

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.026.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ),
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 21 февраля 2023 г. № 1

О присуждении Нестеренко Максиму Алексеевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Сравнительная и эволюционная транскриптомика разных фаз сложных жизненных циклов дигенетических сосальщиков» по специальности 1.5.17. Паразитология принята к защите 26 сентября 2022 г. (протокол заседания № 6) диссертационным советом 24.1.026.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1, приказ № 105/нк от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Нестеренко Максим Алексеевич, 21 сентября 1994 года рождения, в 2018 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» по направлению «Биология», специализация «Зоология, гидробиология, паразитология, энтомология» с присвоением квалификации «Магистр». В 2022 г. окончил аспирантуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» по направлению 06.06.01 Биологические науки, с присвоением квалификации

«Исследователь. Преподаватель-исследователь». Работает младшим научным сотрудником лаборатории протеомики надорганизменных систем в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.

Диссертация выполнена на кафедре Зоологии беспозвоночных Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Правительство Российской Федерации.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, Старунов Виктор Вячеславович, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Зоологический институт Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории эволюционной морфологии.

Официальные оппоненты:

Спирidonov Сергей Эдуардович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, заведующий лабораторией систематики и эволюции паразитов, главный научный сотрудник,

Горбушин Александр Михайлович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, ведущий научный сотрудник,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», г. Санкт-Петербург, в своем положительном отзыве, подготовленном доцентом кафедры зоологии и генетики, кандидатом биологических наук, доцентом Прохоровой Еленой Евгеньевной, подписанном заведующим кафедрой зоологии и генетики, доктором биологических наук, профессором Атаевым Геннадием Леонидовичем и

утвержденном проректором по научной работе и инновационной деятельности, доктором педагогических наук, профессором, членом-корреспондентом РАО Писаревой Светланой Анатольевной указала, что «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, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует требованиям положения «О порядке присуждения ученых 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)». Тем не менее, в отзыве есть ряд замечаний. Отмечено, что «единственное замечание к рукописи – небрежность в написании полных видов – в большинстве случаев название рода приводится сокращенно». Помимо этого, есть замечания к формулировке первой и четвертой задач диссертации. Указано, что первая задача «является скорее описанием этапа плана работ, а не отдельной задачей», а четвертая задача «в представленном виде скорее отражает методические подходы, которые автор планировал использовать для достижения результатов». Отмечено, что в главе 1 не хватает подробного описания основных объектов исследования – *Sphaeridiotrema pseudoglobulus* и *Psilotrema simillimum*. Высказано замечание, что «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 контаминации были использованы справочные транскриптомы битиний и сборка генома банкивской

курицы. Однако в результатах не указано, была ли выявлена контаминация, и насколько существенной она была». Отдельное замечание касается того, что «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». Высказаны замечания и 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?». Тем не менее, в отзыве указано, что «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».

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 10 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 2 работы. Объем работ по теме диссертации составляет 3.34 печатных листов, опубликованных в рецензируемых научных изданиях - 2.75 печатных листов. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах в диссертации отсутствуют. Авторский вклад в опубликованные в соавторстве научные работы составляют не менее 75%.

Наиболее значительные работы по теме диссертации:

Nesterenko M. A. Molecular signatures of the rediae, cercariae and adult stages in

the complex life cycles of parasitic flatworms (Digenea: Psilostomatidae) / M. A. Nesterenko, V. V. Starunov, S. V. Shchenkov, A. R. Maslova, S. A. Denisova, A. I. Granovich, A. A. Dobrovolskij, K. V. Khalturin // *Parasites & Vectors*. – 2020. – Vol. 13. – №. 1. – P. 1–21.

Nesterenko M. The digenean complex life cycle: phylostratigraphy analysis of the molecular signatures / M. Nesterenko, S. Shchenkov, S. Denisova, V. Starunov // *Biological Communications*. – 2022. – Vol. 67. – №. 2. – P. 65–87.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1) д.б.н. В.А. Мордвинова, ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, 2) д.б.н. А.И. Грановича, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 3) к.б.н. К.Е. Николаева, ФГБУН Зоологический институт РАН, 4) к.б.н. А.А. Лобова, ФГБУН Институт цитологии РАН, 5) к.б.н. А.А. Мирянова, ФГБУН Зоологический институт РАН, 6) к.б.н. Е.А. Водясовой, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», 7) к.б.н. Е.В. Дмитриевой и к.б.н. Ю.М. Корнийчук, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», 8) к.б.н. Д.Ю. Крупенко, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 9) к.б.н. И.А. Левакина, ФГБУН Зоологический институт РАН.

Всего поступило 9 отзывов из 5 организаций. Все отзывы положительные. Отзывы подписали 2 докторов и 8 кандидатов наук. Из них 5 отзывов без замечаний и 4 с замечаниями, вопросами и рекомендациями. В отзыве к.б.н. К.Е. Николаева высказано замечание, что в разделе степень разработанности темы исследования Введения ссылки на исследования следовало привести непосредственно в приведенном списке видов трематод, для которых проведены сравнительные исследования транскриптомов. В отзыве к.б.н. А.А. Лобова заданы вопросы, касающиеся природы обнаруженных различий между *P. simillimum* и *S. pseudoglobulus* в количестве уникальных генов для каждой стадии жизненных циклов. В отзыве к.б.н. Е.А. Водясовой высказано замечание, что во втором положении, выносимом на защиту, следовало опустить утверждение, что

повышенная экспрессия генов соответствует активности биологических процессов, характерных для рассматриваемых фаз жизненных циклов, так как это известный факт; отмечается, что анализировать общие и специфичные экспрессирующиеся гены для *Sphaeridiotrema pseudoglobulus* не имеет смысла ввиду возможного наличия дубликаций генов; заданы вопросы, касающиеся проверки сборки транскриптома *Fasciola gigantica* на возможность исключения в связи с большим числом дубликатов однокопийных ортологов, а также оснований выбора порогового значения экспрессии для классификации активных генов и различий в результатах кластеризации редий при рассмотрении молекулярной подписи и повышенной экспрессии генов. В отзыве к.б.н. Д.Ю. Крупенко задан вопрос, касающийся корректности выделения при анализе групп «редиидных» и «спороцистоидных» трематод с учетом множества признаков, по которым различаются виды, включенные в эти группы. Ответы на замечания содержатся в стенограмме заседания совета.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты и сотрудники ведущей организации – известные российские ученые, исследующие проблемы паразитологии и эволюционной биологии, имеющие научные труды по указанной проблематике в рецензируемых научных изданиях (оппонент д.б.н. С.Э. Спиридонов – специалист по паразитическим червям; оппонент к.б.н. А.М. Горбушин – специалист в области сравнительной транскриптомики и эволюции иммунных систем беспозвоночных животных).

Ведущая организация является крупным образовательным и исследовательским центром в области фундаментальных биологических исследований, в том числе – исследований в области паразитологии. Сотрудник, подготовивший отзыв ведущей организации, к.б.н. Е.Е. Прохорова – признанный специалист в области сравнительной иммунологии и популяционной генетики, исследующий молекулярные основы защитных реакций моллюсков при трематодной инвазии.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Установлено, что в ходе реализации сложных жизненных циклов дигеней происходит согласованное изменение экспрессии многих белок-кодирующих генов, что приводит к формированию фазо-специфичных «молекулярных подписей»; **разработаны** методы эволюционной транскриптомики в исследованиях дигеней; **показано**, что в состав «молекулярной подписи» каждой из рассмотренных фаз сложного жизненного цикла дигеней включены белок-кодирующие гены, активные как на одном, так и нескольких этапах жизненного цикла; **обнаружено** сходство «молекулярных подписей» фаз как во внутривидовом, так и межвидовом сравнении, указывающее на сходство клеточного состава паразитов на разных фазах цикла и/или условий, воздействующих на их организм; **выявлено** преобладание в реконструированной модели генома последнего общего предка дигеней числа появившихся белок-кодирующих генов над числом дублицированных генов; **предложена** гипотеза о том, что возникновение новых белок-кодирующих генов было основным направлением эволюционной трансформации генома последнего общего предка дигеней; **доказано**, что в пределах одного сложного жизненного цикла дигеней фазы статистически значимо различаются по вкладам в их «молекулярные подписи» групп генов с разным филогенетическим происхождением; **введено** понятие фазово-специфичной молекулярной подписи сложного жизненного цикла дигеней.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:
доказано, что «молекулярная подпись» фазы сложного жизненного цикла дигеней представляет собой уникальный набор белок-кодирующих генов, обладающих заметным уровнем экспрессии на рассматриваемом этапе реализации жизненного цикла; впервые для представителей таксона Psilostomatidae **описаны** транскриптомы редий, церкарий и марит; **определены** биологические процессы, в которых принимают участие белок-кодирующие гены, появившиеся у последнего общего предка дигенетических сосальщиков; **определены и описаны**

статистически значимые различия во вкладах групп генов с разным филогенетическим происхождением в «молекулярные подписи» фаз сложных жизненных циклов этих паразитов. Полученные результаты вносят вклад в расширение представлений о характере эволюционного усложнения жизненного цикла последнего общего предка дигеней. Исследование молекулярных основ реализации их сложного жизненного цикла предлагает новый взгляд на проблему формирования множества контрастных фенотипов фаз путем регуляции единого генома.

Применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов) использован комплекс лабораторных и биоинформатических методов исследования, включающих как частичную постановку сложного жизненного цикла паразита в лабораторных условиях и выделение образцов транскриптомов фаз, так и современные методы биоинформатики, в том числе построение модели генома последнего общего предка таксона, филостратиграфию и эволюционную транскриптомику; **изложен** комплексный подход к биоинформатическому анализу геномных и транскриптомных данных дигенетических сосальщиков и интерпретации полученных результатов; **изучены** транскриптомы 7 видов дигеней, относящихся к 3 семействам.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и опубликованы методы филостратиграфии и эволюционной транскриптомики для анализа данных по дигенетическим сосальщикам; **представлены** перспективные модели для исследования взаимоотношений в системе паразит-хозяин; **определены** как сходства, так и различия в наборах активных генов между фазами сложного жизненного цикла дигеней; расширен круг видов дигеней, для которых **выявлены** наборы генов, потенциально кодирующих секреторные белки, что может быть использовано для разработки мишеней для лекарственных препаратов; **адаптированы** методы сравнительной и эволюционной транскриптомики для исследования сложных жизненных циклов;

создана основа для дальнейших исследований, посвященных секвенированию и анализу транскриптомов отдельных клеток, формирующих организм контрастных фаз сложного жизненного цикла дигеней, и применению методов эволюционной транскриптомики в анализе полученных данных.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ: в исследовании использованы стандартизированные методы пробоподготовки и секвенирования, все образцы транскриптомов фаз были собраны в двух независимых биологических повторностях; проведенный автором биоинформатический анализ транскриптомных данных сопровождается подробным описанием всех использованных методов и программ для анализа с указанием версий программ и основных параметров запуска; в тексте диссертации также приведена ссылка на репозиторий GitHub, где хранятся программы, написанные соискателем и использованные в исследовании; все библиотеки коротких парных прочтений образцов транскриптомов представителей Psilostomatidae, полученные в ходе исследования, опубликованы в открытом доступе в архиве прочтений последовательностей (Sequence Read Archive, SRA) национального центра биотехнологической информации США NCBI и доступны для повторного исследования. **Теоретическая часть диссертации** построена на проверяемых данных и согласуется с опубликованными материалами по теме диссертации; **идеи** соискателя **базируются** на анализе обширного списка транскриптомных данных филогенетически близких и отдаленных видов дигеней, их тщательном обобщении и оценке всех современных сведений по геномике и транскриптомике дигенетических сосальщиков; **использованы** оригинальные данные, которые были получены в ходе исследования автора, с проведением сравнения с ранее полученными другими авторами транскриптомными и геномными данными для дигеней; **установлено** качественное совпадение результатов соискателя с современными данными, представленными в независимых источниках по исследованию молекулярных основ реализации сложных жизненных циклов дигеней; соискателем **использованы** разнообразные современные методы

биоинформатического анализа транскриптомных данных.

Личный вклад соискателя состоит в его непосредственном участии во всех этапах исследований – от сбора материала и его первичной обработки до получения результатов. Соискателем самостоятельно осуществлялся полевой сбор материала и на профессиональном уровне освоены все методы, используемые в работе. Тщательный анализ полученных данных и сопоставление собственных результатов с литературными сведениями выполнены соискателем лично. Во всех совместных публикациях соискателю принадлежит ведущая роль как в получении данных, так и в подготовке рукописей.

В ходе защиты диссертации были заданы вопросы о том, как отразится на результатах транскриптомного анализа замена экспериментального хозяина на природного; можно ли на основании проведенных исследований предположить, какая фаза была первичной в сложном жизненном цикле дигеней; сколько геномов трематод к настоящему времени секвенировано; можно ли использовать в анализе некодирующую ДНК, и есть ли различия в присутствии транспозонов в исследованных геномах; почему для исследования не были выбраны трематоды из разных семейств и с различающимися жизненными циклами. Критических замечаний соискателю высказано не было.

Соискатель Нестеренко М.А. ответил на заданные ему в ходе заседания вопросы и пояснил, что транскриптом отражает состояние системы, поэтому любые изменения в дизайне эксперимента повлияют и на транскриптом. Соискатель привел собственную аргументацию, почему определить порядок появления фаз в жизненном цикле последнего общего предка дигеней, основываясь исключительно на результатах эволюционной транскриптомики, в настоящий момент затруднительно. Соискатель ответил, что для дигеней доступно более 10 геномов, но размеры геномов и качество сборки последовательностей сильно варьируют, в том числе из-за наличия большого числа повторов, включающих мобильные элементы. Соискатель объяснил, что ключевыми факторами для выбора видов дигеней для исследования стали

возможность постановки жизненного цикла в лабораторных условиях и наличие различий в общих схемах реализации жизненных циклов у филогенетически близких видов дигеней.

На заседании 21 февраля 2023 г. диссертационный совет принял решение – за решение научной задачи, имеющей значение для развития паразитологии, присудить Нестеренко М.А. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 9 докторов наук по специальности 1.5.17. Паразитология, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту – нет, проголосовали: за – 16, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель

диссертационного совета



Пугачев Олег Николаевич

Ученый секретарь

диссертационного совета



Ахметова Лилия Агдасовна

22 февраля 2023 г.

