

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Кочневой Альбины Александровны
«ПРОТЕОМЫ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЦЕСТОД НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЖИЗНЕННОГО
ЦИКЛА»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.17 – Паразитология

Диссертационная работа Альбины Александровны Кочневой посвящена исследованию протеомов – совокупности белков – на разных стадиях жизненного цикла цестод из хозяев–рыб. Работа производит очень благоприятное впечатление. Актуальность и новизна исследования не вызывают сомнений. Исследование взаимоотношений паразита и его хозяина – фундаментальная проблема биологии, имеющая ключевое значение для понимания природы паразитизма. В своей работе для изучения этих взаимоотношений Альбина Александровна использовала современные молекулярные методы протеомики и транскриптомики. Объекты исследования – широко распространенные цестоды *Triaenophorus* spp. и *Schistocephalus solidus*. Автором впервые описаны белковые профили гельминтов *Triaenophorus* spp. и *Schistocephalus solidus*, изучена вариабельность протеома цестод *S. solidus*, *T. nodulosus* и *T. crassus* в зависимости от фазы жизненного цикла паразита и гостальной специфичности, описано распределение белков вдоль тела червей *Triaenophorus* spp. Впервые проведена сборка транскриптома *T. nodulosus* и на основе полученных данных составлена база белковых последовательностей данного вида гельминта. Кроме того, автором предпринята попытка определения функций обнаруженных белков. Следует отметить, что работы такого плана, как правило, касаются эпидемиологически значимых паразитов родов *Taenia* и *Echinococcus*. Цестоды – паразиты рыб в этом отношении практически не исследованы, что делает работу Альбины Александровны Кочневой во многом пионерной.

Диссертационная работа имеет традиционную структуру, изложена на 112 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение), заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений, списка иллюстративного материала и приложения. Список литературы включает 252 источника, из них 35 – на русском языке. Диссертация содержит 11 рисунков и 6 таблиц, таблицы 3, 5 и 6 вынесены в приложение. Все представленные в диссертационной работе рисунки очень наглядно иллюстрируют полученные результаты.

По материалам диссертационной работы опубликовано 9 статей, 4 из которых в

изданиях из перечня научных журналов, рецензируемых ВАК при Минобрнауки России, и 5 в международных изданиях, индексируемых в базах Scopus и Web of Science. В пяти статьях Альбина Александровна – первый автор, что свидетельствует о ее значительном вкладе в совместную работу над статьями.

Для достижения поставленной цели – изучения качественного и количественного состава белков цестод в зависимости от стадии онтогенеза и гостальной специфичности, были определены четыре адекватные этой цели задачи.

В работе применительно к паразитологическим объектам использованы самые современные протеомные и транскриптомные методы исследования, в том числе выделение и секвенирование РНК, сбор транскриптома и его аннотация, предсказание протеома, выделение и очистка водорастворимых белков, разделение белков в полиакриламидном геле по технологии 2D-DIGE, идентификация белков методом отпечатка пептидных масс и тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Эти методы достаточно подробно изложены в диссертации. Однако количество исследованных образцов (червей, рыб, повторности в экспериментах), к сожалению, описаны не для всех задач.

На защиту вынесены четыре положения, которые подтверждаются сделанными выводами. Можно поспорить с частью вывода 1 «Содержание цитоскелетных и двигательных белков снижается в дистальных отделах стробилы, что МОЖЕТ ОТРАЖАТЬ морфологические изменения в пролоттидах». Представляется, что правильнее было бы написать «что проявляется в морфологических изменениях», потому что, сначала все таки происходят биохимические перестройки, которые потом проявляются в морфологических изменениях, а не наоборот. Хотя, возможно, автор просто не смог правильно расставить акценты, имея ввиду первичность биохимических перестроек по сравнению с морфологическими.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из трех разделов: первый посвящен изучению белкового состава цестод *Triaenophorus* spp.; второй – реорганизации протеома цестоды *Schistocephalus solidus* при переходе от стадии плероцеркоида к половозрелому гельминту и третий – изучению отношений паразит-хозяин в паре плероцеркоиды *S. solidus* и трехглазая колюшка *G. aculeatus*.

Альбиной Александровной Кочневой впервые изучен протеом *T. nodulosus*, в настоящее время это единственный вид семейства *Bothriosephalidae*, для которого была получена база данных белковых последовательностей. Альбиной Александровной показано, что более половины белков *T. nodulosus* на момент анализа не имели гомологов в протеомах других доступных в базах данных видов цестод. Все полученные данные

загружены в базу данных NCBI BioProject (PRJNA526283). Необработанные чтения размещены в базе данных NCBI SRA (SRX5509575), а собранные контиги - в базе Transcriptome Shotgun Assembly (GHIF00000000). Опубликованные А.А. Кочневой базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и функциональные аннотации белков *T. nodulosus* могут существенно облегчить биохимические и протеомные исследования этих червей.

В результате проделанной работы А.А. Кочневой идентифицировано 11 белков, достоверно различающихся по содержанию вдоль тела цестод рода *Triaenophorus*. Обнаружены статистически значимые различия при сравнении белковых профилей плероцеркоидов *T. nodulosus* из разных видов рыб – вторых промежуточных хозяев.

Очень интересен раздел диссертации, посвященный изучению variability состава протеома *S. solidus* при переходе от стадии плероцеркоида к половозрелому гельминту и включающий эксперименты по культивированию плероцеркоидов до стадии зрелых червей. Исследование белкового состава смывов с поверхности тела инвазионных плероцеркоидов *S. solidus* и целомической полости зараженных и незараженных хозяев – рыб показало, что у зараженных рыб повышается содержание белков, играющих важную роль при свертывании крови, иммунной регуляции, воспалении и фибринолизе.

Завершается диссертационная работа небольшим заключением. Содержание автореферата полностью отражает содержание диссертационной работы. Стоит отметить список литературы, в котором наряду с современными источниками цитируются классические работы по паразитологии, относящиеся к 50–80 годам XX столетия. Это свидетельствует о тщательной работе А.А. Кочневой с литературой и знании предмета исследований.

Вместе с тем, к диссертации есть ряд замечаний, которые в своем большинстве носят редакционный характер.

Так, на мой взгляд, неудачно выбран стиль цитирования литературных источников (нумерация), что не позволяет мобильно узнать, на какой источник ссылается автор.

На стр. 12 автор четыре раза ссылается на источник [13] из списка литературы. При этом ссылка подкрепляет основополагающие для жизнедеятельности цестод факты (стробиляцию, роль тегумента и т.п.). При этом источник сведений – автореферат докторской диссертации. Диссертация, несомненно, сильная, но касающаяся других объектов и вопросов паразитологии. В этих случаях стоило бы ссылаться на более классические и фундаментальные работы, которые, кстати сказать, есть в списке литературы (например, М.Н. Дубинина и Б.И. Куперман).

Не убеждают выводы, сделанные в разделе обзора литературы «Молекулярно-

генетические особенности метаболизма цестод». В разделе описана встречаемость различных ферментов у различных видов цестод. В выводе же автор пишет, что «среди особенностей метаболизма цестод можно выделить адаптационные изменения пищеварительной, антиоксидантной и репродуктивной систем», что, несомненно справедливо, но не следует из текста раздела.

В тексте диссертации встречаются неудачные выражения. Например, на стр. 4 Альбина Александровна пишет: «Хозяевами цестод являются ЖИВЫЕ организмы...». Разве бывает по-другому? К сожалению, эта же фраза присутствует и в автореферате. На стр. 14 неудачное выражение «взрослых червей гельминта»; на стр. 25. выражение «пищеварительных соков хозяина», скорее всего прямой перевод, правильнее было бы написать «пищеварительных ферментов». На этой же странице есть фраза «Основываясь на литературных данных, можно сделать вывод, что паразитические черви ВЫБРАСЫВАЮТ в окружающие его ткани хозяина ОГРОМНОЕ количество биологически активных молекул». По сути фраза правильная, но слова «выбрасывают» и «огромное», на мой взгляд, слишком экспрессивные для строгого научного текста. На стр. 35 в таблице 1 указан «вес червя», правильно было бы указать – «масса червя». На стр. 70 неудачное выражение «Известно, что паразиты не способны синтезировать *de novo* собственные жирные кислоты и стерины, поэтому зависят по данным ЭЛЕМЕНТАМ от хозяина». Правильнее было бы написать «веществам» или «метаболитам». То же повторяется на стр. 71 «получение необходимых питательных элементов».

В очень интересном разделе «Инкубация инвазионных плероцеркоидов *S. solidus* ... (получение половозрелых гельминтов)» отсутствуют ссылки на методику. Если предложенный способ получения половозрелых червей разработан автором, стоило бы это отметить. В противном случае нужна ссылка на используемый метод. К сожалению Альбина Александровна не высказывает предположений почему после инкубации масса червей уменьшалась, хотя они находились в растворе глюкозы? Теряли яйца? Слишком низкие концентрации глюкозы?

К сожалению, в разделе «Методика» не описано, как создавали необходимую концентрацию углекислого газа при содержании червей и какая группа червей служила контролем. В результате непонятна фраза на стр. 54 «Гельминты *S. solidus*, которых содержали 48 часов при различных температурах (40°C и 22°C), различались по 405 белкам по сравнению с КОНТРОЛЬНОЙ группой плероцеркоидов». Из-за неполного описания эксперимента также непонятен вывод о том, что «синтез двух третей всех белков *S. solidus*, инкубированных при 40°C, вызван изменением состава инкубационной среды и/или анаэробными условиями, и только одна треть белков непосредственно реагировала

на повышение температуры». Т.е. непонятно, как разделяли влияние температуры и состава газовой среды. Что значит фраза в подписи к рис. 8 «белки, различающиеся по содержанию у паразитов, инкубированных при 22°C в течение 48 часов, и плероцеркоидов без нагревания»? Если 22°C – это нагревание, то какая температура имеется ввиду «без нагревания»? Только из подписи к рис. 10 становится понятно, что контрольная группа – это извлеченные из рыбы черви без инкубации. Более подробно описанная методика исключила бы ненужные вопросы.

На стр. 39 остался безымянным сотрудник лаборатории экологии рыб и водных беспозвоночных ИБ КарНЦ РАН, определивший пол и возраст трехиглой колюшки по отолитам.

На стр. 65 присутствует очень спорная фраза: «Поскольку у взрослых особей *S. solidus* ослаблено питание [111, 211]...». Непонятно, что имели ввиду процитированные авторы, но трудно представить обитающих в кишечнике с практически неограниченным доступом к питательным веществам цестод, у которых ослаблено питание.

Представляется излишним раздел «СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА», повторяющий подписи к рисункам и таблицам.

Однако, все высказанные замечания не влияют на общее высокое качество проделанной работы и в высшей степени благоприятное впечатление от знакомства с ней.

Таким образом, диссертационная работа Кочневой А.А. «Протеомы некоторых видов цестод на разных стадиях жизненного цикла» является законченной научно-квалификационной работой. По научной новизне, актуальности, методическому уровню, теоретической и практической значимости, объему и уровню публикаций диссертация представляет собой законченное исследование, соответствующее пп. 9-11, 13-14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», а его автор Кочнева Альбина Александровна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.17 – паразитология.

Официальный оппонент

Галина Игоревна Извекова

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической паразитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, <https://ibiw.ru>. 8(48547)24-533 izvekova@ibiw.ru