

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию Запариной Оксаны Геннадьевны
«Роль окислительного стресса в развитии неоплазии холангиоцитов на
экспериментальной модели описторхоза»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.22. - клеточная биология**

Описторхоз – заболевание из группы трематодозов, вызываемое паразитическими плоскими червями рода *Opisthorchis* – имеет большую эпидемиологическую и эпизоотическую значимость. Описторхоз, вызываемый трематодой *Opisthorchis viverrini*, распространён в Юго-Восточной Азии. На территории России главный очаг заболевания находится в Западной Сибири и вызывается кошачьей двуусткой *O. felineus*. Описторхоз сопровождается значительным патогенным воздействием на организм окончательных хозяев. Показано, что описторхиды, распространенные в Юго-Восточной Азии, могут быть канцерогенами и основными факторами развития рака эпителия желчных протоков. В отношении *O. felineus* ранее также было показано, что описторхоз в сочетании с применением нитрозамина может вызывать рак желчных протоков у хомячков в эксперименте. Однако однозначно не была показана роль *O. felineus* в канцерогенезе и не были исследованы молекулярные механизмы этого процесса. Этим определяется теоретическая значимость и большое практическое значение исследование для *O. felineus* молекулярных механизмов патогенеза и возможности являться канцерогеном.

Диссертация Оксаны Геннадьевны посвящена поиску клеточных путей в развитии неоплазии и выявлению маркеров окислительного стресса при экспериментальном описторхозе. Она имеет традиционную структуру изложения материала: введение, 3 главы, обсуждение, выводы, заключение и список литературы. Работа изложена на 118 страницах, включает 19 рисунков и 6 таблиц, список литературы содержит 169 источников, в том числе – 154 иностранных.

В качестве основных объектов исследования соискателем были выбраны лабораторные животные (сирийские хомячки *Mesocricetus auratus*), которые были экспериментально заражены *O. felineus*. Кроме того, экспериментальные животные получали антиоксиданты Ресвератрол и SkQ1. Работа выполнена на достаточно большом объеме экспериментального материала с использованием молекулярно-биологических, биоинформатических, биохимических и гистологических методов.

В главе 1 – «Обзор литературы» – приводится обзор данных по биологии, жизненному циклу, эпидемиологии *O. felineus*. Описаны патологические изменения печени и молекулярные механизмы их формирования при описторхозе, в том числе, канцерогенез. Приводится информация по составу экскреторно-секреторного продукта *O. felineus*. Изложена информация по молекулярным механизмам, физиологическим эффектам окислительного стресса и защите организма от активных форм кислорода. Дана классификация и принцип действия природных и синтетических низкомолекулярных антиоксидантов. Из анализа литературных данных следует, что молекулярные механизмы, участвующие в развитии предраковых процессов - гиперплазии и неоплазии - при описторхозе не известны; ничего неизвестно о связи окислительных повреждений ДНК с неоплазией эпителия желчных протоков; не показана связь между продукцией АФК и наличием окислительных повреждений при описторхозе, вызванном *O. felineus*.

Глава 2. Материалы и методы исследования. В главе описаны материалы и методы исследования. Для решения поставленных задач был использован большой арсенал методов: экспериментального заражения и терапии животных, инкубирования паразитов, световой микроскопии, гистологические, иммуногистохимические, культуры клеток, вестерн блот анализа, анализа транскриптомов и дифференциальной экспрессии генов, ПЦР с детекцией в режиме реального времени, биохимического анализа, иммуноферментного анализа, статистической обработки данных. Между тем, по главе имеется ряд вопросов. В тексте присутствует неясная формулировка: «Гиперплазию, неоплазию, дистрофию паренхимы, воспалительную инфильтрацию и перидуктальный фиброз (срезы, окрашенные по Ван Гизону) оценивали в зависимости от площади, занимаемой в поле зрения среза». В результате остается непонятным, как же проводили оценку патологических изменений: количественно, полуколичественно; какие конкретно критерии оценки применяли? Интересно, почему протеазный ингибиторный коктейль добавляли в образцы не сразу же в лизирующий буфер вместе с PMSF, а только после гомогенизации? Не повлияло ли это на сохранность белков в лизате? Применялась ли для денситометрии нормализация по какому-нибудь контрольному белку с известной концентрацией, присутствовавшему при электрофорезе всех образцов? Кроме того, из утверждения «анализ результатов, полученных при выполнении экспериментов, был проведен в программе Statistica 6.0.» неясно, какие конкретно из полученных результатов анализировались в данной программе?

В главе 3 излагаются собственные исследования автора, а также встречаются элементы обсуждения. Произведено иммуногистохимическое выявление продуктов перекисного окисления липидов при описторхозе у золотистых хомячков на срезах

печени. Определено изменение содержания продуктов окислительных повреждений ДНК в моче у золотистых хомячков при описторхозе. Описываются морфологические изменения печени при описторхозе. Тем не менее, отсутствует достаточное подтверждение полученных результатов представлением адекватных микрофотографий. Так рис. 1В, на который ссылается автор на стр. 55, имеет настолько малое увеличение микрофотографий, что не позволяет увидеть «инфильтрацию мононуклеарными и эозинофильными клетками». На микрофотографиях не отмечены явления «пролиферации желчных протоков», «изменение эпителиальных клеток кубического эпителия на бокаловидные секретирующие клетки», что затрудняет проведение объективной оценки результатов, представленных в таблице 1. Отсутствуют микрофотографии срезов печени, окрашенные по Ван Гизону, позволяющие выявить фиброз. В связи с чем, остается непонятным, каким образом на рисунке 1А был определен «перидуктальный фиброз»? Интересно, почему параметр «воспаление» последовательно увеличивается на 1 и 3 месяц после заражения, но уменьшается через 18 месяцев? Что обозначено на рисунке 1 как «ВИ»? Также имеются вопросы по рисунку 3. Почему на рисунке 3А для TNF α отсутствуют фото иммуоблота в группе «контроль»? Несмотря на то, что через 3 и 18 месяцев после заражения уровень TNF α в печени значительно возрастает, через 6 месяцев его уровень достоверно снижается. С чем это могло быть связано?

Далее проводится анализ дифференциально экспрессируемых генов в печени при описторхозе хомячков. Ряд генов с наибольшими изменениями и экспрессируемых ими белков был подвержен более тщательному анализу. В этой части возникает вопрос по рисунку 5А. Каким образом на микрофотографиях срезов, меченных антителами к специфическим белкам, были идентифицированы такие патоморфологические изменения, как «перидуктальный фиброз» и «воспалительный инфильтрат»? Из тепловой карты (рисунок 5Б) видно, что для некоторых генов внутри отдельных групп (как контрольной, так и экспериментальных) наблюдается большой разброс значений параметра. В связи с чем, возникает закономерный вопрос: достаточна ли была выборка по 3 животных в каждой группе? Утверждение «...количество специфически окрашенных клеток было значительно выше в группах инфицированных животных по сравнению с интактными, существенной разницы между 1 и 3 месяцами инфекции не было...» на стр. 60 не подтверждено числовыми данными. В тексте указано, что «уровень экспрессии мРНК этих генов показан в виде тепловой карты (Рис. 4Б)». Видимо, имелся в виду все-таки рисунок 5Б?

Следующим этапом была оценка терапевтического потенциала антиоксидантов при экспериментальном описторхозе у хомячков. Показано воздействие антиоксидантов на

гистоморфологию печени при описторхозе. В этом разделе также возникают вопросы по рисункам 7 и 8. Почему изображение желчного протока присутствует на микрофотографиях «OF», «OF+Pec», «OF+SkQ1» и отсутствует на фото «Контроль», «Ресвератрол», «SkQ1»? Отсутствие идентичных морфологических структур на всех фотографиях не позволяет адекватно оценивать описываемые в разделе результаты. На микрофотографиях не отмечены явления «гранулематозное воспаление» «инфильтрация мононуклеарными клетками и эозинофилами», а также морфологические подтверждения «гиперплазии», «метаплазии», «неоплазии», что затрудняет проведение объективной оценки результатов. Отсутствует расшифровка обозначения «ПВ».

Проведено исследование влияния антиоксидантов на уровень экспрессии генов, кодирующих провоспалительные, профибротические факторы и генов антиоксидантной системы в печени хомячков при экспериментальном описторхозе. Определено содержание белков, способствующих развитию воспалительного ответа, белков антиоксидантной системы и маркеров фиброгенеза в печени; уровня 8-OHdG в моче хомячков экспериментальном описторхозе на фоне приема антиоксидантов. Также проведено иммуногистохимическое исследование влияния антиоксидантов на наличие маркеров перекисного окисления липидов в печени контрольных и зараженных животных. Кроме того, автором проведено исследование воздействия антиоксиданта SkQ1 на активацию транскрипционного фактора NRF2 на хомячках и в культуре клеток. Опять же возникает вопрос к оформлению иллюстративного материала. В тексте, ссылаясь на рисунок 15, описывается влияние антиоксиданта SkQ1 на соответствующие маркеры в печени при описторхозе. Однако в названии рисунка 15 это не отражено, в связи с чем, непонятно, на каких конкретно микрофотографиях показано влияние антиоксиданта. Вероятно, обозначенных «OF+S», хотя расшифровка этого обозначения в подписи к рисунку отсутствует. Проводилась ли количественная оценка наблюдаемых гистопатологических изменений?

Далее были измерены биохимические показатели, связанные с функционированием печени, в сыворотке крови хомячков, инфицированных *O. felinus*, при приеме антиоксидантов.

И на заключительном этапе проведено исследование сочетанного эффекта антиоксидантов и антигельминтика празиквантела на следующие показатели в организме хомячков, зараженных *O. felinus*: гистопатологические изменения печени; экспрессия генов, участвующих в регуляции процессов воспаления и фиброгенеза.

Завершается диссертационная работа обсуждением собственных результатов, выводами и заключением.

По диссертационной работе также имеется ряд вопросов и замечаний общего характера:

1) Во введении указано, что «биоинформатический анализ был выполнен д.б.н. в.н.с. Пахаруковой М.Ю». В таком случае остается непонятным, на каком основании в диссертационную работу был включен раздел «3.2. Анализ секвенирования транскриптомов печени хомячков при экспериментальном описторхозе»? В том случае, если имелся личный вклад диссертанта в получение данных результатов, это должно было быть указано в диссертационной работе.

2) Диссертант утверждает, что экскреторно-секреторные продукты гельминта «...обладают провоспалительными и генотоксичными свойствами...». Однако широко известен тот факт, что паразиты способны уклоняться и регулировать иммунный ответ хозяина, изменения его с Th1- на Th2-зависимый через секрецию определенных белков и метаболитов. Наблюдали ли Вы в ходе своих исследований какие-либо признаки противовоспалительного действия со стороны *Opisthorchis felineus* на организм хозяина?

3) Имеются ли какие-то сведения о практике применения препаратов ресвератрол и SkQ1 при лечении описторхоза у людей?

4) В тексте диссертации имеются многочисленные пунктуационные, орфографические ошибки, опечатки, причем иногда по несколько ошибок на одной странице. В частности, на страницах 16, 18, 19, 21, 23, 25, 28, 29, 31, 32, 34, 35, 36, 40, 41, 44, 47, 53, 54, 55, 57, 58, 60, 63, 70, 73, 77, 78, 81, 82, 83, 87, 93, 94, 95. Встречаются и неудачные или несоответствующие научному стилю выражения, например: «увеличивается от времени инфекции», «больных онкологией», «повышенный билирубин», «была оказана активация обоих типов генов».

Поставленные в начале исследования задачи выполнены полностью, описаны и тщательно проанализированы. Содержание автореферата отражает содержание диссертации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК, в одной из которых О.Г. Запарина является первым автором. Четыре из пяти статей опубликованы в высокорейтинговых международных журналах. Результаты исследований были неоднократно доложены на международных и всероссийских конференциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все высказанные в отзыве замечания носят дискуссионный характер и касаются структурной организации работы и редакционных моментов, не связанных с ее основным смыслом. Новые данные, полученные в диссертационной работе Запариной Оксаны

Геннадьевны, вносят существенный вклад в изучение молекулярных и клеточных механизмов развития патологических изменений в организме млекопитающих при описторхозе. Среди достоинств диссертационной работы следует также отметить комплексный подход к решению проблемы, большой объем использованных экспериментальных данных, глубокий статистический анализ данных, важную практическую значимость для ветеринарии и медицины.

Диссертационная работа «Роль окислительного стресса в развитии неоплазии холангиоцитов на экспериментальной модели описторхоза» представляет собой самостоятельное законченное научное исследование, соответствующее пп. 9 - 14 Положения о присуждении ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 N 842 (ред. от 01.10.2018)), а ее автор Запарина Оксана Геннадьевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. - клеточная биология.

Официальный оппонент
Кутырев Иван Александрович,
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории
паразитологии и экологии гидробионтов
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института общей и
экспериментальной биологии Сибирского
отделения Российской академии наук
(ИОЭБ СО РАН)

Куты

И.А. Кутырев

670047 Улан-Удэ,
ул. Сахьяновой, д. 6
ikutyrev@yandex.ru
Телефон ИОЭБ СО РАН: 8-3012-43-42-11
Сотовый телефон: 8-914-846-55-43

*Возможность подписать Кутырева И. А. доверяю
ведущий сотрудник отдела кадров
Смирнов Д. А.*

