

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ
БИОЛОГИИ**

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИМКБ СО РАН)

пр. Академика Лаврентьева, д. 8/2, Новосибирск, 630090
телефон (383) 3639042, факс (383) 3639078
e-mail: info@mcb.nsc.ru

<http://www.mcb.nsc.ru>

ОКПО 30781167, ОГРН 1115476157070,
ИНН / КПП 5408291757 / 540801001



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИМКБ СО РАН

д.б.н. С.А. Демаков

«7» июня 2021 г.

7.06.2021 № 15318 - 06-0215
На № _____ от _____

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию **Пирожковой Дарьи Сергеевны**
«Структурно-функциональная организация генов сапозин В-подобных белков у
описторхид», представленную на соискание учёной степени
кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «генетика»

Актуальность темы исследования

Точные молекулярные механизмы действия лекарств (в частности празиквантела), применяемых для лечения описторхоза, пока что окончательно не выяснены. Кроме того, существует риск снижения чувствительности паразитов к этим лекарственным препаратам. Учитывая высокую долю описторхоза в структуре биогельминтозов на территории Российской Федерации, разработка новых методов лечения, а также диагностики и вакцинной профилактики этого заболевания является актуальной задачей, для решения которой, в свою очередь, требуется доскональное понимание особенностей биологии описторхид. Имеющиеся литературные данные указывают на то, что сапозин В-подобные белки, обладающие способностью взаимодействовать с липофильными молекулами, могут входить в состав экскреторно-секреторного продукта описторхид и, соответственно, участвовать во взаимодействии паразита и хозяина. Однако сведения о количестве и разнообразии таких белков у описторхид чрезвычайно фрагментарны. В этой

связи диссертационная работа Пирожковой Д.С., посвящённая выявлению генов описторхид, кодирующих сапозин В-подобные белки, анализу структурно-функциональной организации этих генов и их паттернов экспрессии, безусловно, является актуальным и важным исследованием.

Научная значимость и новизна научных результатов

В представленной работе впервые установлено существование трёх групп генов-ортологов, кодирующих сапозин В-подобные белки, в геномах описторхид *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* и *Metorchis orientalis*. Определены особенности структурно-функциональной организации и эволюции этих генов, а также относительные уровни их экспрессии на разных стадиях развития описторхид. Выявлено повышение уровня экспрессии гена *OfSAP2 O. felineus* при культивировании взрослых особей *in vitro*, а также при их обработке празиквантелом *in vivo*. Полученные результаты безусловно обладают научной значимостью, а их научная новизна не вызывает сомнений.

Практическая значимость

Результаты, полученные в диссертационной работе Пирожковой Д.С., могут быть использованы при разработке диагностических тестов, новых методов лечения, а также вакцинной профилактики трематодозов, прежде всего, описторхоза и клонорхоза.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Пирожковой Д.С. построена по традиционному плану и состоит из введения, трёх глав («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение»), заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 97 страницах, содержит 17 рисунков и 5 таблиц. Список литературы включает 115 источников. В целом, по

своей структуре и оформлению работа соответствует требованиям ГОСТ Р 7.0.11 – 2011.

В разделе «Введение» соискатель подробно описывает актуальность темы исследования и степень её разработанности, формулирует цель и задачи исследования, описывает степень научной новизны исследования, формулирует теоретическую и практическую значимость работы, приводит информацию о публикациях в рецензируемых журналах и о тезисах конференций.

Глава «Обзор литературы» написана на высоком уровне с использованием большого количества литературных источников, в ней подробно и полно рассмотрены последние данные, касающиеся темы диссертационной работы. В разделе 1.1 приведена общая характеристика дигенетических сосальщиков – паразитических плоских червей класса Trematoda. Подробно описаны морфология, жизненный цикл, ареал обитания печёночных сосальщиков *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, относящихся к роду *Opisthorchis*, а также патогенез вызываемых ими заболеваний человека – описторхоза и клонорхоза. Раздел 1.2 посвящён описанию специфической покровной ткани (тегумента) и экскреторно-секреторного продукта вышеперечисленных печёночных сосальщиков, а также особенностям их взаимодействия с конечным хозяином. В разделе 1.3 обобщены сведения о структурах, функциях и механизмах действия сапозин В-подобных белков, выявленных у разных организмов, включая трематод. В разделе 1.4 описаны свойства и механизм действия празиквантела – основного препарата, применяемого для лечения трематодозов, в том числе описторхоза и клонорхоза, а также рассмотрены вопросы, касающиеся чувствительности и устойчивости трематод к этому лекарству. Помимо этого, автором сформулированы гипотезы о влиянии празиквантела на экспрессию генов сапозин В-подобных белков у описторхид. Наконец, в разделе 1.5 кратко суммированы литературные данные о роли сапозин В-подобных белков трематод, подчёркнута важность их дальнейшего и более подробного изучения.

Диссертационная работа Пирожковой Д.С. выполнена с использованием современных и классических методов генетики и молекулярной биологии, среди которых – работа с лабораторными животными, ПЦР, очистка и секвенирование продуктов ПЦР, количественное измерение уровня экспрессии генов с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени, а также биоинформатический анализ данных. Используемые методы подробно описаны в главе «Материалы и методы».

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из 5 разделов. Раздел 3.1 посвящён поиску генов, кодирующих сапозин В-подобные белки, у описторхид *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis* и *M. Orientalis*, изучению особенностей экзон-интронных структур этих генов, а также анализу доменной структуры кодируемых ими белковых продуктов. Поиск генов был выполнен преимущественно методами биоинформатики с использованием данных о геномах и транскриптомах указанных видов, полученных из общедоступных специализированных баз данных. В разделе 3.2 описаны результаты филогенетического анализа как аминокислотных последовательностей выявленных сапозин В-подобных белков описторхид, так и нуклеотидных последовательностей сайтов сплайсинга соответствующих генов. Раздел 3.3 посвящён изучению стадиоспецифичности экспрессии генов описторхид, кодирующих сапозин В-подобные белки, посредством биоинформатического анализа литературных данных о транскриптомах метацеркарий и марит исследуемых видов; для генов *O. felineus* автором были также получены экспериментальные данные, которые в целом согласуются с результатами проведённого биоинформатического анализа. В разделе 3.4 описаны результаты исследований, направленных на выяснение влияния празиквантела на активность генов, кодирующих сапозин В-подобные белки, у взрослых особей *O. felineus*, а также на чувствительность последних к этому препарату. В частности, приводятся сведения о выживаемости червей под воздействием празиквантела, а также о различном относительном количестве транскриптов генов *OfSAP1* и *OfSAP2* в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Полученные

экспериментальные результаты сопоставляются с гипотезами, изложенными в разделе 1.4. В разделе 3.5 обсуждаются возможные функции сапозин В-подобных белков описторхид, с учётом новых данных, полученных в данной диссертационной работе.

В разделе «Заключение» Дарья Сергеевна обобщает полученные результаты. Выводы, сделанные автором, являются обоснованными и полностью соответствуют заявленным целям и задачам.

К диссертационной работе Пирожковой Д.С. есть ряд вопросов и замечаний, преимущественно связанных с оформлением работы.

1) В тексте диссертации неоднократно упоминается некий N-концевой сигнальный пептид (например, на стр. 6, 25, 29 и 30), однако не объясняется, какую именно функцию он выполняет в сапозин В-подобных белках. Обеспечивает ли этот сигнальный пептид котрансляционный или посттрансляционный транспорт белка в определенную клеточную органеллу? Насколько он похож на другие, хорошо охарактеризованные сигнальные пептиды?

2) Текст на стр. 28 и рисунок 5, касающиеся «определенного структурного сходства» коэнзима Q10 (убихинона), хлорохина и празиквантела нуждаются в дополнительном обосновании. Во-первых, из рисунка 5 не очевидно в чём именно заключается «определенное структурное сходство» между вышеперечисленными веществами. Следовало бы отметить «структурно сходные» части молекул этих веществ на рисунке 5. Если же речь идёт о сходстве их трёхмерных структур, то тогда стоило бы привести соответствующие изображения с указанием атомов, которые предположительно взаимодействуют с сапозин В-подобными белками, будучи схожим образом расположенными по отношению друг к другу во всех этих молекулах. Во-вторых, не ясно для чего приведена ссылка на статью (Pirozhkova, Katokhin, 2020a), в которой не упоминается ни убихинон, ни хлорохин, ни празиквантел.

3) Может ли наличие или отсутствие 12-нуклеотидного фрагмента в 5'-концевой части кодирующей гена *OfSAP1 O. felineus* быть следствием не

альтернативного сплайсинга, а полиморфизма? Были ли использованы для получения образцов геномной ДНК и транскриптов (EST) взрослых червей (последовательности которых, в конечном счёте, сравнивали) особи из одной и той же популяции или изогенной линии?

4) Не ясно, что такое «M value» и как рассчитывали это значение (стр. 73).

5) Нестандартное расположение раздела «Список сокращений» в конце текста диссертации представляется не очень удобным для использования. Кроме того, расшифровки некоторых сокращений приведены только на английском языке (стр. 83). Помимо этого, отсутствует единство стиля в плане использования сокращений терминов и названий. В частности, в первой половине текста больше используется слово «празиквантел», а во второй – его сокращение «PZQ», причём иногда они встречаются рядом друг с другом и даже в пределах одного и того же предложения (например, на стр. 34).

6) В тексте диссертационной работы игнорируются общепринятые правила написания названий генов курсивом и белков прямым шрифтом, за исключением названия гена *caenorh-5* нематоды *Caenorhabditis elegans* на стр. 27, а также названий генов в таблице 1 (в которой, однако, и названия белков написаны курсивом). В связи с этим не всегда понятно при упоминании названия гена или белка, про что именно идёт речь. Это затрудняет восприятие изложенного материала. Для корректного оформления названий генов и белков необходимо обратиться к правилам для авторов таких журналов как «Биохимия», «Молекулярная биология» и «Вавиловский журнал генетики и селекции».

7) Для ряда перечисленных (в том числе очень специфических) использованных баз данных, компьютерных программ и методов (стр. 45-47) отсутствуют какие-либо ссылки на веб-ресурсы или публикации. В первом предложении на стр. 49 указан два раза один и тот же идентификатор последовательности транскрипта GBJA01004791.1, при том, что по смыслу ожидаются два разных идентификатора. Идентификатор последовательности ортолога гена *OfSAP1* у *C. sinensis*, указанный на стр. 53 (SRR040494.481247),

отличается от такового, приведённого в таблице 4 (SRR040494.48124). Не ясно, что именно обозначает идентификатор «mk4.002629.00», приведённый на стр. 59.

8) Некоторые выражения в тексте диссертации представляются некорректными или не очень удачными, например, «пятый экзон состоит из 22 а.о.» (стр. 55), «черви получали один балл» (стр. 69).

9) В тексте диссертационной работы присутствует существенное количество опечаток. Вот лишь несколько примеров: «рибисомального» вместо «рибосомального» (стр. 16), лишнее слово «отмечены» (подпись к рисунку 4), «празикантела» вместо «празиквантела» (стр. 34) и «экспреиментально» вместо «экспериментально» (таблица 4). Помимо этого, в нескольких местах текста отсутствуют или неверно расставлены знаки препинания или же им предшествуют лишние пробелы. Отсутствует единство стиля в плане использования буквы «ё» и нижнего индекса. Наконец, также отсутствует единство стиля и в указании концентрации веществ в растворах. А именно, местами используются нестандартные формы записи концентрации «нМ/мкл» и «мкМ/мкл» (например, на стр. 42), также рядом в тексте встречаются концентрации 100 мМ и 0,001 М (стр. 37) вместо более логичных 100 мМ (или 0,1 М) и 1 мМ.

10) В таблице 2 многие ячейки в столбцах 1 и 3 неоправданно заполнены на английском языке. На рисунках 6 и 10 все надписи выполнены на английском языке и с помощью специальных символов, которые не расшифрованы в подписях к этим рисункам. На рисунках 9 и 11 не указана единица измерения приведённых шкал. На рисунках 12, 15, 16 и 17 не объяснено, что именно отображают усы на графиках. Также на рисунках 15 и 17 названия генов написаны без приставки «*Of*», а на рисунке 16 не указан объект исследования (вид, стадия развития, ткань). На рисунке 14 на панели А отсутствует шкала, а на панели Б шкала практически не видна; не объяснено, чему соответствуют зелёный, красный и жёлтый сигналы, а также на что указывает стрелка на панели Г.

Отмеченные недостатки не являются принципиальными и ни в коей мере не снижают общей положительной оценки диссертации. Выводы по результатам проведённой работы не вызывают сомнений. В целом, диссертационная работа Пирожковой Дарьи Сергеевны является законченным научным трудом. По результатам работы опубликовано три статьи; основные результаты также доложены на двух международных конференциях. Автореферат соответствует диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Пирожковой Д.С. «Структурно-функциональная организация генов сапозин В-подобных белков у описторхид», представленная к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «генетика», является законченным научным исследованием, посвящённым изучению структурно-функциональной организации генов описторхид, кодирующих сапозин В-подобные белки, выяснению их филогенетических связей, а также зависимости транскрипционной активности этих генов у взрослых червей *O. felineus* от празиквантела. В ходе работы установлено, что у каждого из исследованных видов описторхид (*O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis* и *M. orientalis*) имеется 3 консервативных гена, кодирующих сапозин В-подобные белки, причём ген *SAP3* экспрессируется на стадии метацеркарии, а гены *SAP1* и *SAP2* – преимущественно на стадии мариты. Кроме того, выявлено, что экспрессия гена *OfSAP2* *O. felineus* повышается при культивировании марит *in vitro*, а также при их обработке празиквантелом *in vivo*. Результаты получены с использованием современных методов исследования, а сделанные выводы обоснованы и не вызывают сомнений. Всё это позволяет заключить, что диссертационная работа Пирожковой Дарьи Сергеевны по содержанию, актуальности, новизне, методическому уровню, а также практической ценности полученных результатов полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого

Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор, Пирожкова Дарья Сергеевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «генетика».

Отзыв был заслушан и одобрен на семинаре лаборатории клеточного деления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН), протокол № 1 от 7 июня 2021 г.

Зав. лабораторией клеточного деления

ИМКБ СО РАН,

к.б.н.



А.В. Пиндюрин

Сведения о составителе отзыва: Пиндюрин Алексей Валерьевич, кандидат биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика, зав. лабораторией клеточного деления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН). Адрес: пр. ак. Лаврентьева 8/2, Новосибирск, 630090. Тел. +7(383) 3639042, e-mail: a.pindyurin@mcb.nsc.ru

Сведения о лице, утвердившем отзыв: Демаков Сергей Анатольевич, доктор биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика, директор ИМКБ СО РАН. Тел. +7(383) 3639042, e-mail: demakov@mcb.nsc.ru

Подпись Пиндюрина А.В. удостоверяю

Учёный секретарь ИМКБ СО РАН

к. б. н.



Л.Г. Ахмерова