

## ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук Петри Наталии Дмитриевны  
на тему: «Формирование лево-правого организатора в нормальном  
развитии *X. laevis* и под воздействием ингибитора форминов»  
по специальности 1.5.23. – Биология развития, эмбриология

Эмбриональные регуляторы морфогенеза, таких как определение осей тела эмбриона и, в том числе, установления лево-правой оси является одним из актуальных направлений эмбриологии.

У модельного объекта биологии развития – *Xenopus laevis* за установление лево-правой асимметрии тела отвечает постериорный дорсальный участок крыши гастроцеля, содержащий клетки презумптивной мезодермы, функционирующий на стадии нейрулы как лево-правый организатор.

Несмотря то, что структуры, по морфологии, функциям и набору экспрессирующихся генов сходные с лево-правым организатором шпорцевой лягушки, находят у многих млекопитающих, рыб и даже у морского ежа, вопрос о сроках и конкретном механизме установления лево-правой асимметрии у шпорцевой лягушки до сих пор не был полностью закрыт. Гипотеза о роли форминов в раннем установлении асимметрии у *X. laevis* нуждалась в проверке.

Таким образом, **актуальность** диссертационного исследования Н.Д. Петри не вызывает сомнений.

**Целью** настоящей работы было: выявить пространственную и временную динамику морфологии и молекулярно-генетической разметки лево-правого организатора, определить последствия ингибирования форминов для лево-правой асимметрии зародыша *X. laevis*.

Работа Н.Д. Петри представляет собой рукопись общим объемом 120 страниц. Она иллюстрирована 3 таблицами и 30 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы из 85 источников (из них 84 на иностранных языках) и благодарностей.

Содержание данного исследования связано с детальным изучением развития лево-правого организатора шпорцевой лягушки на последовательных стадиях онтогенеза.

По теме диссертации Н.Д. Петри **опубликовано** 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI (РИНЦ). В работах отражены все основные положения и выводы диссертации. Результаты исследований неоднократно обсуждались на международных, всероссийских, региональных симпозиумах, конференциях и совещаниях.

**Объектом исследования** служили шпорцевые лягушки *X. laevis* (Daudin), содержащиеся на кафедре эмбриологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, а также *Escherichia coli* XL1-Blue, предоставленные лабораторией.

Достоверность полученных результатов обеспечивается корректным применением современных молекулярных методов и протоколов исследования, адекватным статистическим анализом полученных данных, а также публикациями результатов в рецензируемых научных журналах.

Н.Д. Петри самостоятельно ставила задачи, освоила использованные в работе методики, планировала и выполняла все эксперименты в рамках данной работы. Автором выполнена вся математическая обработка первичного материала, сформулированы все выводы и положения работы. Автор принимал непосредственное участие в написании статей и апробации материалов диссертации.

**Научная новизна** работы состоит в том, что Н.Д. Петри впервые получены детальные пространственно-временные карты экспрессии ряда ключевых генов в лево-правом организаторе и последовательные изменения морфологии его поверхности.

Также в диссертационном исследовании прояснены противоречивые данные о влиянии ингибирования форминов на лево-правую асимметрию: изучен вклад активности форминов в нормальную асимметрию эмбриона лягушки на разных стадиях развития, охарактеризованы молекулярные и морфологические нарушения эмбриона при экспериментальном нарушении функционирования форминов, проведено детальное сравнение с морфологией и молекулярной разметкой интактных эмбрионов на разных стадиях развития *X. laevis*. В рамках исследования подробно изучено развитие лево-правого организатора шпорцевой лягушки на последовательных стадиях онтогенеза. Н.Д. Петри впервые исследовано влияние ингибирования форминов на лево-правый организатор.

Во введении автором аргументированно обосновывается актуальность и проблематика диссертационного исследования. Грамотно сформулированы цели и задачи исследования, а также основные положения, выносимые на защиту.

Раздел 1 представляет собой обзор научной литературы, включая публикацию автора, где Н.Д. Петри приводит современные представления о молекулярной основе и эволюционном разнообразии установления лево-правой асимметрии у ряда изученных групп животных, происходящей благодаря асимметричной работе сигнального каскада Nodal (или гомологичных генов сигнального каскада Nodal у вторичноротых беспозвоночных). Завершается обзор заключением, что все выдвинутые ранее гипотезы раннего установления асимметрии у *Xenopus* укладываются в контекст модели ресничного лево-правого организатора, кроме гипотезы

участия форминов, как кандидатов на роль универсальных регуляторов цитоскелета, которая требует дальнейшей проверки.

В разделе 2 содержатся сведения об объектах, материалах и методах исследования. Объектом исследования служили шпорцевые лягушки *X. laevis* (Daudin), содержащиеся на кафедре эмбриологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, а также *Escherichia coli* XL1-Blue, предоставленные лабораторией. Перечислены все использованные в ходе работы, реактивы, среды, буферы и растворы, праймеры, а также оборудование.

В основе проведенной работы лежит комплекс современных методов биологии развития, молекулярной биологии, цитологии. Ингибирование форминов производили путём инкубации эмбрионов в растворе ингибитора форминов SMIFH2 в 0,1x MMR. Сканирующая электронная микроскопия зародышей на стадиях 10,5-18 проведена с использованием сканирующего электронного микроскопа CamScan S-2. Иммунофлуоресцентный анализ проводили на микроскопе Olympus FluoView FV10i. Синтез антисмысловых РНК-зондов проводили в несколько этапов. Гибридизацию *in situ* проводили согласно разработанному в лаборатории протоколу. Препараты просматривали и фотографировали на стереомикроскопе Olympus SZX9, снабжённом камерой TourCam E3CMOS. Световая микроскопия: срезы образцов, полученные в результате гибридизации *in situ* фотографировали на микроскопе Olympus CX41, снабжённом камерой TourCam UNCCD05000KPA. Морфометрические измерения выполняли в программе ImageJ: измеряли длину ресничек на клетках лево-правого организатора на фотографиях, полученных методом СЭМ.

Статистический анализ выполнен с помощью программы R [R Development Core Team, 2004]. Воздействие ингибитора форминов на экспрессию *Nodal1* и *Pitx2* на стадии 28 и на асимметрию висцеральных органов головастиков оценивали при помощи теста пропорций с поправкой

Бонферрони. Анализ количественных характеристик области лево-правого организатора на образцах со сканирующей электронной микроскопии проводили при помощи теста Стьюдента с поправкой Бонферрони (при пороговом значении p-value равном 0,05).

Раздел 3 посвящён изложению полученных диссертантом результатов исследования. Н.Д. Петри было подробно описано нормальное развитие лево-правого организатора *X. laevis* от закладки его материала на стадии поздней бластулы до исчезновения зрелого лево-правого организатора с поверхности гастроцеля, методами гибридизации *in situ* и СЭМ.

Поскольку существуют свидетельства в пользу определения лево-правой оси во время дробления и ключевой роли форминов в процессе установления асимметрии у *X. laevis*, диссертантом было применено химическое ингибирование форминов на разных стадиях развития *X. laevis* и исследовано влияние этого ингибирования на лево-правую асимметрию зародышей, на морфологию и на молекулярную разметку лево-правого организатора. Эмбрионы, обработанные SMIFH2 во время дробления, не показали изменений экспрессии *Nodal1*, тогда как инкубация в SMIFH2 на стадиях гастролы и нейрулы привела к достоверному снижению доли эмбрионов с нормальной левосторонней экспрессией *Nodal1*. Аналогичные результаты были получены для экспрессии *Pitx2*. Установлено, что асимметрия, возникшая на молекулярном уровне в виде левосторонней экспрессии *Nodal1* и *Pitx2*, в дальнейшем проявляется на морфологическом уровне у головастиков *X. laevis*. На основании результатов данного этапа исследования, Н.Д. Петри доказано, что формины необходимы для установления асимметрии на тех стадиях, когда в крыше гастроцеля формируется и функционирует лево-правый организатор, и подтверждают гипотезу о том, что ключевым явлением для установления асимметрии у *X. laevis* является именно ресничный ток в крыше гастроцеля.

Исследование молекулярной разметки лево-правого организатора после ингибирования форминов на гастрале-нейруле показало, что поверхность лево-правого организатора сужается в первую очередь за счёт потери клетками боковых зон связи с поверхностью, а перекрывающие организатор клетки действительно имеют энтодермальную природу.

Диссертантом установлено, что в ходе ингибирования форминов на стадиях гастралы-нейрулы лево-правый организатор формируется нормальным образом, однако во время нейруляции его боковые зоны преждевременно перекрывается энтодермой, предположительно до того, как они успеют воспринять сигнал тока жидкости и активировать каскад Nodal.

Таким образом, диссертантом получены **новые уникальные данные**, которые существенно детализируют и углубляют знания о развитии лево-правого организатора шпорцевой лягушки в целом и о сроках специализации его отдельных участков. Новые сведения могут быть использованы для сравнения этапов развития, морфологии и молекулярной разметки лево-правого организатора амфибий с гомологичными органами других позвоночных и вторичноротых животных, расширяя научные представления о степени их эволюционного консерватизма. Исследование влияния ингибирования форминов на асимметрию и лево-правый организатор шпорцевой лягушки позволяет поместить гипотезу о роли форминов в установлении асимметрии в контекст общей гипотезы ресничного тока и подтверждает ключевую роль лево-правого организатора в установлении асимметрии у амфибий. Сходство генетических основ и молекулярных механизмов установления лево-правой асимметрии, а также закономерностей расположения асимметричных органов у амфибий и млекопитающих позволяет проводить на шпорцевой лягушке эксперименты, сложные в исполнении или вовсе невозможные для плацентарных животных. Изучение как нормальных закономерностей установления лево-правой оси тела, так и различных отклонений от нормальной асимметрии тела амфибий



позволяет провести параллели с аналогичными заболеваниями человека, связанными с неправильным установлением лево-правой асимметрии и строением асимметричных висцеральных органов в эмбриогенезе.

**Теоретическое значение** работы состоит в том, что новые данные, полученные Н.Д. Петри, значительно углубляют научное понимание развития лево-правого организатора у *X. laevis*. Удалось показать, что поверхностная мезодерма будущего лево-правого организатора проходит гастрюляцию, не теряя поверхностного положения, боковые сенсорные зоны претерпевают позднюю специализацию в начале нейруляции, и после окончания нейруляции материал лево-правого организатора уходит в глубокие слои мезодермы, становясь частью хорды и сомитов. На основании новых сведений об ингибировании форминов можно утверждать, что установление асимметрии у амфибий происходит с участием лево-правого организатора, а ингибирование форминов приводит к морфологическим нарушениям организатора и дальнейшим проявлениям нарушений асимметрии тела.

**Практическая значимость** работы Н.Д. Петри состоит в том, что новые результаты могут быть применены в дальнейших исследованиях лево-правого организатора амфибий, а также при сравнительном изучении способов установления асимметрии у животных. Изучение отклонений от нормальной асимметрии тела амфибий позволяет провести параллели с аналогичными заболеваниями человека, связанными с неправильным установлением лево-правой асимметрии и строения асимметричных висцеральных органов в эмбриогенезе. Кроме того, результаты диссертации могут быть использованы в учебном процессе для обновления методических материалов и развития учебных практических курсов по биологии развития.

Полученные Н.Д. Петри новые сведения расширяют понимание механизмов развития лево-правого организатора шпорцевой лягушки на

последовательных стадиях онтогенеза, а также впервые изучены последствия ингибирования форминов на лево-правый организатор.

При ознакомлении с диссертацией возникли **замечания и вопросы**. Так, при первом упоминании латинского названия вида полагается писать его полностью. Однако, к сожалению, на обложке диссертации и автореферата присутствует сокращенный вариант – «*X. laevis*». В материалах и методах отсутствует информация по объему использованного в исследовании материала, что, вероятно, в подобных исследованиях не требуется. Каково число повторностей проведенных экспериментов?

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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Петри Н.Д. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.23 – Биология развития, эмбриология.



Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией функциональной экологии наземных животных  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института  
экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии  
наук

Вершинин Владимир Леонидович



02.12.2024

Контактные данные:

тел.: 79630482949, e-mail: vol\_de\_mar@list.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

1.5.15 – Экология (биологические науки)

1.5.12 – Зоология (биологические науки)

Адрес места работы:

620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, д. 202,

Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской  
академии наук, лаборатория функциональной экологии наземных животных

Тел.: 7(343) 2103858; e-mail: wow@ipae.uran.ru