

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Становой Марии Владиславовны

на тему: «Целомоциты пескожила *Arenicola marina* (Annelida,

Polychaeta): морфология и иммунные функции»

по специальности 1.5.12 – «зоология»

Иммунная система беспозвоночных животных была, и во многом остается, одной из наименее изученных сторон биологии. Несмотря на то, что такое ключевое понятие, как фагоцитоз, был описан Мечниковым на личинках иглокожих еще в XIX веке, до последнего времени наши знания о молекулярных механизмах функционирования иммунных систем практически отсутствовали для большого числа групп беспозвоночных. Представленная диссертация вносит существенный вклад в наше понимание функционирования целомоцитов - ключевого для иммунной системы целомических животных элемента. Мария Владиславовна всесторонне анализирует клеточный состав, молекулярные механизмы иммунного ответа и структуру протеасом у такого классического модельного вида многощетинковых червей как пескожил *Arenicola marina*.

Четкая классическая структура диссертации отражена в Содержании. Текст написан хорошим литературным языком, содержит очень небольшое количество опечаток. Диссертация состоит из Введения, четырех классических глав (Литературный обзор, Материалы и методы, Результаты и Обсуждение) и Выводов. Список цитируемой литературы включает 167 процитированных источников, из которых 154 опубликованы на иностранных языках. Работа изложена на 145 страницах текста, включая 5 таблиц и 66 рисунков.

Во **Введении** дана краткая характеристика актуальности работы, указана ключевая роль целомоцитов в формировании иммунного ответа у некоторых групп беспозвоночных, включая и Annelida. Проведение комплексного сравнительного анализа клеточной популяции целомоцитов у представителей разных таксономических групп аннелид представляется крайне важным, а использование современных методов и комплексный подход к анализу результатов позволят получить более полное представление о функционировании иммунной системы аннелид. Также во введении сформулирована цель работы: комплексный анализ состава и функций популяции целомоцитов у морского пескожила *Arenicola marina* и сравнение полученных данных с информацией по другим видам. Сформулированы 6 задач, позволяющие достигнуть поставленную цель исследования. В заключительной части Введения сформулирована научная новизна и значимость работы, и четко сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1 (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР) изложена на 34 страницах, состоит из трех разделов и является полноценным научным исследованием. В первом разделе даются общие сведения об иммунных системах беспозвоночных животных, включая гуморальный и клеточный механизмы. Также приведен краткий обзор истории исследований защитных систем беспозвоночных. Отмечено, что если до относительно недавнего времени приобретенный иммунитет считался "изобретением" позвоночных (от миног и выше), то в настоящее время эти положения пересматриваются, и появляются свидетельства наличия иммунологической памяти у разных групп беспозвоночных.

Во втором разделе литературного обзора рассматриваются отдельно по каждому классу (полихеты, олигохеты и пиявки) морфология, цитогенез и функции целомоцитов аннелид. Это полноценный обзор современной литературы, изложенный на 15 страницах (самый большой раздел главы) и

подробно освещающий эту достаточно малоизученную область зоологии беспозвоночных. Благодаря интересу исследователей к изучению клеточных элементов целомической жидкости, олигохеты являются наиболее полно изученной группой аннелид, большая часть информации получена в ходе исследований модельных объектов – преимущественно представителей семейства Lumbricidae (в первую очередь, родов *Lumbricus* и *Eisenia*). Подробно описаны два класса клеток - амебоциты и элеоциты. Для полихет дана развернутая характеристика как амебоцитов и элеоцитов, также представлена информация о третьем типе целоцитов - эритроциты. Указано, что для пескожила - объекта исследования данной работы наличие элеоцитов не показано, хотя они массово присутствуют у других семейств. Указано на отрывочность и спекулятивность данных по целоцитам пиявок - самой неизученной в этом плане группы кольчатых червей. В заключение этого подраздела приводится синтез полученной информации, где сравниваются общие для разных групп аннелид типы целоцитов.

Третий раздел данной главы озаглавлен "Иммунно-ассоциированные молекулы аннелид и других беспозвоночных животных" . Подробно рассматриваются имеющиеся данные по следующим классам молекулярных механизмов защиты организма у полихет: система прото-комплемента, лектин-подобные молекулы, Toll-like рецепторы, агглютинирующие, лизирующие и антимикробные молекулы, Кислород-зависимые и фенолоксидазные эффекторные механизмы, белковый гомеостаз иммунных клеток.

На мой взгляд, последнюю группу следовало бы выделить в отдельный самостоятельный подраздел литературного обзора, так как анализ протеасом червя-пескожила в представленном исследовании является большим и важным разделом диссертационной работы, и, безусловно, заслуживает более подробного обзора современных представлений о составе

и функционировании данного белкового комплекса у различных групп беспозвоночных.

Глава **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ** состоит из очень логично построенных пяти разделов. Дается описание объекта исследования (червя *Arenicola marina*). Во втором подразделе "Морфология целомочитов *Arenicola marina*" описываются методы получения данных клеток и микроскопии. В разделе "Участие целомочитов *Arenicola marina* в защитных реакциях" описывается методика проведения экспериментов по фагоцитозу (в эксперименте использовали частицы клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Zymozan A), инкапсуляции (введения в полость тела стеклянных шариков и связывание липополисахарида (добавление LPS) . В разделе Анализ транскриптома целомочитов *Arenicola marina* описывается отбор проб целомочической жидкости и последующая активация целомочитов, выделение РНК и приготовление библиотек для проведения RNA-Seq анализа. Все процедуры описаны достаточно полно и подробно, что указывает, что диссертант освоил данные методы и понимает биологическую суть пробоподготовки. Достаточно четко описаны процессы биоинформатической обработки полученных чтений - первичная обработка, сборка транскриптома de-novo, аннотация полученных транскриптов и проведение сравнительного филогенетического анализа. В разделе Протеасомный комплекс целомочитов *Arenicola marina* описываются методы исследования этого аппарата белкового гомеостаза клетки. Для изучения протеасомного комплекса целомочитов и его реакции на экспериментальную иммунную индукцию использовали сравнение целомочитов трех групп животных: нативные (неинфицированные), контрольные и инфицированные LPS.

Глава **РЕЗУЛЬТАТЫ** изложена на 12 страницах и 4 раздела соотносятся с разделами предыдущей главы. В разделе Морфология и ультраструктура целомочитов *Arenicola marina* описываются выявленные

типы целомоцитов: веретеновидные, округлые целомоциты с псевдоподиями, распластывающиеся целомоциты а также другие, не отнесенные автором к конкретному типу. Следует отметить, что выделение отдельного типа распластывающихся целомоцитов (клетками различного размера и формы, которые в живом виде активно распластываются на стекле) возможно не совсем корректно в названии, так как до этого автором отмечено, что если использовать стекло с адгезивной поверхностью (покрытое полилизинном), в течение 20 минут большая часть целомоцитов успевает осесть, но при этом почти все клетки распластываются по стеклу. Тем самым, само по себе "распластывание", скорее всего, не является определяющим для этого типа клеток. Кроме того, неясно как ведут себя клетки этого типа в самом черве, где нет плоской стеклянной поверхности - распластываются ли они только по чужеродной субстанции, или также и по внутренним поверхностям целомических полостей червя. В разделе **Участие целомоцитов *Arenicola marina* в защитных реакциях** представлены результаты экспериментов по индуцированному фагоцитозу и инкапсуляции и связыванию LPS. Все результаты, полученные как в этом, так и в предыдущем разделах хорошо и подробно проиллюстрированы, однако помещение всех иллюстраций в приложение в конце диссертации безусловно затрудняет восприятие. Раздел **Анализ транскриптома целомоцитов *Arenicola marina*** - один из наиболее информационно насыщенных в представленной диссертации. Впервые для кольчатых червей проведено секвенирование, сборка и аннотация транскриптома целомоцитов. Идентифицировали 28693 «генов» (открытых рамок считывания, ORF), кодирующих белки длиной более 100 аминокислотных остатков. Анализ представленности в проведенной сборке однокопийных генов для метазой (BUSCO) показал присутствие 98% генов, что является отличной характеристикой полноты и качества сборки транскриптома. К сожалению, автор провел пулирование библиотек перед секвенированием, поэтому различия в экспрессии у активированных и неактивированных целомоцитах выявить не имелось возможности. Тем не

менее, наличие транскриптома позволит при желании разработать зонды на анализ экспрессии конкретных генов с использованием метода ПЦР в реальном времени, либо путем проведения RNA-Seq с меньшим покрытием и мэппированием на полученный транскриптом. Описаны выявленные белки для всех важнейших механизмов молекулярного иммунного ответа и предложены гипотезы о функционировании данных систем у пескожила. Показано, что *Лектин-подобные молекулы* представлены в транскриптоме целоцитов очень разнообразно. Характерной чертой транскриптома целоцитов является низкое разнообразие лектинов групп C1qL и FReDC. При этом выявлены 15 генов, кодирующих лектины С-типа (CLECT). Также автор обнаружила новое разнообразное подсемейство галектин-подобных белков, AmGal-BDC, с характерной доменной архитектурой, которая встречается только у нескольких видов – представителей групп Mollusca, Brachiopoda и Chelicerata, но, по всей видимости, отсутствует у представителей Mandibulata и Deuterostomia. *Пороформирующие молекулы* в транскриптоме целоцитов имеют неожиданно ограниченный репертуар. Целоциты *A. marina* экспрессируют 18 TLR, последовательности которых отличаются друг от друга более чем на 15%. Показано, что целоциты *A. marina* экспрессируют семь глобиновых цепей многомерного внеклеточного гемоглобина (Hb). В целом, данный раздел, даже в отрыве от остальных разделов работы, мог бы стать законченным диссертационным исследованием. В последнем разделе представлены результаты исследования протеасомного комплекса целоцитов *Arenicola marina*, показано, что в норме в целоцитах содержание 26S-протеасом ниже, чем это характерно для клеток млекопитающих. При этом достаточно высоко содержание субъединиц протеасом типа $\alpha 1, 2, 3, 5, 6, 7$.

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты обобщены в Главе ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, изложенной на 12 страницах чистого текста (все иллюстрации отнесены в Приложение). Проведено соотнесение собственных результатов с мировой научной

литературой. Проведено сравнение предложенной классификацией морфологических типов целоцитов с ранее предложенными классификациями. Отмечается, что расплывающиеся амебоциты не были ранее описаны. Это связано с тем, что обе упомянутые классификации (Dales, Dixon, 1981, Персинина, Чага, 1994) основаны на изучении целоцитов, зафиксированных в суспензии. Наблюдений за поведением живых клеток авторы не проводили. Обобщая полученные данные по морфологии целоцитов, их поведению и участию в клеточных защитных реакциях, а также данные литературных источников, диссертант заключает, что можно выделить следующие морфофункциональные типы целоцитов: ювенильные, мелкие амебоциты (гранулоциты) с псевдоподиями, шнуровидные амебоциты, расплывающиеся веретеновидные амебоциты, расплывающиеся вакуолизированные амебоциты округлой формы. Последние два типа не были ранее описаны.

Подводит итог диссертационного исследования глава **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**, в котором кратко, но емко подводятся итоги работы.

В заключение следует отметить, что на защиту представлена цельная работа зрелого и неравнодушного к объекту исследователя. Особенно значимыми и важными результатами работы можно с уверенностью выделить наши значительно расширившиеся представления о морфологии и функционировании иммунной системы такого модельного вида полихет как пескожил, но также и понимание функционирования данной системы в целом для беспозвоночных и полихет в частности. Работа закладывает основы для дальнейших исследований этого замечательного модельного объекта и одной из самых малоизученных сторон биологии беспозвоночных - функционирования иммунитета.

Автореферат полностью соответствует тексту диссертации, основные положения которой отражены в печатных работах. По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе три статьи в

рецензируемых журналах из списка ВАК. Результаты докладывались на многочисленных международных и российских конференциях.

Диссертационная работа «**Целомоциты пескожила *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta): морфология и иммунные функции**» полностью соответствует требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.12 – «зоология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным п.п. 2.1-2.5 Положения присуждения ученых степеней в Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова. Диссертационная работа оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Московского государственного университета.

Таким образом, соискатель **Становова Мария Владиславовна** полностью заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 – «зоология».

кандидат биологических наук,
Нач. отдела молекулярной генетики,
Всероссийский научно-исследовательский
институт рыбного хозяйства и океанографии,
(ФГБНУ «ВНИРО»), г. Москва

Н.С. Мюге

Подпись Мюге Н.С. заверяю

Директор департамента кадровой политики

Дата представления отзыва

12 декабря 2022 г.

Данные об оппоненте Мюге Н.С.:
Ph.D. in Biology (Rutgers University, USA) - 1996
к.б.н. по специальности "генетика" (ИБР РАН, 1997)
105187 Москва, Окружной проезд 19
ФГБНУ "ВНИРО", отдел молекулярной генетики
8(499)2648519 (лаб), e-mail: