors, PRR) (стр. 77) без того, чтобы подтвердить высказанную гипотезу проверкой числа изоморф у отдельных животных.

Автореферат адекватно отражает содержание диссертации.

Следовательно, я заключаю, что диссертация «Целомоциты пескожила *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta): морфология и иммунные функции» отвечает требованиям «Положения...» по содержанию и оформлению, представляет новый значимый материал, на современном научном уровне обработанный, содержание диссертации соответствует специальности «зоология» (по биологическим наукам). Как член диссертационного совета, я буду голосовать за присуждение Марии

Владиславовне ученой степени и рекомендую диссертационному совету присудить Марии Владиславовне Становой ученою степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 – «зоология».

Текст диссертации написан понятно, хорошим стилем, компактно, но небрежно.

На фотографиях ТЭМ: рисунки 14, 18, 22 диссертации, рис. 3В-Е автореферата – фантастический масштаб. На рисунках 27Д, 38, 40 масштаб правдоподобный.

На рисунке 3А автореферата звездочками отмечены якобы «целоמוциты с включениями». Как включения внутри клеток распознаны на сканирующей фотографии не поясняется. В диссертации на аналогичном рисунке 42 звездочки отсутствуют.

В разделе «3. Материал и методы» удивляет использование для беломорского червя «безкальциевой-безмагниево́й воды» с концентрацией солей 43% (стр. 47).

В обзоре литературы Мария Владиславовна противопоставляет «2.2.1. *Oligochaeta*», «2.2.2. *Polychaeta*» и «2.2.3. *Hirudinea*». Такое противопоставление идет наперекор современным взглядами на родственные отношения внутри кольчатых червей («полихеты», как известно, парафилетичны относительно «олигохет», а «олигохеты», парафилетичны относительно *Hirudinea*) и выглядит анахронизмом, которой помешал бы правильной интерпретации старых морфологических данных, не будь те столь малосодержательными. Упоминаемые «полихеты» (цирратулиды, сабеллиды, теребеллиды и основной объект пескожил *Arenicola marina*) филогенетически ближе к «олигохетам», чем к другим упоминаемым в п. 2.2.2 «полихетам» (нереидам, афродитидам). Тот же диссонанс с современной системой и на стр. 78 (раздел «5. Обсуждение результатов»). В самом деле, *Nereididae* и *Arenicolidae* «внутри одной группы», но эта группа – все плейстоаннелиды. Основанный на ложной посылке, что пескожилы и нереисы «близкородственные», локальный вывод о быстрой эволюции генов иммунитета, может и верный, оказывается не подкрепленным.

На стр. 23 в обзоре литературы приведены старые (60-70-х годов, до победы хемиосмотической теории Митчелла) ссылки на некие «внеклеточные дыхательные пигменты». Однако дыхание связано с созданием трансмембранного электрохимического потенциала путем последовательного переноса электрона в цепи локализованных в мембране дыхательных ферментов и их кофакторов (пигментов). Какое физиологическое значение могут иметь «внеклеточные дыхательные пигменты»,

не способные участвовать в дыхании? Там же: «Элециты синтезируют ... металлы» – это как понимать? Холодный термоядерный синтез они изобрели или хотя бы электрохимию металлов освоили, как некоторые бактерии? Рекомендую Марии Владиславовне на будущее критичнее относиться к утверждениям других авторов перед их цитированием.

На стр. 55 записано: «интерпретация микроскопических данных зависит от использованных методов фиксации и окраски». От методов фиксации и окраски зависят результаты, а их интерпретация зависит всё же от бытующей научной парадигмы, от добросовестности и квалификации исследователя.

На стр. 55 записано: «этот тип клеток обладает низкой адгезивностью, поскольку он редко встречается в образцах целомической жидкости, зафиксированных в суспензии». Почему не наоборот: обладает высокой адгезивностью, поскольку редко встречается в суспензии (а обычно на субстрате и в агрегатах)?

Могут ли 96% целоцитов разных типов происходить от 4%, приходящихся на ювенильные (стр. 70)? По отношению клеток не раскрыть генеалогию. При определенной скорости деления стволовых клеток и продолжительности жизни дифференцированных клеток можно достичь любого их соотношения. Считается, что миллионы клеток постларвальной мезодермы пескожила происходят от двух телобластов.

Список цитируемой литературы оформлен небрежно: в тексте цитируются источники «Gorbushin, 2016» (стр. 39) и «Gorbushin, 2019» (стр. 14, 36, 37), тогда как в списке ссылка только на «Gorbushin, 2018»; отсутствуют в списке, например, цитируемые источники «Ovchinnikova et al., 2004, 2007», «Lee, Kang et al. 2007», «Sandvang et al., 2008», «Berlov, Maltseva 2016», «Panteleev et al., 2020», «Elliott et al., 2020», «Krasity, Troll et al. 2011», «Elsbach, 1998», «Škanta et al., 2016», «Bogdan, 2001», «Nathan, Ding, 2010», «Panday et al., 2015», «Leffler, Carlsson et al. 2002», «Gerdol et al. 2015, 2018, 2019», «Hasan, Gerdol et al. 2016», «Tasumi and Vasta 2007», «Yoshino, Dinguirard et al. 2008», «Fattman et al., 2003», «Takeuchi et al., 1995», «Andreakis et al., 2010», «Maltzeva et al., 2014; 2016», «Калякина, 1976, 1980» и другие; источник «Metchnikoff, 1893» приведен в списке под номерами 109 и 110.

На стр. 50 и в других местах под «инфицированием» неожиданно подразумевается введение в полость тела червей стеклянных шариков или резаной собачьей шерсти.

Не для всех пересечений на диаграмме Венна (рисунок 46В диссертации и 4В автореферата) указаны значения, а проигнорированное значение было бы полезно.

На стр. 63 записано: «10994 совпадений ниже порога сходства (E-value: 1E-25)». Ее нельзя назвать неправильной, но все же *E-value* – это не прямой показатель «сходства», в отличие от «Identities» и «score».

На стр. 64 речь идет о «ядовитых нейротоксинах и цитотоксинах», будто есть неядовитые токсины.

На стр. 42 записано: «промежуточные продукты реакции меланинового пути участвуют в процессе заживления ран путем образования ковалентных связей в поврежденных тканях». Неправильным утверждение не назвать, но логическая последовательность нарушена.

На стр. 46 записано: «Это достаточно крупный (до 10-12 см в длину) вид». Я семестр учил М.В. Становову вместе с другими студентами, что вид – это таксономическая категория, и раздосадован крахом моих педагогических усилий в виде «таксономической категории до 10-12 см в длину» с «полостью, заполненной жидкостью» в диссертации М.В. Становой. Тем не менее, не могу признать этот и другие замеченные недостатки диссертации препятствием к присуждению за нее ученой степени.

Владимир Вениаминович Алёшин
доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник отдела эволюционной биохимии
НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ
Индекс, почтовый адрес: Москва, 119991, Ленинские горы, д. 1, стр. 40
Электронная почта: Aleshin@belozersky.msu.ru
Телефон: 8 (495) 939-14-40

ПОДПИСЬ
УДОЛЮВЕРЯЮ
ЗАВ.КАНЦЕЛЯРИЕЙ
Н.Н. СИДОРОВА

16 декабря 2022 г.

Специальности, по которым официальным оппонентом защищены диссертации:

03.00.08 – «зоология» (кандидата биологических наук)

03.00.03 – «молекулярная биология» (доктора биологических наук)