

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.011.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____
Дата защиты 19 февраля 2020 г. протокол № 4

О присуждении Львовой Мария Николаевна
учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Экспериментальное исследование патогенеза описторхоза, вызванного трематодой *Opisthorchis felineus*» по специальности 03.04.04 – клеточная биология, цитология, гистология принята к защите 04.12.2019 г, протокол № 22, диссертационным советом Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет Д 003.011.01 утверждён ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутверждён Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Львова Мария Николаевна, 1976 года рождения. В 2000 году с отличием окончила Новосибирскую государственную медицинскую академию, г. Новосибирск. В 2007 году окончила очную аспирантуру при ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН. С 2008 г. по настоящее время Львова М.Н. работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Мордвинов Вячеслав Алексеевич** – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. **Беклемишев Анатолий Борисович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генной инженерии, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

2. **Корниенко Светлана Александровна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории систематики беспозвоночных животных ФГБНУ Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р.п. Кольцово. В своём положительном заключении, подписанном заведующей лабораторией вирусных гепатитов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», д.б.н., Кочневой Г.В. и утверждённом генеральным директором ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», д.б.н. Максютковым Р.А., указало, что «диссертационная работа является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком научном уровне, и соответствует требованиям п.9

«Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.04.04 – клеточная биология, цитология, гистология. Отзыв на диссертацию и автореферат обсужден на научном семинаре отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, состоявшемся 31 января 2020 г, протокол № 22.».

Соискатель имеет всего 44 публикации, из них 11 – по теме диссертации, общим объёмом 47 страниц, в том числе 4 статьи, опубликованных в научных рецензируемых изданиях, (Scopus, WoS) и 7 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций.

Наиболее значительные публикации по теме диссертации:

1. **L'vova M.N.**, Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Sripa B. Comparative histopathology of *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke. // Parasitol. Int. 2012. V. 61. № 1. P. 167–172. doi: 0.1016/j.parint.2011.08.005.
2. **Львова М.Н.**, Дужак Т.Г., Центалович Ю.П., Катохин А.В., Мордвинов В.А. Секретом мариты печеночного сосальщика *Opisthorchis felinus*. // Паразитология. 2014. Т. 48. № 3. С. 169–184.
3. **L'vova M.**, Zhukova M., Kiseleva E., Mayboroda O., Hensbergen P., Kizilova E., Ogienko A., Besprozvannykh V., Sripa B., Katokhin A., Mordvinov V. Hemozoin is a product of heme detoxification in the gut of the most medically important species of the family Opisthorchiidae. // Int. J. Parasitol. 2016. V. 46. № 3. P. 147–156. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.12.003.
4. Petrenko V.A., Pakharukova M.Y., Kovner A.V., **L'vova M.N.**, Lyakhovich V.V., Mordvinov V.A. Secretion of Thioredoxin Peroxidase Protein of Cat Liver Fluke *Opisthorchis felinus* during Modeling of Experimental Opisthorchiasis. // Bull. Exp. Biol. Med. 2017. V. 162. № 6. P. 773–776. doi:

10.1007/s10517-017-3710-5.

На диссертацию и автореферат поступило 14 отзывов, все положительные.

Отзывы прислали:

1. Архипов И.А. – д.в.н., профессор, зам. руководителя по научной работе, зав. лаборатории экспериментальной терапии, Всероссийский НИИ фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН» (г. Москва).
2. Атаев Г.Л. – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой зоологии ФГБОУ ВО Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена (г. Санкт-Петербург).
3. Никишин В.П. – д.б.н., с.н.с., главный научный сотрудник лаборатории экологии гельминтов ФГБУН Институт биологических проблем Севера ДВО РАН (г. Магадан). «...(интересно, а какую роль в питании гематофагов играет тегумент у тех и других, если, конечно, играет?), идентификацию белков в экскреторно-секреторных продуктах кошачей двуустки (интересно, а каким именно образом эти продукты в виде экзосомоподобных везикул выделяются из тела трематоды и распространяются в другие локусы печени, свободные от паразитов?), дифференцировку особенностей патогенеза трематод в зависимости от их видовой принадлежности, формирование кристаллов гемозоина на поверхности липидных капель (надо понимать, что липидные капли являются одним из результатов распада клеток крови?). Участие тегумента во взаимоотношениях паразита и хозяина, показанное в работе, подразумевает (прямо или косвенно) определенную роль гликокаликса трематод в их осуществлении – в автореферате об этом если и говорится, то вскользь, хотя даже полученные результаты уже требуют уточнения существующих взглядов на его химические свойства.»

4. Крещенко Н.Д. – к.б.н. ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики рецепции Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»» (г. Пущино).

5. Беспрозванных В.В, - д.б.н. заведующий лабораторией паразитологии ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН (г. Владивосток). «Имеются некоторые вопросы и замечания по содержанию автореферата 1. В названии фигурирует только *O. felineus*, в то время как в цели – обозначены представители рода *Opisthorchis*, а в задачах, помимо *O. felineus* говорится о *O. viverrini* и *C. sinensis*? 2. При патоморфологических исследованиях, тем более при сравнительном анализе сроков и интенсивности патологических изменений при инфицировании *O. felineus* и *O. viverrini* не обозначена интенсивность инвазии червями окончательных хозяев.»

6. Кутырев И.А. – д.б.н., с.н.с. лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН» (г. Улан-Удэ). «Наряду с этим, возникают некоторые вопросы и замечания к работе. Обозначения на отдельных рисунках слишком мелкие, сливаются с фоном, что затрудняет их восприятие. В таблице 1 белок под названием «26kDa GST» имеет молекулярную массу 25038 Да, а белок «28 kDa GST» - 24676. На рисунке 11 обозначения у 2 и 4 дорожек одинаковые, а картины фореа различаются»

7. Семенова С.К. – к.б.н. старший научный сотрудник лаборатории организации генома Институт биологии гена РАН (г. Москва).

8. Глупов В.В. – Член-корр. РАН, директор ФГБНУ Институт систематики и экологии животных СО РАН (г. Новосибирск).

9. Бакштановская И.В. – к.б.н., ведущий научный сотрудник, ученый секретарь ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (г. Тюмень).

10. Ромашов Б.В. – д.б.н. с.н.с. главный научный сотрудник ФГБУ «Воронежский государственный природный биосферный заповедник им. В.М. Пескова» (г. Воронеж).

11. Айдагулова С.В. – д.б.н. профессор зав лаборатории клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ (г. Новосибирск).

12. Долгих В.В. – д.б.н., зав. лабораторией молекулярной защиты растений ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (г. Санкт-Петербург).

13. Теренина Н.Б. – д.б.н. ведущий научный сотрудник Центр паразитологии Институт проблем экологии и эволюции им. Н.А. Северцева РАН (г. Москва).

14. Одоевская И.М. – к.б.н. ведущий научный сотрудник зав лаборатории иммунологии и молекулярных исследований Всероссийский НИИ фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН» (г. Москва).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области клеточной и молекулярной биологии, а также паразитологии, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали своё письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одной из ведущих организаций в нашей стране по фундаментальным научным исследованиям в области клеточной, молекулярной биологии, геной инженерии и биотехнологии, обеспечивающих научное и практическое обеспечение противодействия глобальным инфекционным угрозам.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований доказано, что гистопатологические изменения

гепатобилиарной системы сирийских хомячков, *Mesocricetus auratus*, при инфицировании их метацеркариями трематоды *Opisthorchis felineus* обусловлены способом питания этих гельминтов – гематофагией, и связаны с накоплением гемозоина (продукта детоксикации гема) и экскреторно-секреторного продукта марит в тканях печени хозяина в процессе развития заболевания.

Предложена гипотеза, что гемозоин, образующийся у гельминта в процессе переваривания гемоглобина и последующей биокристаллизации гема, может быть фактором, обуславливающим патоморфологические изменения тканей печени хозяина.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые проведен комплексный гистологический анализ последствий экспериментального описторхоза у хомячков, вызванного маритами трематод рода *Opisthorchis*, с акцентом на патологические изменения печени хозяина при заражении *O. felineus*.

Показано, что для описторхоза, вызываемого *O. felineus*, в отличие от *Opisthorchis viverrini*, характерны более ранние и выраженные патоморфологические изменения гепатобилиарной системы хомячков: воспалительная клеточная инфильтрация, гиперплазия и дисплазия эпителия желчных протоков, формирование гранул вокруг яиц паразита, перидуктального и холангиофиброза, что приводило к сужению просветов желчных ходов и др. Показано также, что эти процессы сопровождались накоплением в тканях печени хозяина экскреторно-секреторного продукта гельминта и депозитов пигмента.

Впервые **определена** структура пигмента, локализованного в кишечнике *O. felineus* и *Clonorchis sinensis*, а также в гепатобилиарной системе экспериментальных животных, исследован протеомный состав экскреторно-секреторного продукта марит *O. felineus* и его влияние на тканевые элементы печени хомячков.

Установлено, что депозиты пигмента являются кристаллами гемозоина, которые образуются на поверхности липидных капель в просвете кишечника гельминтов в процессе переваривания гемоглобина. Таким образом, доказано, что трематоды *O. felineus* и *C. sinensis* являются гельминтами-гематофагами, у которых обезвреживание гема, высвобождающегося в процессе пищеварения, происходит путем образования кристаллов гемозоина.

Установлено, что экскреторно-секреторный продукт *O. felineus*, в отличие от близкородственного вида *O. viverrini*, содержит большое количество антиоксидантных белков и протеолитических ферментов, среди которых глутатион-S-трансфераза и катепсин F являются мажорными.

Доказано, что экскреторно-секреторный продукт марит *O. felineus* и его компонент тиоредоксинпероксидаза присутствуют не только в тканях гельминта, но и в эпителии желчных протоков сирийских хомячков, в том числе не содержащих паразитов, что может быть одной из причин диффузного поражения гепатобилиарной системы.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что в ходе выполнения работы **получен** рекомбинантный белок тиоредоксинпероксидазы *O. felineus* и поликлональные антитела к нему, которые были использованы коллегами в исследовании операционного материала у пациентов с описторхозом и показали высокую иммуногенность тиоредоксинпероксидазы *O. felineus*.

Получены новые фундаментальные знания о патоморфологических изменениях гепатобилиарной системы хомячков при экспериментальном описторхозе, связанных со способом питания представителей семейства Opisthorchiidae и видоспецифическими особенностями состава их секрета, которые могут быть основой для создания и дальнейшего усовершенствования методов терапии и иммунодиагностики описторхоза, а также могут быть использованы для изучения таксономии трематод и их сравнительной эволюции.

Результаты диссертационной работы представляют интерес для научно-исследовательских организаций медико-биологического профиля, изучающих на клеточном уровне механизмы взаимоотношений в системе «паразит – хозяин» при гельминтных инвазиях и занимающихся поиском новых методов их профилактики и лечения. Результаты работы могут быть использованы в образовательном процессе на биологических, медицинских и ветеринарных факультетах высших учебных заведений.

Применительно к проблематике диссертации результативно применены стандартные подходы, используемые в гистологии, клеточной и молекулярной биологии, генной инженерии, а также биоинформатике. Они были оптимизированы к конкретным условиям экспериментов и включали окраску парафиновых срезов печени гематоксилин-эозином и иммуногистохимическое окрашивание поликлональными антителами, культивирование марит *O. felineus in vitro*, электрофорез белков в полиакриламидном геле, протеолиз белков в полиакриламидном геле и в растворе, масс-спектрометрию, выделение экзосомоподобных везикул, выделение кристаллов из марит гельминтов, получение кристаллов β -гематина, просвечивающую и сканирующую электронную микроскопию, инфракрасную Фурье-спектроскопию, клонирование нуклеотидной последовательности в прокариотическую систему экспрессии, получение и очистку рекомбинантного белка и поликлональных антител к нему, иммуноферментный анализ.

С их помощью выявлены особенности адаптации тканей печени сирийских хомячков к воздействию патогенетических факторов, связанных с заражением гельминтами рода *Opisthorchis*, а также видовые особенности биологии *O. felineus*.

Оценка достоверности результатов исследования выявила высокую воспроизводимость полученных результатов и наличие всех необходимых контролей к проводимым экспериментам. Результаты сравнительной оценки гистологических изменений печени при описторхозе, вызванным *O. felineus* и

O. viverrini, не противоречат имеющимся в литературе данным, но существенно дополняют их. При обсуждении результатов диссертационной работы о составе и роли в патогенезе описторхоза экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* учитывались клинические и экспериментальные данные, полученные ранее другими исследователями по рассматриваемой тематике.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии автора в планировании, проведении и обсуждении всех экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, участии в апробации результатов исследования и подготовке публикаций. Основные результаты получены автором самостоятельно. Исследование содержимого кишечника описторхид, а также электронная микроскопия микровезикул экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* проведены совместно с сотрудниками сектора структурной биологии клетки ИЦиГ СО РАН – к.б.н. Е.В. Киселевой и к.б.н. М.В. Жуковой. Масс-спектрометрические исследования выполнены совместно с к.б.н. Т.Г. Дужак в ЦКП Международного томографического центра СО РАН.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют п. 3. «Системный анализ взаимоотношений клеток, тканей и функциональных систем организмов – представителей всех царств», п. 5. «Исследование адаптации тканевых элементов к действию различных биологических, физических, химических и других факторов», п. 6. «Молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток многоклеточных, малоклеточных и одноклеточных организмов в норме и патологии» и п. 7. «Разработка экспериментальных моделей, методов цитологической диагностики, морфометрии, маркерной гисто- и цитохимии и др» паспорта специальности 03.04.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки).

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствует критериям пункта 9, абзац 2 «Положения о присуждении

ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

На заседании 19 февраля 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Львовой Марии Николаевне учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 6 докторов наук по специальности, участвующих в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 21, против – 1, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель
диссертационного совета,
академик РАН



В.К. Шумный

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

19.02.2020 г.