

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Богомолова Антона Геннадьевича «Разработка метода визуализации хромосомоспецифичных последовательностей ДНК при проведении FISH», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

Актуальность исследования

Одним из перспективных методов современной цитогенетики является метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), который в настоящее время находит широкое применение в молекулярно-цитогенетических исследованиях хромосом, в том числе для диагностики хромосомных патологий человека. Однако присутствие большого количества диспергированных повторяющихся последовательностей ДНК в хромосомах эукариот является серьезной проблемой при анализе и интерпретации результатов FISH. Поэтому для определения сигналов хромосомоспецифичных последовательностей ДНК при проведении FISH требуется подавление флуоресцентных сигналов, исходящих от диспергированных повторяющихся последовательностей ДНК. Отчасти эта проблема решается с помощью супрессионной гибридизации *in situ* (CISS-гибридизация). Однако этот трудоемкий и дорогостоящий метод имеет ряд ограничений, снижающих его эффективность при исследовании хромосом у видов, с высоким содержанием диспергированных повторенных последовательностей, особенно, если размер их генома существенно превышает размер генома человека.

Таким образом, для определения сигналов хромосомоспецифичных последовательностей ДНК актуальной задачей является разработка альтернативных подходов к элиминации гибридизационного сигнала повторяющихся последовательностей. В данной диссертационной работе эта задача решается с помощью компьютерной обработки FISH-изображений.

Научная новизна и практическая значимость работы и полученных результатов

Автор диссертации разработал оригинальный компьютерный метод VISSIS, неоспоримым преимуществом которого является то, что он позволяет выделить сигналы хромосомоспецифичных последовательностей без проведения предварительной супрессии гибридизации повторяющихся последовательностей. Кроме того, метод

позволяет улучшить результаты CISS-гибридизации и снизить стоимость проведения анализа. Разработанный метод апробирован для идентификации целых хромосом и крупных хромосомных районов у 19 видов саранчовых, в геноме которых ранее не удавалось идентифицировать хромосомоспецифичные последовательности ДНК из-за большого количества диспергированных повторяющихся последовательностей ДНК в их геномах.

Структура и общая характеристика диссертационной работы

Объём диссертации составляет 139 страниц машинописного текста, включая 34 рисунка и 12 таблиц. Диссертация построена по классической схеме и состоит из списка сокращений, введения, трех глав, содержащих обзор литературы (глава 1), описания разработанного метода (глава 2) и результатов его апробации (глава 3), заключения, выводов и списка литературных источников, содержащего 189 ссылок.

Введение содержит все основные разделы, предусмотренные требованиями Министерства образования РФ относительно оформления рукописи. Представлено обоснование актуальности темы диссертационной работы. Корректно и однозначно сформулированы цель и задачи исследования. Обозначена теоретическая и практическая значимость работы и её научная новизна. Представлены необходимые сведения в подразделах: «Основные положения, выносимые на защиту»; «Апробация работы и публикации»; «Объем и структура диссертации» и «Личный вклад автора».

Первая глава диссертации содержит обзор литературы, в котором проведен всесторонний анализ данных в области флуоресцентной гибридной нуклеиновых кислот *in situ*, описаны типы ДНК-проб и их применение. Обозначена проблема идентификации материала хромосом и хромосомных районов, обусловленная наличием большого количества повторяющихся последовательностей ДНК в хромосомах эукариот. Описаны экспериментальные методы выявления специфичного FISH-сигнала ДНК-проб, полученных из целых хромосом или хромосомных районов. Рассмотрены компьютерные технологии, нацеленные на решение проблемы исключения сигнала повторяющихся последовательностей с помощью цифровой обработки FISH-изображений. В заключение первой главы отмечается, что задача идентификации материала целых хромосом и крупных хромосомных районов у видов, размер генома которых в несколько раз превышает размер генома человека и характеризуется большим количеством до сих пор остающейся нерешенной. Здесь автор диссертации суммирует ограничения и недостатки существующих подходов и формулирует цель исследования.

Вторая глава диссертации посвящена разработке оригинального компьютерного метода визуализации хромосомспецифичных последовательностей ДНК VISSIS (*Visualization of Specific Signal In Silico*) на основе анализа сигналов, продуцируемых хромосомспецифичными последовательностями ДНК при проведении двухцветной FISH ДНК-проб, полученных из целых хромосом или хромосомных районов. Здесь автор излагает идею метода, детально описывает этапы и алгоритмы цифровой обработки изображений, включая сегментацию изображения, классификацию объектов, калибровку интенсивностей сигналов и выделение специфичного сигнала. Все этапы обработки изображений наглядно проиллюстрированы фотографиями, схемами и рисунками, что облегчает восприятие представленного материала. Важной особенностью метода VISSIS является то, что он снижает или полностью исключает интенсивность сигналов, обусловленных гибридизацией диспергированных повторяющихся последовательностей, на всех хромосомах и, кроме того, его использование не зависит от субъективного мнения исследователя и не требует ручной настройки для определения сигналов хромосомспецифичных последовательностей ДНК.

Метод VISSIS реализован в виде программы VisualCS, позволяющей визуализировать сигнал хромосомспецифичных последовательностей ДНК при проведении FISH. Краткое описание работы программы представлено в заключительном параграфе главы 2.

В третьей главе диссертации представлены результаты апробации разработанного метода для анализа набора изображений хромосом человека, описторхид и саранчовых, геномы которых значительно различаются как по размеру, так и по доле повторяющихся последовательностей. При этом все наиболее существенные результаты диссертационной работы Богомоллова А.Г. являются абсолютно новыми.

Во-первых, показано, что разработанный метод может использоваться для уменьшения требуемого объема Cot-1 ДНК в ходе проведения FISH-диагностики и тем самым может снизить стоимость проведения диагностики хромосомных патологий человека.

Во-вторых, полученные результаты подтвердили возможность идентифицировать хромосомы человека без супрессии гибридизации повторяющихся последовательностей. При этом рекомендованы пары хромосом человека для проведения двухцветной FISH без супрессии гибридизации повторяющихся последовательностей для достижения максимальной эффективности компьютерной обработки методом VISSIS.

В-третьих, сравнение результатов анализа FISH-изображений, полученных в результате CISS-гибридизации и методом VISSIS показало, что использование компьютерных методов идентификации хромосомного материала является наиболее перспективным у тех видов, для которых CISS-гибридизация не дает удовлетворительных результатов, или в принципе не может быть проведена.

В-четвертых, с помощью метода VISSIS впервые удалось идентифицировать гомологичные (и частично гомологичные) районы хромосом (половых хромосом) у саранчовых, геном которых по размеру в несколько раз превышает геном человека.

Полученные результаты имеют не только теоретическое, но и практическое значение. Действительно, использование компьютерного анализа позволяет исключить стадию супрессии гибридизации повторяющихся последовательностей при проведении FISH и тем самым расширить применение FISH в исследованиях по сравнительной цитогенетике и геномике, а также удешевить метод молекулярно-цитогенетической диагностики хромосомных патологий и онкологических заболеваний человека.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Положения, выносимые на защиту, согласуются с данными, представленными в диссертационной работе. Выводы обоснованы и являются логическим завершением диссертационной работы.

Замечания

Диссертационная работа А.Г. Богомолова производит хорошее впечатление, выполнена на высоком профессиональном уровне и не дает повода для серьезных критических замечаний. Среди незначительных замечаний можно отметить, наличие опечаток и неточности в употреблении терминов.

Заключение

В целом, следует высоко оценить диссертационную работу Богомолова Антона Геннадьевича. Она является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для развития исследований в области молекулярной цитогенетики хромосом. Новизна и значимость представленной работы не вызывают сомнений. Основные результаты и выводы исследования сформулированы ясно и убедительно, являются обоснованными и логически подводят итог проведенного исследования. Автореферат адекватно и полно отражает содержание работы. Материал диссертации соответствует указанной специальности. Диссертация

апробирована на многих российских и международных научных конференциях. Все основные результаты полно представлены в работах соискателя, опубликованных в авторитетных изданиях, в том числе в пяти журналах из списка ВАК, индексируемых в Web of Science и Scopus.

Таким образом, диссертационная работа Богомолова А.Г. полностью соответствует всем требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика», а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук по специальности

03.00.03 - молекулярная биология

заведующий теоретическим отделом



Бажан Сергей Иванович

06.05.2019

р.т. +7 (383) 363-47-00 вн. номер 2001,

e-mail: bazhan@vector.nsc.ru

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора)

Почтовый адрес: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Телефоны: 8(383)-3634710, 8(383)-3366010;

Факс: 8(383)-3367409;

E-mail: vector@vector.nsc.ru

web-сайт: <http://www.vector.nsc.ru>

Подпись заведующего отделом, д.б.н. С.И. Бажана заверяю:

Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Начальник отдела кадров

6 мая 2019 г.



И.В. Ильин