

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе и
инновационной деятельности
Российского государственного
педагогического университета
им. А. И. Герцена,
доктор педагогических наук,
профессор,
член-корреспондент РАО

С. А. Писарева

« 12 » 01 20 23 г.



Отзыв

ведущей организации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена» на диссертацию Нестеренко Максима Алексеевича «Сравнительная и эволюционная транскриптомика разных фаз сложных жизненных циклов дигенетических сосальщиков», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.17. Паразитология (биологические науки) в диссертационный совет 24.1.026.01, созданный на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Зоологический институт Российской академии наук (ЗИН РАН)» по адресу: 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 1.

Актуальность темы. Сложный жизненный цикл трематод с чередованием амфимиктического и партеногенетического поколений является ярким примером формирования и функционирования различных фенотипов путем регуляции работы одного генома. Но несмотря на долгую историю изучения молекулярных основ реализации жизненных циклов дигеней, вопрос о вкладе отдельных генов в формирование фенотипа особей конкретного поколения практически не изучен. Набор генов, активных на различных этапах жизненного цикла, можно определить, анализируя их транскриптомы. Сравнение транскриптомов разных фаз жизненного цикла позволяет определить их «молекулярные подписи» - последовательности (генов, транскриптов или белков), которые могут быть использованы в качестве маркера фенотипа. Такой подход позволяет на новом уровне анализировать особенности адаптаций дигеней к хозяину, а также вносит вклад в понимание

эволюции жизненных циклов. Поэтому получение и анализ транскриптомов разных стадий жизненного цикла трематод новых видов, представляет огромный интерес как для эволюционной транскриптомими трематод, так и для паразитологии в целом.

Цель работы заключается в определении молекулярных основ реализации сложных жизненных циклов дигеней и возможных путей их становления в ходе эволюции. Для реализации заявленной цели автором были сформулированы четыре задачи, которые в целом отражают проделанную работу.

Научная новизна. В работе впервые получены «справочные» транскриптомы двух видов дигеней – *Sphaeridiotrema pseudoglobulus* и *Psilotrema simillimum*. Собранные транскриптомы являются первыми не только для двух исследуемых видов, но и для целого таксона Psilostomatidae. Автором впервые выполнен сравнительный транскриптомный анализ для редий, церкарий и марит представителей Psilostomatidae. Предпринята первая попытка обобщить представление о молекулярных подписях фаз сложного жизненного цикла дигеней. В работе впервые для дигеней использованы методы эволюционной транскриптомики. Предпринята одна из первых попыток реконструировать модели геномов последних общих предков плоских червей. Результаты сравнения реконструированных моделей геномов предков впервые применены в исследовании молекулярных основ эволюционного усложнения жизненного цикла последнего общего предка дигеней.

Теоретическая и практическая ценность работы. Полученные для *P. simillimum* и *S. pseudoglobulus* транскриптомные данные и результаты их анализа имеют важное значение для глубокого понимания молекулярных основ реализации сложных жизненных циклов Psilostomatidae. Разработанные модели и опубликованные по результатам работы материалы представляют значимость для специалистов разных областей, заинтересованных в исследовании эволюции как отдельных систем паразит-хозяин, так и сложных жизненных циклов.

С практической точки зрения, дигенеи *P. simillimum* и *S. pseudoglobulus*, представляют собой удобные и перспективные модели для исследования взаимоотношений в системе паразит-хозяин. В рамках представленной научной работы выполнен комплексный анализ ранее опубликованных геномных и транскриптомных данных разных видов дигеней. Полученные результаты ценны также для практической паразитологии. Сведения о наборах белков, характерных для фаз развития паразита, могут быть использованы для разработки мишеней для антигельминтных препаратов.

Степень достоверности результатов. В работе использованы стандартизированные методы пробоподготовки и секвенирования. Все образцы были выполнены в двух независимых биологических повторностях. Проведенный биоинформатический анализ содержит описание всех использованных методов и программ для анализа с указанием основных

параметров запуска. Все библиотеки прочтений образцов, полученные в ходе исследования, опубликованы в открытом доступе (Sequence Read Archive).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 159 страницах, имеет классическую структуру и включает введение, 4 главы, заключение, выводы, список литературы и 1 приложение. Объем основного текста диссертации составляет 135 страниц, включая 4 таблицы и 19 рисунков. Приложение содержит список библиотек коротких парных прочтений, использованных в исследовании. Список литературы включает 160 источников, из них - 9 на русском языке. Текст диссертации написан грамотно и несмотря на обилие специальной лексики легко читается. Единственное замечание к рукописи – небрежность в написании полных видов – в большинстве случаев название рода приводится сокращенно.

Характеристика работы.

Во *Введении* автор описывает теоретическую и практическую значимость работы, обосновывает её актуальность, а также отмечает научную новизну исследования. Здесь же приводятся основные положения, выносимые на защиту диссертации и формулируется цель и задачи исследования. В этом же разделе отражены методология исследования, апробация работы, объём и структура диссертации.

Глава 1 посвящена обзору литературы и насчитывает 27 страниц. Вначале автор поверхностно характеризует основные фазы жизненного цикла дигеней, взгляды на его природу, затем более подробно рассматриваются схемы реализации исследуемых жизненных циклов, но основное внимание в разделе оправданно уделяется анализу результатов, полученных с применением методов биоинформатики в отношении марит, партенит и личинок. Завершается глава изложением основ основ филостратиграфии и применения возрастных индексов транскриптомов в изучении жизненных циклов. В целом глава дает представление о современном состоянии изучаемой проблемы и основных подходах, используемых для ее решения.

В *Главе 2* подробно описаны материалы и методы, положенные в основу диссертационного исследования. Она дает полное впечатление о масштабе исследования и его основных этапах. Описаны сбор материала, экспериментальная часть работы, включающая лабораторное заражение, выделения РНК, подготовку библиотек для секвенирования и секвенирование. Также подробно описаны биоинформатические подходы: сборка транскриптомов, анализ уровней экспрессии, определение и аннотация белок-кодирующих последовательностей, поиск ортологичных последовательностей, реконструкция моделей геномов, филостратиграфический анализ наборов белков и др. Биоинформатический анализ выполнен с использованием языков программирования R и Python, а также специальных программ. В целом используемые методы соответствуют задачам исследования и полностью отвечают критерию воспроизводимости. Сведения о методах исследования обеспечивают полное доверие к достоверности полученных результатов. При этом не возникает сомнений в профессиональном владении автором методами.

Глава 3 включает 15 разделов, в которых последовательно изложены результаты исследования. Результаты описаны очень подробно, легко читаются и хорошо проиллюстрированы. В разделах, посвящённых анализу и сравнению полученных транскриптомов, а также выявлению компонентов молекулярных подписей различных фаз жизненного цикла дигеней, большое внимание уделено методической составляющей – анализу эффективности методов используемых для решения поставленных задач.

Глава 4 посвящена обсуждению полученных результатов. Так как автор во многом является первопроходцем в своей области исследования, в обсуждении содержится немного ссылок на работы других авторов. При этом обсуждение весьма плодотворное – автор критически анализирует полученные результаты, применённые методики и делает несколько серьёзных заключений. Глава начинается с рассмотрения сложностей изучения молекулярных основ реализации жизненного цикла дигеней. Как наиболее существенные затруднения автор отмечает относительность используемых для характеристик критериев, когда выбранная точка отсчёта (первоначально изученная стадия жизненного цикла и набор генов) влияет на получаемое представление о молекулярных подписях разных этапов жизненного цикла. Другое препятствие для получения объективной картины вклада генома в реализацию разных фаз жизненных циклов – разнообразие и пластичность циклов трематод. Полученные автором на представителях Psilostomatidae данные свидетельствуют о том, что большая часть белок-кодирующих генов работает на всех рассмотренных фазах жизненных циклов. Это означает, что изменение фенотипа в ходе жизненного цикла может быть связано не столько с изменением набора работающих генов, сколько с изменением уровней их экспрессии. В большинстве случаев количество генов со статистически значимым повышением уровня экспрессии не превышает 20% от молекулярной подписи фазы. В молекулярных подписях фаз присутствуют эволюционно консервативные модули, общие как для филогенетически близких, так и для отдалённых видов дигеней. Анализ обогащения терминов геной онтологии показал большой вклад в эволюцию геномов дигеней как дублированных, так и вновь появившихся генов. Последнее могло стать преадаптацией для усложнения жизненного цикла. При этом усложнение жизненного цикла вероятно потребовало не только добавления новых генов, но и согласования экспрессии генов их разных филострат.

Проведённый биоинформатический анализ позволил распределить практически все белок-кодирующие гены исследованных видов плоских червей по 15-ти филостратам. Использование информации о филостратиграфической аффилиации генов демонстрирует сложный филостратиграфический состав разных групп генов. Проведённый анализ относительных уровней экспрессии филострат доказал, что группы генов с разным филогенетическим происхождением изменяют активность на разных фазах сложного жизненного цикла.

Завершается диссертация *Заключением* и *Выводами*. В *Заключении* автор кратко проанализировал полученные результаты, а также

эффективность используемых в работе подходов и методов. При этом он критически оценил сложности, возникшие при проведении исследования и предложил перспективные пути их преодоления.

Апробация результатов. Результаты диссертации опубликованы в 10-ти статьях (из них 2 - в изданиях, рекомендованных ВАК), также представлены в докладах на 12-ти конференциях и семинарах.

Замечания.

Есть замечания к формулировке 1-ой и четвертой задач диссертации. В первом случае (задача получения транскриптомов) является скорее описанием этапа плана работ, а не отдельной задачей, так как именно анализ данных транскриптомов и осмысление полученных сведений представляет научную ценность. Во многом это замечание относится и к 4-ой задаче, которая в представленном виде скорее отражает методические подходы, которые автор планировал использовать для достижения результатов

В главе 1 не хватает подробного описания основных объектов исследования – *Sphaeridiotrema pseudoglobulus* и *Psilotrema simillimum* тем более, что они не являются распространенными моделями для экспериментальных работ. В тексте диссертации отсутствуют даже полные названия этих видов.

К сожалению, в главе 2 недостаточно подробно описана пробоподготовка. Например, как очищали редий от тканей моллюска, или марит от содержимого кишечника, пытались ли избежать контаминации, которая существенно влияет на результаты таких исследований? Отмечено, что для выявления контаминаций были использованы справочные транскриптомы битиний и сборка генома банкивской курицы. Однако в результатах не указано, была ли выявлена контаминация, и насколько существенной она была.

В обсуждении при сравнении транскриптомов разных фаз жизненного цикла трематод автор сфокусировал внимание только на белок-кодирующих генах с заметными уровнями экспрессии, объясняя это тем, что белки участвуют в подавляющем большинстве биологических процессов. Однако общеизвестно, что именно РНК участвуют в регуляции работы генома. Соответственно, изучение изменения активности генов, обнаружение регуляторов генной активности может дать общее представление о направлении процессов дифференцировки в ходе развития. Поэтому, игнорируя некодирующие белки РНК, можно упустить самое важное. Не сомневаюсь, что у автора были причины сделать такое отсечение. Возможно, методические трудности. Желательно было бы это объяснить.

Есть замечания к Выводам. Так вывод 1 скорее таковым не является. Уже во введении и в литературном обзоре автор отмечает, что понятие молекулярной подписи уже сложилось. Следовательно, у каждой фазы жизненного цикла она своя. Скорее следовало бы отметить, что полученные автором данные подтвердили справедливость использования такой характеристики для исследуемых объектов. Выводы 2 и 4 не являются

самостоятельными, так как непонятно, они посвящены исследуемым видам или трематодам в целом?

Отмеченные недостатки диссертации во многом обусловлены поисковым характером исследования. Автору пришлось одному из первых излагать оригинальные результаты, адаптируя сложившуюся в зарубежной литературе лексику на русский язык.

Заключение. Диссертация Нестеренко Максима Алексеевича «Сравнительная и эволюционная транскриптомика разных фаз сложных жизненных циклов дигенетических сосальщиков», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком профессиональном уровне, и отвечает паспорту специальности 1.5.17. Паразитология.

Автореферат и 10 публикаций полностью соответствуют содержанию диссертационной работы. По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует требованиям положения «О порядке присуждения учёных степеней» от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Нестеренко Максим Алексеевич, достоин присуждения искомой степени по специальности 1.5.17. Паразитология (биологические науки).

Отзыв на диссертацию Нестеренко Максима Алексеевича «Сравнительная и эволюционная транскриптомика разных фаз сложных жизненных циклов дигенетических сосальщиков» подготовлен доцентом кафедры зоологии и генетики РГПУ им. А. И. Герцена, кандидатом биологических наук, доцентом Прохоровой Еленой Евгеньевной.

Отзыв обсуждён и утверждён заседании кафедры зоологии и генетики. Присутствовало на заседании 18 человек. Результаты голосования: «за» – 18 человек, «против» – 00 (протокол заседания № 4 от 7.12.2022 г.).

Заведующий кафедрой зоологии и генетики
РГПУ им. А.И. Герцена
доктор биологических наук, профессор

Г. Л. Атаев

Доцент кафедры зоологии и генетики
РГПУ им. А. И. Герцена
кандидат биологических наук, доцент

Е. Е. Прохорова

e-mail: elenne@mail.ru
eprokhorova@herzen.spb.ru
Телефон: +7 (812) 571-23-46
191186, Санкт-Петербург,
набережная реки Мойки, д. 48

«Подпись руки Г. Л. Атаева заверяю»

А.А. Лактионов
К. Б. И.
и аттестован
кадров высшей
преподавания