

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Лисицы Андрея Валерьевча на диссертацию Пахаруковой Марии Юрьевны на тему «Структурно-функциональная организация системы метаболизма ксенобиотиков у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884)» по специальности 03.01.03 – молекулярная биология на соискание ученой степени доктора биологических наук

Актуальность избранной темы. Возбудитель описторхоза кошачья двуустка *Opisthorchis felineus* является паразитом человека и рыбоядных млекопитающих. Согласно приведенным в диссертации сведениям, до 45% населения эндемичных регионов в Западной Сибири заражены *O.felineus*. Предположительно, этот вид паразитических червей обладает канцерогенным потенциалом и является причиной возникновения холангиокарциномы. В представляемой к защите работе автор проводит комплексное исследование функционирования метаболических систем *O.felineus*, связанных с биотрансформацией и транспортом экзогенных и эндогенных субстратов. Знание закономерностей функционирования этих систем необходимо для понимания адаптации биохимических процессов паразитов к существованию в организме хозяина, и устойчивости к антипаразитарной терапии. Выбранный объект исследования, поставленные цель и задачи актуальны, поскольку белки системы метаболизма ксенобиотиков трематод могут стать основой для разработки новых антигельминтных препаратов направленного воздействия. Такие препараты на основе ингибиторов выбранных белков важны как в качестве монотерапии паразитозов, так и при разработке комбинаторных подходов в лечении паразитарных заболеваний. Поиск новых противоописторхозных лекарственных средств повышенной эффективности и безопасности, повышение эффективности уже выпускающихся антигельминтиков – приоритет современной медицины и фармакологии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Представленные в диссертации Пахаруковой М.Ю. научные положения и выводы базируются на глубоком, системном и разностороннем анализе проблематики с использованием широкого спектра методов. Исследование проводилось на нескольких уровнях (исследование биологии, транскриптомики, функциональной геномики *O.felineus*, включая анализ механизмов

синтеза генотоксических соединений) методами молекулярной и клеточной биологии, молекулярного клонирования, биохимии и биоинформатики. Оценка антигельминтных свойств веществ *in vivo* и *in vitro* выполнена как традиционными методами, так и согласно разработанным автором методикам, например, тестирование повреждений оболочки гельминтов. Основные результаты работы изложены в 13 статьях (две из них обзорного характера), опубликованных в российских и международных журналах. Положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации обоснованы и подтверждены экспериментально.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Ранее было распространено устойчивое мнение, что у паразитических червей отсутствует система цитохромов P450 и первая фаза метаболизма ксенобиотиков. На момент начала диссертационной работы, в 2009 году, в литературе присутствовали данные, лишь косвенно указывающие на наличие CYP системы у паразитических плоских червей. Предложенный автором дизайн исследования позволил провести экспериментальную проверку и впервые подтвердить существование функционально активной системы биотрансформации у данного вида червей. Результаты работы и сделанные из них выводы основаны на фактическом экспериментальном материале, грамотный анализ которого позволил получить статистически значимые результаты. Выводы, представленные в диссертационной работе, обоснованы и соответствуют полученным результатам.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

В диссертационной работе впервые сформировано представление о молекулярных механизмах, обеспечивающих функционирование базисных метаболических систем у паразитических червей. Знание законов функционирования этих систем необходимо для понимания адаптации биохимических процессов паразитов к существованию в организме хозяина.

Сведения о наличии белков надсемейства цитохромов P450 у плоских паразитических червей пригодятся при создании новых антигельминтных препаратов, поскольку показано, что данные белки являются перспективной фармацевтической мишенью. Антипаразитарная терапия, нацеленная на подавление функции цитохромов P450 или Р-гликопротеинов гельминтов, может быть перспективным подходом с точки зрения расширения сферы применения уже существующих в клинической практике лекарственных препаратов, - ингибиторов белков семейства CYP. В подтверждение

автор в своем исследовании провел эксперименты, подтверждающие эффективность азольных препаратов клотримазола и миконазола на уровне Празиквантела – противогельминтного лекарственного средства, в настоящее время основного препарата для лечения описторхоза.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Использование найденных компонентов системы биотрансформации и клеточного транспорта ксенобиотиков целесообразно при разработке новых антигельминтных лекарственных композиций, например, комбинаторных препаратов на основе празиквантела, обладающих избирательным действием на выбранные ферментативные или транспортные пути.

Содержание диссертации, ее завершенность. Диссертационная работа Пахаруковой М.Ю. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы и приложений. Список используемой литературы содержит 158 работ. Диссертационная работа изложена на 207 страницах машинописного текста, включает 8 таблиц и 47 рисунков.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности проблематики, приведены цель и основные задачи исследования, указана научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведено краткое описание методологии и методов исследования, представлены положения, выносимые на защиту, аргументирована достоверность полученных результатов и представлены результаты апробации диссертации.

Обзор литературы хорошо структурирован и дает целостное представление о биологии и канцерогенном потенциале исследуемых плоских червей. Автор подробно описывает систему метаболизма у описторхид, в том числе, адаптивные механизмы их существования в желчных протоках хозяина. Диссертантом раскрыты состав и функции системы метаболизма ксенобиотиков, освещены проблемы и существующие терапевтические решения в области терапии описторхоза, приведено описание методов поиска новых антигельминтных препаратов. Обзор литературы последовательно и понятным языком готовит читателя к восприятию дальнейшего материала диссертации.

В разделе «Материалы и методы» приводится подробное описание экспериментальных методов, в том числе, описаны гистологические методы, проведение тестирования препаратов *in vitro*, процедура приготовления лизатов

червей, выделения РНК, синтез кДНК и секвенирования СУР и Р-гликопротеинов, протокол проведения цифровой капельной ПЦР и ПЦР с детекцией в реальном времени, процедура проведения нокдауна генов методом РНК-интерференции, клонирования гена СУР в вектор для экспрессии в бактериальной системе. Данный раздел подтверждает, что диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне.

В разделе «Результаты и обсуждение» рассматриваются полученные результаты и проводится их подробный анализ. Автор идентифицировал *in silico* гены *O. felineus* и других паразитических плоских червей, кодирующие белки метаболизма ксенобиотиков и клеточной экскреции; проведено моделирование структуры этих белков и оценка их функциональной специфичности. Основой для описания особенностей системы метаболизма и транспорта ксенобиотиков в жизнедеятельности *O. felineus* явились результаты проверки полученных результатов с использованием технологии подавления экспрессии генов и ингибиторного анализа функциональной активности белков. Автор аргументированно и последовательно доказывает положения, выносимые на защиту.

Работа написана грамотным и понятным языком, поставленные в диссертации задачи решены полностью. Выводы четко сформулированы, отвечают поставленным задачам и положениям, выносимым на защиту. Автореферат отражает содержание диссертационной работы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом. Несомненным достоинством работы является предложенный автором комплексный подход к исследованию молекулярных механизмов функционирования *O. Felineus*, объединяющий методы биохимии, сравнительной геномики и постгеномного анализа. Вызывает уважение личное участие автора в планировании всех экспериментов, что подтверждает разностороннюю компетентность диссертанта. К достоинствам работы следует отнести то, что среди цитируемых источников ~20% из числа опубликованных в период 2014-2016 гг., что показывает современность и своевременность данной работы.

При знакомстве с работой возникли следующие вопросы и комментарии:

- 1) Стр. 55: «Многие линии мышей и крыс устойчивы к описторхозу, вызываемому *O. felineus* и *O. Viverrini*». Какие специфичные молекулярные механизмы, по мнению автора, лежат в основе формирования устойчивости у этих видов

- организмов к описторхозу? Могут ли эти особенности как-то быть использованы для решения задачи снижения распространенности описторхоза в регионе?
- 2) Может ли факт заражения описторхозом подтверждаться с использованием методов молекулярной диагностики – например, по наличию в крови антител? Является ли такой способ диагностики более информативным в сравнении с традиционно используемым (анализ на наличие яиц паразита), не позволяющим выявлять заболевших на ранних стадиях заражения?
 - 3) Стр. 86: «... (в отличие от *O.felineus*)... у *Fasciola hepatica* вообще нет оксистеролов, вероятно, существуют специфические ферментативные пути их генерации у *Opisthorchiidae*. Учитывая тот факт, что в качестве ферментативного пути продукции оксистеролов традиционно рассматривают монооксигеназы цитохромы P450, исследования системы P450 и системы клеточного транспорта метаболитов у паразитических червей становится наиболее актуальной задачей.». С какими особенностями и различиями в системе P450 автор связывает отсутствие оксистеролов у *F.hepatica* и их наличие у *O.felineus*, учитывая, что в геномах обоих видов присутствует только один ген, кодирующий белки надсемейства CYP?
 - 4) Довольно скромная часть раздела «Материалы и методы» уделена описанию процедуры выявления гомологов белков метаболизма ксенобиотиков, что затрудняет масштабирование предложенного в работе методического подхода для решения задач других исследований. На первом этапе для поиска CYP *O.felineus* в работе проводился анализ опубликованных неаннотированных транскриптомов и геномов нематод - геном *O. felineus* на момент проведения исследования секвенирован не был.
 - 5) В тексте диссертации цель работы сформулирована как «поиск и исследование структурно-функциональной организации систем метаболизма и транспорта ксенобиотиков у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*», что отличается от формулировки цели в автореферате «Цель настоящей работы идентификация и исследование...»
 - 6) Литературный обзор. Глава 3. Система метаболизма ксенобиотиков Раздел 3.1-3.3 включает 7 страниц описания, но приведена только одна ссылка на цитируемый источник – Montellano 2005.
 - 7) К незначительным замечаниям можно отнести следующие:

- в работе указано, что «... исследование призвано решить ряд практических вопросов, связанных с созданием базовой платформы для поиска новых белков мишеней для антипаразитарной терапии...». Несмотря на то, что в тексте работы приводятся аргументированные выводы о перспективности найденных молекулярных мишеней для антигельминтных препаратов, использование в данном контексте слово «платформа» звучит чересчур амбициозно;
- ряд рисунков, которые представлены в работе, не имеют соответствующего описания в тексте;
- текст содержит некоторые опечатки и погрешности оформления;

Указанные выше недочеты, судя по всему, имеют объяснение, и поэтому не являются принципиальными и не влияют на положительное заключение по диссертации.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней. Данная работа является первым комплексным исследованием функциональной геномики возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*, в частности, структурно-функциональной организации системы биотрансформации и транспорта как экзогенных, так и эндогенных субстратов. Полученные результаты о составе системы биотрансформации соединений у плоских паразитических червей опровергают бытующее мнение в современной научной литературе об отсутствии цитохромов P450 у паразитических видов. Содержание автореферата соответствует материалам, представленным в диссертации, и отражает суть проведенного исследования.

Пахарукова М.Ю. представила материалы, изложенные в работе, на 12 международных конференциях, в 14 публикациях в ведущих научных журналах, относящихся к списку ВАКа, и 1 патенте. Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов диссертации не вызывают сомнений. Автор хорошо владеет современной литературой по тематике, четко сформулировал цель и задачи исследования, которые полностью решил.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к докторским диссертациям, критериям пунктов 9-11, 13 и 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013

года № 842, с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор, Мария Юрьевна Пахарукова, заслуживает искомой степени доктора биологических наук по специальности «03.01.03 – молекулярная биология».

Официальный оппонент,

Доктор биологических наук, академик РАН,

Главный научный сотрудник,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ),

119121, г.Москва, ул.Погодинская, д.10 стр. 8

Телефон: +7(499)2463731

Эл.адрес: lisitsa063@gmail.com



(подпись)



(расшифровка подписи)

21 февраля 2017

Подпись



заверяю

Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карпова Е.А.

