



УТВЕРЖДАЮ:
И.о. генерального директора
ФБУН ГНЦ ВБ
«Вектор»

В.Н. Михеев

« 25 » ноября 2015 г.

О Т З Ы В

ведущей организации на диссертационную работу «ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ТРЕМАТОДЫ *OPISTHORCHIS FELINEUS*» Помазного Михаила Юрьевича, представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «генетика»

Актуальность диссертационной работы связана с фактическим отсутствием генетической информации о геноме трематоды *O.felineus*, его структуре, особенностях генов и их экспрессии на момент начала выполнения диссертационной работы. Ранее, были опубликованы только работы по расшифровке нескольких генов, в частности парамиозина, для *O.felineus*. Медицинскую важность паразитарной инфекции человека, вызываемой трематодой *O.felineus*, трудно недооценить. В зоне риска заражения проживают десятки миллионов людей только на территории РФ, где ежегодно регистрируются десятки тысяч случаев заболевания.

Близкородственные трематоды *O. felineus*, *C. sinensis* и *O. viverrini* очень широко распространены в Евразии. В ареале их распространения проживает до одного миллиарда человек. К сожалению, точной статистики по количеству инфицированных (больных) людей просто нет. По всей вероятности, речь может идти о многих миллионах больных людей. Фактическое отсутствие иммунитета к этой паразитарной инфекции у человека, длительный срок жизни паразита в организме человека (предположительно десятки лет) и его способность вызывать различные заболевания человека, включая онкологические, придает этим паразитарным инфекциям большое медицинское значение.

В рамках диссертационной работы была предпринята попытка проанализировать транскриптомы взрослой и инвазивной жизненных форм

трематоды *O. felineus*. Не вызывает сомнений, что расшифровка геномной информации *O. felineus* принципиально важна для понимания фундаментальных основ геномики этого паразита. Она станет базой для понимания патогенеза этой паразитарной инфекции, разработки новых химиопрепаратов, создания перспективных вакцинных препаратов и, конечно, новых диагностических наборов. Полученная генетическая информация существенно расширит наши представления о структуре и функциях белков этого паразита, даст понимание о структуре и регуляции работы генома этого паразита, что, в конечном счете, станет фундаментальной основой для развития дальнейших исследований в этой области. Вышесказанное позволяет заключить, что рецензируемая работа по своей значимости, актуальности и новизне относится к пионерским работам, а ее актуальность и новизна не вызывает ни малейших сомнений.

В качестве основных целей и задач диссертационной работы были сформулированы следующие положения:

- Определение последовательностей белок кодирующих мРНК транскриптомов мариты и метацеркариев *O. felineus*;
- Проведение биоинформационного анализа транскриптомом;
- Выполнение сравнительного анализа транскриптомных профилей мариты и метацеркариев *O. felineus*.

Цели и задачи исследования, сформулированные автором, представляются принципиально важными и научно обоснованными. Их достижение позволяет существенно расширить наши представления по геномике *O. felineus*. Выбор методов исследования полностью адекватен целям диссертационной работы. Он позволил автору получить громадный массив данных по геномным последовательностям *O. felineus* и полностью решить сформулированные в диссертационной работе задачи. Как представляется, полученные результаты фактически создали фундаментальную основу для проведения дальнейших исследований транскриптомов трематоды *O. felineus*. Особенно важно отметить, что расшифрованные геномные последовательности депонированы в международную базу данных. Это, безусловно, будет способствовать ускорению исследований в области геномики и биоинформатики, а также окажет громадное влияние на развитие исследований в смежных областях молекулярной биологии и генетики.

Диссертационная работа Помазного М.Ю. построена по традиционной схеме и состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов, главы результаты и обсуждение, заключения, выводов, списка

литературы и трех приложений. Диссертация изложена на 96 страницах, иллюстрирована 7 таблицами и 20 рисунками, список использованной литературы включает 183 литературных источника.

В литературном обзоре автором проведен подробный анализ данных литературы по характеристике *O. felineus*, ареалу ее распространения, медицинской значимости, функциональной геномике и транскриптомике трематод, особенностям ее жизненного цикла и молекулярно-генетической организации геномов трематод. Особое внимание диссертант уделил описанию транскриптомике трематод. В разделе "Материалы и методы" автором достаточно подробно описан комплекс молекулярно-биологических методов, методов высокопроизводительного секвенирования и основные биоинформационные подходы к анализу геномных последовательностей. Эта часть диссертационной работы демонстрирует хорошее владение автором широким спектром современных методов исследования и анализа геномных последовательностей сложных организмов.

В экспериментальном разделе работы (глава 4) достаточно подробно описываются основные результаты диссертационной работы. Раздел хорошо структурирован и по своей компоновке хорошо соответствует основным положениям диссертационной работы. Логика изложения экспериментального материала хорошо обосновывает основные выводы работы. Аналитические материалы, представленные в трех приложениях, имеют весьма важное научно-практическое значение. В разделе «Заключение» подробно обосновываются основные выводы диссертационной работы. Материалы этих разделов дополнены ссылками на международные базы данных, где депонированы нуклеотидные последовательности генома и транскриптомов *O. felineus*, определенные диссертантом.

Говоря об наиболее существенных достижениях диссертационной работы, следует отметить следующие достижения автора:

- При анализе экспрессии полученных транскриптов были идентифицированы 11'114 генов, экспрессирующихся на обеих стадиях развития *O. felineus*, и 903 и 648 гена, экспрессирующихся только в марите или метацеркарии, соответственно;
- Установлено, что наиболее экспрессируемые гены взрослой стадии являются катепсин F, миоглобин, белок яйца, глутатион трансфераза, а также HDM белок. В метацеркарии же, среди белков с наибольшей экспрессией представлены неспециализированные гены, такие как рибосомальные белки, убиквитин и белок теплового шока;

- Выявлено, что у *O. felineus* редуцированы такие молекулярные системы, как синтез полиаминов и метаболизм метионина. Также полностью отсутствует молекулярный аппарат поддержания пероксисом;
- Катепсины, кальмодулины и MD-2 домен содержащие белки представлены в транскриптом *O. felineus* большим числом копий, чем имеется у модельных эукариотических организмов. Это соответствует гипотезе относительно недавней геномной экспансии этих генных семейств;
- Обнаружены новые гранулиноподобные белки, не имеющие ортологов у родственных описторхид;
- Филогенетически *O. felineus* и *C. sinensis* ближе друг к другу, чем каждый из них к *O. viverrini*.

Оценивая работу в целом, можно смело говорить о том, что автором получен комплекс новых фундаментальных знаний о структуре генома и транскриптома *O. felineus*. Цели и задачи диссертационной работы достигнуты, достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Решение всего этого комплекса задач полностью соответствует требованиям ВАК по отношению к кандидатским диссертационным работам.

К сожалению, работа не лишена определенных недостатков.

- Так раздел 1.1 диссертационной работы, и соответствующий раздел автореферата, можно было бы существенно усилить кратким изложением достижений в области исследования полных геномов других паразитов человека и принципиальной роли этих исследований в ускорении и развитии смежных исследований.
- В разделе 3.3.1 (стр. 33) отсутствует информация по протоколу эвтаназии лабораторных животных и номера протоколов этического комитета ИЦиГ СО РАН.
- Для биоинформационного исследования нуклеотидных последовательностей автор использовал различное программное обеспечение, которое достаточно подробно описано в разделе 3. В некоторых случаях не указаны номера использованных версий этих программ.
- Представляется, что вывод 4 с обобщающим описанием особенностей транскриптомов *O. felineus*, более логично расположить на первом месте в разделе 6. А только затем перейти к более частным выводам, характеризующим особенности транскриптомов.

- В работе имеется небольшое количество редакционных замечаний. Например: список сокращений расположен на странице 76 данной работы. При работе с диссертацией было бы, наверное, удобнее его разместить в начале диссертационной работы. Имеются отдельные опечатки, но их общее количество незначительно, и не влияет на прочтение и понимание диссертационной работы.

Все полученные результаты были достаточно широко представлены научной общественности на различных конференциях и симпозиумах, которые проходили на территории РФ. Конечно, было бы целесообразно рекомендовать более широко представить результаты диссертационной работы на представительных международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 2 полноразмерные научные статьи в журналах перечня ВАК. Принципиально важно отметить, что автором депонировано в GenBank 15266 нуклеотидных последовательностей *Opisthorchis felineus*, в том числе 2560 EST. На наш взгляд это важнейшее достижение автора, которое делает доступным транскриптом *O. felineus* для исследователей всего мира.

Основные положения автореферата и выводы полностью соответствуют материалам, представленным в диссертационной работе.

Диссертационная работа обсуждена на Семинаре отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор".

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует весьма высоко оценить тщательно выполненную и продуманную диссертационную работу Помазного М.Ю. Полученные им результаты могут послужить и служат основой для дальнейшего развития геномики и транскриптомики трематод, патогенных для человека. На наш взгляд, расшифровка геномной информации *O. felineus* принципиально важна и может быть классифицирована как важнейшее достижение в области исследования генома этого паразита. Полученная генетическая информация существенно расширит наши представления о структуре и функциях белков этого паразита, даст понимание о структуре и регуляции работы генома *O. felineus*, что, в конечном счете, станет фундаментальной основой для развития дальнейших исследований в этой области. Это, без сомнения, станет базой для исследования патогенеза этой паразитарной инфекции, разработки новых химиопрепаратов, кандидатных вакцин против печеночных трематод, новых иммунобиологических и диагностических препаратов. Вышесказанное позволяет заключить, что рецензируемая работа

по своей значимости, актуальности и новизне относится к пионерским работам, а ее актуальность и новизна не вызывает ни малейших сомнений.

Вклад автора в решение проблемы исследования генома *O. felineus*, анализа особенностей его работы, изучения молекулярно-генетических основ организации генома обеспечивает приоритет нашей страны в этой области исследования геномики и транскриптомики паразитарных инфекций. Вне сомнения, именно это позволяет заключить, что диссертант решил важную научную проблему в области геномики и транскриптомики трематоды *Opisthorchis felineus*, одного из важнейшего паразитарных агентов для человека на территории России.

Таким образом, диссертационная работа Помазного М.Ю. является законченной научной квалификационной работой, в которой получены фундаментальные результаты, которые станут основой для практического использования. Диссертационную работу можно квалифицировать как крупное достижение мирового уровня в развитии геномики и транскриптомики трематоды *Opisthorchis felineus*.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что, несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, большая научная и практическая важность данной работы дает все основания считать, что диссертационная работа полностью соответствует п. 9 Положения о присуждении ученых степеней ВАК РФ и ее автор, безусловно, заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.02.07 – «генетика».

Зав. лаборатории отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор", д.б.н.,
Кочнева Галина Вадимовна

Подпись Кочневой Г.В. заверяю
Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор",
к.б.н., доцент, Плясунова Ольга Александровна

