

## ОТЗЫВ

на диссертационную работу Максима Алексеевича Нестеренко «Сравнительная и эволюционная транскриптомика разных фаз сложных жизненных циклов дигенетических сосальщиков» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.17. Паразитология (биологические науки) в диссертационный совет 24.1.026.01 на базе Зоологического института РАН.

Диссертационная работа М. А. Нестеренко посвящена молекулярно-биологическим основам, обеспечивающим сложные жизненные циклы трематод. Диссертант использует в тексте диссертации термин «дигенеи», который и будет далее использоваться в отзыве. Диссертантом использованы методы биоинформатического анализа значительных массивов нуклеотидных данных, а именно – транскриптомов разных стадий жизненного цикла этих паразитов. Впервые для российских работ по паразитологии, диссертантом использованы концепции и методы филостратиграфии и эволюционной транскриптомики. Данная работа по своим целям и методологии не отстает от аналогичных работ в других странах, используя, развивая и предлагая широкому научному сообществу совершенно иные, ранее невозможные подходы. В применении к изучению жизненных циклов использованные методы основываются на выявлении и оценке дифференциальной экспрессии генов паразитов.

Следует отметить, что представленная работа представляет первое известное нам исследование, в котором проведен комплексный сравнительный анализ молекулярных подписей фаз жизненных циклов филогенетически близких и отдаленных видов дигеней.

Диссертант очень подробно рассматривает в своей работе то, что он обозначает как «степень разработанности темы исследования». Им приведен список видов и таксонов дигеней, для которых методы сравнительной транскриптомики уже были применены. В этом списке находим немало дигеней медицинского и ветеринарного значения, в том числе виды родов: *Fasciola* (Fasciolidae), *Opisthorchis*, *Clonorchis* и *Metorchis* (Opisthorchiidae), *Paragonimus* (Troglorematidae), *Paramphistomum* (Paramphistomidae), *Schistosoma* и *Trichobilharzia* (Schistosomatidae). В то же время понятно, что реального таксономического разнообразия этот список изученных форм не охватывает. Диссертант справедливо отмечает, что большая часть этих исследований посвящены изучению транскриптомов отдельных стадий амфимиктического поколения – в основном марит. Приводя этот список, диссертант подчеркивает новизну своей работы, поскольку им были исследованы представители семейства Psilostomatidae, ранее этими методами не исследованные. Прав диссертант и в том, что именно в его работе сделана попытка расширить набор анализируемых данных, путем включения в него и возможных предковых форм для всех дигеней - т. е. различных видов свободноживущих плоских червей.

Диссертантом очень четко сформулированы основная цель и задачи работы. Цель он понимает, как изучение молекулярных основ, обеспечивающих сложные жизненные циклы дигеней. Связано с этой формулировкой и намерение диссертанта реконструировать возможные эволюционные пути становления и развития таких адаптаций. Подчиненные этой цели задачи также сформулированы очень четко и вполне логичны: получение высококачественных транскриптомов двух выбранных в качестве объектов дигеней, выявление характерных для каждой из изученных стадий особенностей транскриптомов, проведение филостратиграфического анализа обнаруженных белок-кодирующих генов исследуемых видов и реконструкция основных черт генома общих предков плоских червей (включая дигеней).

Можно согласиться с диссертантом и в его понимании теоретической и практической значимости работы, как впервые обеспечившей получение транскриптомных данных для ранее не изученных этими методами представителей семейства Psilostomatidae. Эти данные получены с целью выявления молекулярных основ, обеспечивающих сложные жизненные циклы дигеней. В процессе работы диссертант достиг несомненного успеха в развитии лабораторных методик изучения дигеней этого семейства. Хотя полностью обеспечить завершение их жизненного цикла в лаборатории не удалось, технические приемы содержания отдельных стадий цикла представляют практический интерес. В качестве более далекой перспективы, понимание протеомного состава отдельных стадий жизненного цикла дигеней может обеспечить разработку лекарственных препаратов для борьбы с трематодолами животных и человека.

Переходя к анализу содержания диссертации отметим, что основной текст ее изложен на 122 страницах и включает введение и основные четыре главы. Диссертация сопровождается заключением и выводами, а также приложением, содержащим перечень библиотек парных прочтений транскриптомов, использованных в исследовании. В диссертации также даны 4 таблицы и 19 рисунков.

Первая глава – «Обзор литературы», как можно понять из самого названия, содержит анализ наличествующей литературы по теме исследования. Надо сказать, что глава подразделена на однородные по содержанию разделы, открывающие для читателя отдельные стороны жизненного цикла дигеней. Начинается глава с «Общего описания фаз сложного жизненного цикла дигеней», что очень удобно, особенно для паразитологов не занятых в своей работе изучением дигеней. Читаются разделы этой главы посвященные истории изучения дигеней с большим интересом. Столь же полезны, как справочные материалы, и последующие разделы «Развитие представлений о структуре жизненных циклов дигеней» и «Описания схем реализации сложных жизненных циклов исследуемых видов дигеней». Наряду с двумя видами, послужившими объектами данного диссертационного исследования, в разделе приведены сведения по фасциолам и двум видам рода *Trichobilharzia*. Также приводится описание сложного жизненного цикла *Schistosoma mansoni*. Последующие два раздела главы непосредственно касаются применения новых методов изучения геномов дигеней - технологии высокопроизводительного секвенирования, собственно транскриптомного анализа и теоретических основ такого нового подхода в изучении эволюции живого, как филогенетика. В этом последнем разделе диссертант рассматривает наиболее информативные последние работы, сходные по целям, подходам и выводам к его работе – а именно реконструкцию и анализ геномов предков дигенеи-микрофаллиды *Atriophallophorus winterbourni*.

Вторая глава «Материалы и методы», как и следует из ее названия, содержит весь массив технических сведений об объекте исследований и многочисленных биоинформатических программах и подходах, обеспечивших получение, аннотацию и анализ полученных транскриптомных данных. Аккуратно приведены сведения о наборах для выделения РНК, наборах для создания библиотек для секвенирования, и самом прочтении на Illumina HiSeq2500. Далее в главе приводится впечатляющий список программ и платформ, использованных для подготовки библиотек коротких парных прочтений и последующей сборки транскриптомов *de novo*, оценки качества полученных библиотек коротких парных прочтений, исправления возможных ошибок секвенирования. Следует отметить, что диссертант не только исследовал данные на возможную биологическую контаминацию, но и загрузил библиотеки коротких парных прочтений в базу данных NCBI Sequence Read Archive. Таким образом полученные

данные открыты для ознакомления, оценки и дальнейшего использования научным сообществом. Дальнейший анализ полученных данных состоял в определении уровней экспрессии и аннотации экспрессирующихся генов. Последняя функция достигалась на основе сравнения полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с существующими базами данных (NCBI nr, PfamA и др.). Проводимый анализ опирался на выявление и анализ групп ортологов, при котором, использовали данные как по паразитическим, так и по свободноживущим видам плоских червей. Существенную новизну составило и определение т.н. «молекулярных подписей» отдельных стадий жизненных циклов дигеней. Поиск кластеров ко-экспрессии был проведен для *P. simillimum* (одного из основных объектов исследования), *Schistosoma mansoni* и двух фасциол. *Sphaeridiotrema pseudoglobulus* в анализ не была включена ввиду возможного влияния смеси видов на профиль экспрессии генов. Выявление дифференциальной экспрессии белок-кодирующих генов позволило также определить кластеры ко-экспрессии некоторых генов у двух основных объектов исследования и у фасциол.

Общий биологический интерес представляют подходы диссертанта к реконструкции геномов последних общих предков дигеней и свободноживущих плоских червей, и к анализу филогенетического состава наборов белок-кодирующих генов у этих организмов.

Глава третья – «Результаты», по своей структуре, во многом повторяет предыдущую главу, поскольку в ней «пошагово» излагаются полученные результаты, и представление этих данных, естественным образом, имеет ту же самую структуру. В данной главе приведены численные и качественные данные о полученных результатах: числе коротких парных прочтений в полученных библиотеках, количестве собранных протяженных последовательностей (т.н. «контигов») для двух изученных видов, оценке уровней экспрессии и определении кодируемых аминокислотных последовательностей.

Хорошим примером творческого и ответственного отношения диссертанта к изучаемому материалу служит дополнительный фрагмент работы, связанный со сравнением гаплотипов митохондриального гена *cox1* в полученном наборе генов одного из изученных видов псилостоматид - *Sphaeridiotrema pseudoglobulus*. Из полученных данных были извлечены последовательности основной первой субъединицы гена цитохром с-оксидазы (*cox1*), которые показали присутствие в материале двух гаплотипов *S. pseudoglobulus*.

Далее в работе приводится результат поиска ортологичных последовательностей для полученных данных. Интересен вывод о наибольшем сходстве наборов белок-кодирующих генов *P. simillimum* и *S. pseudoglobulus* с таковыми у фасциол.

Определенным смысловым ядром полученных данных могут стать сведения о т.н. «молекулярных подписях» отдельных фаз жизненного цикла изученных циклов дигеней. С помощью наглядных диаграмм Венна показаны показатели сходства и различия в составе экспрессирующихся генов между редиями, церкариями и маритами *Psilotrema simillimum* и *Sphaeridiotrema pseudoglobulus*. (Отметим, что диссертант четко обозначает само понятие «молекулярной подписи», как набора последовательностей, который может быть использован в качестве маркера рассматриваемого фенотипа). Интересны и выявленные существенные различия (64% против 39%) в числе идентифицированных генов активных на всех фазах жизненного цикла между этими двумя видами одного семейства.

Для определения совпадений и различий в составе «молекулярных подписей» каждой из изученных стадий сложного жизненного цикла изученных видов, а также и с другими видами дигеней, был проведен анализ по методу многомерного шкалирования. Было показано, что большую часть кластеров составляют биологические повторности одной фазы сложного



жизненного цикла каждого из рассмотренных видов. На следующем этапе были определены биологические процессы, возможно связанные с замеченным повышением экспрессии для отдельной фазы сложного жизненного цикла. При этом были выявлены многочисленные секреторные белки, как возможный продукт такой экспрессии. Особый интерес представляют положения диссертации о функциональной роли генов, которые, по результатам проведенной реконструкции, появились у последнего общего предка дигеней. Показано, что эти гены обеспечивают проведение сигналов, функционирование клеток, развитие, размножение и регуляцию экспрессии генов. Были выявлены и гены подвергшиеся дупликации у последнего общего предка дигеней, которые, как показано в диссертации, обеспечивают развитие органов животных, клеточный ответ на различные раздражители, фагоцитоз, метаболизм эстрогена и жирных кислот, регуляцию различных процессов и миграцию эпителиальных клеток.

Два последних раздела главы «Результаты» отражают применение методов филогенетики для анализа состава выявленных наборов белок-кодирующих генов. Методы филогенетического анализа выявили филогенетические кластеры, наполненные вполне узнаваемым зоологическим смыслом: от «клеточных организмов» и «Eukaryota» до «род» и «вид».

Вершиной и логическим завершением диссертации стала глава «Обсуждение». В ней подробно, и с более заметным использованием общей биологической и зоологической терминологии рассматриваются результаты проведенного биоинформатического исследования. В главе находим яркие положения, которые может быть и не являются исключительно авторскими для диссертанта, но обоснованно приводятся в «Обсуждении» и находят еще более яркое свое подтверждение в проведенной им работе. Так положение о том, что «сложный жизненный цикл дигеней ..... является ярким примером формирования и функционирования множества фенотипов путем регуляции работы одного генома» заслуживает осмысления исследователями разных направлений.

Данная глава содержит аналитическую информацию по самым разным аспектам изучаемой проблемы. Диссертант проводит оценку качества полученных им транскриптомных прочтений, уровень соответствия полученных филогенетических данных по группам ортологичных генов с современными представлениями об филогении дигеней. Поскольку и сами применяемые методы, и сопутствующая им терминологическая база новы для нашей науки, то хотелось бы поблагодарить диссертанта за четкую формулировку используемых им понятий. Так, разъяснение понятия «молекулярной подписи» фазы сложного жизненного цикла, как «многокомпонентной системы, составными частями которой являются не столько гены сами по себе, сколько уровни их экспрессии в определенных условиях, в том числе и в клеточных типах, формирующих организм» представляется ценным и удобным для широкого использования.

Значительный теоретический интерес представляют размышления диссертанта о роли появившихся *“de novo”* и дублированных генов как преадаптаций для усложнения жизненного цикла последнего общего предка дигеней. Такое предположение увязывается с концепцией «полифенизма», т. е. наличия нескольких альтернативных фенотипов, реализуемых на основе одного генома.

В «Обсуждении» также разъясняется понятие «возрастного индекса» отдельных транскриптомов и «молекулярных подписей». Целью исследователя тут ставится реконструкция эволюционного процесса становления сложных жизненных циклов дигеней – в каком порядке эти фазы появлялись и становились частью единого общего жизненного цикла. Диссертант достигает тут понимания того факта, что высокий возрастной индекс молекулярной подписи отдельной стадии жизненного цикла не обязательно указывает на позднее «появление» этой фазы

в жизненном цикле. Альтернативной и более вероятной ситуацией представляется вовлечение большего числа «новых» генов в фазу с высокими показателями возрастного индекса. Их доля на таких фазах значительно превышает таковую на фазах жизненного цикла с низкими значениями возрастного индекса. Чрезвычайно интересным и имеющим общее биологическое значение представляется вывод о различной активности группы генов разного филогенетического происхождения на разных фазах жизненного цикла.

В самой диссертационной работе и в автореферате очень информативно оформлена заключительная часть: есть и «Заключение» и «Выводы». Заключение составлено более подробно, содержит аргументированные положения, созвучные поставленной цели, задачам и выносимым на защиту положениям. Диссертант упоминает и возникшие в ходе выполнения работы проблемы с использованием для сравнительного анализа данных по транскриптому *Sphaeridiotrema pseudoglobulus*, связанных, как им показано, с возможным наличием РНК криптических видов этого рода в собранном материале. Такое внимательное отношение к полученным результатам ценно само по себе, и станет отправной точкой для исследований по криптическим видам в пределах рода *Sphaeridiotrema*.

Раздел «Выводы» составлен очень кратко, и в весьма «конденсированном» виде представляет основные достигнутые результаты.

Говоря о публикации результатов этой диссертационной работы следует отметить достаточно высокий уровень журналов, где появились сообщения с участием диссертанта. Это журналы «Parasites & Vectors» и Biological Communications. Следует отметить, что достигнутый диссертантом высокий профессиональный уровень позволил ему участвовать и в других биоинформатических проектах, как например в изучении корнеголовых раков (F1000 Research, 2023, Vol. 11: 583 DOI: 10.12688/f1000research.110492.2), хотя эти работы и не упомянуты в работе. Также работа была апробирована на различных международных и российских научных мероприятиях: Двенадцатом европейском мультиколлоквиуме по паразитологии; Четвертом международном конгрессе по морфологии беспозвоночных; Шестом Съезде Паразитологического общества в 2018 г.; Девятой конференции Скандинавско-балтийского общества паразитологов; Десятой Московской конференции по вычислительной молекулярной биологии.

Как всякая большая работа, основывающаяся на применении новых методов, представленная диссертация М.А. Нестеренко содержит некоторые стилистические и технические особенности, вызывающие вопросы у оппонента. Учитывая новизну для российской аудитории методов филостратиграфии, хотелось бы более подробного введения в смысл того метода и сопутствующих ему положений в главе «Обзор литературы». Не лишним было бы, на мой взгляд, включить и данные об ограничениях этого метода, той конструктивной критике, что сопутствует распространению этого подхода (как, например, Moyers V.A. and J. Zhang, MBE, 2015 do: 10.1093/molbev/msu286). Быть может, следовало бы предварить основную часть диссертации (в конце Главы 1) списком терминов с пояснениями. В качестве дискуссионных замечаний отметим также, что при построении моделей геномов последних общих предков дигеней в анализ не были включены геномные или транскриптомные данные по цестодам, несмотря на то, что данные имеются в открытом доступе. Можно также заметить, что для извлечения и анализа последовательностей генов из реконструированных моделей геномов предков в качестве "эталона" использовались данные по *Schistosoma mansoni*, крайне специфичному виду дигеней, хотя, вероятно, для этой роли лучше подошел бы вид *Fasciola hepatica*.

Технические замечания также носят характер «предпочтений». Так, в редакциях некоторых журналов существует мнение, что, начиная новый абзац, следует давать биномиальное название вида полностью (род – вид, без сокращения названия рода), поскольку это облегчает чтение. В целом же, диссертация очень хорошо отредактирована и мелкие стилистические или грамматические ошибки очень редки.

Таким образом, диссертация Максима Алексеевича Нестеренко представляет собой целостное и важное по своей научной значимости исследование, в которой решение базовых проблем классической паразитологии основывается на применении самых современных методов: прочтения и аннотации транскриптомов и филостратиграфического анализа полученных данных. Содержание автореферата диссертации соответствует содержанию полного текста работы. Проведенное исследование апробировано в выступлениях на различных международных и российских научных встречах, и отражено в двух публикациях в рецензируемых журналах. Представленная диссертация «Сравнительная и эволюционная транскриптомика разных фаз сложных жизненных циклов дигенетических сосальщиков» отвечает всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности 1.5.17. «Паразитология» (биологические науки), а ее автор – Максим Алексеевич Нестеренко - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Заведующий лабораторией систематики  
и эволюции паразитов Центра паразитологии  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института проблем экологии и эволюции  
им. А.Н. Северцова РАН,  
доктор биологических наук  
по специальности 1.5.17. «Паразитология» (биологические науки)



Спиридонов Сергей Эдуардович

Москва, 199049, ул. Мытная, дом 28 стр. 1  
телефон 9 495 959 97 25  
электронная почта: [s\\_e\\_spiridonov@rambler.ru](mailto:s_e_spiridonov@rambler.ru)



Подпись *Спиридонова С.Э.*  
веряю, зав. канц. ИПЭЭ РАН *SHL*  
30 01 2023.