

На правах рукописи

ЗАВАЛЬНАЯ  
ЕВГЕНИЯ ГЕНРИХОВНА

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *PIWI* В ПРОЦЕССЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ  
КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ  
ГОЛОТУРИИ *EUPENTASTA FRAUDATRIX***

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник **Елисейкина Марина Геннадьевна**

**Официальные оппоненты:**

**Аминин Дмитрий Львович**, доктор биологических наук, чл.-корр. РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, зав. лабораторией биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ

**Андреева Александра Юрьевна**, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН», руководитель лаборатории экологической иммунологии гидробионтов, ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита диссертации состоится 9 июня 2023 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета 24.1.191.01 (Д 005.008.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423)2310-900, e-mail: nscmb@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/soviet-d-005-008-01/62-zavalnaya-evgeniya-genrikhovna>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

*Ващенко*

М.А. Ващенко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Известно, что многие представители иглокожих способны к регенерации внутренних органов после травм или в процессе бесполого размножения (Dolmatov, 1999; Candia-Carnevali, 2006). Иглокожие принадлежат к вторичноротым и рассматриваются как сестринская по отношению к хордовым группа беспозвоночных (Blair, Hedges, 2005; Swalla, Smith, 2008). Близость к хордовым и выраженные регенеративные способности позволяют использовать иглокожих в качестве ценных модельных организмов для решения задач эволюционной и регенеративной биологии (Human, 1955; Gahn, Baumiller, 2010).

Голотурии, или морские огурцы, обладают уникальным защитным механизмом – эвисцерацией, одной из форм аутомии, когда в ответ на стресс они выбрасывают часть своих внутренних органов (García-Arrarás et al., 1998; Dolmatov, Ginanova, 2009). Утраченные органы могут впоследствии достаточно быстро восстанавливаться (Марушкина, Грачева, 1978; Долматов, 2007). В процессе эвисцерации у голотурий вместе с комплексом внутренних органов удаляется значительный объем целомической жидкости (ЦЖ) с содержащимися в ней клетками – целомоцитами (Li et al., 2018; Ding et al., 2021). Целомоциты являются главным компонентом иммунной системы иглокожих, отвечают за клеточные реакции иммунитета и осуществляют синтез гуморальных факторов иммунной защиты (Eliseikina et al., 2004; Golconda et al., 2019). В процессе регенерации голотуриям необходимо регенерировать свои целомоциты, тем самым восстанавливая иммунную функцию (Li et al., 2018). Однако вопрос о клеточных источниках восстановления целомоцитов окончательно не решен. Предполагается, что в ЦЖ присутствует популяция циркулирующих стволовых клеток, способных давать начало всем типам целомоцитов (Eliseikina, Magarlamov, 2002; Candia-Carnevali et al., 2009; Sharlaimova et al., 2021). Однако, основываясь лишь на морфологических данных, такие предположения нельзя считать достоверными. Необходимы надежные молекулярные маркеры, способные решить вопрос присутствия или отсутствия стволовых клеток в ЦЖ и обозначить их вовлеченность в восстановительные процессы. На сегодняшний день в качестве маркеров стволовых клеток используется группа генов «стволовости», один из которых – ген *piwi* (Fierro-Constaín et al., 2017).

Ген *piwi* экспрессирует регуляторный белок, встречающийся у животных и простейших, способных к половому размножению (Beuret, Lin, 2011). Основной функцией белка Piwi считается защита генома первичных половых клеток от деятельности мобильных генетических элементов (Mani, Juliano, 2013). Белок Piwi, направляемый некодирующими Piwi-взаимодействующими РНК (пиРНК), обладает способностью подавлять деятельность

транспозонов (Sumiyoshi et al., 2016). Сохранение стабильности генома особенно важно для стволовых клеток зародышевой линии, поскольку нарушения, вызванные в них транспозонами, могут быть переданы следующему поколению (van Wolfswinkel, 2014; Lim, Kai, 2015).

Хотя *Piwi* наиболее специфичен для клеток зародышевой линии, появляется все больше свидетельств его обнаружения в соматических тканях в основном у беспозвоночных, таких как кишечнополостные, губки, оболочники (Funayama et al., 2010; Rinkevich et al., 2010; Lim et al., 2014; Fierro-Constaín et al., 2017; Prahera et al., 2017). У многих исследованных организмов ген экспрессируется как в стволовых клетках зародышевой линии, так и в соматических мультипотентных, чаще плюрипотентных, стволовых клетках, вовлеченных в регенерацию (De Mulder et al., 2009; Plickert et al., 2012; Fierro-Constaín et al., 2017).

Объектом нашего исследования послужила голотурия *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov & Baranova, 1958) (Holothuroidea, Dendrochirota), обладающая выраженным регенераторным потенциалом и способная к эвисцерации внутренних органов и целомочитов с последующим их восстановлением. Использование маркера *piwi* поможет решить вопрос о наличии и локализации стволовых клеток, дающих начало клеткам ЦЖ в процессе регенерации после эвисцерации.

**Степень разработанности темы.** С открытием соматической экспрессии *piwi*, его функции активно исследуются. Появляются новые сведения о его роли в эмбриогенезе (Mani et al., 2014; Yajima et al., 2014) и в развитии различных патологий (Tan et al., 2015). Исследуются механизмы совместной работы *Piwi* и малых пиРНК, способы эпигенетической и трансляционной регуляции экспрессии генов, используемые ими для замалчивания транспозонов, спецификации зародышевой линии, поддержания стволовых клеток в недифференцированном состоянии, также для осуществления ряда дополнительных функций, таких как регуляция клеточного цикла и участие в мейозе (Sienski et al., 2012; Mani et al., 2014; Ito et al., 2015; Jiang et al., 2016; Ponnusamy et al., 2017; Yashiro et al., 2018; Zeng et al., 2020). Благодаря привлечению к исследованиям функций *piwi* все больше неклассических объектов молекулярной биологии, таких как губки, оболочники, более очевидной ставится связь гена с регенерацией (Funayama et al., 2010; Rinkevich et al., 2010; Juliano et al., 2014).

Появляются новые данные по исследованию *piwi* у иглокожих (Song, Wessel, 2007; Yajima et al., 2014; Sun et al., 2021). Морские ежи, традиционно используемые в качестве модельных объектов биологии развития, не обладают ярко выраженными регенеративными способностями, однако исследования дифференциальной экспрессии генов, связанных с регенерацией шипов или педицеллярий, показали присутствие экспрессирующих *piwi*

мультипотентных стволовых клеток в некоторых соматических тканях (Reinardy et al., 2015; Bodnar, Coffman, 2016). У *Holothuria glaberrima* транскрипты *piwi* были обнаружены в клетках паренхимы, вероятно, принимающих участие в регенерации нервной системы (Mashanov et al., 2015). Однако, данные о соматической экспрессии *piwi* у других иглокожих в настоящее время отсутствуют.

**Цель и задачи исследования.** Цель представленной работы – изучение механизма восстановления клеточного состава ЦЖ голотурии *E. fraudatrix* после эвисцерации с использованием гена *piwi* и продукта его активности – белка Piwi, в качестве молекулярных маркеров стволовых клеток.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Основываясь на данных транскриптомного анализа, установить наличие, доменную структуру белка Piwi у голотурии *E. fraudatrix* и его гомологию с белками Piwi у представителей разных систематических групп животных.
2. Детектировать наличие белка Piwi в гонадах голотурии *E. fraudatrix*.
3. Идентифицировать клетки, экспрессирующие белок Piwi, в составе ЦЖ голотурии *E. fraudatrix* и исследовать их динамику в ходе восстановления целомоцитов после эвисцерации.
4. Осуществить поиск места локализации Piwi-содержащих клеток в тканях стенки тела голотурии.
5. Исследовать динамику экспрессии *piwi* в клетках ЦЖ и стенке тела *E. fraudatrix* в процессах восстановления после эвисцерации.

**Научная новизна.** На основании данных о динамике клеточных популяций целомоцитов в ходе репаративной регенерации показано, что источником основных линий дифференцировки иммунокомпетентных клеток ЦЖ являются низкодифференцированные ювенильные клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением.

Впервые в тканях голотурии *E. fraudatrix* обнаружен ген *piwi* и продукт его активности – белок Piwi. Установлено, что экспрессия *piwi* характерна как для половых, так и для соматических клеток голотурии. Показано, что активность гена в половых клетках ограничивается лишь мужской линией.

Впервые в рамках данной диссертационной работы в составе клеток ЦЖ обнаружена субпопуляция Piwi-позитивных клеток, имеющих морфологические признаки ювенильных целомоцитов, и на основании данных о динамике численности клеток в ходе регенерации показано их участие в процессе восстановления клеточного состава ЦЖ. Использование белка Piwi в качестве маркера мульти-/плюрипотентности позволило также идентифицировать в составе стенки тела голотурии *E. fraudatrix* пул Piwi-позитивных

клеток. Установлено, что эвисцерация стимулирует их выселение в целомическую полость, что свидетельствует об их участии в восстановлении клеточного состава ЦЖ. Впервые исследована динамика экспрессии гена *piwi* в клетках ЦЖ и в тканях стенки тела после эвисцерации, полученные данные подтверждают наличие внешней по отношению к целомоцитам субпопуляции клеток-предшественников, реализующихся в условиях вызванного эвисцерацией стресса.

**Теоретическое и практическое значение работы.** У голотурии *E. fraudatrix*, обладающей способностью к эвисцерации и последующему восстановлению комплекса внутренних органов, обнаружен регуляторный белок Piwi. Анализ аминокислотных последовательностей подтвердил структурную и функциональную консервативность белка. Показано, что экспрессия гена *piwi* характерна как для клеток полового пути, так и для соматических клеток, что свидетельствует об универсальной роли продукта его активности – белка Piwi, в поддержании мульти-/плюрипотентности клеток. Использование гена *piwi* в качестве специфического молекулярного маркера стволовых клеток при исследовании восстановления клеток ЦЖ голотурии *E. fraudatrix* позволило получить убедительные доказательства гистогенетических взаимоотношений целомоцитов и клеток, локализованных в соединительной ткани стенки тела. Полученные данные способствуют пониманию механизмов, лежащих в основе процесса регенерации целомоцитов иглокожих.

Исследование механизмов, реализуемых в ходе репаративной регенерации, на примере представителя иглокожих актуально как для понимания способов регуляции клеточной дифференцировки, так и для развития представлений об эволюции механизмов регенерации в ряду вторичноротых животных. Полученные в результате исследования данные могут быть использованы для решения задач регенераторной медицины.

Теоретические положения и результаты проведенных исследований использованы при составлении отчетов по теме ННЦМБ ДВО РАН «Регенерация, бесполое размножение и иммунитет у двустворчатых моллюсков и иглокожих» (0268-2019-0001, № гос. регистрации 221022400135-6).

**Методология и методы диссертационного исследования.** Для исследования механизмов восстановления клеточного состава ЦЖ после эвисцерации голотурии *E. fraudatrix* в данной работе применялись биохимические, цитологические и молекулярные методы анализа. Метод проточной цитометрии был использован для анализа динамики субпопуляций целомоцитов на ранних сроках регенерации. В качестве маркера стволовых клеток в тканях голотурии был выбран ген *piwi*. Для поиска продуктов его экспрессии в тканях *E. fraudatrix* использовали метод вестерн-блоттинга с применением антител к белку Piwi, а также метод МАЛДИ масс-спектрометрии для его идентификации. Исследование

местоположения клеток, содержащих белок *Piwi*, прослеживание их динамики по ходу восстановления клеточного состава ЦЖ, а также установление внутриклеточной локализации белка осуществляли с помощью методов иммуоцитохимии и электронной иммуоцитохимии. Для количественной оценки экспрессии гена использовали два метода ПЦР: ПЦР в реальном времени и цифровую капельную ПЦР.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. У представителя иглокожих голотурии *E. fraudatrix* экспрессия гена *piwi* характерна для гонад и некоторых соматических тканей, в частности, для клеток ЦЖ и стенки тела.

2. В составе ЦЖ выявляется субпопуляция *Piwi*-позитивных клеток, характеризующихся высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и обладающих признаками ювенильных.

3. Источником восстановления клеточного состава ЦЖ в условиях стресса, вызванного эвисцерацией, является внешняя популяция клеток-предшественниц, заселяющих рыхлые и плотные слои стенки тела и выселяющихся в ЦЖ сразу после эвисцерации.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов основывается на использовании современных методов исследования, репрезентативности выборки и корректном анализе полученных данных с помощью методов статистического анализа.

Эксперименты проводили в соответствии с разработанными для каждого метода протоколами и рекомендациями. Осуществляли постановку предварительных экспериментов с подбором оптимальных условий. Воспроизводимость и специфичность каждого используемого в работе метода подтверждали использованием отрицательных контролей и многократных повторов.

Данные проведенных экспериментов задокументированы и представлены в настоящей работе в виде графиков и рисунков. Большая часть полученных в ходе выполнения диссертационной работы результатов опубликована в рецензируемых научных изданиях.

**Личный вклад автора.** В рамках исследования были освоены различные биохимические, цитологические и молекулярные методы. Автором подготовлены и реализованы все этапы экспериментальных работ, а также произведен анализ и статистическая обработка полученных данных, подготовка графиков и иллюстраций. Автор принимал участие в представлении полученных результатов исследования на конференциях и написании научных публикаций.

**Апробация работы и публикации.** Полученные результаты были представлены на XVI Международной конференции по иглокожим (Нагоя, Япония, 2018); на X Европейской конференции по иглокожим (Москва, Россия, 2019); и Ежегодной научной конференции

Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, Россия, 2018-2019). По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых Scopus/Web of Science и входящих в список изданий, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 111 страницах, содержит 2 таблицы и 20 рисунков. Материалы работы представлены в виде введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», а также выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 297 наименований, из них 290 на английском языке.

**Благодарности.** Выражаю глубокую признательность своему научному руководителю к.б.н. Марине Геннадьевне Елисейкиной за опытное руководство, помощь в проведении исследования, консультирование по любым возникающим вопросам и всестороннюю поддержку на протяжении всех лет работы в лаборатории. Особую благодарность выражаю к.б.н. Шамшуриной Екатерине Валерьевне за помощь в освоении новых методик и обсуждения результатов. Хочу поблагодарить д.б.н. Ламаш Нину Евгеньевну за обучение биохимическим методам, к.б.н. Бороду Андрея Дмитриевича за помощь в работе на проточном цитометре и клеточном сортере, Вернера Андрея Эдуардовича за консультирование по нюансам работы метода капельной цифровой ПЦР, к.б.н. Шабельникова Сергея Владимировича за помощь в анализе белка Piwi методом МАЛДИ масс-спектрометрии, Черепкову Элеонору Валерьевну и Бойко Алексея Вячеславовича за их ценные комментарии к биоинформатической части работы, к.б.н. Пущина Игоря Игоревича за консультирование по вопросам статистической обработки данных. Глубокую признательность выражаю к.б.н., доценту кафедры клеточной биологии и генетики ДВФУ Токмаковой Наталье Павловне за ознакомление с текстом рукописи, рекомендации и справедливые замечания, а также всему коллективу кафедры за многолетнюю поддержку. Выражаю искреннюю благодарность заведующему лаборатории сравнительной цитологии ННЦМБ ДВО РАН д.б.н., чл.-корр. РАН Долматову Игорю Юрьевичу и всему коллективу лаборатории за постоянную и всеобъемлющую помощь в работе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 17-04-01334.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Филогенетический анализ.** На основе анализа транскриптома *E. fraudatrix* (TSA NCBI, GHCL00000000) (Boyko et al., 2020) были выведены две аминокислотные последовательности, соответствующие генам семейства *piwi*. Белковые домены анализировали с помощью сайта Simple Modular Architecture Research Tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) и базы данных консервативных доменов NCBI. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей Piwi проводили с помощью программы ClustalW. Филогенетическое дерево было построено в программе MEGA (версия 5.05) с использованием метода максимального правдоподобия и модели WAG. Каждая ветвь дерева была подтверждена бутстрэп-методом на основе 500 повторений.

**ПААГ электрофорез.** Поликлональные кроличьи антитела против Piwi *E. fraudatrix* были получены путем иммунизации пептидом, который включал высоко консервативный участок, расположенный в PIWI домене (VATKVAMQLNCKLGG) (Almabion, Россия).

Для разделения белков проводили электрофорез в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (Laemmli, 1970) при постоянном напряжении: 100 В до и 150 В после входа образцов в разделяющий гель (камера для вертикального электрофореза VE-2М, Helicon, Россия).

Вестерн-блоттинг проводили по стандартной методике (Towbin et al., 1979). Разделенные электрофорезом белки переносили на активированную метанолом ПВДФ мембрану (0,45 мкм, Bio-Rad, США) в модифицированном Лэммли электродном буфере (0,025 М Трис, 0,19 М глицин (pH 8,2-8,3), 0,01% ДСН, 20% метанол) с помощью мокрого переноса (150 мА в течение 1,5 ч в камере для блоттинга Criterion Blotter, Bio-Rad, США). Мембрану инкубировали в блокирующем буфере (TBST, содержащий 5% обезжиренное молоко (AppliChem GmbH, Германия)) в течение 1 ч. Окрашивали антителами, разведенными на TBST, содержащем 0,5% обезжиренного молока, в следующих соотношениях: первичные поликлональные антитела против Piwi – 1:5000 в течение ночи; козы антимышиные IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена (Vector Laboratories, США) – 1:10000 в течение 1 ч. Мембрану промывали TBST и проводили детектирование с помощью набора Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, США) в камере ChemiDoc XRS+ Gel Imaging System (Bio-Rad, США). Белки из фрагментов ПААГ, соответствующие молекулярной массе 100 кДа, подвергали трипсинолизу и идентифицировали с помощью тандемной времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии на приборе SCIEX 5800 TOF/TOF System (AB Sciex Pte.Ltd., Сингапур).

**Проточная цитометрия.** Анализ динамики субпопуляций целомоцитов проводили с использованием проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). У 5 подопытных животных перед эвисцерацией и через 1, 4, 24 ч после начала эксперимента отбирали по 300 мкл ЦЖ. Образцы фиксировали 1 ч с добавлением в ЦЖ 25% глутарового альдегида, так, чтобы конечная концентрация фиксатора в образце составляла 2,5%. Целомоциты окрашивали с помощью ДАПИ (GERBU Biotechnik GmbH, Германия) с конечной концентрацией 1 мкг/мл. В каждом образце оценивали, по крайней мере, 30000 событий. Исключение из анализа клеточных агрегатов производили путем треугольного гейтирования на двухпараметрических диаграммах FSC-A против FSC-H. ДАПИ-позитивные клетки детектировали с использованием 450/45 BP канала. Приблизительный размер клеток в образцах определяли с использованием калибровочных частиц для проточной цитофотометрии на FSC-A графике (Molecular Probes, США). Статистический анализ проводили с использованием программы STATISTICA 12 (StatSoft, США). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Статистическая значимость результатов оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) с последующим LSD тестом. При этом значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимыми.

Разделение фиксированных целомоцитов на субпопуляции проводили на клеточном сортере FACSMelody™ (Becton, Dickinson and Co., США), подключенном к компьютеру с установленным программным обеспечением BD FACSCorus™ (Becton, Dickinson and Co., США). Целомоциты разделяли на три субпопуляции на двумерном графике FSC-A против SSC-A в зависимости от относительного размера и грануляции клеток. Для каждой субпопуляции было получено не менее  $10^6$  клеток.

**Иммуоцитохимия.** В эксперимент были взяты по 3 особи на каждую экспериментальную точку: интактные особи (контроль), 4 ч, 24 ч и 7 сут после эвисцерации. Для приготовления мазков целомоцитов по 200 мкл ЦЖ отбирали у каждого из подопытных животных, фиксировали 4% параформальдегидом (ПАР), приготовленном на ФСБ, pH 7,4 (AMRESCO, США). Образцы тканей стенки тела фиксировали 4% ПАР в ФСБ, pH 7,4, (AMRESCO, США). Для получения замороженных срезов кусочки ткани помещали в 15% раствор сахарозы в ФСБ и заливали в среду NEG-50™ (Thermo SF, США). Срезы изготавливали на криомикротоме HM 560 CryoStar (Thermo SF, США).

Окрашивание мазков целомоцитов и срезов замороженного материала проводили по аналогичной методике. Чтобы предотвратить неспецифическое связывание первичных антител, образцы обрабатывали блокирующим буфером (3% рыбный желатин (Teleostean galatin, Sigma-Aldrich, США), 0,3 М глицин, 0,5% Тритон X-100 на ФСБ). Инкубировали с

первичными иммунными анти-Piwi антителами, разведенными 1% БСА на ФСБ в соотношении 1:300; вторичными антикроличьими антителами, мечеными Alexa 546 (Molecular Probs, США), разведенными в соотношении 1:750. Материал анализировали с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия). Подсчитывали количество меченных антителами клеток в ЦЖ на 1000 клеток. Полученные данные выражали в процентах. Индивидуальные различия выражали с учетом среднего квадратичного отклонения.

Для электронной иммуноцитохимии были взяты 5 особей *E. fraudatrix* через 24 ч после эвисцерации. Образцы целомоцитов фиксировали 4% ПАР на ФСБ, заключали в 1% легкоплавкую агарозу LE (GERBU, Германия), приготовленную на ФСБ, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в среду LR White (Sigma-Aldrich, США). Ультратонкие срезы изготавливали с использованием ультрамикротомы UC7 (Lieca, Германия). Срезы обрабатывали блокирующим буфером (3% рыбный желатин (Teleostean galatin, Sigma-Aldrich, США), 0,3 М глицин, 0,5% Тритон X-100 на ФСБ). Инкубировали с первичными иммунными анти-Piwi антителами, разведенными на 3% БСА на ФСБ в соотношении 1:30; со вторичными антикроличьими антителами, мечеными коллоидным золотом с размером частиц 11 нм (Sigma-Aldrich, США), разведенными в соотношении 1:50. Материал анализировали с использованием трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

**ПЦР в реальном времени и капельная цифровая ПЦР.** Тотальную РНК выделяли из образцов тканей *E. fraudatrix* с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Для выделения тотальной РНК образцы ЦЖ с содержащимися в ней клетками отбирали от одних и тех же 3 особей в «норме», через 1 ч, 24 ч и 7 сут после эвисцерации. Образцы тканей стенки тела брали тотально у интактных особей, а также через 1 ч, 24 ч и 7 сут после эвисцерации. На каждый срок было взято по 10 животных. Выделенную РНК подвергали реакции обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) с Oligo(dT) (Thermo FS, США) и случайным декануклеотидным праймерами (Евроген, Россия).

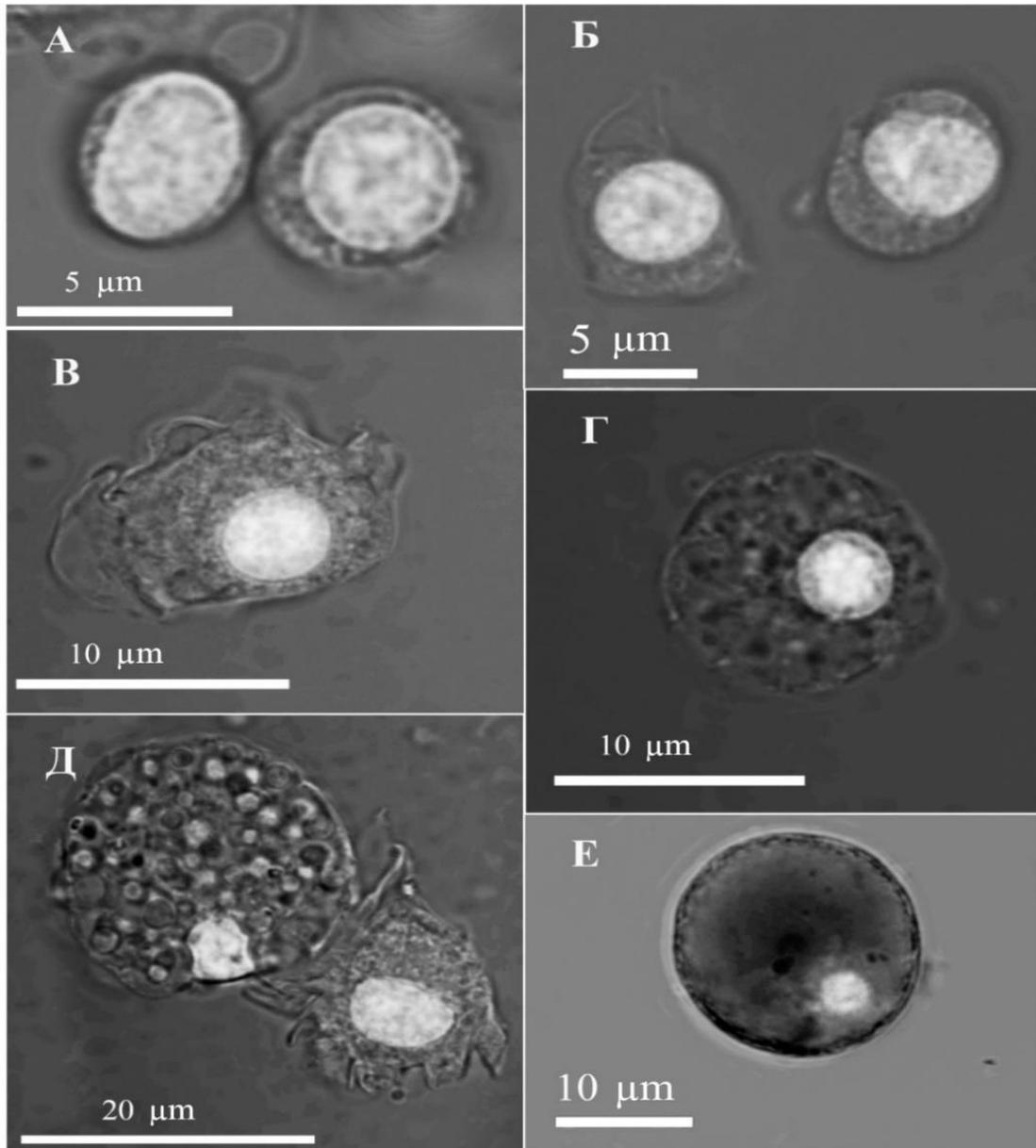
ПЦР в реальном времени проводили с использованием смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Конечная концентрация кДНК составила 50 нг в 20 мл реакционной смеси. Каждый образец анализировали в трех технических повторах. Отрицательный контроль с использованием свободной от нуклеаз воды вместо матрицы кДНК воспроизводили также в трех повторах для каждого гена. Для анализа данных ПЦР использовали программное обеспечение CFX Maestro Software (версия 3.1, Bio-Rad, США). Определение относительного

уровня экспрессии целевых генов осуществляли с применением  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -метода (Livak, Schmittgen, 2001) с нормализацией по референсным генам *ef1a* и *tubulin*.

Капельную цифровую ПЦР проводили с использованием системы ddPCR QX200 (Bio-Rad, США). Конечная концентрация кДНК составила 100 нг в 20 мкл реакционной смеси. Смесь помещали в пластиковый картридж генератора капель (DG8 Gaskets for QX100/QX200 Droplet Generator, Bio-Rad, США) и смешивали с 70 мкл минерального масла (Droplet Generator Oil for EvaGreen, Bio-Rad, США) для образования капель (QX200 Droplet Generator, Bio-Rad, США). Полученную эмульсию амплифицировали в термоциклере C1000 Touch (Bio-Rad, США). Анализ данных ПЦР производился с помощью устройства для считывания капель (QX200 droplet reader, Bio-Rad, США) и программного обеспечения QuantaSoft v1.7.4 (Bio-Rad, США). Абсолютная количественная оценка каждого транскрипта была представлена в виде числа копий транскрипта на мкл амплифицированной смеси для ПЦР. Каждый образец был представлен в трех повторах, все прогоны ПЦР содержали лунки с отрицательным контролем в трех экземплярах на каждый ген. В качестве внутренних контролей использовали гены *ef1a* и *tubulin*. Статистическая значимость результатов оценивалась с помощью непараметрического дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis ANOVA), при этом значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым. Два метода ПЦР сравнивались с помощью корреляционного теста Пирсона. Для проведения статистического анализа использовался пакет программ STATISTICA 12 (StatSoft, США), Microsoft Excel (Microsoft, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

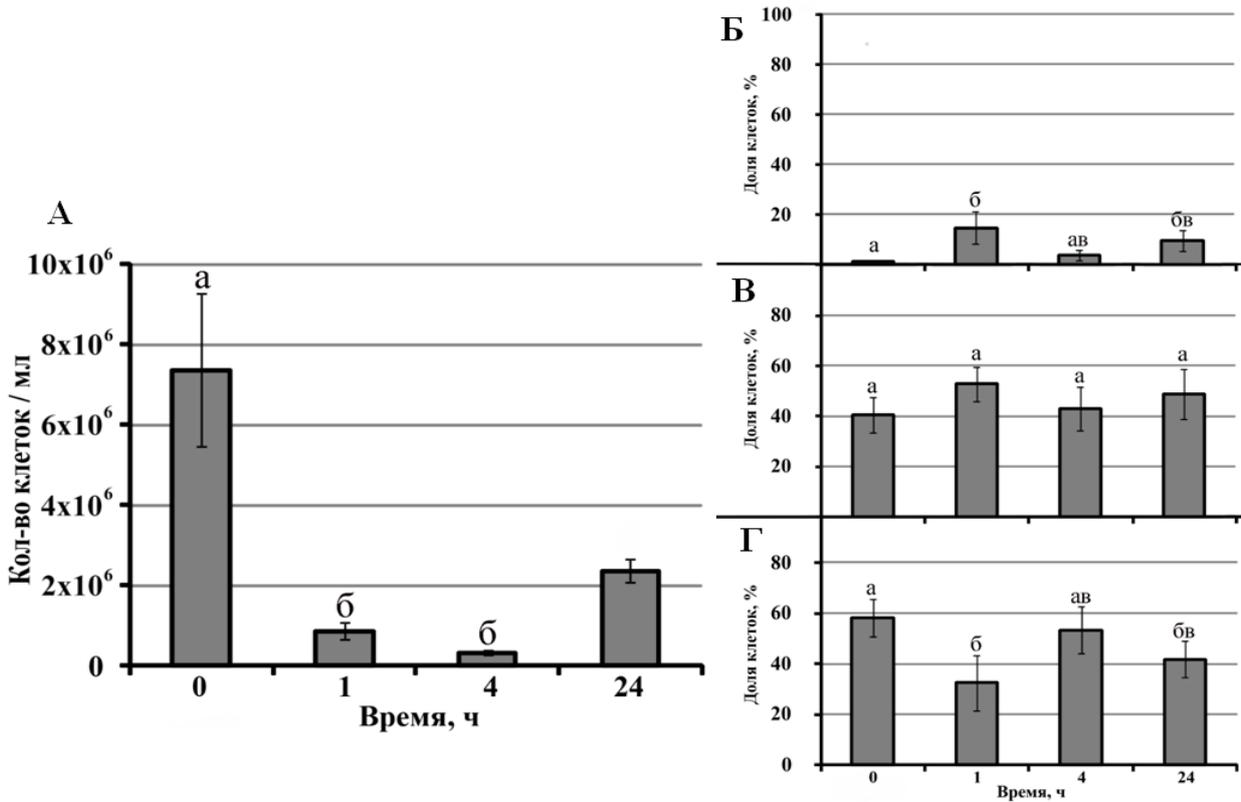
**Клеточный состав ЦЖ голотурии *E. fraudatrix*.** На основании данных о линейных размерах и структуре цитоплазмы целомоцитов голотурии *E. fraudatrix* в их составе выделены три основные группы, различающиеся по степени дифференцированности: ювенильные низкодифференцированные клетки, среднедифференцированные и дифференцированные целомоциты (рис. 1). Клетки диаметром 3-5 мкм с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и неразвитой цитоплазмой – низкодифференцированные ювенильные клетки. Клетки диаметром 6-10 мкм с увеличенным объемом цитоплазмы нами обозначены как среднедифференцированные. Основная масса целомоцитов – дифференцированные клетки диаметром 11-20 мкм: либо округлые, с развитой цитоплазмой, заполненной секреторными гранулами (морулоподобные целомоциты), либо полиморфные, способные образовывать псевдоподии разной формы (петаллоидные и филоподиальные амебоциты).



**Рисунок 1** – Морфология целомоцитов основных размерных групп (Завальная и др., 2020). А – ювенильные клетки, диаметром 3-5 мкм; Б – среднедифференцированные клетки диаметром 6-10 мкм; В, Г, Д – дифференцированные клетки диаметром от 11 до 20 мкм: амебоциты (В, Д) и морулоподобные клетки (Г, Д); Е – гемоциты.

**Динамика численности целомоцитов в ЦЖ после эвисцерации.** Количество целомоцитов в ЦЖ у интактных животных колеблется от  $6 \cdot 10^6$  до  $9 \cdot 10^6$  у разных особей. Исследование клеточного состава ЦЖ в ходе первых 24 ч регенерации *E. fraudatrix* показало, что восстановление количества целомоцитов является одной из первых реакций в ответ на стимулированную эвисцерацию. Сразу после эвисцерации голотурия теряет значительный объем ЦЖ, количество содержащихся в ней клеток резко снижается, до  $8,7 \cdot 10^5 \pm 2,2 \cdot 10^5$  через 1 ч; данный показатель достигает минимальных значений через 4 ч ( $3,2 \cdot 10^5 \pm 5,7 \cdot 10^4$ ), а затем

медленно восстанавливается, не приближаясь за сутки эксперимента к первоначальным значениям ( $2,5 \cdot 10^6 \pm 2,9 \cdot 10^5$  при  $p < 0,05$ ) (рис. 2А).

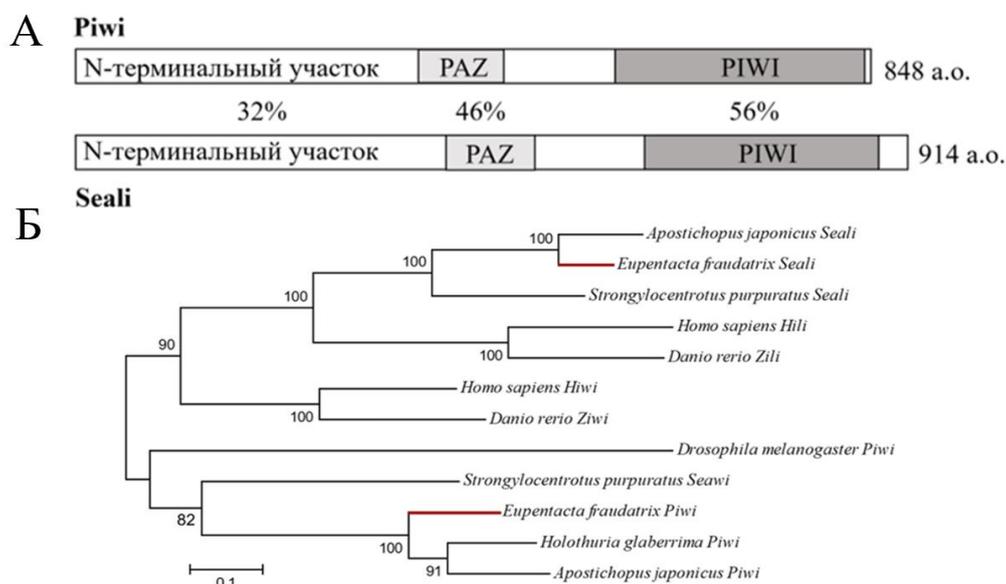


**Рисунок 2** – Изменение содержания клеток в ЦЖ *E. fraudatrix* после эвисцерации. А – общее содержание целоцитов, Б – ювенильные клетки, В – среднедифференцированные клетки, Г – дифференцированные клетки. По оси ОХ – время после эвисцерации (0 – интактные животные, 1, 4, 24 ч), по оси ОУ – количество клеток в мл ЦЖ (А) или доля клеток каждой группы, выраженная в процентах от общего количества целоцитов (Б-Г). Одинаковые буквенные индексы, расположенные над столбцами, показывают отсутствие статистически значимых различий между значениями, при  $p < 0,05$  и  $n=5$ .

В ходе регенерации изменяется не только суммарное количество целоцитов в ЦЖ, но и соотношение в ней клеток разных морфотипов (рис. 2 Б-Г). Показано, что у интактных животных основную массу целоцитов составляют дифференцированные клетки ( $58,2 \pm 7,4\%$ ); вторыми по представленности являются среднедифференцированные клетки ( $40,7 \pm 7,04\%$ ); а минорную клеточную субпопуляцию составляют низкодифференцированные клетки ( $1,09 \pm 0,37\%$ ). Анализ изменений соотношения дифференцированных и ювенильных форм целоцитов показал, что снижение доли дифференцированных целоцитов через 1 ч после эвисцерации ( $32,5 \pm 4,3\%$ ) и в меньшей степени через 24 ч ( $41,8 \pm 7,1\%$ ) сопровождается увеличением содержания ювенильных клеток (до  $14,6 \pm 6\%$ ). Напротив, снижение доли ювенильных клеток в ЦЖ через 4 ч после эвисцерации ( $3,7 \pm 2,1\%$ ) сопровождается ростом

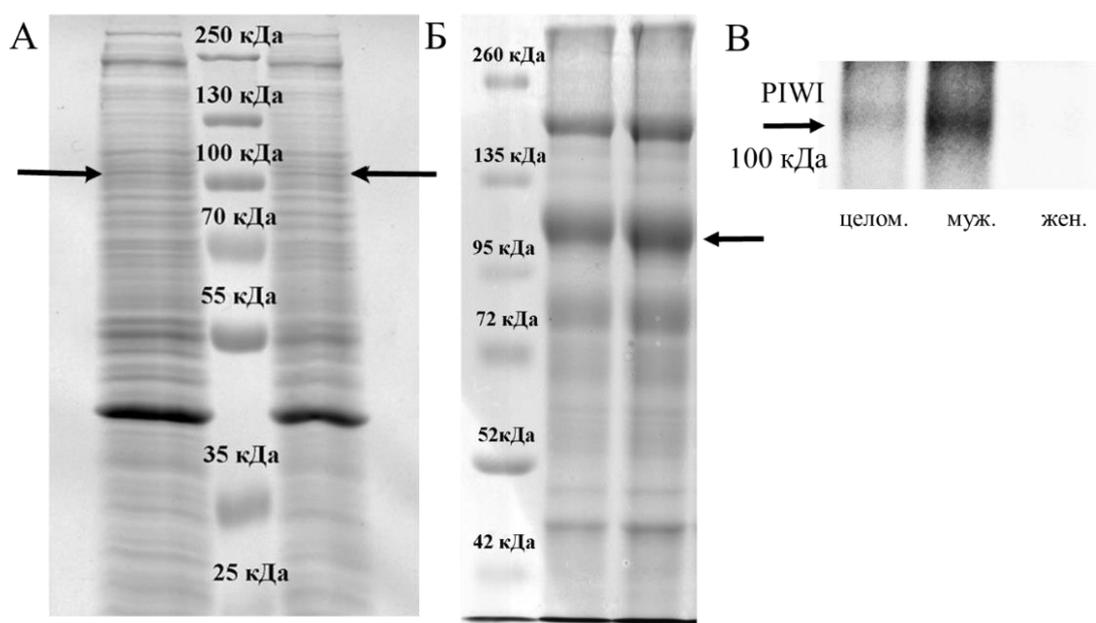
содержания в ней дифференцированных форм ( $53,3 \pm 7,5\%$ ). Отмеченная разнонаправленная динамика разных морфотипов целооцитов свидетельствует в пользу идущих в ЦЖ процессов дифференцировки ювенильных клеток в функционально активные морулоподобные клетки и амебоциты, что подтверждает и присутствие в ней переходных, среднедифференцированных форм. Это соответствует данным литературы, согласно которым предшественниками дифференцированных форм целооцитов иглокожих, вероятно, являются ювенильные клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (Chia, Xing, 1996; Weissman et al., 2001; Gilbert, 2010).

**Характеристика белка Piwi *E. fraudatrix*.** В ходе анализа транскриптома *E. fraudatrix* были обнаружены две последовательности мРНК *piwi*, в дальнейшем именуемые *piwi* и *seali*, гомологичные соответственно *piwi* *Holothuria glaberrima* (Mashanov et al., 2015) и *seali* *Apostichopus japonicus* (Zhang et al., 2017). Анализ доменной структуры выведенных аминокислотных последовательностей показал наличие консервативных доменов PAZ и PIWI, содержащих сайты связывания молекулы РНК и активный сайт с каталитическим центром, расщепляющим фосфатный остов целевой РНК аналогично тому, как это делает фермент РНКазы H (Parker et al., 2009). Филогенетический анализ Piwi *E. fraudatrix* показал их наибольшее родство с гомологичными белками иглокожих (рис. 3).



**Рисунок 3** – Характеристика белков Piwi и Seali *E. fraudatrix*. А – Схема доменной организации: показан процент идентичности между доменами двух последовательностей; а.о. – количество аминокислотных остатков. Б – Филограмма белков подсемейства Piwi. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислот. Числами показана в процентах достоверность ветвления 500 альтернативных деревьев, подтвержденная бутстрэп-методом. Красным цветом обозначено положение последовательностей *E. fraudatrix*.

**Идентификация белка Piwi в тканях *E. fraudatrix*.** Методом вестерн-блоттинга с использованием антител против белка Piwi была выявлена специфически окрашенная полоса молекулярной массой около 100 кДа в тканях мужских, но не женских гонад, а также в целомотцах *E. fraudatrix* (рис. 4). Методом МАЛДИ масс-спектрометрии данные полосы были идентифицированы как белок Piwi. Соматическая экспрессия *piwi* может указывать на наличие мульти-/плюрипотентных стволовых клеток в ЦЖ *E. fraudatrix*.

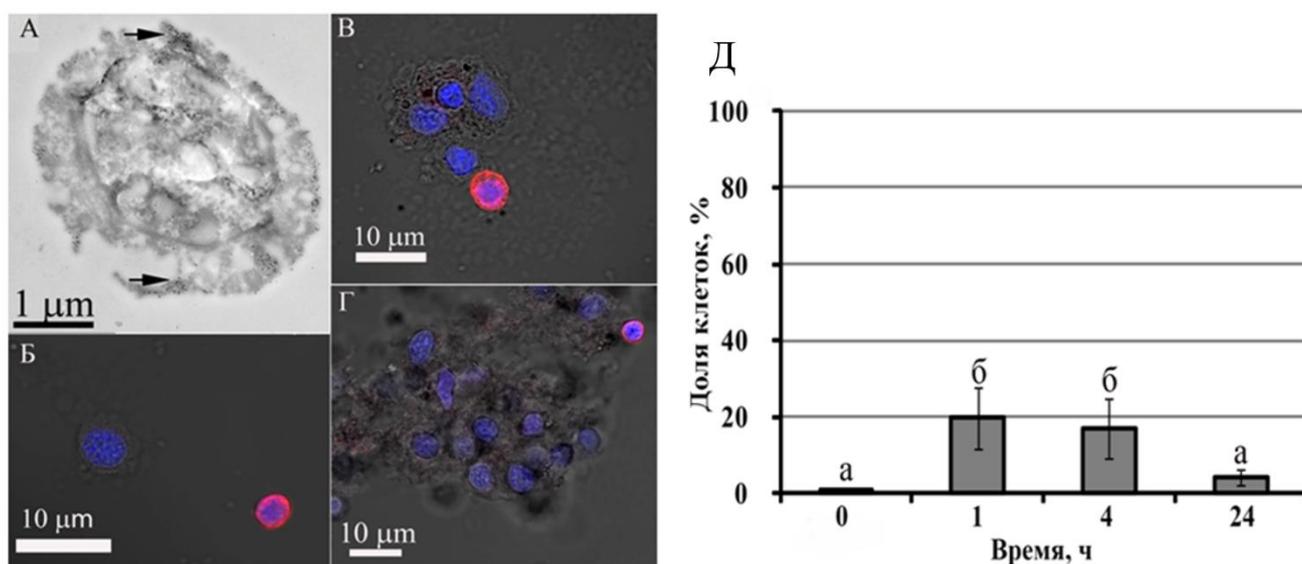


**Рисунок 4** – Идентификация белка Piwi в тканях *E. fraudatrix*. А, Б – ПААГ-электрофорез тотальных лизатов целомотцов (А) и зрелых гонад (Б) *E. fraudatrix*. Количество белка в каждой лунке равно 20 мкг. Обозначены стандартные значения молекулярных масс. Окраска Кумасси G-250. В – Вестерн-блот анализ образцов целомотцов (целом.), женских (жен.) и мужских (муж.) зрелых гонад *E. fraudatrix* с использованием поликлональных антител против белка Piwi (1:5000). Обозначенная стрелкой полоса массой 100 кДа была вырезана для МАЛДИ масс-спектрометрии.

Иммуноцитохимическое окрашивание ЦЖ *E. fraudatrix* показало наличие в составе ювенильных целомотцов отдельной субпопуляции клеток, иммунопозитивных по Piwi. Данная субпопуляция, минорная у интактных животных, через 1 ч после эвисцерации значительно возрастает в количестве, одновременно с увеличением в ЦЖ числа свободно циркулирующих целомотцов (рис. 5).

Известно, что восстановление клеточного состава ЦЖ *E. fraudatrix* не сопровождается усилением митотической активности целомотцов (Eliseikina et al., 2010). Наблюдаемое увеличение числа недифференцированных ювенильных целомотцов, экспрессирующих Piwi, в течение первых суток регенерации при отсутствии пролиферации оставшейся части

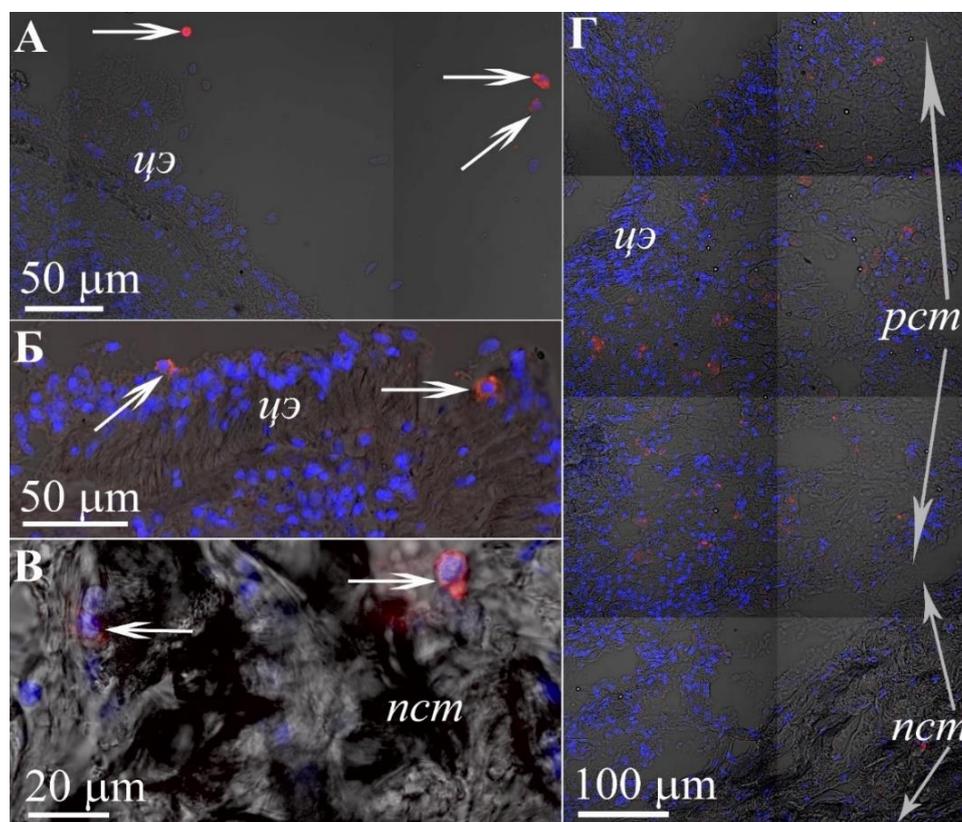
целоцитов предполагает наличие внешней резервной субпопуляции клеток-предшественников, способных мигрировать в полость целома и дифференцироваться в разные типы целоцитов.



**Рисунок 5** – Piwi-позитивные клетки в ЦЖ интактных голотурий *E. fraudatrix*. А – клетка с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, меченая антителами; стрелки указывают на скопления частиц коллоидного золота. Электронная иммуноцитохимия. Б-Г – Иммуноцитохимическое окрашивание поликлональными кроличьими антителами к белку Piwi, вторичные антитела мечены Alexa 546 (красная флуоресценция). Б – Piwi-позитивная клетка с интенсивно окрашенной цитоплазмой и среднедифференцированный целоцит. В-Г – единичные Piwi-позитивные клетки в составе агрегатов целоцитов. Д – Содержание Piwi-позитивных клеток в ЦЖ *E. fraudatrix* в норме и после эвисцерации. По оси ОХ– время после эвисцерации (0 – интактные животные, 1, 4, 24 ч), по оси ОУ – доля иммунопозитивных клеток, выраженная в процентах. Одинаковые буквенные индексы, расположенные над столбцами, показывают отсутствие статистически значимых различий между значениями, при  $p < 0,05$  и  $n=5$ .

Одним из вероятных источников клеток-предшественников целоцитов *E. fraudatrix* является соединительная ткань стенки тела, поскольку в литературе встречались свидетельства выселения стволовых клеток из областей соединительной ткани у иглокожих (Holland, 1965; Магарламов, 2004; Candia-Carnevali, 2006). Иммуноцитохимический анализ структур стенки тела *E. fraudatrix* на разных этапах регенерации показал наличие Piwi-позитивных клеток в составе тканей, составляющих стенку тела, в частности в плотных и рыхлых слоях соединительной ткани и в целомическом эпителии. Визуально отмечено, что количество меченых клеток меняется в течение ранних сроков восстановления целоцитов:

в то время как у интактных животных встречаются лишь единичные клетки, через 4 ч после эвисцерации иммунопозитивные клетки были многочисленны в соединительной ткани стенки тела (рис. 6). Было показано, что клетки мигрируют из более глубоких слоев дермы по целомическому эпителию и выселяются в целомическую полость.

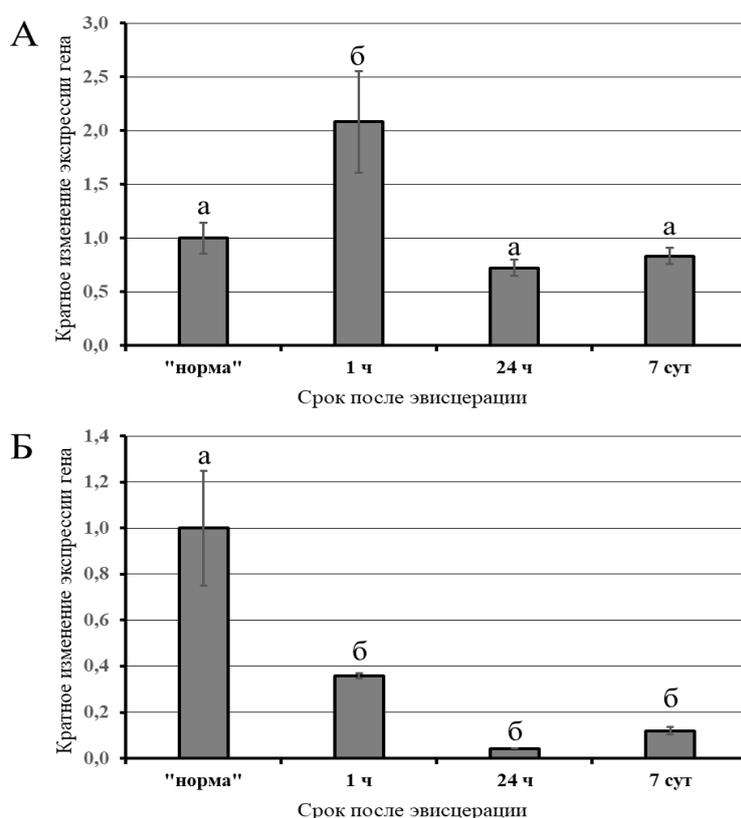


**Рисунок 6** – Piwi-позитивные клетки в ЦЖ и тканях стенки тела голотурии *E. fraudatrix*, 4 ч после эвисцерации. Меченные антителами клетки (обозначены белыми стрелками) в целомической полости (А), в толще и на поверхности целомического эпителия (Б), в составе плотной соединительной ткани стенки тела (В). Меченые клетки в составе рыхлой и плотной соединительной ткани стенки тела (Г). Условные обозначения: цэ – целомический эпителий, пст – плотная соединительная ткань, рст – рыхлая соединительная ткань стенки тела. Синяя флуоресценция маркирует ядерную ДНК, окрашенную ДАПИ, красная флуоресценция – компоненты, окрашенные антителами к белку Piwi.

Мы также обнаружили, что Piwi является преимущественно цитоплазматическим белком; окраска цитоплазмы антителами либо равномерная диффузная, либо в виде перинуклеарных гранул – структур, известной как nuage. Подобная локализация ассоциируется с ролью белка в поддержании стволовых клеток путем эпигенетической регуляции экспрессии генов в клетке (Cox et al., 1998; Reddien et al., 2005; De Mulder et al., 2009; Rinkevich et al., 2010). В совокупности, полученные данные позволяют нам утверждать о присутствии в соединительной ткани *E. fraudatrix* резервной популяции стволовых клеток-

предшественников, которые служат источником восстановления клеток ЦЖ в условиях стресса, вызванного эвисцерацией.

**Определение динамики экспрессии генов *piwi* в ходе восстановления популяции целомоцитов.** Для количественной оценки экспрессии генов *piwi* и *seali* в целомоцитах и стенке тела *E. fraudatrix* использовали методы ПЦР в реальном времени и цифровой капельной ПЦР. Обнаруженная в целомоцитах интактных животных низкая экспрессия гена *piwi* ( $1,98 \pm 0,17$  копий в мкл) в ответ на стимулированную эвисцерацию резко возрастает и уже через 1 ч достигает своего пика ( $4,5 \pm 1,7$  копий в мкл), после чего снижается (рис. 7).

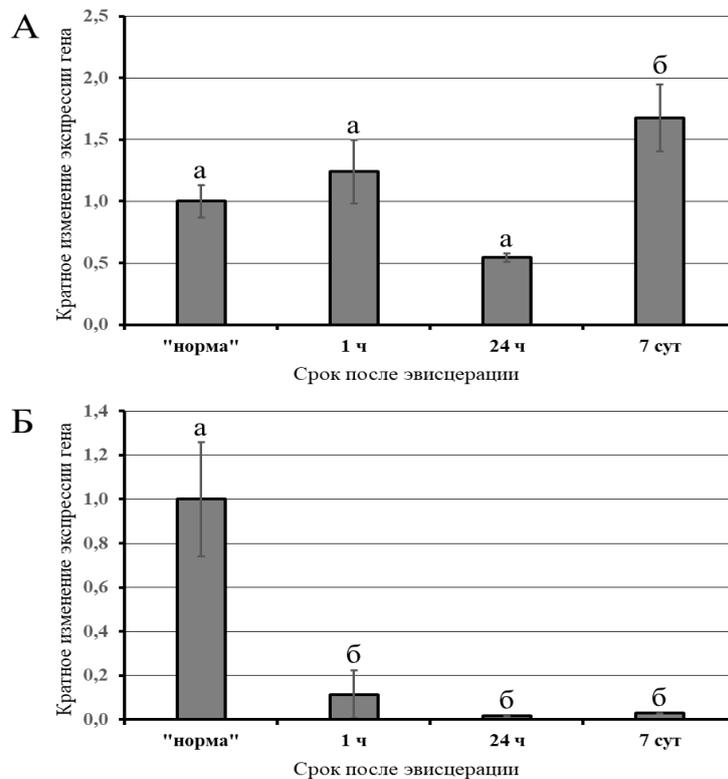


**Рисунок 7** – Динамика экспрессии гена *piwi* в целомоцитах (А) и стенке тела (Б) в зависимости от срока регенерации *E. fraudatrix*, анализ методом кцПЦР. Нормализация по референсному гену *tubulin*, значения «нормы» приняты за единицу. Индивидуальный разброс оценивали по показателям среднеарифметического значения. Одинаковые индексы показывают отсутствие статистически значимых различий при  $p < 0,05$  и  $n=3$ . По оси X – срок после эвисцерации, по оси Y – кратное изменение экспрессии гена.

Резкий рост *piwi* через 1 ч после эвисцерации, установленный с помощью ПЦР и визуализированный иммуногистохимически на мазках целомоцитов, согласуется с описанным ранее фактом увеличения доли ювенильных клеток в ЦЖ в этот период. В стенке тела при этом количество мРНК транскриптов *piwi*, напротив, снижается, вероятно из-за выселения клеток в полость целома и истощения резервной популяции клеток-

предшественников при восстановлении клеточного состава ЦЖ. В целом мы отмечаем разнонаправленную динамику экспрессии *piwi* в целомоцитах и стенке тела голотурии, что сопровождает процесс выселения клеток в целомическую полость. По окончании эксперимента показатели экспрессии в стенке тела не восстанавливаются до своих первоначальных значений, небольшой прирост наблюдается только лишь на 7 сутки после эвисцерации ( $1,9 \pm 0,5$  копий в мкл).

Паттерн экспрессии гена *seali* сильно отличается от характера экспрессии *piwi*: *seali* слабо вовлечен в процесс восстановления целомоцитов в течение первых суток, но показывает резкое возрастание активности на 7 сутки после эвисцерации (рис. 8). Очевидно, что оба гена участвуют в восстановительных процессах в соматических тканях *E. fraudatrix*, но, вероятно, выполняют разные функции.



**Рисунок 8** – Динамика экспрессии гена *seali* в целомоцитах (А) и стенке тела (Б) в зависимости от срока регенерации *E. fraudatrix*, анализ методом кцПЦР. Нормализация по референсному гену *tubulin*, значения «нормы» приняты за единицу. Одинаковые индексы показывают отсутствие статистически значимых различий. Индивидуальный разброс оценивали по показателям среднеарифметического значения. Одинаковые индексы показывают отсутствие статистически значимых различий при  $p < 0,05$  и  $n=3$ . По оси X – срок после эвисцерации, по оси Y – кратное изменение экспрессии гена.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование гистогенетических взаимоотношений клеток ЦЖ и соединительной ткани стенки тела голотурии *E. fraudatrix* в ходе репаративной регенерации после эвисцерации. Применение комплексного экспериментального подхода, сочетающего клеточные и молекулярно-генетические методы идентификации клеток-предшественников целомоцитов и их ниш, способствовало пониманию механизма быстрого восстановления популяции клеток ЦЖ на начальных этапах регенерации.

В качестве молекулярного маркера клеток-предшественников были использованы ген «стволовости» *piwi* и продукт его экспрессии – белок Piwi. В ходе проведенного анализа установлено, что белок Piwi голотурии *E. fraudatrix* гомологичен белкам Piwi других иглокожих и содержит консервативные для белков данного подсемейства функциональные домены. С использованием биохимических, цитохимических и молекулярных методов исследования установлено наличие клеток, экспрессирующих *piwi*, в составе субпопуляции ювенильных целомоцитов *E. fraudatrix*. Кроме того, клетки, содержащие белок Piwi, обнаружены в соединительной ткани стенки тела. Исследование экспрессии гена *piwi* в ЦЖ и стенке тела в динамике на ранних сроках регенерации продемонстрировало его вовлеченность в восстановительные процессы *E. fraudatrix*. На основании полученных данных сделано заключение о наличии у *E. fraudatrix* в составе соединительной ткани стенки тела резервной популяции клеток-предшественников целомоцитов, которые выселяются в целомическую полость на начальных этапах регенерации после эвисцерации.

Использование гена *piwi* в дальнейшем в качестве маркера мульти-/плюрипотентности позволит провести скрининговый анализ на наличие клеток-предшественников в тканях других иглокожих, а применение таких молекулярных методов, как нокдаун генов, поможет обозначить его специфические функции в их различных морфогенезах.

## ВЫВОДЫ

1. Регуляторный белок *Piwi*, отвечающий за поддержание мульти-/ плюрипотентности стволовых клеток, обнаружен у голотурии *E. fraudatrix*. Структурный анализ аминокислотных последовательностей выявил наличие в его молекуле консервативных для белков этой группы функциональных доменов PAZ и PIWI и показал высокую степень идентичности с белками *Piwi* других Metazoa, подтвердив его эволюционную консервативность.

2. Субпопуляция клеток, содержащих в цитоплазме белок *Piwi*, была идентифицирована в составе клеток ЦЖ. Особенности строения *Piwi*-позитивных клеток указывают на их принадлежность к морфотипу ювенильных целомоцитов, являющихся предшественниками двух основных линий дифференцировки клеток ЦЖ – амебоцитов и морулоподобных клеток.

3. Анализ динамики клеточных популяций целомоцитов показал, что восстановление клеточного состава ЦЖ после эвисцерации происходит за счет миграции и выселения из депо низкодифференцированных ювенильных клеток и их последующей дифференцировки. В том числе, это подтверждает динамика содержания *Piwi*-позитивных клеток в ЦЖ, количество которых максимально в первые часы регенерации и возвращается к значениям, характерным для интактных животных, через сутки после эвисцерации.

4. Использование белка *Piwi* в качестве маркера стволовых клеток позволило детектировать в составе плотных и рыхлых слоев соединительной ткани стенки тела субпопуляцию *Piwi*-позитивных клеток. Установлено, что эвисцерация стимулирует их миграцию и выселение в целомическую полость, что подтверждают разнонаправленные показатели экспрессии гена *piwi* в стенке тела и в клетках ЦЖ. Количественным определением транскриптов было подтверждено, что уровень экспрессии *piwi* во время регенерации целомоцитов значительно снижался в стенке тела и в то же время возрастал в ЦЖ. Таким образом, соединительную ткань стенки тела можно рассматривать как депо клеток-предшественников целомоцитов, которые реализуются в условиях вызванного эвисцерацией стресса и вовлекаются в процессы восстановления клеточного состава ЦЖ.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Завальная Е.Г.**, Шамшурина Е.В., Елисейкина М.Г. Иммуноцитохимическая идентификация PIWI-позитивных клеток в ходе восстановления популяции целомоцитов после эвисцерации у голотурии *Eupentacta fraudatrix* (Djakonov et Baranova, 1958) (Holothuroidea: Dendrochirota) // Биология моря. 2020. Т. 46, № 2. С. 117–125.

2. Dolmatov I. Yu., Kalacheva N. V., Tkacheva E. S., Shulga A. P., **Zavalnaya E. G.**, Shamshurina E. V., Girich A. S., Boyko A. V., Eliseikina M. G. Expression of *Piwi*, *MMP*, *TIMP*, and *Sox* during gut regeneration in holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirotida) // Genes. 2021. Vol. 12, № 8. Article No. 1292. Doi: 10.3390/genes12081292

Работы в материалах конференций и в других изданиях:

1. **Zavalnaia E.G.**, Petrova I. Yu., Eliseikina M.G., Girich A.S., Dolmatov I.Yu. Vasa and piwi-like proteins in the tissues of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Dendrochirota, Holothuroidea) // Program and Abstracts 16th International Echinoderm Conference. Nagoya, Japan, May 2018 – June 1, 2018. – Nagoya: Nagoya University, 2018. P. 210.

2. **Zavalnaia E.G.**, Shamshurina E.V. The expression of *piwi* and *seali* genes in holothurian *Eupentacta fraudatrix* tissues during regeneration // Abstracts of the 10th European conference on Echinoderms, 16–19 September 2019, Moscow, Russia. – Moscow: Borissiak Paleontological Institute RAS, 2019. P. 110.

3. **Завальная Е.Г.**, Ткачева Е.С., Шамшурина Е.В. Анализ экспрессии генов семейства PIWI в тканях голотурии *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov & Baranova, 1958) (Holothuroidea, Dendrochirota) в ходе регенерации // Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Годичная научная конференция, 22–23 апреля 2019 г.: сборник материалов. – Владивосток, 2019. С. 57–62. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=41424230>

ЗАВАЛЬНАЯ  
ЕВГЕНИЯ ГЕНРИХОВНА

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *PIWI* В ПРОЦЕССЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ  
КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ  
ГОЛОТУРИИ *EUPENTASTA FRAUDATRIX***

1.5.22. Клеточная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук