

В Диссертационный совет Д 003.011.01 на базе  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и  
генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

**Отзыв официального оппонента**

о диссертации Коростиной Валерии Сергеевны «Изучение локализации и функциональной значимости белка Каицо в организме взрослых мышей» на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В данной диссертационной работе автор изучает локализацию и функциональную значимость белка Каицо, а именно, влияние нокаута гена Каицо на поведение и развитие острого воспаления у мышей. Данные задачи являются чрезвычайно актуальными, поскольку их решение существенно расширяет представление о функциях белка которые до сих пор остаются не до конца изученными. В литературе существуют данные о возможной связи локализации Каицо в опухолевых тканях человека со степенью злокачественности. Однако единого мнения на этот счет нет, к тому же достоверность гистологических исследований и окрашиваний на Каицо было осложнено из-за отсутствия отрицательных контролей. Однозначных и достоверных результатов о локализации Каицо в организме мышей крайне мало. Наиболее достоверным доказательством специфичности иммуногистохимических окрашиваний является использование тканей мышей с генетическим нокаутом *Kaizo*.

Известно, что отсутствие этого белка у земноводных является летальным на эмбриональной стадии, однако, до работы диссертанта считалось, что мыши, нокаутные по гену *Kaizo*, не проявляют никаких фенотипических и морфологических особенностей. Результаты, полученные после проведенного морфологического исследования мозга нокаутных животных и подробного поведенческого фенотипирования мышей с нокаутом по гену *Kaizo* в существенной мере заполняют пробелы в знаниях о влиянии Каицо на морфологию мозга и изменения в поведении.

Известно, что при скрещивании Каицо-нокаутных мышей с мышами линии  $Arc^{Min/+}$ , несущей мутацию опухолевого супрессора APC, у потомства увеличивается

продолжительность жизни и замедляется развитие полипов. При локальном увеличении экспрессии Каизо в кишечнике у мышей, происходит спонтанное развитие хронических воспалительных процессов, а при скрещивании таких мышей с линией Arc<sup>Min/+</sup> воспалительные процессы усугубляются, и происходит сокращение продолжительности жизни. Образование полипов зачастую является следствием хронического воспаления, что может стать причиной развития рака толстой кишки. В связи с этим изучение роли Каизо в остром и хроническом воспалении являются особо актуальными.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫПОЛНЕННОЙ РАБОТЫ

Работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК. Соблюдены все правила построения рукописи по всем необходимым разделам. Диссертационная работа В.С. Коростиной изложена на 121 странице и включает следующие разделы:

Введение (5 стр.), Обзор литературы (25 стр.), Материалы и методы (18 стр.), Результаты (31 стр.), Обсуждение (3 стр.), Заключение (1 стр.), Выводы (7 пунктов), Список литературы (220 наименований). Работа проиллюстрирована 32 рисунками и 9 таблицами.

Анализируемая работа представляет собой фундаментальное научное исследование, посвящённое актуальной проблеме, выполненное с применением современных и соответствующих задачам экспериментальных методов.

**Цель исследования** сформулирована чётко и конкретно – изучить локализацию и функции белка Каизо в организме взрослых мышей с использованием модели генетического нокаута.

Для достижения цели были применены вполне адекватные методы, положенные в основу решения 3х задач: Определить локализацию белка Каизо в клетках и тканях мышей; Провести поведенческое фенотипирование нокаутных по гену *Kaizo* мышей, оценить методом МРТ морфологические параметры мозга; Определить влияние нокаута гена *Kaizo* на развитие острого воспалительного процесса в кишечнике мышей в ответ на воздействие декстран сульфата натрия.

**Положения, выносимые на защиту**, являются обоснованными и соответствуют содержанию диссертации и автореферата.

**Введение** написано в достаточно чёткой и полной форме. Автор подробно описывает актуальность выбранного исследования, на основании чего формулирует цель и задачи исследования. Кроме того, во введении представлены: научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

**Обзор литературы** содержит исчерпывающее введение в проблему и представлен семью подразделами. Подробный обзор с использованием большого количества литературы позволяет оценить современное состояние проблемы исследования.

Все подразделы главы **Материалы и Методы** демонстрируют обширный набор взаимосвязанных методов и методик, применённых автором, без заметных неточностей. Все методики адекватны поставленной цели и решаемым задачам и описаны достаточно полно.

**Результаты** диссертации представлены тремя блоками, в которых изложены результаты собственных исследований и их интерпретация.

В первой части работы было проведено подробное иммуногистохимическое исследование локализации белка Каизо в органах и тканях мыши. В результате проведённого исследования с использованием поликлональных антител к белку Каизо, автор показал ядерную локализацию Каизо в различных клетках, преимущественно в эпителиальных тканях. Также было выявлена цитоплазматическая локализация Каизо в фотосенсорных клетках глаз. Было показано и доказано, что Каизо специфически локализуется в сперматогониальных стволовых клетках типа  $A_{\text{парные}}$  и  $A_{\text{линейные}}$ .

Во второй части работы было проведено морфологическое исследование при помощи метода МРТ и выявлено значительное уменьшение боковых желудочков мозга у мышей, нокаутных по гену *Каизо*. Проведённое исследование поведения нокаутных по *Каизо* мышей выявило у них повышенную двигательную и исследовательскую активность, кроме того повышался уровень претимульного торможения и снижались когнитивные способности мышей.

Третья часть работы демонстрирует влияние нокаута гена *Каизо* на протекание острого воспалительного процесса при воздействии декстрана сульфата натрия. Показано, что у нокаутных животных происходит отсроченное снижение веса, менее выраженное проявление морфологических и гистологических признаков воспаления, а также ниже уровни экспрессии цитокинов.

Работа хорошо проиллюстрирована, необходимые данные наглядно отображены с помощью графиков.

Все полученные результаты представляются ценными как для фундаментальной науки, так и для практического использования в дальнейших экспериментальных исследованиях во многих научных коллективах, занимающихся разработкой экспериментальных моделей, методов цитологической диагностики, морфометрии.

**Обсуждение** полученных данных корректно и проведено с использованием достаточного числа литературных источников.

В **заключении** диссертант суммирует основные итоги работы, сопоставляя их с литературными данными.

**Выводы**, сделанные в работе, по своему содержанию, безусловно, соответствуют поставленным задачам. Отражают её содержание и вытекают из полученных данных.

**Список литературы** составлен в соответствии с новыми требованиями 2014 года.

## **НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

Результаты, полученные Коростиной В.С., безусловно, являются новыми. В рамках работы впервые было проведено детальное иммуногистохимическое исследование распределения экспрессии Каизо в организме мышей, показана ядерная локализация во многих клеточных типах и единственная цитоплазматическая локализация белка Каизо в сетчатке глаз. Автором выявлена и подтверждена локализация Каизо в сперматогониальных стволовых клетках типа Апарные и Алинейные, что позволяет считать Каизо новым маркёром недифференцированных сперматогониальных клеток. Впервые были получены интересные результаты о повышенной двигательной и исследовательской активности, увеличенном престаимпульном торможении и пониженной обучаемости и пространственной памяти у мышей с нокаутом по гену *Каизо*. В данной работе была впервые использована модель декстран сульфат индуцированного острого колита у мышей. Доказано, что отсутствие Каизо изменяет динамику протекания острого воспаления, а именно приводит к задержке развития острого воспалительного ответа при воздействии химического провоспалительного агента.

## **СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И ОБОСНОВАННОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Основные эксперименты были проведены и проанализированы автором самостоятельно. В работе было использовано около 12 различных методик, иммуногистохимическое окрашивание органов, получение тотальных препаратов семенных каналцев, магнитно-резонансная томография, серия поведенческих тестов, оценка экспрессии цитокинов и т.д. Все исследования были проведены с привлечением современных гистологических и молекулярных методик, достоверность и обоснованность полученных автором результатов не вызывает сомнений, так как все эксперименты

проводились с использованием контролей. Приведённые в диссертации фотографии являются очень высокого качества и не вызывают сомнения в результатах.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Полученные данные иммуногистохимии будут служить в качестве стандарта для будущих исследований, что исключит недостоверные окрашивания и предотвратит неправильную интерпретацию полученных результатов. Уникальные данные о морфологических изменениях в мозге, а также подробное поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом гена *Kaizo* позволяют использовать данную линию мышей для изучения механизмов эпигенетической регуляции различных функций нервной системы. Результаты о значимости белка Каизо при остром воспалении существенно расширяют исследования, направленные на изучение связи воспаления с развитием рака на других мышинных моделях.

Представленные результаты данной работы могут быть использованы в образовательных курсах по физиологии и гистологии, представлять интерес для Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», а также в научно-исследовательской работе других лабораторий, занимающихся разработкой экспериментальных моделей, методов цитологической диагностики и морфометрии.

## ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Принципиальных замечаний по диссертационной работе В.С. Коростиной нет. Есть ряд вопросов, уточнений и соображений дискуссионного характера.

1. В обзоре литературы не упоминается о том, что существует атлас «proteinatlas», в котором описывается экспрессия Каизо в различных тканях и органах человека. Авторы так же не сопоставляют данные этой базы данных со своими результатами.

2. В материалах и методах не освещено, какие именно эпитопы узнают антитела на Каизо.
3. При описании установок для изучения поведенческих тестов рисунки со схемами приборов облегчили бы понимание текста.
4. В результатах говорится о том, что при отсутствии белка Каизо у мышей происходят различные изменения в поведении и наблюдается уменьшение боковых желудочков мозга, однако остался неосвещённым вопрос о том, какие гены в мозге при отсутствии Каизо изменяют свою активность. Проводился ли экспрессионный анализ на чипах или анализ при помощи РНК секвенирования различных структур головного мозга мыши, в которых наблюдается локализация Каизо?
5. При описании локализации Каизо в различных органах и тканях мыши автор практически не упоминает ткани, в которых этот белок не экспрессируется. Так, например, в селезенке Каизо был найден и в красной, и в белой пульпе. Возникает вопрос - во всех ли клетках селезенки есть этот белок, или где-то, например, в клетках стромы, его нет?
6. В результатах работы описывается локализация Каизо в стволовых сперматогониальных клетках репродуктивной системы у взрослых мышей. Изучалась ли экспрессия Каизо в эмбриональный и постэмбриональный период развития мыши?
7. Было бы очень интересно при модели экспериментального колита у мышей сделать оценку клеточного состава инфильтратов в месте воспаления методами проточной цитометрии.

**Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати.**

Основные результаты диссертации опубликованы в научной печати (13 научных работ, в том числе 5 статей), что подтверждается списком публикаций, приведённом в автореферате и диссертации. Необходимо отметить тот факт, что по теме работы опубликованы 2 статьи в англоязычных журналах, что делает результаты доступными для всего мирового сообщества.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Коростиной Валерии Сергеевны «Изучение локализации и функциональной значимости белка Каизо в организме взрослых мышей» обладает

теоретической и практической значимостью. Результаты данной работы вносят значительный вклад в исследование локализации белка Каизо в организме мышей, понимание морфологических, физиологических и поведенческих особенностей мышей с нокаутом гена *Kaizo*, динамики развития воспалительных процессов у данной линии.

Диссертационная работа Коростиной В.С. производит хорошее впечатление, она выполнена на высоком профессиональном уровне, написана чётким и грамотным языком и хорошо проиллюстрирована. Замечания, которые возникли в ходе рецензирования работы, носят чисто редакционный характер и не снижают высокой значимости полученных результатов. Автореферат диссертации адекватно излагает краткое содержание работы, полностью соответствует тексту диссертации и содержит все наиболее интересные результаты. Все выводы аргументированы и сделаны на основании собственных данных.

Таким образом, следует высоко оценить диссертационную работу В.С. Коростиной. Она является вполне законченным оригинальным исследованием, по актуальности, новизне, теоретической значимости и научно-практической пользе отвечающим требованиям ВАК и Постановлениям Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям. Коростина Валерия Сергеевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология.

Лагарькова Мария Андреевна

д.б.н., профессор РАН

зав. лабораторией клеточной биологии

Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России),

г. Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а

тел. +7 (499) 246-4409

Email: [info@niifhm.ru](mailto:info@niifhm.ru)

«25» сентября 2016 г.

подпись проф. РАН  
Завещаю: Учковой комиссии



Васильева Л.Л.