



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ФБУН ГНЦ
ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
доктор биологических наук
Р.А. Максютов

«03» 03 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека на диссертационную работу

Запариной Оксаны Геннадьевны

**«Роль окислительного стресса в развитии неоплазии холангиоцитов
на экспериментальной модели описторхоза», представленную на
соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.22 – «Клеточная биология»**

Актуальность темы диссертационного исследования

Актуальность диссертационной работы связана с тем, что кошачья двуустка *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*) (Rivolta, 1884) очень широко распространена на территории России и стран Восточной Европы. Основной очаг этого заболевания находится на территории Западной Сибири, в бассейне реки Обь, где по разным оценкам заражено до 60 % населения сельских районов. Описторхоз сопровождается формированием очагов хронического воспаления в печени, фиброзом и неоплазий эпителия желчных протоков. Неоплазия эпителия, характеризующаяся многослойностью, атипичной морфологией, нарушением связей клеток с базальной мембраной, ассоциируется с развитием предракового состояния пораженного инвазией организма. В настоящее время известен целый комплекс данных, подтверждающих канцерогенность *O. felineus* для человека. Однако тонкие молекулярные механизмы и клеточные пути,

ведущие к развитию неоплазии эпителия желчных протоков фактически мало изучены.

Предшествующие гипотезы постулировали, что ключевую роль в генерации осложнений при трематодозах играет механическое повреждение клеток двуустками; действие активных форм кислорода, генерируемых иммунными клетками хозяина; влияние экскреторно-секреторного продукта гельминта. Все это приводит к накоплению мутаций, что в конечном счете приводит к неоплазии клеток эпителия. Косвенные данные предполагали возможность вовлечения окислительного стресса в структурные изменения печени и позволили предположить, что ингибирование свободных радикалов может положительно сказаться на состоянии тканей печени при описторхозе. В этой связи диссертант попытался использовать антиоксиданты с разным механизмом действия на развитие неоплазий при экспериментальной описторхозной инфекции.

В процессе выполнения диссертационной работы автором работы была сформулирована основная цель исследования: поиск клеточных путей в развитии неоплазии и выявление маркеров окислительного стресса при экспериментальном описторхозе на модели сирийских хомячков *M. auratus*.

Для достижения цели исследования решались следующие основные задачи:

- Проведение оценки накопления окислительных повреждений ДНК и липидов, возникновения морфологических изменений в печени и в организме сирийских хомячков при их экспериментальной инфекции.
- Выполнение анализа транскриптома печени инфицированных *O. felineus* хомячков с целью выявить дифференциально-экспрессирующиеся гены предположительно взаимосвязанные с данной инфекцией и проведение функционального анализа дифференциально экспрессирующихся генов, с подтверждением активации наиболее представленных клеточных путей с помощью иммуногистохимии и Вестерн-блот анализа.
- Исследование влияния антиоксидантов разного механизма действия (Ресвератрол и SkQ1(-10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium) на экспрессию генов Tnf, Inos,

Alox5, Ck7, Tgf β , Acta2, на структуру гепатобилиарной системы золотистых хомячков на фоне экспериментального описторхоза при их длительном использовании.

Цель работы и задачи исследования представляются актуальными. Положения, выносимые на защиту, полностью отражены в материалах диссертации. Основное содержание диссертационной работы позволяет говорить о решении поставленных автором задач. Полученные результаты не вызывают сомнений и являются принципиально новыми и научно-обоснованными. Все выводы подтверждены экспериментальным материалом и являются логическим завершением диссертационной работы.

Научная новизна и важнейшие достижения исследования

Научная новизна работы заключается в том, что диссертационная работа является первым комплексным исследованием роли окислительного стресса в развитии воспаления, неоплазии холангиоцитов и общего структурно-функционального состояния печени при описторхозе, вызванном *O. felineus*. Впервые показана взаимосвязь между маркерами окислительного стресса в тканях печени и выраженностью неоплазии холангиоцитов у сирийских хомячков при инфекции *O. felineus*. Динамика накопления малонового диальдегида и 4-гидрокси-2-ноненаля в тканях печени носит линейный характер и зависит от срока инфекции.

Впервые изучены изменения транскриптома в печени инфицированных *O. felineus* хомячков. Эпителиально-мезенхимальный переход, IL6/JAK/STAT3 сигнальный путь, TNF- α , NIPPO пути передачи сигнала, а также клеточные пути развития воспалительного ответа, взаимодействия с внеклеточным матриксом и регуляция клеточного цикла были наиболее представлены в печени инфицированных животных среди дифференциально-экспрессирующихся генов.

Используя ингибиторный анализ с антиоксидантами ресвератролом и SkQ1, впервые показано снижение уровня неоплазии эпителия желчных протоков и снижение уровня маркеров перекисного окисления липидов у инфицированных *O. felineus* хомячков. Таким образом, в работе удалось сформировать первые представления о механизмах, которыми может быть обусловлено повреждение печени и развитие неоплазии в результате инфицирования *O. felineus*.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

1. Выраженность неоплазий эпителия желчных протоков у сирийских хомячков, инфицированных *O. felineus* взаимосвязана с увеличением сроков инфекции и маркерами окислительного стресса в тканях печени.
 2. Проведенная аннотация 2151 дифференциально экспрессирующихся генов в печени инфицированных *O. felineus* хомячков показала, что наиболее представленными были элементы регуляторных путей эпителиально-мезенхимального перехода, IL6/JAK/STAT3, TNF- α , NIPPO, воспалительного ответа.
 3. Анализ транскриптома, иммуногистохимии и Вестерн-блот анализа показал, что при инфекции регистрируется активация эпителиальных (Cdh1) и мезенхимальных (Cdh2, Vim, Acta2, Colla1 и Mmp9) маркерных генов.
 4. Снижение степени развития неоплазии эпителия желчных протоков, а также ингибирование экспрессии мРНК и продукции белков, ассоциированных с воспалением (TNF- α , CD68) и с фиброгенезом (CK7, α SMA) связано с использованием антиоксидантов ресвератрол и SkQ1 и сопровождается улучшением структурно-функционального состояния тканей печени хомячков при длительной инфекции *O. felineus*.
- Поставленные цели и задачи диссертационной работы полностью соответствуют полученным результатам.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа выполнена в классическом стиле, она изложена на 118 страницах, содержит 19 рисунков, 6 таблиц. Список литературы содержит 169 ссылок на работы отечественных и зарубежных авторов.

В первой главе диссертационной работы представлен обзор литературы описывающий общую характеристику описторхид, их жизненный цикл, структурно-функциональные изменения в печени при описторхозе, роли молекулярных механизмов и метаболитов в структурно-функциональных изменениях в печени, рассмотрены основные понятия об окислительном стрессе, активных формах кислорода и системе антиоксидантной защиты организма, описаны антиоксиданты природного и синтетического происхождения и возможной роли окислительного

стресса в различных структурно-функциональных изменениях печени при описторхозе.

Во второй главе описаны методы и подходы, использованные для выполнения диссертационной работы. Описаны использованные биологические объекты, лабораторные животные, совокупность методов по получению метацеркарий описторхоза и структурной оценки поражений печени. Подробно описаны методы получения генетических материалов и оценки экспрессии генов, включая методы определения нуклеотидных последовательностей методами высокопроизводительного секвенирования, анализа ДНК библиотек.

Третья глава посвящена детальному описанию результатов. Глава разбита на пять подразделов в которых описана: динамика структурных изменений в печени животных в зависимости от срока инвазии описторхоза, анализ результатов секвенирования транскриптомов печени хомячков при экспериментальном описторхозе, влияние антиоксидантов на структурное и функциональное состояние печени при описторхозе, оценка биохимических показателей сыворотки крови и характеристика комбинаторного эффекта антиоксидантов с празиквантелом на структурное состояние печени, включая уровни экспрессии мРНК ключевых генов процессов воспаления и фиброгенеза.

Основные разделы диссертационной работы логично обсуждаются, и выводы работы формулируются на основе всей совокупности полученных результатов и отдельно поясняются в разделе заключение.

Полученные результаты были апробированы на ряде российских и международных конференций и конгрессах. По теме диссертации опубликовано 5 научных статей, в том числе 4 статьи в международных высокорейтинговых журналах, относящихся к квартилю Q1, и индексируемых в базах данных WoS и Scopus. Диссертационная работа соответствует опубликованным результатам.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность результатов диссертационного исследования Запариной О.Г. обоснованность основных положений, выводов и практических рекомендаций обеспечивается как современным уровнем исходных теоретических положений, так и разумной и адекватной задачам логикой плана исследования, использованием современных методов,

соответствующих поставленной цели и задачам, корректной статистической обработкой и интерпретацией полученных результатов.

Необходимо отметить личный вклад соискателя. Все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Таким образом, рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Запаринной Оксаны Геннадьевны является самостоятельным законченным исследованием, посвященным исследованию механизмов биологического канцерогенеза, в частности, изучению динамики предраковых изменений желчных протоков и маркеров неопластических процессов при экспериментальной инфекции печеночными трематодами семейства *Opisthorchiidae*. В работе удалось показать, что за формированием предраковых изменений стоит увеличение окислительных повреждений липидов и ДНК клеток хозяина. Повреждения возникают в результате действия избытка свободных радикалов, генерируемых в печени. Маркеры повреждений липидов, малоновый диальдегид и 4-гидрокси-2-ноненаль, накапливаются в тканях печени в прямой зависимости от времени инфекции; повышенный уровень маркера повреждений ДНК (8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин) сохраняется в течение всего времени инфекции.

В работе было выполнено секвенирование транскриптома печени и впервые выявлено 2151 дифференциально экспрессирующихся генов у инфицированных животных. Наиболее представленными среди обогащенных MSigDB путей в дифференциально экспрессирующихся генах были эпителиально-мезенхимальный переход, IL6/JAK/STAT3 сигнальный путь, TNF- α , HIPPO пути передачи сигнала, а также клеточные пути развития воспалительного ответа, взаимодействия с внеклеточным матриксом и регуляции клеточного цикла. Также продемонстрировано, что в тканях печени *O. felineus* инфицированных животных регистрируется повышенный уровень содержания маркеров воспаления CD68, TNF- α . Полученные результаты коррелируют с результатами изучения динамики предраковых изменений желчных протоков и указывают на важную роль хронического воспаления в биологическом канцерогенезе. Кроме того, было показано, что при инфекции *O. felineus* в тканях печени накапливается маркер альтернативно активированных макрофагов CD163. Вероятно, увеличение содержания этих клеток

приводит к обнаруженному в наших экспериментах росту продукции TGF β , активации миофибробластов и, соответственно, повышенной экспрессии α -SMA. Суммарно это приводит к усиленному отложению коллагена 1 и фиброгенезу. Таким образом, в работе выявлены клеточные пути, вовлеченные в развитие предраковых изменений, индуцированных инфекцией *O. felineus*.

Также было показано, что антиоксиданты ресвератрол и SkQ1 снижают степень воспаления и неоплазии эпителия желчных протоков при экспериментальном описторхозе. Полученные данные указывают, что ресвератрол и SkQ1 потенциально могут быть использованы в комплексной терапии описторхоза. Несмотря на то, что конкретные клеточные пути возникновения и развития предраковых патологических изменений при описторхозе все еще изучены недостаточно, данная работа показала, что окислительный стресс и окислительные повреждения биомолекул играют значимую роль в формировании таких предраковых повреждений печени, в частности, неоплазии эпителия желчных протоков.

Общие замечания по диссертационной работе

Представленная работа не лишена определенных недостатков. К ним следует отнести:

- На стр. 16 автореферата представлен список работ, опубликованных по теме диссертации. Простейший поиск показывает, что список публикаций, прямо или косвенно связанных с темой диссертации, далеко не полон. Например, в нем отсутствует статья Kovner A, Zaparina O, Kapushchak Y, Minkova G, Mordvinov V, Pakharukova M. Jagged-1/Notch Pathway and Key Transient Markers Involved in Biliary Fibrosis during *Opisthorchis felineus* Infection. Trop Med Infect Dis. 2022 Nov 9;7(11):364. doi: 10.3390/tropicalmed7110364.
- Автором получены принципиально важные данные по транскриптому печени при экспериментальном описторхозе. Он включает более 2150 дифференциально экспрессирующихся генов. Вполне очевидно, что это огромный объем генетической информации, который просто невозможно включить в текст работы или в приложения к ней. Было бы весьма полезно разместить эту информацию на общедоступных серверах. Это

может быть весьма полезно для других исследователей, работающих в этой и смежных областях.

- Количество неточностей и опечаток в работе минимальное.

Эти недостатки не снижают научной значимости диссертационной работы и, оценивая работу в целом, можно сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна, пионерский характер и достоверность не вызывают сомнений.

На мой взгляд, для достижения основных результатов диссертационной работы был использован адекватный набор молекулярно-биологических методов исследования в сочетании с современными методами высокопроизводительного секвенирования и анализа полученных массивов последовательностей методами компьютерного анализа.

Это позволило автору успешно решить задачи диссертационной работы. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом и теоретическом уровнях. Выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам.

Основные положения автореферата полноценно отражают материалы диссертационной работы. Опубликованные научные труды, исчерпывающие отражают содержание диссертационной работы. Научные положения, выносимые на защиту, достаточно полно отражены в опубликованных работах.

Заключение

Оценивая работу в целом, можно твердо сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Отзыв на диссертационную работу О.Г. Запариной «Роль окислительного стресса в развитии неоплазии холангиоцитов на экспериментальной модели описторхоза» обсужден и принят на Научном семинаре отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Федерального Бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (Протокол № 61 от 21 февраля 2023 г.).

Соответствие диссертации требованиям ВАК

Диссертационная работа Запаринной Оксаны Геннадьевны на тему: «Роль окислительного стресса в развитии неоплазии холангиоцитов на экспериментальной модели описторхоза» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук является законченной научно-квалификационной работой. Диссертация полностью соответствует требованиям пп. 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 (с изменениями в ред. Постановления Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016, №650 от 29.05.2017, №1024 от 28.08.2017, №1168 от 01.01.2018, №426 от 20.03.2021), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – «Клеточная биология».

Заведующий лаборатории, отдел
молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора,
д.б.н.

Г.В. Кочнева

Подпись Кочневой Г.В. удостоверено
Начальник отдела кадров
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора



И.В. Ильин

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)
630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
Тел: +7(383)363-47-00
E-mail: vector@vector.nsc.ru
Сайт: <http://www.vector.nsc.ru/>