

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки Институт общей и  
экспериментальной биологии  
Сибирского Отделения Российской  
академии наук, д.б.н., профессор

Л.Л. Убугунов

«07» марта 2022 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения  
Российской академии наук**

**на диссертационную работу Кочневой Альбины Александровны  
на тему: «Протеомы некоторых видов цестод на разных стадиях  
жизненного цикла», представленную на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности 1.5.17 – Паразитология**

### Актуальность и научная новизна

Цестоды – высокоспециализированные организмы, в биологии и морфологии которых проявляются важные черты адаптации к паразитическому образу жизни. В жизненном цикле цестод происходит смена нескольких хозяев, принадлежащих к различным систематическим группам: позвоночным и беспозвоночным, пойкилотермным и гомойотермным животным. Соответственно, при смене хозяев одним и тем же видом паразита существенно изменяются условия существования данного паразита: физиологические и биохимические особенности жизнедеятельности хозяев, включая реакции иммунной системы. Белки являются важнейшими молекулярными агентами в приспособлении организмов к условиям окружающей среды, в том числе и адаптации цестод к внутренней среде своих хозяев. При смене хозяев, соответственно, набор данных молекулярных агентов должен меняться. Развитие протеомики в молекулярной паразитологии началось сравнительно недавно. Особенно слабо в этом отношении исследованы цестоды. В связи с этим, актуальность диссертационной работы А.А. Кочневой, посвященной исследованию белков цестод, не вызывает сомнений. Основное внимание автор сосредоточил на изменении качественного и количественного состава белков в зависимости от стадии онтогенеза и гостальной специфичности паразитов. Научная новизна рецензируемой диссертации не вызывает сомнений. Автором впервые описан состав белков цестод *Triaenophorus nodulosus*, *T. crassus*, *Schistocephalus solidus* в зависимости от стадии жизненного цикла, видов вторых

промежуточных хозяев, в разных частях тела паразитов. Сборка транскриптома *T. nodulosus* и составление базы предсказанных белков у этого паразита также проведены впервые.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные диссертантом результаты расширяют знания об особенностях протеомов цестод и их роли в адаптации ленточных червей к паразитическому образу жизни на молекулярном и биохимическом уровнях, взаимоотношениях в системе «паразит - хозяин». Данные о белковом составе цестод могут быть использованы для поиска белков-мишеней при разработке антигельминтных лекарственных средств. Полученные материалы могут служить базой для разработки системы контроля и ведения профилактических мероприятий по ихтиопатологическому благополучию в рыбоводных хозяйствах. Результаты работы могут быть использованы в учебном процессе ВУЗов биологического и ветеринарного профиля.

### **Структура и содержание работы**

Диссертация, в целом, построена по классической схеме, с соблюдением соответствующих требований и соответствует логике поставленной цели и сформулированным задачам. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений, списка иллюстративного материала и приложения. Список литературы включает 252 наименования, из которых 217 – иностранных. Диссертация изложена на 112 страницах, содержит 6 таблиц и 11 рисунков.

Во введении обоснована актуальность темы, изложена основная гипотеза диссертационного исследования, сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов и личный вклад автора в выполнение работы и получение результатов.

В главе 1 «Обзор литературы» дается основная информация о морфологических и биохимических адаптациях цестод к паразитическому образу жизни, в том числе на молекулярно-генетическом уровне. Представлены сведения о белковом составе цестод на разных стадиях жизненного цикла, а также их секреторно-экскреторных продуктов. Описана роль паразитарных белков во взаимоотношении с организмом хозяина.

В главе 2 «Материалы и методы» дана подробная характеристика объектов исследования, а также применявшихся методик. В качестве основных объектов исследования были взяты плероцеркоиды и взрослые особи 3 видов цестод: *Triaenophorus nodulosus*, *T. crassus* и *Schistocephalus solidus*. Плероцеркоиды *T. nodulosus* были взяты от трех видов вторых промежуточных хозяев: окунь *Perca fluviatilis*, ерш *Gymnocephalus cernuus* и налим *Lota lota*. Плероцеркоиды *S. solidus* извлечены из трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus*. Достоинством диссертации стоит считать использование самых современных методов транскриптомики, протеомики и биоинформатического анализа данных, которые достаточно подробно

описаны в данной главе. Использованные статистические методы адекватны поставленным задачам анализа данных.

Глава 3 посвящена описанию собственных результатов и сравнению собственных результатов с уже известными данными. Проведено секвенирование мРНК *T. nodulosus*, *de novo* сборка транскриптома *T. nodulosus* и его аннотация. На основании транскриптома произведено предсказание белков *T. nodulosus*. На основе предсказанных белков *T. nodulosus* и других доступных видов цестод построено дерево гомологичных последовательностей. Произведен функциональный анализ предсказанного протеома *T. nodulosus*. Проведено разделение белков сколексов и незрелых проглоттид плероцеркоидов *T. nodulosus* и *T. crassus* методом двухмерного дифференциального электрофореза (2D-DIGE) в полиакриламидном геле (ПААГ). Этим же методом произведено разделение белков сколексов, незрелых и зрелых проглоттид половозрелых особей *T. nodulosus* и *T. crassus*. Проведен сравнительный анализ белковых пятен на электрофореграммах, полученных при разделении белков из разных частей тела плероцеркоидов и взрослых особей этих двух видов цестод. Идентифицированы белки, которые различаются по содержанию в разных частях тела, на разных стадиях развития и между разными видами паразитов. Методом двухмерного электрофореза (2D-EF) в полиакриламидном геле (ПААГ) проведено разделение белков плероцеркоидов *T. nodulosus*, паразитирующих в разных видах рыб: окуне, ерше и налиме. Идентифицированы некоторые белки, по которым различались плероцеркоиды *T. nodulosus*, извлеченные из разных видов хозяев.

Методом хромато-масс-спектрометрии идентифицированы белки плероцеркоидов *S. solidus*: непосредственно извлеченных из полости тела трехиглой колюшки *G. aculeatus*; а также инкубированных *in vitro* при температурах 40°C и 22°C в течение 48 часов. Произведен сравнительный анализ состава белков в различных группах плероцеркоидов. На основании анализа собственных и литературных данных были определены белки, которые рассматриваются как маркеры взрослой стадии или стадии плероцеркоида *S. solidus*.

Методом хромато-масс-спектрометрии идентифицированы белки в смывах с поверхности тела плероцеркоидов *S. solidus*, извлеченных из полости тела трехиглой колюшки *G. aculeatus*; смывах из полости тела особей трехиглой колюшки, зараженных и незараженных плероцеркоидами *S. solidus*. Произведен сравнительный анализ состава белков в смывах из полости тела зараженных и незараженных рыб. Идентифицированы и аннотированы белки трехиглой колюшки, содержание которых различалось в смывах из полости тела зараженных и незараженных рыб. Идентифицированы и аннотированы белки *S. solidus* в смывах с поверхности тела плероцеркоидов *S. solidus* и из полости тела зараженных особей трехиглой колюшки.

Каждый раздел главы начинается с описания собственных результатов и сопровождается обсуждением полученных результатов.

В разделе «Заключение» А.А. Кочнева обобщает полученные данные.

Диссертационная работа заканчивается перечислением выводов, формулировки которых вытекают из поставленных задач и содержания работы.

Достоверность основных положений и выводов диссертационного исследования обеспечивается большим объемом полученных новых оригинальных данных. Результаты базируются на четко поставленных задачах, подборе оптимальных методов их решения, корректно поставленных экспериментах и глубоком анализе полученных данных. Поэтому достоверность основных положений и выводов, соответствующих цели, задачам, не вызывает сомнения.

Автореферат в полной мере отражает основное содержание диссертации. Материалы исследования были представлены и обсуждены на конференциях различного уровня. По теме диссертации опубликовано 9 статей, 4 из которых - в изданиях из перечня рецензируемых научных журналов ВАК при Минобрнауки России; в 5 статьях А.А. Кочнева является первым автором. В публикациях в достаточной мере изложены основные результаты и положения диссертационного исследования.

### **Замечания по работе**

По диссертационной работе имеется ряд замечаний и вопросов:

1) На стр. 28 описывается следующая методика взятия материала: «...у отобранных особей гельминтов с помощью хирургических ножниц отрезали примерно 0.3 см со стороны сколекса, 0.8-1 см после сколекса (незрелые членики) и 0.8-1 см с дистального конца стробилы (зрелые членики)...». А каким образом достигалось предотвращение перекрестной контаминации белками между взятыми образцами (сегментами тела)?

2) Не описаны подробности измерения концентрации белка по Брэдфорду, не указана фирма-производитель набора реактивов (стр. 29). Не указан способ измерения концентрации: в микропланшете или стандартной процедурой. Например, в аннотации к набору реактивов фирмы-производителя Bio-Rad указаны ограничения использования по максимальной концентрации веществ, входящих в состав буферов, в которых содержатся белки. Так, при измерении микропланшетным способом имеются следующие ограничения: тиомочевина – 0,04 М, мочевины – 0,16 М, CHAPS – 0,4 %. При измерении стандартным способом: тиомочевина – 1 М, мочевины – 4 М, CHAPS – 10 %. На стр. 28 указан состав лизирующего буфера: «...2 М тиомочевина (Sigma), 7 М мочевины (Amresco), 4% CHAPS (Amresco)...». Таким образом, для данного буфера метод измерения концентрации белка по Брэдфорду мог оказаться неадекватным.

3) Почему при идентификации белков *T. nodulosus* методом отпечатка пептидных масс поиск проводился только в базе данных NCBI (стр. 31, 34)? Почему для поиска не была использована собственная база предсказанных на основании транскриптома белков *T. nodulosus*? Вероятно, при использовании собственной базы, количество идентифицированных белков было бы больше.

4) Почему для идентификации белков методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS) в организме *T. crassus* и *T.*

*nodulosus*, в отличие от *S. solidus*, не был применен вариант анализа белков из раствора (in solution digestion), при котором можно одновременно получить масс-спектры всех имеющихся в организме паразитов белков? Вероятно, при использовании этого варианта количество идентифицированных белков было бы больше.

5) На стр. 33 описывается методика: «...Содержание белка в пробах определяли по методу Бредфорда [60]. Для дальнейшего анализа отбирали объем гомогената, содержащий 0.4-0.45 мг белка. Белок из гомогената осаждали трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация - 10%). После осадок промывали ледяным 80% этанолом и двумя объемами охлажденного 100% ацетона. Пробы высушивали в ламинарном шкафу и хранили до анализа при -80°C...». Далее пробы растворяли в буфере и использовали для электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле. Однако в процессе осаждения белка и промывки осадка вероятны потери белка. И после разведения проб в буфере необходимо было еще раз измерить содержание белка. Тем более что в дальнейшем пробы использовали для количественного анализа белковых профилей.

6) На рисунке 1 видно, что филогенетическое дерево получено в результате объединения деревьев, построенных двумя разными методами. Однако в диссертации не указано, какие конкретно методы были использованы.

Однако указанные замечания не имеют принципиального характера, носят дискуссионный характер и не снижают качества и высокой научной значимости рассматриваемого диссертационного исследования.

В заключение стоит отметить высокий методический уровень работы, соответствующий последним достижениям в области молекулярной паразитологии, впечатляющий объем материала, использованного в работе и его глубокий анализ, что свидетельствует о серьезном профессиональном уровне Кочневой Альбины Александровны.

### **Заключение**

Диссертационная работа Кочневой Альбины Александровны «Протеомы некоторых видов цестод на разных стадиях жизненного цикла» является законченной научно-квалификационной работой. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.17 – Паразитология. По актуальности, научной новизне, методическому уровню, объему исследований, теоретическому и практическому значению, объему и уровню публикаций работа соответствует п. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор - Кочнева Кочневой Альбины Александровны Альбина Александровна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.17 – Паразитология.

Отзыв ведущей организации подготовлен доктором биологических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов ИОЭБ СО РАН, рассмотрен и утвержден на заседании лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов ИОЭБ СО РАН, протокол № 1 от 06 июня 2022 г.

«07» июня 2022 г.

Кутырев Иван Александрович  
Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов <http://igeb.ru/component/k2/item/159-kutyrev-ivan-aleksandrovich>  
e-mail: [ikutyrev@yandex.ru](mailto:ikutyrev@yandex.ru)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения Российской академии наук <http://igeb.ru>  
670047 г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д. 6.  
Тел.: +7 3012 434211, факс: +7 3012 433034.