

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Борисенко Ильи Евгеньевича на тему: «Регенерация губок *Halisarca dujardini* (класс Demospongiae) и *Oscarella lobularis* (класс Homoscleromorpha): клеточные механизмы и участие сигнального каскада Wnt», представленную на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология

### Актуальность темы.

Диссертация Борисенко Ильи Евгеньевича посвящена фундаментальной проблеме биологии развития – способности организмов восстанавливаться после повреждения. В качестве экспериментальной модели исследования выбраны древнейшие представители многоклеточных животных – губки (Porifera). Считается, что губки обладают высоким потенциалом к регенерации. Исследование клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе этой способности, сравнение их с известными для животных других филогенетических групп, может пролить свет на общие принципы, лежащие в основе этого важнейшего адаптивного процесса в онтогенезе. Поскольку губки занимают базальное филогенетическое положение среди Metazoa, детали клеточных и молекулярных процессов, задействованных во время процесса регенерации, представляют большой интерес для эволюционной биологии. Исследование процессов регенерации давно привлекает внимание исследователей. Однако только относительно недавно к исследованиям на морфологическом и биохимическом уровнях стали присоединяться данные, полученные с привлечением молекулярно-генетических методов, а также высокопроизводительного секвенирования. Представленные в работе данные о вовлеченности консервативных сигнальных каскадов в процесс регенерации у таких анцестральных многоклеточных животных, как губки, дополнит имеющиеся представления о фундаментальных механизмах регенерации. Полученные сравнительные данные о функционировании путей межклеточной коммуникации у видов с расширенными способностями к регенерации дополнит существующие представления о возможностях манипулирования регенеративным потенциалом. Всё вышеперечисленное обуславливает несомненную актуальность представленного Ильей Евгеньевичем Борисенко исследования, посвящённого клеточным механизмам и участию сигнального каскада Wnt в регенерации губок.

### Структура и содержание диссертации.

Диссертация изложена на 90 страницах на русском языке, и на 87 страницах на английском языке. Оба варианта равнозначны и включают следующие разделы: введение, три главы, заключение, выводы, материалы и методы и список литературы. Работа содержит 24 рисунка, список литературы насчитывает 211 источников.

Глава 1 представляет собой обзор литературы и подразделена на три части. Первая часть, «Клеточные и молекулярные механизмы регенерации у беспозвоночных», посвящена обсуждению морфогенетических процессов, происходящих во время восстановления поврежденных тканей, у беспозвоночных. Представлены как классические, так и современные исследования, описывающие эти процессы на цитологическом и молекулярном уровнях. Диссертант последовательно рассматривает спектр восстановительных процессов и известные участвующие в них молекулярные сигналы для каждого типа животных, от стрекочущих до хордовых. Дается представление о современном состоянии данной

проблемы, обосновывается актуальность поднимаемой тематики. Во второй части, «Роль сигнального пути Wnt в репаративных морфогенезах беспозвоночных», диссертант рассматривает участие Wnt-каскада в регенерации у модельных объектов, таких как гидра, дрозofiла и планарии. В третьей части, «Клеточные и молекулярные механизмы регенерации у губок», представлены конкретные имеющиеся данные о морфологических основах процесса восстановления после экспериментальных повреждений у губок, полученные на ультраструктурном уровне. Приводятся имеющиеся современные данные о молекулярной регуляции этих процессов.

В главе 2 «Клеточные механизмы регенерации у *Halisarca dujardini* и *Oscarella lobularis*, представителей разных классов губок», автор приводит собственные экспериментальные данные по изучению процессов репаративной регенерации у двух видов губок из разных классов. Приводятся данные по клеточному составу у губок в разные сроки после нанесения повреждения, полученные с использованием электронной микроскопических методов (сканирующая и трансмиссионная микроскопия). Отдельно приводятся данные по пролиферативной активности клеток по включению EdU у интактных губок и после нанесения повреждения. В обсуждении полученных результатов проводится сравнение наблюдаемых типов клеток, вовлеченных в процесс регенерации у двух видов, высказываются предположения о преимущественном типе клеток, являющихся ведущими у разных видов. Проводится сравнение в результатами, известными для других животных.

В главе 3 «Участие сигнального каскада Wnt в спецификации осей губок и регенерации» диссертант приводит собственные данные по анализу наличия и экспрессии генов Wnt у взрослых губок и у личинок с помощью гибридизации *in situ*. Следует отметить, что автором было впервые проведено секвенирование и собран референсный транскриптом, содержащий транскрипты взрослых губок и личинок *Halisarca dujardini*. В полученном транскриптом идентифицированы компоненты сигнального пути Wnt, проведен анализ и определено филогенетическое положение лигандов. С помощью гибридизации *in situ* показаны паттерны экспрессии нескольких типов идентифицированных Wnt у интактных губок. Также приведены паттерны экспрессии определенных типов Wnt после экспериментального повреждения – удаления фрагмента эктосомы *H. dujardini*, и в ходе развития примморф после диссоциации губки на отдельные клетки. Существенно, что визуализация экспрессии генов дополнена данными секвенирования РНК, что позволяет установить количественные отличия в уровне экспрессии генов Wnt-каскада на разных стадиях процесса регенерации.

В Заключении диссертант дает краткое обоснование важности затрагиваемой тематики, кратко пересказывает полученные результаты и обобщает полученные данные. В обсуждении собственных результатов автор отмечает, что многие затронутые в работе вопросы, поставленные в результате анализа полученных данных – например, гены-мишени Wnt-каскада и экспериментальное подтверждение его функциональной роли – требуют дальнейшей работы. Автором обозначаются широкие перспективы для дальнейшего развития данной тематики.

Далее следует раздел Выводы, которые не дублируют заключение и строго соответствует поставленным в работе Задачам и Цели исследования.

Раздел Материалы и методы приводится в конце работы. В нем кратко перечисляются основные методы, использованные в работе. Подробное описание использованных методов не приводится, в каждом конкретном случае даются ссылки на опубликованные статьи диссертанта. В этом разделе обращает на себя спектр освоенных диссертантом методов,

модернизированных и примененных к немодельным объектам. В частности, мечение ДНК в S-фазе клеточного цикла, секвенирование и анализ данных *in silico*, гибридизация РНК *in situ*.

### **Новизна исследования.**

В диссертации описываются процессы регенерации у двух видов губок, относящихся к разным классам – *Halisarca dujardini* (класс Demospongiae) и *Oscarella lobularis* (класс Homoscleromorpha). Оба вида являются объектами активного изучения в последние несколько десятилетий. При этом впервые в данной работе описывается регенерация на электронно-микроскопическом уровне на последовательных стадиях этого морфогенетического процесса. Проведено секвенирование, поиск генов и анализ экспрессии генов, участвующих в процессе регенерации. Впервые показано присутствие мРНК сигнального каскада Wnt во взрослой интактной губке, в личинке и у взрослой губки после нанесения повреждения. На основании полученных данных высказано предположение, что сигнальный каскад Wnt принимает участие в спецификации оси у *Halisarca*.

### **Степень обоснованности научных положений, заключения и выводов, сформулированных в диссертации, их достоверность.**

Работа грамотно выполнена с методологической точки зрения, дизайн экспериментов корректен, полученные результаты подтверждены экспериментально. Проведен анализ и сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями. Выводы и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют полученным результатам. Все научные положения и выводы диссертации достоверны, основаны на полученном лично автором экспериментальном материале и собственном теоретическом анализе. Результаты, полученные Борисенко И. Е. в ходе работы над диссертацией, опубликованы в 7 научных статьях в журналах, индексируемых системами WoS и/или Scopus, в том числе три в журналах первого квартиля SJR, данные докладывались на научных конференциях и представлены в виде 12 публикаций в материалах международных и всероссийских конференций. Оригинальность и достоверность полученных данных, а также обоснованность сделанных в работе выводов подтверждается уровнем журналов, в которых были опубликованы представленные результаты.

Следует особо отметить, что работа представлена на двух языках: русском и английском. Вся работа выстроена логично и последовательно. В целом, представленное исследование выполнено на современном уровне, как в отношении его актуальности, так и использованной методологии.

### **К работе имеются следующие вопросы и замечания:**

1. В работе представлен обширный экспериментальный материал. Тем не менее, ни из текста результатов, ни из подписей к рисункам, ни из описания методов непонятно, какое количество экспериментов было проведено, сколько особей было использовано для анализа, в каком проценте особей наблюдались выявленные закономерности.

2. В работе не приводятся количественные данные по представленному морфологическому материалу. Автор ограничивается общим описанием процесса и высказываниями типа «в основном», «больше», «преимущественно». При этом в ряде

случаев подсчеты дали бы более убедительный материал для анализа. Например, при подсчете меченых ядер в разных регионах относительно нанесенного повреждения, или числа формирующихся остий при воздействии различных веществ. Также можно было бы провести иммунохимическое маркирование базальных телец хоаноцитов и одновременно пролиферирующих ядер с EdU. Подсчет двойной метки позволил бы точно определить, какой процент дают хоаноциты в популяцию делящихся клеток и что происходит именно с этим типом клеток в процессе регенерации.

3. На приведенных иллюстрациях хотелось бы видеть больше крупных планов клеток с описываемыми морфологическими характеристиками, особенно на разных стадиях процесса дедифференцировки-дифференцировки. Так, автор указывает, что «маркером ...хоаноцитов является базальный жгутиковый аппарат (базальное тельце и вспомогательная центриоль)», но при этом ни на одной из микрофотографий эти структуры не указаны. При этом они прорисованы на обобщающей схеме процесса регенерации у *Halisarca dujardini* (Рисунок 9). Также хотелось бы видеть крупные планы дедифференцированных клеток «бластемы» у *Halisarca dujardini* (Рисунок 5), обсуждению которых автор уделяет большое внимание.

4. В представленном электронном варианте диссертации фотографии даны с низким разрешением, что не дает возможности рассмотреть детали при увеличении рисунка. В частности, тех же жгутиков и базальных телец на микрофотографиях хоаноцитов и хоаноцитных камер, соотношения жгутиковых клеток и меченых ядер у интактных губок и регенерирующих. Это затрудняет восприятие высказываемых автором утверждений.

5. Описывая процессы морфологических изменений специфических типов клеток, автор несколько раз говорит об изменении формы. Хорошо было бы иметь фотографии клеток одного и того же типа в норме и рядом для сравнения то, что происходит с этим же типом клеток (по мнению автора) на разных стадиях регенерации.

6. Хотелось бы в начале работы увидеть расширенное обоснование использования двух разных видов губок. Во Введении и далее по тексту автор говорит, что *Halisarca dujardini* и *Oscarella lobularis* относятся к двум разным классам, а на стр 47 упоминает, что *Oscarella lobularis* относится к «эволюционно удаленному» классу.

7. Работа значительно выиграла бы, если бы в ней было представлено больше схем. Так, в Обзоре литературы нет ни одной схемы, демонстрирующей имеющиеся представления о клеточных и молекулярных механизмах регенерации. В Главе 3, где описывается одно из основных открытий автора – экспрессия разных участников Wnt-каскада у взрослой губки и личинки *Halisarca dujardini* – нет обобщающей схемы, иллюстрирующей основное положение автора об участии сигнального каскада Wnt в спецификации осей губок и регенерации.

8. В работе необходимо привести отдельно список используемых сокращений, так как не во всех случаях автор использует полное наименование до использования сокращения. Даже при наличии такого отдельного списка использование сокращений в подписях к рисункам затрудняет понимание представленного на иллюстрации.

9. Использование двух языков явно чувствуется в работе. И всё же хотелось бы избежать в русскоязычном варианте прямого подстрочного перевода и не использовать фразы: «пул клеток, арестованных в G2 фазе» (стр 12), «солитарных асцидий» (стр 15), «шкалы» и «наконечники стрелок» (в подписях к рисункам).

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, проведенного Ильей Евгеньевичем Борисенко, и не влияют на сделанные в работе выводы. Работа имеет несомненное значение для фундаментального изучения клеточных и молекулярных механизмов регенерации и, в дальнейшем, может сыграть важную роль в развитии представлений о базовых регуляторных механизмах регенерации животных.

Диссертация Борисенко Ильи Евгеньевича на тему: «Регенерация губок *Halisarca dujardini* (класс Demospongiae) и *Oscarella lobularis* (класс Homoscleromorpha): клеточные механизмы и участие сигнального каскада Wnt» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Борисенко Илья Евгеньевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Член диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
заведующая лабораторией сравнительной физиологии развития  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН  
Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова 26  
Телефон: +7(499)135-33-22, e-mail: info@idbras.ru

Воронежская Елена Евгеньевна

17 января 2022 г.

«Подпись Воронежской Е.Е. заверяю»  
Ученый секретарь,  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН,  
к.б.н., доцент



Хабарова Марина Юрьевна