



УТВЕРЖДАЮ:

Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора

Р.А. Максютов

" 3 " февраля 2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о диссертационной работе Львовой Марии Николаевны
**«ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОГЕНЕЗА ОПИСТОРХОЗА,
ВЫЗВАННОГО ТРЕМАТОДОЙ *OPISTHORCHIS FELINEUS*»**, представленной на
соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы диссертации

Работа посвящена трем представителем семейства Opisthorchiidae. Трематоды *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini*, *Clonorchis sinensis* и вызываемые ими заболевания человека остаются серьезной проблемой для здравоохранения во многих странах Евразии. В России обширные и интенсивные очаги описторхоза и клонорхоза связаны с Обь-Иртышским и Амурским речными бассейнами. В некоторых районах, где население традиционно употребляют речную рыбу в пищу, заболеваемость может достигать 60 и более процентов. Для клинической картины заболеваний, вызванных этими гельминтами, характерно длительное течение с симптомокомплексами холангита, холецистита, дискинезии желчных протоков и другими признаками заболеваний ЖКТ. Возможно развитие абсцессов печени, панкреатита и даже холангиокарциномы. Острые и хронические формы заболевания часто ассоциируются с развитием разнообразной иммунопатологии, зачастую с системными аллергическими реакциями. По данным различных исследователей, в мире до 40 млн. людей инфицировано этими трематодами, а в странах, где регистрируются данные заболевания проживает более 2 млрд. человек. В России, по официальным данным на 2018 год, описторхоз, вызываемый *O. felineus*, по-прежнему занимал первое место по количеству инфицированных людей среди биогельминтозов (примерно 80%). Следует отметить, что данные официальной статистики о заболеваемости населения описторхозом далеко не полные и, по всей вероятности, регистрируется только часть обратившихся за медицинской помощью пациентов, преимущественно с острой клинической картиной заболевания. Хронические формы заболевания, которые могут протекать годами, фактически не

регистрируются или регистрируются только частично.

Таким образом высокий уровень заболеваемости людей описторхозом/клонорхозом, вызываемым трематодами семейства Opisthorchiidae (*O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*), предопределяет высокую актуальность и значимость диссертационной работы. Недостаточность фундаментальных знаний по биологии этих трематод и механизмов их взаимодействия с организмом хозяина только подчеркивает необходимость выполнения данной диссертационной работы.

Основное содержание, уровень анализа и завершенность диссертации

Диссертация Львовой М.Н. объемом 150 страниц состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, главы собственных исследований, состоящей из четырех подразделов, заключения, выводов и списка литературы. В список литературы вошли 308 первоисточников, в том числе 34 публикации отечественных и 274 работы зарубежных авторов. Диссертация содержит 2 таблицы, 40 рисунков и 2 приложения.

Во введении обосновывается актуальность темы исследования, раскрыта степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы сформулирована следующим образом: провести «сравнительный анализ патоморфологических и патогенетических особенностей экспериментального описторхоза, вызванного представителями рода *Opisthorchis*». Описана научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, сформулированы выносимые на защиту положения диссертационной работы. Приведены данные по апробации результатов и личному вкладу автора.

В **первой главе** представлен обзор литературы, в котором имеются следующие разделы: общая характеристика семейства Opisthorchiidae (*O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*), гематофагия у паразитов, культивирование описторхид, патогенез описторхоза, патоморфологические изменения печени при описторхозе, экскреторно-секреторный продукт трематод и заключение. Структура обзора представляется обоснованной и полной. Сам обзор написан хорошо, обобщает основные современные работы и представления по теме диссертационной работы. Он читается с большим интересом. Отдельные подразделы обзора могут быть рекомендованы в качестве основы для подготовки обзорных статей или фрагментов монографии по теме исследования. В обзоре дано точное обоснование целей и задач настоящего исследования. По мнению автора, они заключались: (а) в исследовании динамики гистологических изменений гепатобилиарной системы сирийских хомячков при экспериментальном описторхозе, вызванном *O. felineus* и *O. viverrini*; (б) проведении

комплексного анализ состава содержимого кишечника *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*; (в) анализе белкового состава экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* и его возможной локализации в печени экспериментальных животных; (г) получении основного рекомбинантного белка экскреторно-секреторного продукта и антител к данному белку.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. Экспериментальная часть работы основана на большом экспериментальном материале. В целом, выбор методов исследования адекватен поставленным задачам, очень разнообразен и позволяет получать достоверные результаты.

Третья глава состоит из четырех подразделов в которых описаны результаты собственных исследований. Два подраздела связаны с морфологическими и гистологическими исследованиями трех видов трематод. Остальные разделы связаны с изучением экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) *O. felineus* методами протеомики и характеристики рекомбинантной тиоредоксин пероксидазы *O. felineus*.

В первом подразделе главы описано проведение сравнительного гистологического исследования изменений печени экспериментально инфицированных хомячков *O. felineus* и *O. viverrini*. Диссертант описал особенности гистологической картины при развитии экспериментального описторхоза, вызванного этими гельминтами. Более ранние и выраженные патологические изменения при описторхозе, вызванном *O. felineus*, заключались в развитии воспаления, гиперплазии и дисплазии эпителия, а также формировании гранулемы вокруг яиц паразита, холангиоэктазы, перидуктальный фиброза и холангиофиброза, накоплении в гепатобилиарной системе отложений гемозоина.

Использование морфологических методов исследования позволило установить, что *O. felineus* и *C. Sinensis* являются паразитами-гематофагами. Данный тип питания предопределяет цепочку биохимических событий по необходимости переваривания гемоглобина гельминтами и формированию гемозоина и его отложений в организме. Диссертант высказывает гипотезу о возможности разработки эффективных антигельминтных препаратов, специфически блокирующих этот процесс по аналогии с действием противомаларийных препаратов. В следующем подразделе описывается идентификация 45 белков в составе ЭСП и их предварительная классификация в соответствие с их биологической функцией. Автор описывает наличие структурных, антиоксидантных, транспортных белков, ингибиторов протеаз, а также наличие протеолитических и метаболических ферментов. В заключительном разделе главы описывается получение растворимого рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* в

прокариотической системе экспрессии и проведение иммуногистохимического исследования локализации данного белка при описторхозе.

Работа завершается кратким заключением, содержащим анализ и обобщение полученных результатов, список литературы. В состав работы включены 2 приложения. Они иллюстрируют результаты, характеризующие белковой состав *O. felineus* ЭСП и картирование пептидов с помощью MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии.

Научная новизна результатов исследований

На наш взгляд научная новизна исследования состоит в том, что получены результаты сравнительного гистологического исследования изменений печени при экспериментальном описторхозе, вызванном *O. felineus* и *O. viverrini*. Выявлены ранние и более выраженные структурные изменения гепатобилиарной системы организма хозяина.

Накоплены данные показывающие, что представители семейства Opisthorchiidae *O. felineus* и *C. sinensis* являются гематофагами. Определена природа пигмента, локализуемого как в кишечнике мариит *O. felineus* и *C. sinensis*, так и в гепатобилиарной системе экспериментальных животных. С помощью электронной микроскопии, спектроскопии и масс-спектрометрии установлено, что это гемозоин – продукт биокристаллизации (детоксикации) гема.

При помощи масс-спектрометрии и биоинформатического анализа, идентифицированы 45 белков в составе экскреторно-секреторного продукта *O. felineus*. 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. *O. felineus*, аналогично *O. viverrini*, выделяет экзосомоподобные везикулы.

Получен и исследован растворимый рекомбинантный белок тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* в прокариотической системе экспрессии. Иммуногистохимическое исследование локализации данного белка при описторхозе в организме хозяина позволило получить первые данные о возможном его участие в патогенезе описторхоза.

Обоснованность научных положений и достоверность полученных результатов

В целом, достоверность этих результатов не вызывает сомнений и может быть оценена как очень высокая. Эти данные были должным образом опубликованы в рецензируемых российских и международных журналах. Полученные результаты докладывались на многочисленных российских и международных конференциях и семинарах. Диссертация представляется оригинальным документом, в ней имеются необходимые ссылки на

использованные сведения других авторов. В диссертации приведены необходимые иллюстрации по проведению микроскопических и морфологических исследований. В тексте работы и приложениях представлены достоверные структурные данные по получению и анализу аминокислотных последовательностей ЭСП методами масс-спектрометрии с последующим биоинформационным анализом.

Научно-практическая значимость работы

Результаты сравнительного гистологического исследования печени хомячков, инфицированных *O. felineus* и *O. viverrini*, а также данные исследования ЭСП *O. felineus* расширяют имеющиеся представления о структурных изменениях гепатобилиарной системы и особенностях патогенеза экспериментального описторхоза. Это вносит вклад в фундаментальные знания о биологии паразита и о молекулярно-биологических основах взаимоотношений в системе «паразит – хозяин» при описторхозе. Данные масс-спектрометрического анализа экскреторно-секреторных белков *O. felineus* и знания о биохимических особенностях питания паразита необходимы для поиска новых терапевтических мишеней и дальнейшего усовершенствования методов иммунодиагностики описторхоза. Полученная рекомбинантная форма белка тиоредоксин пероксидаза *O. felineus* и поликлональные антитела к ней позволяют исследовать патогенез описторхоза на молекулярном уровне.

Кроме того, результаты биоинформационного анализа продуктов ЭСП могут быть использованы для изучения таксономии этих видов трематод, их сравнительной эволюции и могут стать основой для создания и усовершенствования генетической диагностики описторхоза и клонорхоза. Вне сомнения, структурные данные по белкам ЭСП могут быть полезны для исследования иммунопатологии, ассоциированной с описторхозом и клонорхозом. Оценка свойств этих белков может быть полезна в поиске новых биологически активных белков.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

- Установления факта, что представители семейства Opisthorchiidae *O. felineus* и *C. sinensis* являются гематофагами.
- Описание гистологических изменений печени сопровождающееся гиперплазией и дисплазией дуктального эпителия, воспалением, гранулемами вокруг яиц паразита, холангиоэктазами, перидуктальным и холангиофиброзом.

- Проведение структурного анализа экскреторно-секреторного продукта мариты *O. felineus* и выявление 45 белков, классифицируемых как антиоксидантные, цитоскелетные, транспортные белки, метаболические и протеолитические ферменты, а также ряд белков, неклассифицированных или с неизвестной функцией. Причем мажорными белками ЭСП *O. felineus* являются глутатион-S-трансфераза и катепсин F.
- Одновременное выявление ЭСП *O. felineus* в тканях гельминтов и в эпителии желчных протоков хозяина.
- Выделение рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* и получение антител к нему с последующим проведением иммуноцитохимического анализа. Выявление этого белка в эпителии желчных протоков хозяина и формулирование гипотезы о возможной роли тиоредоксин пероксидазы в патогенезе описторхоза.

Рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Львовой Марии Николаевны является самостоятельным и оригинальным исследованием. Представленная работа не лишена определенных недостатков. К ним следует отнести:

- Не совсем согласны с редакцией вывода 5 диссертационной работы. Представляется не совсем удачным использование термина «синтезированному». Исключение этого слова только бы улучшило восприятие данного вывода. Также улучшило бы восприятие данного вывода делетирование последней фразы вывода о доказательстве роли тиоредоксин пероксидазы.
- Имеются небольшие редакционные замечания. Так, например, использование двухязычных терминов - «*O. felineus*-описторхоз», «*O. viverrini*-описторхоз».

В целом, количество редакционных неточностей незначительно для текстов такого объема и сложности. Диссертация хорошо читается, написана профессионально и продуманно.

На наш взгляд, для достижения результатов диссертационной работы был использован адекватный набор разнообразных современных и классических методов для достижения цели диссертационной работы. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом и теоретическом уровнях. Выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам.

Полученные результаты могут быть также использованы в курсе лекций по клеточной биологии и паразитологии в ВУЗах.

Основные положения автореферата соответствуют тексту диссертационной работы.


Личный вклад автора

Основные результаты получены лично автором, которым была генерирована идея исследования, сформулированы цели, задачи и выводы. Самостоятельно проведено большинство лабораторных исследований, анализ и интерпретация полученных результатов. Ряд результатов получен в сотрудничестве с тайландскими коллегами и на базе ЦКП для проведения микроскопических и масс-спектрометрических исследований.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсуждены на научном семинаре отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, состоявшемся 31 января 2020 г, протокол № 22.

Заключение

Несмотря на сделанные замечания, диссертационная работа является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком научном уровне, и соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Кочнева Галина Вадимовна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией вирусных гепатитов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора 

Подпись Кочневой Г.В. удостоверяю,
ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора,
к.б.н., доцент



О.А. Плясунова

630559 р.п. Колываново, Новосибирская обл.,
Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Телефон: (383) 336-60-10

Факс: (383) 336-74-09

E-mail: vector@vector.nsc.ru

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