

ОТЗЫВ

официального оппонента Жигилевой Оксаны Николаевны о диссертационной работе Пирожковой Дарьи Сергеевны на тему «Структурно-функциональная организация генов сапозин В-подобных белков у описторхид», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность темы. Диссертация Пирожковой Дарьи Сергеевны посвящена изучению генов, кодирующих структуру сапозин В-подобных белков нескольких представителей трематод сем. Opisthorchiidae. Актуальность данной темы определяется, во-первых, высокой социальной значимостью паразитов данной группы как возбудителей заболеваний, которыми страдает значительный процент населения ряда территорий, включая РФ. Во-вторых, значимостью белков данной группы в патогенезе и устойчивости паразитов к лекарственным препаратам. Наличие литературных данных об обнаружении сапозин-подобных белков у родственных видов трематод (печеночных сосальщиков рода *Fasciola* и кровяных сосальщиков рода *Schistosoma*), а также функций этих белков во взаимодействии паразитов и хозяев позволили автору выдвинуть обоснованную **исследовательскую гипотезу** о возможности обнаружения гомологичных генов у описторхид и участии кодируемых ими белков в патогенезе описторхоза.

Для проверки исследовательской гипотезы автором поставлена **цель** провести сравнительно-эволюционный анализ генов сапозин В-подобных белков (SAP) описторхид и изучить их экспрессию. В **задачи** работы входил поиск соответствующих генов в геномах описторхид, описание их структуры, особенностей сплайсинга и доменной организации белков – продуктов этих генов; изучение филогении SAP трематод; оценка уровня экспрессии генов SAP на разных стадиях жизненного цикла описторхид и возможного влияния на него празиквантела, основного препарата для лечения описторхоза и клонорхоза.

Научная новизна проведенных исследований не вызывает сомнений и заключается в выявлении, описании структуры генов сапозин В-подобных белков (SAP) трех видов описторхид, определении их стадий-специфической экспрессии. Автором также описаны и предсказаны транскрипты этих генов, обнаружен новый уникальный высоко консервативный аминокислотный мотив в белке SAP3, функциональное и эволюционное значение которого пока не выяснено.

Полученные данные не только проясняют вопросы частной молекулярной генетики и филогенетики трематод, но и способствуют пониманию структурно-функциональной организации, приспособительного значения и эволюции генов сапозин-подобных белков в целом, что определяет **теоретическую значимость** оппонируемой диссертации.

Практическая значимость работы заключается в попытке прояснения молекулярных механизмов взаимодействия червей с лекарственным препаратом (празиквантелом), а также возможности использования описанных белков как потенциальных антигенов при разработке диагностических систем.

Структура и содержание работы. Диссертация изложена на 97 страницах. Основная часть состоит из введения и трех глав, включая обзор литературы, материалы и методы исследования, раздел с результатами исследования; а также заключения и выводов. Текст иллюстрирован 5 таблицами и 17 рисунками. Библиографический список включает 115 источников, из которых 105 – на иностранном языке.

Вводный раздел диссертации содержит все необходимые для квалификационной работы части, включая декларацию личного вклада. В этом разделе диссертант формулирует три **положения, выносимые на защиту**, хорошо согласующиеся с исследовательскими задачами и выводами.

Глава 1 по сути представляет собой **обзор литературы** по затрагиваемым в диссертации проблемам. В главе 1.1 описаны систематика и биология трематод – объектов исследования, особенности их морфологии и жизненных циклов, распространение, дана краткая характеристика вызываемых ими заболеваний.

Следует отметить неточности при описании жизненного цикла трематод. В частности, указание на то, что «в желудке окончательного хозяина метацеркария начинает эксцистироваться» (с. 16, последний абзац) не соответствует действительности. В желудке окончательного хозяина под влиянием пищеварительных ферментов последнего происходит переваривание только наружной капсулы, сформированной соединительной тканью 2-го промежуточного хозяина (рыбы). Собственно оболочка метацеркария, образованная секретом цистогенных клеток паразита, устойчива к ферментам и защищает метацеркарий от кислой среды желудка окончательного хозяина. Эксцистирование метацеркарий путем разрыва оболочки самой личинкой происходит только в двенадцатиперстной кишке в присутствии желчи. Знание этой закономерности имеет важное практическое значение, так как лежит в основе выделения метацеркарий из тканей рыб методом переваривания искусственным желудочным соком. И поскольку в рассматриваемой работе использовался метод постановки биологических проб, автор должна была знать эту особенность биологии паразита.

Глава 1.2 посвящена описанию физиологии печеночных сосальщиков и их взаимоотношению с хозяевами. Большое внимание в этом разделе уделено описанию ультраструктуры и функционирования тегумента трематод, представляющего собой структурно-функциональную основу взаимодействия паразита с хозяином. Вопросы, затрагиваемые в подглаве 1.2.3, касаются сведений относительно состава экскреторно-

секреторных продуктов трематод и имеют непосредственное отношение к результатам, полученным автором.

В главе 1.3 речь идет о структуре сапозин-подобных белков, подчеркивается их древность и широта распространения у разных групп эукариот, разнообразие свойств и выполняемых биологических функций. В том числе, показано сродство одного из сапозинов В к коэнзиму Q10, а также структурное сходство последнего с хлорохином и празиквантелом, что является теоретическим обоснованием предположения автора о возможном участии сапозин-В-подобных белков трематод в метаболизме этого лекарственного препарата и выработке лекарственной устойчивости червей.

В главе 1.4 автор обсуждает вопросы, связанные с механизмом действия празиквантела и выработкой паразитами устойчивости к лекарственным препаратам.

В целом, обзор литературы основан на новых источниках, логично структурирован, не перегружен лишней информацией и, несмотря на некоторые неточности, которые, скорее, носят дискуссионный характер, оставляет хорошее впечатление. Он показывает противоречивость и неполноту имеющихся литературных данных, и завершается четкой формулировкой и обоснованием исследовательской гипотезы.

В главе 2 описаны перечень реактивов и оборудования, работа с лабораторными животными, лабораторные процедуры и методы биоинформационного анализа. В то же время, отсутствует некоторая важная информация, в частности, об объемах выборок – не указано, сколько хомяков использовано в экспериментах, из каких видов и сколько экземпляров карповых рыб были взяты метацеркарии, каким методом извлекали метацеркарий (переваривания или компрессионным), проводилась ли видовая диагностика метацеркарий и предварительная оценка их жизнеспособности перед заражением хомяков.

Глава 3 посвящена описанию собственных результатов автора.

В главе 3.1 описаны результаты поиска и анализа сапозин-подобных белков описторхид биоинформационными методами. В биоинформационный анализ было вовлечено несколько специализированных баз данных нуклеотидных последовательностей, описаны условия и требования к надежности полученных результатов. Биоинформационные исследования были дополнены экспериментальной проверкой наличия гомолога клонорпорина в транскриптом *O. felinus*. Всего автором было выявлено в базах данных, секвенировано или предсказано 12 транскриптов, кодирующих сапозин В-подобные белки, в том числе один с наличием или отсутствием 12-нуклеотидного фрагмента в 5'-конце. Дополнительные исследования этого фрагмента позволили описать альтернативный сплайсинг мРНК OfSAP1 у *O. felinus*, в то время как у других изученных видов трематод (*C. sinensis* и *O. viverrini*) сайты для

альтернативного сплайсинга отсутствовали. Описаны сходства и различия структуры генов SAP у разных видов описторхид, а также в сравнении с генами фасциол и шистосом.

Выявленные последовательности послужили основой для дальнейшего филогенетического анализа генов сапозин-подобных белков описторхид и других трематод, описанного в главе 3.2. Филогенетический анализ продемонстрировал отсутствие непосредственных эволюционных связей между SAP представителей разных отрядов и позволил автору сделать вывод о независимой мультипликации гена SAP у Fasciolidae и Opisthorchiidae.

В главе 3.3 описаны результаты изучения уровня экспрессии генов OfSAP1–3 на разных стадиях жизненного цикла по данным секвенирования РНК, экспериментально проверенных для *O. felineus* с помощью ПЦР в реальном времени. Выявлена дифференциальная экспрессия SAP1, 2 и 3 у разных видов описторхид, на разных стадиях жизненного цикла и в различных тканях. Показана стадиоспецифичность экспрессии ортологов SAP1–3 у четырех изученных видов описторхид: экспрессия генов SAP1 и SAP2 характерна для половозрелых стадий паразитов, в то время как SAP3 специфически экспрессируется у метацеркарий.

В главе 3.4 описаны результаты экспериментов по влиянию празиквантела на экспрессию генов SAP в модельной системе «сирийские хомяки – *O. felineus*». Опыты по заражению хомяков с последующим лечением их празиквантелом показали относительно низкую и значительно различающуюся эффективность препарата у разных животных. Обращает на себя внимание небольшое количество животных в эксперименте (3 в контроле и 6 в опыте), что не позволило автору осуществить статистическую обработку данных и обосновать выявленные закономерности в опытах *in vivo*. В опытах *in vitro* (табл. 5) объемы выборок были больше, но статистическая обработка также не была выполнена. Хотелось бы знать, выявлены ли достоверные различия между вариантами с разной концентрацией празиквантела.

В подглаве 3.4.3 (с. 70) не указано, какое количество червей было использовано в опытах, сколько микропрепаратов было сделано и у какого процента червей наблюдали описываемые эффекты по нарушению целостности тегумента. Можно было бы предположить, что это были те же черви и в том же количестве, что в предшествующей подглаве, но время инкубации и используемые концентрации празиквантела совпадают лишь частично. Информации о количестве червей, используемых в этом опыте, нет и в главе Материалы и методы (с. 40).

В подглаве 3.4.3 представлены данные о дифференциальной экспрессии генов SAP после обработки празиквантелом в опытах *in vivo* и *in vitro*. Получены интересные результаты, подтвержденные статистически, и указывающие на преимущественное повышение

экспрессии гена OfSAP2 после обработки празиквантелом, а также после инкубации червей *in vitro*.

Проведенные исследования и анализ литературных данных позволили автору предположить возможные функции сапозин В-подобных белков описторхид, описанию которых посвящен раздел 3.5. И хотя вопрос о функциях этих белков остается открытым, и описание главы носит характер предложения различных гипотез и их обсуждения, проведенные исследования вносят определенный вклад в решение этой проблемы.

В **Заключении** автор еще раз подчеркивает важность изучения сапозин В-подобных белков описторхид, а также подводит основные итоги собственных исследований.

Выводы полностью соответствуют поставленным задачам и отражают содержание работы.

Замечания по работе.

Использование автором термина «взрослые черви» не корректно, правильнее было бы говорить о половозрелой стадии, которая у трематод имеет собственное название – марита.

Встречаются отдельные опечатки, например, на с. 5, 1 абз., с. 8, 3 абз., с. 15, 2 абз., с. 23, 2 абз., с. 25, 2 абз.; стилистические ошибки (например, на с. 80, абз. 1: «В большинстве случаев функции SAP связывают с разрушением клеточных или бактериальных мембран в процессе питания или для иммунной защиты от микроорганизмов»).

Отмеченные недостатки не умаляют достоинств работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Пирожковой Дарьи Сергеевны является полноценным законченным трудом, выполненным автором самостоятельно на высоком научно-методическом уровне, написана хорошим литературным языком, стиль изложения – доказательный. Работа содержит достаточное количество исходных данных, иллюстрирована таблицами и рисунками.

Автор продемонстрировала владение разнообразными методами лабораторных и биоинформационных исследований, способность к планированию научно-обоснованных экспериментов, грамотному представлению и критическому обсуждению результатов.

Оценивая рецензируемую работу в целом, следует отметить высокую значимость представленных научных материалов, их теоретическую ценность и практическую направленность. Текст автореферата в целом полно отражает основное содержание диссертации. Результаты работы апробированы в форме докладов на двух съездах профессиональных научных обществ и достаточно полно отражены в 3 статьях в ведущих рецензируемых международных изданиях.

Диссертационная работа «Структурно-функциональная организация генов сапозин В-подобных белков у описторхид» соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 и требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Пирожкова Дарья Сергеевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Профессор кафедры экологии и генетики
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения
высшего образования
«Тюменский государственный университет»,
д-р биол. наук, доцент

Жигилева Оксана Николаевна

625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6
Тел.: +7 (904) 875 14 33

Адрес электронной почты: zhigileva@mail.ru, o.n.zhigileva@utmn.ru

Подпись О.Н. Жигилевой удостоверяю

Ученый секретарь
Федерального государственного
автономного образовательного учреждения
высшего образования
«Тюменский государственный университет»
канд. экон. наук, доцент

12 мая 2021 г.



Лимонова Эмма Михайловна