

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Нестеренко Максима Алексеевича на тему «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).

**Актуальность исследования** М. А. Нестеренко «Сравнительная и эволюционная транскриптомика разных фаз сложных жизненных циклов дигенетических сосальщиков» обусловлена необходимостью анализа методами эволюционной транскриптомики молекулярных основ реализации сложного жизненного цикла *Digenea*, важной в филогенетическом отношении группы паразитов человека и домашних животных. Как справедливо отмечает автор, стремительное развитие технологий высокопроизводительного секвенирования сделало такой анализ возможным, однако до сих пор он не был проведен. Появление высококачественных сборок транскриптомов и геномов филогенетически удаленных дигеней вместе с разработкой новых методов биоинформационного анализа открыло возможность реконструкции моделей геномов предков этих паразитов, анализа таксон-специфичных филострат и их вклада в молекулярные репертуары, специфичные для отдельных фаз жизненного цикла. Такой анализ представляет большой теоретический и практический интерес и делает диссертационное исследование М.А. Нестеренко в высокой степени актуальным.

### **Общая характеристика работы.**

Диссертационная работа является заметным вкладом в современную паразитологическую литературу и содержит оригинальные результаты ретроспективного моделирования эволюционных процессов, сформировавших сложные жизненные циклы паразитических червей *Digenea*. Основной целью диссертационной работы является определение молекулярных основ реализации сложных жизненных циклов дигеней и возможных путей их становления в ходе эволюции.

Диссертация, представленная на отзыв, включает введение, четыре главы, заключение, выводы, список литературы и авторских публикаций по теме диссертации и приложение. Работа оформлена на 135 страницах, включает 19 рисунков и 4 таблицы.

Во введении определены предмет, объекты и степень разработанности темы исследования, описана общая методология исследования, цель и задачи исследования, обоснована актуальность темы исследования и приведены основные положения, выносимые на защиту.

В 1-ой главе приведен обзор научной литературы по современному состоянию представлений о структуре жизненного цикла дигеней в целом и, в частности, схемах реализации циклов исследуемых в работе видов. Также она содержит исчерпывающее описание методологии биоинформационного анализа геномов и транскриптомов для исследования молекулярных основ реализации жизненных циклов дигеней. Столь же исчерпывающим является и описание теоретических основ филогенетики и применение возрастных индексов транскриптомов в изучении жизненных циклов.

Во 2-ой главе описаны объекты и методы исследования. В первых двух разделах этой главы приведены способы и процедура получения исследуемого материала: церкарий, редий, адолескарий/метацеркарий и марит двух видов *Psilotrema simillimum* и *Sphaeridiotrema pseudoglobulus*. Следующие два раздела описывают выделение образцов РНК, создание библиотек кДНК и их секвенирование на высокопроизводительном оборудовании. Затем М. А. Нестеренко приводит подробные методические протоколы необходимой фильтрации возможной контаминации ксеногенным материалом, а также алгоритмы сборки *de novo* протяженных транскриптов из коротких прочтений. Отдельное внимание автор уделяет подробному описанию алгоритмов количественной оценки экспрессии *in silico*, идентификации кодируемых белковых последовательностей, подготовке референсных («справочных») массивов последовательностей и их функциональной аннотации. Последняя проведена путем поиска структурного сходства с ранее описанными белками, с известными свойствами и функциями, а также сходства со структурно- и функционально-консервативными аминокислотными мотивами. Функциональная характеристика дополнена информацией из баз данных онтологии генов (GO) и молекулярных взаимодействий в биологических системах (KEGG).

В этой главе важно отметить детальное описание алгоритма сравнительного биоинформационного анализа репертуара генов, специфичных для каждой отдельной фазы жизненного цикла дигеней («молекулярные подписи»). Этот алгоритм в существенной степени является авторской разработкой и включает последовательные итерации анализа групп ортологичных генов, определение молекулярных подписей отдельных фаз цикла, определение кластеров коэкспрессии и многомерный анализ экспрессии генов. Сюда же относится реконструкция моделей генома последнего общего предка дигеней и свободноживущих плоских червей, филогенетика и анализ филогенетического состава различных наборов белок-кодирующих генов и, наконец, анализ возрастных индексов молекулярных подписей фаз сложных жизненных циклов дигеней. Существенно подчеркнуть, что набор алгоритмов описан достаточно



подробно, чтобы их можно было воспроизвести в других лабораториях и на других объектах исследования.

В 3-ей главе диссертации представлены результаты исследования. Они изложены емко и хорошо проиллюстрированы. М.А. Нестеренко описывает технические параметры впервые полученных референсных транскриптомов *P. simillimum* и *S. pseudoglobulus*. Их качество и полнота вполне соответствует лучшим цеховым образцам. Приводятся данные о наличии у исследуемых видов набора генов, необходимых для биосинтеза жирных кислот. Результаты определения и подробного анализа групп ортологичных последовательностей у 14 видов плоских червей, включая два свободноживущих, приводятся в отдельном разделе. Здесь автор описывает количество и закономерности кластеризации общих и специфичных ортогрупп.

Следующий тематический раздел описывает результаты определения молекулярных подписей фаз жизненных циклов дигеней, полученные из анализа шести видов червей. Этот раздел также включает анализ дифференциальной экспрессии белок-кодирующих генов, определение кластеров коэкспрессии и многомерный анализ экспрессии генов, изложенные в отдельных подглавах. Завершают этот смысловой раздел результаты анализа обогащения терминов генной онтологии, проливающие свет на ориентировочные функции генов, специфичных для той или иной фазы цикла развития.

Затем М.А. Нестеренко описывает результаты реконструкции и анализа моделей геномов последних общих предков дигеней и свободноживущих плоских червей. Здесь автор приводит статистику модельных генных наборов, специфичных для Platyhelminthes и Digenea, и дает характеристику их предполагаемых функций исходя из анализа онтологии генов. Проводит сравнительный анализ списков биологических процессов, в которых они задействованы. Следующий раздел текста описывает результаты анализа филостратиграфического состава различных наборов белок-кодирующих генов. Этот анализ проведен для моделей геномов последнего общего предка Platyhelminthes и Digenea, для генов, имеющих заметную экспрессию на всех рассмотренных фазах жизненных циклов исследованных видов, кластеров коэкспрессии и для секреторных белков. Завершающий раздел в этой главе содержит подробные результаты анализа возрастных индексов молекулярных подписей фаз жизненных циклов дигеней.

В 4-ой главе рукописи М.А. Нестеренко проводит обсуждение полученных результатов, помещает их в современный контекст, формулирует гипотезы и обосновывает выводы. Специально отмечу профессиональную объективность обсуждения результатов исследования. Она свидетельствует о продвинутой аналитических способностях автора, явно умеющего формулировать и обосновывать новые смыслы.

Диссертация производит хорошее впечатление и ее результаты можно трактовать как важный шаг в понимании становления и эволюции сложных жизненных циклов трематод. Автор грамотно осуществил выбор методов сравнительного биоинформационного анализа, адаптировал их и успешно реализовал поставленную цель. **Основная заслуга автора** диссертации состоит в проведении комплексного сравнительного анализа молекулярных подписей фаз жизненных циклов филогенетически близких и отдаленных видов дигеней.

Научные положения, основные результаты и выводы работы корректны, достаточно полно и всесторонне обоснованы. Диссертация соответствует специальности 1.5.17 – Паразитология (биологические науки).

#### **Научная новизна, обоснованность и достоверность результатов.**

Новизна полученных результатов и их научная ценность заключается в получении пионерных сравнительных молекулярных данных о становлении и эволюции сложных жизненных циклов Digenea. Впервые получены и проанализированы образцы транскриптомов фаз партеногенетического и амфимиктического поколений *P. simillimum* и *S. pseudoglobulus*; они размещены в соответствующих базах данных для публичного доступа. Впервые применены методы филостратиграфии и эволюционной транскриптомики для анализа данных по дигенетическим сосальщикам. Впервые достоверно показаны статистически значимые различия во вкладах групп генов с разным филогенетическим происхождением в молекулярные подписи поколенческих фаз. Впервые полученные результаты сравнения реконструированных моделей геномов предков применены в исследовании молекулярных основ эволюционного усложнения жизненного цикла последнего общего предка дигеней.

Обоснованность и достоверность результатов исследования обеспечены: профессиональным анализом современного состояния темы исследования; логикой исследования; адекватным выбором алгоритмов и методов, соответствующих цели и задачам исследования; репрезентативностью выборки объектов исследования и полученных данных, подтвержденных статистическими оценками.

#### **Теоретическая и практическая ценность**

Транскриптомные данные *P. simillimum* и *S. pseudoglobulus* могут быть использованы для целевого анализа другими исследователями из разных областей, заинтересованных в анализе эволюции как отдельных систем паразит-хозяин, так и сложных жизненных циклов других животных. Результаты исследования создают теоретическую основу для разработки инновационных методов борьбы с опасными паразитами человека и домашних животных. Описанные генные репертуары,



характерные для отдельных фаз жизненных циклов дигеней, являются ценными списками генов-кандидатов для углубленного анализа и разработки мишеней не только для лекарственных препаратов, но и для генных манипуляций, направленных на прерывание циклов развития паразитов в естественных местах обитания.

#### **Замечания по диссертационной работе:**

Оценивая диссертацию положительно, следует указать на отдельные недостатки:

1. В работе уделено должное внимание процедуре подготовки сторонних транскриптомных данных для сравнительного анализа. Автор использует для этого единые протоколы удаления низкокачественных и контаминирующих последовательностей, а также квантификации уровней экспрессии транскриптов. Однако в диссертации не анализируется возможная неоднородность этих данных, происходящая из использования разных методов подготовки библиотек кДНК для секвенирования. Эти методы разнообразны и отличаются разной степенью обогащения библиотек кодирующими (poly-A) последовательностями и, наоборот, истощением транскриптов митохондриальных генов и рибосомальной РНК. Потенциально возможное смещение относительных оценок экспрессии генов, происходящее из этих различий, осталось не обсужденным.

2. Значительная условность понятия «ген» в транскриптомных *de novo* сборках упоминается автором в главе «Обсуждение», однако объяснение этой условности целесообразно приводить много раньше, в главе «Материалы и методы» – это значительно упростило бы понимание текста читателем. Вдобавок, в работе не приведены данные о количестве идентифицированных генов в аккуратно прочитанных геномах дигеней – для сравнительной работы это важная информация и пренебрегать ею не следовало.

3. Используемая в исследовании база данных белков с экспериментально доказанными функциями (UniProt: Swiss-Prot) является преимущественно «Mammalia-центричной», что значительно усложняет экстраполяцию функций на новые белки животных из филогенетически удаленных таксонов даже в случае значительного структурного сходства. Для иллюстрации: охарактеризованные белки представителей Mammalia (taxonomy\_id:40674) представлены в базе Swiss-Prot в количестве 67628, а белки представителей Digenea (taxonomy\_id:6179) – лишь 180. При этом автор обнаруживает 2633 гена, которые предположительно появились у последнего общего предка дигеней, и описывает их функциональную вовлеченность в многочисленные биологические процессы (термины GO). Столь значительный дисбаланс числа охарактеризованных (180) и новых таксон-специфичных (2633) генов слишком бросается

в глаза, позволяет сомневаться в адекватности функциональной аннотации последних и нуждается в обсуждении.

**Заключение.** Высказанные выше замечания не снижают высокого уровня проведенной соискателем работы, из чего следует, что диссертационная работа Нестеренко Максима Алексеевича «Сравнительная и эволюционная транскриптомика разных фаз сложных жизненных циклов дигенетических сосальщиков» является завершенной научно-классификационной работой. Полученные автором результаты являются новыми, обоснованными и достоверными. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Работа отвечает требованиям Положения ВАК о порядке присуждения ученых степеней, а ее автор, Нестеренко Максим Алексеевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.17 – Паразитология (биологические науки).

Официальный оппонент:  
ведущий научный сотрудник  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института эволюционной физиологии и  
биохимии им. И. М. Сеченова  
Российской академии наук  
(почтовый адрес: 194223, Россия,  
г. Санкт-Петербург, проспект Тореза, д. 44,  
Тел: (812) 552-79-01  
email: agorbushin@gmail.com

к.б.н.

«20» января 2023 г.

А.М. Горбушин



подпись руки А.М. Горбушина  
подпись канцелярии И.А. Аурманова  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук  
20.01.2023