

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата химических наук, доцента Семенова Дмитрия Владимировича на диссертацию Овчинникова Владимира Юрьевича «микроРНК трематод семейства *Opisthorchiidae*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Диссертационная работа Овчинникова Владимира Юрьевича посвящена идентификации и функциональной аннотации микроРНК паразитических плоских червей *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*. **Актуальность** темы диссертационной работы обусловлена в первую очередь биологическим объектом исследования, так как описторхиды являются распространенными облигатными паразитами и вызывают тяжелые поражения печени у млекопитающих, включая человека. Кроме того, в настоящее время микроРНК и микроРНК-подобные формы рассматривают как одни из важнейших представителей класса малых некодирующих РНК, вовлеченных в регуляцию транскрипции, трансляции и множества других жизненно-важных процессов в многоклеточных организмах. Поэтому, результаты исследования микроРНК трематод семейства *Opisthorchiidae*, представленные в диссертационной работе Овчинникова В.Ю., важны и для понимания механизмов трематодозов, и для разработки новых, современных методов диагностики, профилактики и терапии таких заболеваний.

Основные научные результаты диссертационной работы Овчинникова В.Ю. связаны с комплексным анализом микроРНК описторхид. Для идентификации микроРНК было проведено высокопроизводительное секвенирование кДНК-библиотек малых РНК *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis* на платформе SOLiD. Данные высокопроизводительного секвенирования содержат информацию о нуклеотидных последовательностях более чем 52 млн индивидуальных форм малых РНК описторхид. Результаты высокопроизводительного секвенирования депонированы в международную базу данных BioProject Национального центра биоинформатики США и могут быть использованы для независимого анализа.

Овчинниковым В.Ю. проведен комплексный биоинформатический анализ результатов секвенирования с использованием референсных последовательностей ДНК и РНК трематод, а также данных об известных микроРНК животных. В результате биоинформатического анализа Владимир Юрьевич идентифицировал 55 известных ранее, консервативных микроРНК, принадлежащих к 34 семействам, и одну новую микроРНК, не описанную для *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*.

Анализ генов, кодирующих микроРНК описторхид, позволил Овчинникову В.Ю. выявить и описать четыре кластера генов микроРНК и 3 интронных микроРНК. В

диссертационной работе представлен сравнительный анализ особенностей организации генов микроРНК не только трематод, но и всего таксона первичноротых. При этом было установлено, что большая часть генов микроРНК трематод *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* расположена в областях генома, которые не аннотированы как белок-кодирующие гены, и не образует кластеры.

Сравнительный анализ представленности отдельных форм микроРНК в организме *O. felineus* позволил Овчинникову В.Ю. заключить, что экспрессия микроРНК miR-76, -993 и -2160a характерна для метцеркария, но слабо выражена у половозрелых особей описторхид, что позволяет рассматривать эти микроРНК в качестве “стадия-специфических” РНК.

С использованием трех независимых методов, реализованных в программных пакетах RNAhybrid, PITA и TargetScan, был проведен поиск потенциальных мРНК мишеней, трансляция и стабильность которых модулируется выявленными в работе микроРНК. Текстовый анализ биологических функций белков, кодируемых мРНК-мишенями микроРНК, позволил сделать заключение, о том что микроРНК описторхид вовлечены в основном в регуляцию метаболических процессов.

Результаты диссертационной работы Владимира Юрьевича Овчинникова подтверждены представленными экспериментальными данными и детальным анализом актуальных данных литературы. Результаты диссертационной работы представлены на четырех международных конференциях. По результатам работы опубликовано три статьи в рецензируемых международных научных изданиях. В целом, достоверность, новизна и научная ценность результатов диссертационной работы не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Овчинникова Владимира Юрьевича изложена на 222 страницах и содержит следующие разделы: “Введение”; “Обзор литературы”; “Материалы и методы”; “Результаты исследования”; “Обсуждение”; “Заключение”; “Выводы”; “Список сокращений и условных обозначений”; “Словарь терминов”; “Список используемой литературы” (232 источника) и “Приложения”. Работа включает 6 таблиц, 30 рисунков и 16 приложений.

В разделе **Введение** представлено обоснование актуальности исследования микроРНК паразитических плоских червей *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* с учетом современных данных о тяжести и распространенности заболеваний, вызываемых гельминтами, а также с указанием значимости участия микроРНК в регуляции процессов экспрессии генов в организме паразита, и в процессах взаимодействия “паразит-хозяин”. Корректно и однозначно сформулированы цель и задачи исследования. Обозначена

теоретическая и практическая значимость работы и её научная новизна. Представлены необходимые сведения в подразделах: “Положения, выносимые на защиту”; “Апробация результатов”; “Вклад автора” и “Структура и объем работы”.

В разделе **Обзор литературы** приведена детальная характеристика описторхид и рассмотрены современные данные о положении описторхид в систематике, их строении, жизненном цикле и распространенности этих организмов. Представлены сведения о патогенезе, диагностике и терапии описторхоза. Отдельная часть обзора посвящена анализу современных данных о микроРНК и генах, кодирующих микроРНК. В этой части работы Овчинников В.Ю. провел анализ актуальных данных об эволюции генов и биогенезе микроРНК, а также о механизмах регуляции экспрессии генов с участием микроРНК.

Важной частью Обзора литературы, которая раскрывает актуальность экспериментальных данных диссертационной работы, является подраздел “Методы выявления микроРНК и генов микроРНК”. В подразделе описаны современные подходы к идентификации новых микроРНК животных и определению их потенциальных мРНК-мишеней, кроме того перечислены и систематизированы современные данные об известных микроРНК плоских червей.

Обзор литературы составлен с использованием актуальных источников, хорошо иллюстрирован, написан понятно и легко читается.

В главе **Материалы и методы** подробно описан освоенный автором набор молекулярно-биологических и биоинформатических методов и подходов. Реализация современного подхода к выявлению и детальному описанию многообразия микроРНК описторхид высокоэффективным секвенированием на платформе SOLiD, использование связанных с высокоэффективным секвенированием РНК экспериментальных и биоинформатических методов свидетельствует о высокой квалификации автора.

В главе **Результаты исследования** представлено описание первичных данных и результатов биоинформатического анализа высокоэффективного секвенирования малых РНК *O. felinus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*. Овчинниковым В.Ю. подробно описаны особенности организации генов микроРНК, при этом особое внимание уделено анализу кластеров генов микроРНК плоских червей в свете современных данных об организации генов микроРНК всего таксона первичноротых. Выявлены 55 консервативных микроРНК, принадлежащих к 34 семействам. Установлено, что в наборах РНК исследуемых описторхид отсутствуют представители четырех консервативных семейств микроРНК.

Установлено также, что экспрессия трех микроРНК характерна только для половозрелых описторхов *O. felineus*.

В разделе **Обсуждение** Овчинниковым В.Ю. представлен расширенный анализ полученных результатов и данных литературы, направленный на поиск фундаментальных закономерностей организации генов, кодирующих микроРНК описторхид. Высказан ряд обоснованных предположений о функциях микроРНК в регуляции жизненного цикла паразитов и в процессах взаимодействия “паразит-хозяин”.

Замечания:

1. Важно указать точное количество генов микроРНК, которые образуют или не образуют кластеры, располагаются или не располагаются в экзонах или интронах других генов описторхид.

2. При обсуждении результатов работы необходимо представить количественные характеристики “схожести репертуаров” микроРНК трематод *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*.

3. В тексте работы есть ряд опечаток и неудачных формулировок как-то: “микроРНК обладают кластером”; “профили экспрессии предсказанных микроРНК взрослых червей трех видов описторхид очень похожи”; “микроРНК расположены в интронах” и ряд других.

Указанные замечания носят дискуссионный характер и не снижают ценности полученных результатов, актуальности, фундаментальной и практической значимости диссертационной работы Овчинникова Владимира Юрьевича.

Заключение: диссертационная работа Овчинникова Владимира Юрьевича «микроРНК трематод семейства Opisthorchiidae», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика, представляет собой законченное исследование, выполненное современными методами. В диссертации представлены новые данные, имеющие существенное значение для получения фундаментальных знаний о структуре и функциях микроРНК животных, а также для создания новых подходов к диагностике, терапии и профилактике заболеваний, вызываемых описторхидами.

По актуальности темы, новизне полученных результатов и их теоретической значимости диссертационная работа Овчинникова В.Ю. полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, критериям п. 9

«Положения о порядке присуждении ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор, Овчинников Владимир Юрьевич, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.07 – генетика».

Старший научный сотрудник
Лаборатории биотехнологии
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН)
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 8

Д.В. Семенов

к.х.н., доцент

<http://www.niboch.nsc.ru/>
semenov@niboch.nsc.ru

7(383)3635189

Подпись Семенова Д.В. заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН



П.Е. Пестряков