

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 1 марта 2017 г. № 3

О присуждении **Ивановой Анастасии Сергеевны**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук. Диссертация «Роль генов Agt и Ras-dva в раннем развитии мозга и при регенерации придатков тела у низших позвоночных» по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, принята к защите 14.12.2016 г., протокол № 17 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) (117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Иванова Анастасия Сергеевна 1990 года рождения, в 2012 году окончила очное отделение Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности «физиология», в период подготовки диссертации с 2012 г. и по настоящий момент является аспирантом очной формы обучения Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Диссертация выполнялась в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель – профессор, доктор биологических наук Зарайский Андрей Георгиевич, руководитель лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

**Григорян Элеонора Норайровна**, доктор биологических наук, и.о. руководителя лаборатории проблем регенерации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук (ИБР РАН);

**Пантелеев Андрей Александрович**, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории тканевой инженерии и регенеративной биомедицины НИЦ «Курчатовский Институт» Центра НБИКС Технологий, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» в своем положительном заключении, подписанном профессором, доктором биологических наук Голиченковым Владимиром Александровичем, заведующим кафедры эмбриологии биологического факультета, и утвержденном проректором, начальником управления научной политики и организации научных исследований МГУ имени М.В. Ломоносова А.А. Федяниным, указала, что диссертация удовлетворяет требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а ее автор, Иванова Анастасия Сергеевна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Соискатель имеет 6 опубликованных работ, из них по теме диссертации - 5, в том числе 4 статьи объемом 3,9 печ.л. в научных журналах, цитируемых базой данных Web of Science и/или Scopus. Наиболее значимые работы по теме диссертации, в которые автор внес основной вклад:

1. **Ivanova AS**, Tereshina MB, Ermakova GV, Belousov VV, Zاراisky AG. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles // Scientific Reports 2013; 3: 1279. doi: 10.1038/srep01279

2. Tereshina MB, Ermakova GV, **Ivanova AS**, Zاراisky AG. Ras-dva1 small GTPase regulates telencephalon development in Xenopus laevis embryos by controlling Fgf8 and Agr signaling at the anterior border of the neural plate // Biology Open. 2014 Mar 15;3(3):192-203. doi: 10.1242/bio.20147401

3. **Ivanova AS**, Shandarin IN, Ermakova GV, Minin AA, Tereshina MB, Zاراisky AG. The secreted factor Ag1 missing in higher vertebrates regulates fins regeneration in Danio rerio // Scientific Reports 2015 Jan 29;5:8123. doi: 10.1038/srep08123.

4. **Ivanova AS**, Shandarin IN, Minin AA, Tereshina MB, Zاراisky AG. Ag1 Is Required for the Fin Regeneration in Danio rerio. Bioorg Khim. 2015 Jul-Aug;41(4):427-31. Russian.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.б.н. Григорян Элеоноры Норайровны положительный. Среди замечаний и пожеланий оппонентом было отмечено: 1) Сквозная

нумерация ссылок, несколько затрудняющая чтение, некоторые неточности и опечатки, а также замечания к оформлению некоторых рисунков; 2) Не для всех экспериментов дана полная информации о числе использованных в работе животных и постановке контрольных тестов; 3) Вопросом к первой части главы «Результаты и обсуждения» является уровень соответствия областей окрашивания областям реальной экспрессии изучаемых генов и их продуктов (в т.ч. белков). Поскольку метод гибридизации *in situ* в данном разделе был основным, то в обсуждении целесообразно дать комментарий о степени его надежности. Так, например, написано «мы продемонстрировали, что *Ras-dva1* экспрессируется исключительно в клетках наружного слоя ненейральной эктодермы, на границе с ANB и, таким образом, в принципе, не может регулировать экспрессию генов конечного мозга (внутренний слой клеток) с помощью автономного механизма». Эта сентенция основана на регистрации локализации продуктов реакции при *in situ* гибридизации, но не подкреплена данными на клеточном уровне (возможно иммуноцитохимически); 4) Во второй части главы «Результаты и обсуждения» отсутствует информация о том, что происходит на 1-7 дни наиболее высокой экспрессии генов *xAgg* в сайте ампутации. Указано, что это «не рана и не воспаление», но тогда что? Выяснение этого вопроса на клеточном уровне с помощью морфологических и иммунохимических методов могло помочь увязать роль исследуемых генов с клеточным поведением, их регенерационным ответом; 5) Попытка объяснить разноуровневую экспрессию на ранних этапах регенерации у амфибий и рыб сделана в терминах «разного расхода транскриптов на регенерацию». Это требует разъяснения, т.к. регенерация представляет собой совокупность множества клеточных процессов, к тому же значительно различающихся у взрослых рыб и головастиков амфибий. 6) В обсуждении полагаю необходимым учитывать существующие сегодня иные объяснения наличия/утраты регенерационной способности позвоночными. В них в качестве пререквизитов регенерационной способности рассматриваются высокая пластичность клеточных фенотипов, низкая степень зрелости иммунной системы, альтернатива опухолевому росту и т.д.

2. Отзыв официального оппонента к.б.н. Пантелеева Андрея Александровича положительный. Обозначены некоторые замечания: 1) Не указаны единицы масштаба на рисунке 1; 2) Фраза «Таким образом, можно говорить о том, что для развития теленцефалона необходима коэкспрессия генов *Ras-dva1* и *FoxG1* в двух различных зонах» представляется не совсем обоснованной. *In situ* гибридизация не является количественным методом и даёт представление только о локализации транскрипции, но не о её

функциональной значимости. Подобное заключение должно быть подтверждено функциональным экспериментом (оценкой взаимодействия белковых продуктов); 3) Окончание фразы "В целом, уровень экспрессии гена *Xagr3* был ниже по сравнению с другими генами, т.е. сигнал в ПЦР-амплификаторе фиксируется на более поздних циклах" (стр. 82) лучше было бы заменить на: «сигнал был ниже относительно контрольного гена»; 4) Фраза «Полученные данные можно объяснить следующим образом: если ген экспрессируется на высоком базовом уровне, то при повреждении его транскрипты немедленно расходуются на регенерацию, вследствие чего сначала уровень экспрессии гена снижается, а затем возрастает до базового уровня» (стр. 93) не совсем корректна. Здесь нужно говорить не о снижении уровня экспрессии, а о снижении уровня транскриптов; 5) Фраза "Vivo-морфолино – синтетические морфолиновые олигонуклеотиды, способные проникать в клетку благодаря остатку окта-гуанидин дендримера и подавлять трансляцию целевой мРНК путем связывания с областью инициации трансляции" (стр. 96-97) описывает один из основных методов исследований, поэтому её было бы логичнее использовать гораздо раньше по тексту, при первом упоминании этого метода; 6) Недостаточная обоснованность логической (смысловой) связи между двумя частями работы. Существование этой логической связи затронуто очень кратко во введении и в обзоре литературы, однако вопрос, каким образом результаты первой и второй части работы дополняют друг друга, каково их взаимное значение оставлен без должного внимания. Единственное, что логически объединяет две части работы – это гипотеза, высказанная в последнем пункте выводов.

3. Отзыв ведущей организации положительный. При ознакомлении с диссертацией возникло замечание по литературному обзору о нехватке информации о морфологических особенностях и молекулярных механизмах регенерации в других таксонах, также есть небольшие технические замечания: в обзоре литературы на заимствованном рисунке 12 отсутствует ссылка на источник, в разделе «Методы и материалы» не везде приведена информация о контрольных экспериментах и математическом анализе, также есть небольшие опечатки и терминологические неточности.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих теме представленной диссертации, в частности в области исследований молекулярных механизмов регуляции раннего развития позвоночных, физиологических и молекулярно-генетических механизмов регенерации рыб и амфибий, клеточных технологий и молекулярно-биохимических основ дифференцировки и трансдифференцировки клеток. Это подтверждается наличием у них

значительного количества публикаций в ведущих российских и международных научных журналах и изданиях. Наличие большого опыта и высокой квалификации в соответствующих областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований было впервые доказано существование сигнальной петли обратной связи между генами *Agr*, *Ras-dva* и фактором роста фибробластов *Fgf8* между клетками нервной пластинки и клетками прилежащей к ней головной нервной эктодермы, был продемонстрирован сложный механизм взаимодействия этих генов в раннем нейрогенезе. Также были впервые получены данные о вовлеченности генов *Agr* и *Ras-dva* в процесс регенерации придатков тела у низших позвоночных.

Теоретическая значимость исследования состоит в получении новых фундаментальных знаний относительно сигнальных каскадов, регулирующих раннее развитие переднего мозга позвоночных, закладывающих основу для дальнейших исследований молекулярно-генетических основ его формирования. Новые данные об участии генов *Agr* и *Ras-dva* в регенерации придатков тела головастика шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и рыбы *Danio rerio* позволят глубже понять механизмы регенерации позвоночных и основы ее регуляции.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что изучение молекулярных механизмов развития переднего мозга является основой для лечения ряда нейродегенеративных заболеваний, а также заболеваний, связанных с повреждениями мозга и ЦНС. Исследование новых регуляторов регенерации позволит оценить их роль как в патологических процессах, таких как доброкачественные и злокачественные опухоли, перерождение клеток так и в норме - дифференцировка клеток при заживлении раны, ускорение деления клеток при значительных повреждениях кожи и внутренних органов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные работы были проведены с использованием сертифицированного оборудования и материалов, показана воспроизводимость результатов исследования. Теоретические предположения и концепции, использованные в работе, построены на основе современных литературных данных по теме диссертации, а полученные автором результаты с ними согласуются. В ходе выполнения работы были использованы современные методики молекулярной биологии, биотехнологии и биоорганической химии.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в выборе основных

направлений и методов исследования, получении и анализе экспериментальных данных. Весь экспериментальный материал, за исключением трансгенной линии лягушек (pXag2-Egfr), которая была создана сотрудниками лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН ранее, был получен лично автором, подготовка основных публикаций по выполненной работе происходила совместно с другими авторами данных работ при непосредственном участии соискателя.

На заседании 1 марта 2017 года диссертационный совет принял решение присудить Ивановой Анастасии Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 6 докторов наук (по специальности 03.01.03 – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель диссертационного совета  
академик РАН

В.Т. Иванов

Ученый секретарь диссертационного совета  
д.ф.-м.н.



В.А. Олейников