

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук Корниенко Светланы Александровны 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. Диссертация М.Н. Львовой «Экспериментальное исследование патогенеза описторхоза, вызванного трематодой *Opisthorchis felineus*» посвящена анализу последствий заражения лабораторных животных гельминтами семейства Opisthorchiidae, прежде всего, вида *O. felineus*. В Обь-Иртышском бассейне, охватывающем значительную часть территории Сибири, расположен самый обширный и интенсивный в мире очаг *O. felineus*-описторхоза. Однако многочисленны случаи регистрации больных описторхозом и за пределами Сибири. Вместе с тем, наряду с заражением человека *O. felineus* увеличивается риск инфицирования россиян другими описторхидами, *O. viverrini* и *C. sinensis*, что связано с увеличением туристического потока в Юго-Восточную Азию, где эти виды являются эндемичными. Целью исследования было сравнение патоморфологических и патогенетических особенностей экспериментального *O. felineus*-описторхоза, и описторхоза, вызванного *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis*, широко распространенных в странах Юго-Восточной Азии и на Дальнем Востоке.

Актуальность данной работы очевидна, учитывая масштабность этого заболевания во всем мире, тяжелые последствия, которые вызывают гельминты в организме хозяина и отсутствие эффективной 100%-ой антигельминтной терапии. Кроме различных патологий в печени (холангит, холецистит, дискинезия и стриктуры желчных протоков, абсцесс печени), описторхоз может вызывать патологии в других органах и системах организма, о чем свидетельствуют многочисленные отечественные и зарубежные исследования. Показано, что описторхоз, вызванный *O. viverrini*, может приводить к развитию холангиокарциномы (Sripa et al., 2007).

Сравнительный анализ гистопатологических данных, полученных у животных с *O. felineus*- и *O. viverrini*-описторхозом необходим, поскольку позволит учитывать видоспецифические особенности развивающейся патологии при выборе корректной медикаментозной терапии. Прецизионная терапия широко обсуждается в различных областях биологии и медицины. В этой связи, данные, полученные М.Н. Львовой, представляют большой интерес и полезны как для биологов, исследующих проблему описторхоза на моделях животных, так и для медиков, использующих научные разработки в клинической практике.

Научная новизна и практическая значимость исследований. М.Н. Львовой проведен подробный гистологический сравнительный анализ изменений в гепатобиллиарной системе сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) в динамике развивающейся патологии от 2 недель до 6 месяцев при внедрении в организм хозяина гельминтов *O. felineus* или *O. viverrini*. Результаты этого анализа позволили автору говорить о разной степени патогенности этих видов и связать более ранние и выраженные гистопатологическими изменениями печени хомячков после заражения *O. felineus* с присутствием в экскреторно-секреторном продукте этого вида продукта детоксикации гема – гемозоина и широкого спектра многофункциональных белков. Причем наличие этого пигмента было не только в кишечнике гельминтов *O. felineus*, но и в ткани печени хозяина. Автор впервые показала, что трематоды *O. felineus* и *C. sinensis* являются гематофагами, у которых обезвреживание гема происходит в кишечнике путем формирования кристаллов гемозоина на поверхности липидных капель. С привлечением современных методов исследования таких как, масс-спектрометрия и биоинформатический анализ, автором показано, что, в отличие от *O. viverrini*, в состав секрета *O. felineus* входит большее количество антиоксидантных и протеолитических ферментов, из них мажорными являются глутатион-S-трансфераза и катепсин F. В дальнейшем автором была получена рекомбинантная форма одного из белков экскреторно-секреторного продукта – тиоредоксин пероксидазы, участвующего в патоморфогенезе описторхоза, вызванного *O. felineus*, и антитела к этому белку.

Таким образом впервые проведено комплексное исследование последствий экспериментального *O. felineus*-описторхоза с акцентом на специфические особенности патогенеза, обусловленные этим видом. Бесспорно, что полученные автором уникальные данные вносят большой вклад в фундаментальные исследования биологии гельминтов разных видов и их взаимоотношениях с хозяином. Полученные результаты будут полезны как для студентов биологов, так и медиков, изучающих причины и последствия развития болезни в рамках курсов по паразитологии, гистологии, цитологии и молекулярной биологии. Установленный состав секрета *O. felineus* необходим для совершенствования диагностики заболевания и поиска соответствующих методов лечения больных с учетом стадии развиваемой патологии.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Автором получен обширный экспериментальный материал. Обоснованность и достоверность полученных результатов не вызывают сомнений, выводы, являются корректными.

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на семи российских и международных конференциях и конгрессах, и представлены в виде 4 научных статей в журналах, входящих в международную базу цитирования WoS.

Научные положения, выносимые на защиту, и выводы по результатам проделанной

работы хорошо продуманы, доказаны полученным экспериментальным материалам и не вызывают сомнений.

Рекомендации по использованию результатов диссертации.

Материалы диссертации могут быть использованы как теоретическая база в научно-исследовательских институтах гистологического, молекулярно-генетического, паразитологического и фармакологического профиля, а также в курсе лекций по паразитологии, гистологии, цитологии и клеточной биологии государственных университетов.

Краткая характеристика основного содержания диссертации. Диссертационная работа М.Н. Львовой написана четко, логически выдержана, очень хорошо иллюстрирована, оформлена традиционно. Она состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), главы с изложением результатов собственных исследований и их обсуждением (глава 3), заключения, выводов и списка литературы, а также двух приложений. Работа изложена на 150 странице, содержит 40 рисунков и 2 таблиц и 2 приложения. Список цитируемой литературы включает 308 работ в основном зарубежных авторов.

В вводной части диссертации обосновывается актуальность проблемы, определяются цели и задачи исследования.

Обзор литературы (глава 1) состоит из 6 параграфов и демонстрирует хорошую эрудицию автора по исследуемой проблеме. Объем этой части диссертации достаточно полный (38 стр.) и касается исключительно темы диссертации. В 1-ом параграфе обзора дана общая характеристика семейства Opisthorchiidae (*O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*). Приводятся данные по географии исследуемых видов и эпидемиологии описторхоза. Подробно описывается жизненный цикл описторхов, а также морфологические особенности описторхид в зависимости от стадии развития. В 5-ом пункте 1-го параграфа этой главы приводятся противоречивые данные, описывающие характер питания описторхид, и обосновывается необходимость изучения литературы по гематофагии у трематод. Во 2-ом параграфе обзора литературы приведены примеры паразитов, питающихся кровью и особенности способов обезвреживания гема у них. Делается вывод о том, что наиболее распространенным способом детоксикации гема у гельминтов является образование железосодержащего темно-коричневого пигмента – гемозоина. Далее описываются возможные способы формирования гемозоина у различных паразитов. Так как для исследования гемозоина широко используется синтетический аналог β-гематин, в данном параграфе перечислены способы его получения. Автор приводит литературные данные о биологической роли гемозоина как для паразитов, так и для их окончательных хозяев. В 3-ем пункте первой главы автор приводит литературные

данные о культивировании описторхид в лабораторных условиях на различных стадиях с целью изучения их биологических особенностей. Далее в 4-ом и 5-ом параграфе описан патогенез, а также схожие и специфические патоморфологические изменения печени при *O. felinus*- и *O. viverrini*-описторхозе, что свидетельствует о необходимости сравнительного гистопатологического исследования печени при экспериментальной моноинвазии *O. felinus* и *O. viverrini*. Так как одним из ведущих патогенетических факторов является токсическое воздействие продуктов жизнедеятельности гельминтов на организм хозяина в 6-ом параграфе подробно описаны состав экскреторно-секреторных продуктов трематод и, в частности, описторхид и современные подходы к изучению секретомов. Таким образом, литературные данные достаточно полно отражают современное состояние поднятых в диссертации вопросов, логично обосновывают цель и задачи диссертационного исследования, сформулированные в работе.

Раздел «Материалы и методы» (глава 2) написан достаточно подробно и четко. Выбор методов соответствует поставленным задачам и включает проведение экспериментов на самцах сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*), инфицированных метацеркариями *O. felinus*, *O. viverrini* или *C. sinensis* и отбор различного биологического материала. Он впечатляет большим количеством используемых современных методов исследования, как гистологических и микроскопических, так и молекулярно-биологических, протеомных и биоинформатических. Использование приведенных методов исследования подчеркивают высокую квалификацию диссертанта М.Н. Львовой.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» состоит из 4 параграфов и содержит собственные данные, большинство из которых получено впервые. В 1-ом параграфе изложены и обсуждены новые результаты сравнительного анализа гистопатологических изменений печени при описторхозе, вызванном *O. felinus* и *O. viverrini*. Выявлены видоспецифические различия по интенсивности и срокам возникновения патологических проявлений у животных, инфицированных разными видами описторхов. Показано, что только при *O. felinus*-описторхозе в кишечнике гельминтов и в окружающих тканях хозяина накапливаются депозиты темного пигмента. Так как для *O. viverrini* в литературе уже описана весомая роль экскреторно-секреторного продукта в патогенезе возникающих в печени изменений и определен белковый состав, 2-ой и 3-ий параграфы данной главы посвящены исследованию ЭСП *O. felinus*. Во 2-ом параграфе проанализировано содержимое кишечника 3-х представителей семейства Opisthorchiidae (*O. felinus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*) и впервые доказано, что *O. felinus* и *C. sinensis* являются гематофагами, а обезвреживание гема у них происходит с помощью формирования кристаллов гемозоина на поверхности липидных капель.

В 3-ем параграфе описан белковый состав экскреторно-секреторного продукта *O. felineus*, его распределение по тканям хозяина, на основании этих данных сделан правомерный вывод о том, что в патогенезе описторхоза, вызванного этим гельминтом, экскреторно-секреторный продукт также играет важнейшую роль. В 4-ый параграф посвящен получению рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* (одного из компонентов секрета), поликлональных антител к нему. Показано схожее распределение этого белка по тканям хозяина и, следовательно, его роль в патогенезе. В целом полученные результаты проливают свет на особенности биологии представителей семейства Opisthorchiidae, расширяют представления о патогенезе описторхоза и взаимоотношениях в системе «паразит – хозяин», что необходимо для совершенствования диагностики и лечения *O. felineus*-описторхоза.

Представленная диссертационная работа имеет четкий стиль и логику изложения.

Таким образом, диссертационная работа Марии Николаевны Львовой представляет собой высококвалифицированное комплексное законченное исследование, выполненное на высоком методическом уровне, результаты которого имеют научное и практическое значение.

Замечания

1. Название работы включает только один вид описторхид - *O. felineus*, в то время как в цели и в задачах исследования, как и на протяжении всего изложения, сравнивается влияние на организм окончательного хозяина (золотистого хомячка или человека) трех видов трематод, *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*. Было бы логичнее отразить в названии диссертационной работы все используемые в работе виды рода - *Opisthorchis* spp. Например, «Экспериментальное исследование патогенеза описторхоза, вызванного трематодами *Opisthorchis* spp.».

2. В опытах по заражению хомяков использовалось по 50 метацеркарий. Непонятен выбор авторов: по какой-то методике или это находка авторов. Возможно, надо было аргументировать дозировку. В результатах описывается воздействие трематод на ткани печени, но нигде не сказано о приживаемости метацеркарий. Возможно, что количество прижившихся метацеркарий также может оказывать влияние на воздействие трематод на печень хозяина.

3. На рисунках не всегда подрисуночные подписи соответствуют обозначениям на рисунке. Например, на рис. 18А есть обозначение Эр, в подрисуночной подписи отсутствует его объяснение. И, наоборот, в подрисуночной подписи есть комментарий «В – вена», но на рисунке нет такого обозначения. На рисунке 39 есть несоответствие подписанных дорожек гель-электрофореза. Так 6-9 это очищенный рекомбинантный белок и 9 – это маркер. На этом же рисунке непонятно, почему дорожки 2 и 4 подписаны одинаково при различной

электрофоретической картине.

4. В рукописи не везде корректно упоминаются видовые латинские названия. При первом упоминании вида рекомендуется писать его полное биномиальное название и авторов вида. Диссертантка употребляет *E. caproni* (Richard, 1964), а следует *Echinostoma caproni* (Richard, 1964). Хотя в другом разделе иной вид рода *Echinostoma* представляет как *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914).

Данные замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования М.Н. Львовой.

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:

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории систематики беспозвоночных животных

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Института систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук (ИСиЭЖ СО РАН)

Корниенко С.А.

31.01.2020 г.

Адрес: 630091, Новосибирск,

ул. Фрунзе, д.11

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

Подпись Корниенко С.А. удостоверяю

Начальник отдела кадров
ИСиЭЖ СО РАН



Базимирова М.Х.

31.01.2020