

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук Завальной Евгении Генриховны**  
**на тему: “ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *PIWI* В ПРОЦЕССЕ**  
**ВОССТАНОВЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ**  
**ЖИДКОСТИ ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA FRAUDATRIX*”**  
**по специальности 1.5.22. – Клеточная биология**

Диссертационное исследование Завальной Евгении Генриховны посвящено изучению механизмов восстановления клеточного состава целомической жидкости голотурии *Eupentacta fraudatrix* после эвисцерации с применением гена *piwi* и продукта его активности – белка *Piwi*. В настоящее время изучение фундаментальных молекулярных механизмов, лежащих в основе процесса регенерации, является перспективным подходом для раскрытия путей регуляции дифференцировки клеток, что, в свою очередь способствует развитию регенеративной медицины. При этом работы, выполняемые на, так называемых, не классических модельных объектах, в том числе и на водных беспозвоночных, позволяют изучить все многообразие механизмов регенерации у животных. Автор диссертационной работы успешно сочетает изучение особенностей структуры белка *Piwi* и реконструкцию его филогенетических отношений с другими систематическими группами животных с определением локализации *Piwi*-позитивных клеток в тканях и целомической жидкости голотурий до и после эвисцерации при помощи биохимических и цитологических методов анализа. Также на основании молекулярно-генетических подходов была изучена динамика экспрессии гена *piwi* в тканях и клетках животных после

эвисцерации, позволяющая определить роль белка *Piwi* в регенерации целомической жидкости.

Евгения Генриховна в своем исследовании представляет детальное описание аминокислотной структуры белка *Piwi* голотурий, приводит анализ его гомологии с другими представителями *Metazoa*, идентифицирует субпопуляции *Piwi*-позитивных клеток в целомической жидкости и показывает динамику изменений клеточного состава целомической жидкости после эвисцерации, демонстрирует процесс миграции *Piwi*-позитивных клеток из стенок целомической полости, количественно анализирует экспрессию гена *piwi* в клетках. Учитывая, что механизмы регенерации голотурий во многом являются уникальными и широко исследуются в последнее десятилетие проведенное исследование, несомненно, является не только **новым**, но и **актуальным**.

Диссертационная работа Завальной Евгении Генриховны построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение и выводы. Работа изложена на 111 страницах, содержит 297 ссылок на литературные источники, только 7 из которых – на русском языке. Более 26 источников литературы имеют год выпуска от 2018.

Во **введении** подробно освещены актуальность и научная новизна работы, сформулированы цели и задачи исследования, перечислены положения, выносимые на защиту, приведена теоретическая и практическая значимость работы, указан список конференций, на которых проводилась апробация работы, отражен личный вклад автора в реализацию диссертационного исследования. **Положения, выносимые на защиту**, соответствуют полученным результатам.

В **обзоре литературы** подробно и вместе с тем лаконично изложена современная фундаментальная база о механизмах регенерации у животных, с отдельным анализом исследований последних лет о процессах регенерации у иглокожих, приводится характеристика молекулярного маркера стволовых

клеток *riwi*, раскрыты его функции в соматических клетках и клетках зародышевой линии. В целом, автор демонстрирует глубокое знание современной литературы, относящейся к вопросу исследования.

В работе использован широкий спектр современных методов исследования, а именно: молекулярно-генетические подходы к филогенетическому анализу, а также, определению уровня экспрессии гена *riwi* в клетках голотурии, биохимические методы анализы, включающие вестерн-блоттинг и МАЛДИ-спектрометрию, блок цитологических методов, таких как проточная цитометрия, сортировка клеток, иммуоцитохимия, электронная, флуоресцентная и оптическая микроскопия. Следует отметить, что работа выполнена с применением наиболее современных и точных методов анализа, что, несомненно, украшает выполненное исследование и повышает релевантность полученных данных. В разделе «Материалы и методы» авторы приводят также подробное описание протоколов исследований для каждого этапа работ, что существенно упрощает читателю понимание и оценку полученных результатов.

Раздел «результаты» проиллюстрирован большим количеством четких и наглядных рисунков. Всего представлено 20 рисунков. В данном разделе приводятся данные по идентификации белка *Riwi* в тканях голотурии *E. fraudatrix* и анализу его гомологии с представителями других систематических групп животных. Также исследован клеточный состав целомической жидкости голотурий, даны описания морфотипов целомоцитов. Далее автор приводит результаты изменений клеточного состава целомической жидкости голотурий после эвисцерации, исследует локализацию *Riwi*-позитивных клеток в целомической жидкости и тканях стенки тела после эвисцерации. Несомненным плюсом работы является использование двух методов оценки уровня экспрессии генов *riwi*, а также продемонстрированная высокая сходимость полученных данных. Таким образом, данные, полученные диссертантом в ходе выполнения исследования, отличаются новизной и достоверностью.

В разделе «обсуждение» приводится анализ полученных данных в контексте современного состояния исследуемой проблемы. Раздел написан ярко и интересно, логика рассуждения легко прослеживается.

Завершают диссертацию **заключение и 4 вывода**, в которых отражены результаты работы, перечислены выявленные закономерности. Выводы основаны на результатах достаточного количества экспериментов, четко сформулированы и согласуются с задачами, поставленными в работе.

В целом, диссертация Завальной Евгении Генриховны является самостоятельным, завершенным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне и вносящим существенный вклад в понимание механизмов регенерации у иглокожих и путей восстановления клеточного состава целомической жидкости *E. fraudatrix* после эвисцерации.

**Автореферат** полностью отражает содержание диссертации. Основные научные результаты, включенные в работу, опубликованы в рецензируемых научных журналах и доложены на научных конференциях.

Несмотря на общее положительное впечатление от работы, возникли некоторые **вопросы и замечания**, не умаляющие достоинств диссертационного исследования:

1. В результатах анализа транскриптома *E. fraudatrix* авторы указывают на присутствие в нем двух мРНК, кодирующих 2 белка, принадлежащих к подсемейству Piwi: *piwi* и *seali*. В дальнейшем, приводится детальный анализ аминокислотной структуры обоих белков, а также сравнение их гомологии с представителями других животных. Также в разделе «результаты» показаны данные по изменению уровня экспрессии гена *seali* в целомицитах голотурии после эвисцерации. Вместе с тем, белок *seali* не идентифицировался в тканях и клетках голотурий. Анализ его структуры и роли в восстановлении клеточного состава целомической жидкости после эвисцерации не прописаны в задачах работы. В этом случае можно было бы привести обоснование, почему роль *seali* исследована частично, в сравнении с *piwi*, а также

включить его изучение в задачи работы, поскольку описание результатов, связанных с определением его роли в процессах регенерации голотурий составляет значительную часть диссертационного исследования.

2. В подразделе 3.5 результатов исследования приводятся данные о локализации клеток в тканях и целомической жидкости голотурий, экспрессирующих ген *riwi* после эвисцерации, однако, данных об их локализации в норме (до эвисцерации) нет. Таким образом, читателю затруднительно проследить динамику процесса, хотя в результатах авторы делают акцент на то, что характер полученных микрофотографий *riwi*-позитивных клеток в соединительной ткани голотурий предполагает, что клетки находились на стадии миграции. Возникает логичный вопрос, откуда мигрировали эти клетки после эвисцерации и какова численность *riwi*-позитивных клеток в составе соединительной ткани стенки тела голотурий до эвисцерации?

3. В описании проведенных экспериментов практически для всех использованных методов, за исключением подразделов 2.4.1 (Проточная цитометрия), 2.5.3 (ПЦР в реальном времени) и 2.5.4 (Капельная цифровая ПЦР) отсутствует информация о методах статистической обработки результатов, а также о критериях, выбранных для оценки статистической достоверности различий. Целесообразно было бы выделить в разделе «Материалы и методы» отдельный подраздел «Статистика», где были бы детально изложены все математические методы анализа данных, использованные в работе, приведен объем выборки для каждого метода исследований. Подобное изложение дало бы возможность в полной мере оценить масштаб проведенной работы, ее полноту, что, несомненно, только украсило бы диссертацию.

4. Среди общих комментариев к тексту диссертационной работы следует указать некоторое количество стилистических ошибок и

несколько вольное представление численных значений измеренных параметров: целесообразно использовать единую разрядность чисел в изложении результатов.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертационная работа “Экспрессия гена *riwi* в процессе восстановления клеточного состава целомической жидкости голотурии *Eupentacta fraudatrix*” соответствует основным квалификационным критериям (пункты 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции от 11 сентября 2021 года), а ее автор, Завальная Евгения Генриховна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности **1.5.22. – Клеточная биология.**

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук

Руководитель Лаборатории экологической иммунологии гидробионтов

Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

Андреева Александра Юрьевна

17.05.2023 г.

[Redacted signature]

Контактные данные:

Тел. 89111756614, e-mail: [andreevaal@gmail.com](mailto:andreevaal@gmail.com)

Адрес места работы: 299011, г. Севастополь, просп. Нахимова 2

Тел: +7-8692-544110; e-mail: [ibss@ibss-ras.ru](mailto:ibss@ibss-ras.ru)

Подпись [Redacted]  
Начальник управления кадрами и трудовыми отношениями ФИЦ ИВЖОМ  
[Redacted]

