

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Беклемишева Анатолия Борисовича на диссертационное исследование Львовой Марии Николаевны «Экспериментальное исследование патогенеза описторхоза, вызванного трематодой *Opisthorchis felineus*», представленное на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология в диссертационный совет Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Актуальность темы исследования.

По данным ВОЗ по меньшей мере, 56 миллионов человек в мире страдают от одной или более трематодных инфекций пищевого происхождения. Наиболее распространенными видами этих гельминтов, поражающими человека, являются *Clonorchis*, *Opisthorchis*, *Fasciola* и *Paragonimus*. Трематодные инфекции пищевого происхождения зарегистрированы более чем в 70 странах мира, но наиболее распространены в Восточной Азии и Южной Америке. В России самый обширный очаг описторхоза, вызываемого *O. felineus*, расположен в Обь-Иртышском бассейне, который охватывает значительную часть территории Сибири с заболеваемостью населения описторхозом в некоторых районах достигающим 60%. Согласно современным представлениям длительная описторхозная (клонорхозная) инвазия вызывает иммунные нарушения в организме, сопровождается развитием тяжелых осложнений, таких как холангит, холецистит, дискинезия и стриктуры желчных протоков, абсцесс печени, панкреатит и, вероятно, может способствовать возникновению холангиокарциномы (ХКН) - тяжелой и смертельной формы рака желчных протоков. Международным агентством по изучению рака трематоды *O. viverrini* и *C. sinensis* классифицированы как канцерогены I группы. Экспериментальных данных по изучению канцерогенности *O. felineus* пока недостаточно, хотя есть сведения о его большей патогенности по сравнению с *O. viverrini* и *C. sinensis*. Известно, что у больных с хроническим описторхозом, вызванным *O. felineus*, основными осложнениями являются стриктуры желчных протоков, а также острые и хронические панкреатиты тогда как при инвазии *O. viverrini*, основным осложнением является развитие холангиокарциномы.

Распространенность трематодозов печени (описторхоза и клонорхоза), разнообразие их клинических проявлений, тяжёлые исходы заболевания диктуют необходимость разработки эффективных методов профилактики, диагностики и лечения этих инвазий. По данным исследований последних десяти лет при описторхозе, вызванном *O. viverrini* и *C. sinensis* значительный вклад в патогенез вносят экскреторно-секреторные продукты (ЭСП) гельминтов, белковый состав которых изучен с применением методов протеомики. Исследования антигенных и функциональных свойств белков ЭСП используются при создании средств иммунодиагностики и иммунопрофилактики заболеваний, вызванных этими видами трематод. Аналогичные протеомные исследования ЭСП *O. felineus* к началу работы соискателя не проводились. В этой связи диссертационная работа Львовой М.Н., направленная на сравнительное изучение патоморфологических и патогенетических особенностей экспериментального описторхоза, вызванного трематодами *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* является, несомненно, актуальным исследованием.

Степень разработанности темы исследования. Как уже отмечалось выше к началу исследований соискателя было показано, что все три вида трематод, вызывающих описторхоз и клонорхоз, сопровождаются различными клиническими проявлениями, причём наиболее изученными были патоморфологические и патогенетические особенности заболеваний, вызванных трематодами *O. viverrini* и *C. sinensis*. В частности, с применением протеомных подходов были изучены составы белков ЭСП *O. viverrini* и *C. sinensis*, а также антигенные свойства и функции некоторых из этих белков. Результаты этих исследований были использованы для разработки диагностических тестов, вакцин и поиска средств терапии начальных и хронических форм заболеваний вызываемых названными трематодами. Аналогичные исследования инвазий, вызываемых *O. felineus*, были ограничены изучением главным образом клинических и патоморфологических проявлений. Исследования белкового состава ЭСП были ограничены только данными о молекулярных массах белков ЭСП, полученных методом их электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

Научная новизна исследования. Соискателем впервые проведено гистологическое исследование изменений печени животных в динамике экспериментального описторхоза, вызванного трематодами *O. felineus* и *O. viverrini*, в результате которого были выявлены специфические структурные изменения гепатобиллиарной системы животных инфицированных *O. felineus*. Оригинальными являются и данные, свидетельствующие о том, что трематоды *O. felineus* и *C. sinensis* являются гематофагами, поскольку в кишечнике их марит соискателем обнаружен пигмент, который по результатам анализа с помощью электронной микроскопии, спектроскопии и масс-спектрометрии оказался гемозоином – продуктом биокристаллизации (детоксикации) гема. Важно отметить, что у близкородственного вида *O. viverrini* гемозоин в просвете кишечника соискателем не был обнаружен.

Особого внимания заслуживают пионерские исследования соискателя, направленные на выяснение белкового состава ЭСП *O. felineus* и функций некоторых из этих белков. В частности диссертанткой с помощью масс-спектрометрии и биоинформатического анализа впервые определен белковый состав ЭСП, который в отличие от такового у *O. viverrini* представлен большим количеством антиоксидантных и протеолитических ферментов.

Таким образом в результате выполнения диссертационной работы соискателем получены принципиально новые данные, касающиеся патоморфологических и патогенетических особенностей экспериментального описторхоза, вызванного трематодами *O. felineus*.

Теоретическая и практическая значимость работы. С помощью гистологических методов исследования соискателем получены оригинальные данные о структурных изменениях в печени животных в динамике развития экспериментальной инфекции, вызванной трематодами *O. felineus*, а также данные о гематофагии этого паразита. Эти результаты расширяют имеющиеся представления об особенностях патогенеза экспериментального описторхоза, биохимических особенностях питания паразита и

вносят вклад в изучение биологии трематоды *O. felineus* и взаимоотношений этого паразита с организмом хозяина при описторхозе.

Масс-спектрометрический и биоинформатический анализы ЭСП *O. felineus* позволили определить состав белков и функции отдельных белков ЭСП, что наряду с получением рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы паразита, представляется важным для создания средств иммунодиагностики, иммунопрофилактики и терапии описторхоза, вызываемого трематодой *O. felineus*.

Результаты исследований соискателя могут быть внедрены в учебный процесс на курсах клеточной биологии и паразитологии медицинских ВУЗов и биологических факультетов университетов.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов

Диссертационная работа Львовой М.Н. представляет собой большое по объёму разноплановое исследование с использованием современных гистологических методов, методов клеточной биологии, молекулярно-биологических, генно-инженерных методов, а также физических и компьютерных методов анализа.

Результаты исследований получены на современном оборудовании мирового уровня, таком как: робот карусельного типа STP120 («Thermo Scientific», США), станция для парафиновой заливки образцов Microm EC 350 («Thermo Scientific», Германия), ротационный микротом MICROM («Carl Zeiss», Германия), микроскоп (Olympus BX51, Япония), многофункциональный микропланшетный ридер Tecan Infinite M200 (Австрия), гель документирующая система VersaDoc MP4000 («BioRad», США), планшетный анализатор VICTOR X3 Multilabel Plate Reader («Perkin Elmer», Финляндия), масс-спектрометры UltraFlex III MALDI-TOF/TOF («Bruker», Германия) и Ultraflex II MALDI-TOF («Bruker», Германия), жидкостный хроматограф LC Packings Ultimate Chromatograph («Dionex», США), сопряженный масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (LTQ-FT-ICR-масс-спектрометр) («Thermo Finnigan», Германия) электронный микроскоп JEM 100 SX (Jeol Ltd., Япония), электронный сканирующий микроскоп EVO MA10 («Carl Zeiss», Германия) и инфракрасный Фурье-спектрометр Tensor 27 («Bruker», Германия).

Основные результаты диссертационной работы Львовой М.Н. были многократно апробированы на российских и международных научных форумах и опубликованы в 5-ти научных статьях в зарубежных журналах и отечественных журналах перечня ВАК.

Всё изложенное позволяет говорить о высоком профессиональном уровне исследования. Большой объем экспериментального материала, использование современных высокоинформативных методов исследований и теоретическое обобщение полученных данных, позволили Марии Николаевне сформулировать основные положения и выводы диссертационной работы, объективность и высокая степень достоверности которых не вызывает сомнений.

Соответствие содержания и оформления диссертации требованиям ВАК. Диссертационная работа Львовой М.Н. изложена на 150 страницах текста, имеет традиционную структуру и состоит из введения обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка

цитируемой литературы и 2-х приложений. Работа хорошо иллюстрирована и включает 45 таблиц и 31 рисунок.

Во "Введении" диссертации в краткой форме изложено состояние проблемы в области изучения трематод возбудителей описторхоза и клонорхоза у человека и животных ясно сформулирована цель и задачи исследования.

Глава «Обзор литературы», состоит из 6-ти разделов. В 1-м приводится общая характеристика семейства *Opisthorchiidae* (*O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*), включающая: систематическое положение семейства и входящих в него видов; географическое распространение представителей семейства *Opisthorchiidae* и эпидемиология описторхоза; жизненный цикл, морфология и способ питания описторхид.

Раздел о гематофагии у паразитов включает данные о составе и формировании гемозоина, его биологической роли и возможном использовании в качестве мишени для диагностики и лечения паразитозов.

В последующих разделах приводится современное состояние вопросов, связанных с культивированием описторхид, патогенезом описторхоза и исследованием патоморфологических изменений печени при описторхозе, изучением состава экскреторно-секреторного продукта трематод.

В целом прочтение этой главы позволяет получить полную информацию о современном состоянии вопросов, связанных с распространением описторхоза в нашей стране и в мире, особенностях жизненного цикла гельминтов, патогенеза описторхоза и его диагностики. При прочтении главы обращает на себя внимание широкая эрудиция диссертантки в этих вопросах.

В главе «Материалы и методы» детально описаны использованные в работе методы исследования, включающие как гистологические, так и клеточные, молекулярно-биологические и генно-инженерные методы, а также физические методы анализа белков.

В главе «Результаты и обсуждение» изложены результаты собственных исследований автора. Материалы этой главы изложены детально и последовательно, всесторонне проанализированы и обсуждены. Экспериментальные данные хорошо иллюстрированы 40 рисунками и 2-мя таблицами, что облегчает восприятие текста. В методическом отношении экспериментальная работа выполнена безукоризненно. Полученные результаты позволили диссертанту сделать вполне обоснованные выводы.

В заключении обобщены основные результаты исследований. Полученные соискателем данные достоверны, выводы корректны, обоснованы и логически вытекают из полученных соискателем результатов. Автореферат достаточно полно и адекватно отражает содержание диссертации. Диссертация изложена хорошим литературным языком и легко воспринимается.

В целом Львовой М.Н. на обширном экспериментальном материале выполнена объёмная и очень интересная и важная как в научном, так и в практическом отношении работа. При прочтении диссертации обращает на себя внимание глубокое и всестороннее знание соискателем научной литературы по изучаемой проблеме. Следует отметить и высокую методическую подготовку диссертантки, которая при решении поставленных задач использовала, как уже отмечалось выше, широкий арсенал современных методов исследования, удовлетворяющих решению поставленных задач.

Таким образом, диссертационная работа Львовой М.Н., как по содержанию, так и по оформлению соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Результаты, полученные соискателем при изучении состава ЭСП *O. felineus* и функций отдельных белков, а также данные об обнаружении гемозоина в кишечнике этого вида трематод могут быть использованы в дальнейших исследованиях, направленных на создание средств иммунодиагностики, вакцинопрофилактики и терапии *O. felineus*-описторхоза. Материалы диссертации целесообразно включить в соответствующие курсы лекций по паразитологии для студентов ВУЗов, врачей факультетов усовершенствований последипломного образования и медицинских училищ.

Общие замечания по диссертационной работе. Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет. Однако имеется вопрос к диссертанту. Чем обусловлен выбор гена тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* для получения кодируемого им рекомбинантного белка, но не каких-либо других генов паразита, кодирующих мажорные иммунореактивные белки?

В тексте диссертации встречаются стилистические и терминологические неточности, например:

- на стр.100 и 105 в отношении белков применяется термин «экспрессия», тогда как этот термин следует применять только для генов и РНК ;
- на стр. 47, 98, 105-107 при характеристике состава и размера белков используется термин «аминокислота», тогда как в этих случаях следует использовать термин «аминокислотный остаток»;
- на стр. 59 используется выражение «...клонировали в экспрессирующий вектор рQE-31...», тогда как более корректно писать «...клонировали **в составе** экспрессирующего вектора рQE-31 в клетках ...»;
- название пункта методов 2.7.3. гласит: «Получение фрагмента ДНК, соответствующего тиоредоксин пероксидазе *O. felineus* без сигнальной последовательности». Более точная формулировка: «Получение фрагмента ДНК, **кодирующего зрелую** тиоредоксин пероксидазу *O. felineus*».

Высказанные замечания несколько не умаляют научно-практической ценности выполненной работы.

Заключение о соответствии диссертации требованиям Положения о присуждении ученых степеней. Диссертация представляет собой завершённое оригинальное научное исследование, соответствующее паспорту специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология в нескольких разделах, а именно: 3. Системный анализ взаимоотношений клеток, тканей и функциональных систем организмов – представителей всех царств; 6. Молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток многоклеточных, малоклеточных и одноклеточных организмов в норме и патологии; 7. Разработка экспериментальных моделей, методов цитологической диагностики, морфометрии, маркерной гисто- и цитохимии и др. Диссертационное исследование Львовой Марии Николаевны «Экспериментальное исследование патогенеза описторхоза,

вызванного трематодой *Opisthorchis felineus*», выполненное под руководством доктора биологических наук, Мордвинова Вячеслава Алексеевича, является самостоятельной научно-квалификационной работой, проведенной на высоком научно-методическом уровне, в которой получен фактический материал и содержится решение научной задачи – сравнение патоморфологических и патогенетических особенностей экспериментального описторхоза, вызванного представителями рода *Opisthorchis*, что имеет существенное значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии. Практическая значимость работы заключается в определении белкового состава экскреторно-секреторного продукта, а также получении рекомбинантной формы одного из этих белков – тиоредоксин пероксидазы, и поликлональных антител к ней, что может быть использовано для совершенствования иммунодиагностики. Обнаружение гемозоина указывает на потенциальный положительный эффект многих антималярийных препаратов при описторхозе, вызванном *O. felineus*. Блокирование формирования гемозоина (обезвреживания гема) – основа для разработки новых подходов к лечению описторхоза. Диссертационное исследование по актуальности, методическому уровню, значимости полученных результатов, выводов и полноте их опубликования отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученой степени» (утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а Львова Мария Николаевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией генной инженерии
ФГБНУ «Федеральный исследовательский
центр фундаментальной и трансляционной
медицины»

Беклемишев А.Б.

Дата (31.01.2020 г.)

Подпись

Адрес: 630060, Новосибирск,
ул. Тимакова, д.2
<https://frcftm.ru/>

Подпись Беклемишев А.Б. удостоверяю

Начальник отдела кадров
ФИЦ ФТМ



О.М. Минеева

31.01.2020 г.