

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации М.Ю. Пахаруковой «Структурно-функциональная организация системы метаболизма ксенобиотиков у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884)», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология

Дигенетические сосальщики (трематоды) семейства Opisthorchiidae – одни из самых распространенных и опасных гельминтов человека. Два представителя этого семейства *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* признаны канцерогенами первого класса опасности для человека. Для кошачьей двуустки *O. felineus* вопрос о канцерогенном потенциале остается открытым, несмотря на огромный ареал паразита на территории Европы и Азии и высокую зараженность населения в эндемичных регионах Западной Сибири. Это определяет актуальность и практическую значимость докторской диссертации Марии Юрьевны Пахаруковой «Структурно-функциональная организация системы метаболизма ксенобиотиков у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884)». Научная значимость диссертации, прежде всего, связана с отсутствием к началу ее выполнения какой-либо информации о системе биотрансформации экзогенных ксенобиотиков и эндогенных соединений у описторхид и трематод в целом.

Цель представленной работы сформулирована как идентификация и изучение структурно-функциональной организации такой системы у *O. felineus*. Для ее достижения диссертантом был сформулирован и успешно решен широкий круг задач, включающий в себя (1) поиск специфичных оксистерольных метаболитов холестерина в тканях паразита и хозяина; (2) биоинформационный поиск соответствующих генов, вовлеченных в процессы биотрансформации; (3) моделирование структуры кодируемых ими белков; (4) анализ их функциональной активности, значимости для жизнеспособности гельминтов и локализации в тканях паразита; (5) выбор белков-мишеней, перспективных для разработки новых антипаразитарных препаратов.

Успешное выполнение запланированных исследований стало возможным благодаря использованию диссертантом удобной экспериментальной модели – хомяки *Mesocricetus auratus*, искусственно инфицированные метацеркариями *O. felineus*, а также разнообразных, современных и достаточно сложных методических подходов. При проведении экспериментов автором были

использованы методы биоинформационного анализа последовательностей паразитических генов, определения констант связывания и IC_{50} для различных соединений, количественного ОТ-ПЦР, РНК-интерференции, молекулярного клонирования, гетерологичной экспрессии белков в бактериях с последующим хроматографическим выделением рекомбинантных продуктов, спектрофотометрического измерения активности цитохрома Р450, ВЭЖХ с tandemной масс-спектрометрией, световой и флюоресцентной микроскопии и т.д.

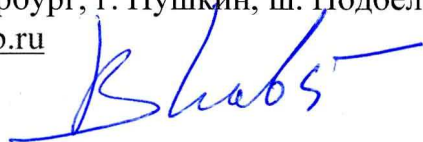
На первом этапе исследования диссертант впервые обнаружил оксистерольные метаболиты, идентичные или близкие по структуре оксистеролам *O. viverrini*, в экстрактах *O. felineus*, а также в желчи, крови и моче хозяина. Некоторые из обнаруженных оксистеролов оказались конъюгированными с азотистыми основаниями ДНК. Полученные данные показали, что канцерогенный потенциал кошачей двуустки следует признать сравнимым с потенциалом других описторхид и позволили предположить наличие у паразитов монооксигеназ системы Р450, традиционно ответственных за ферментативный биосинтез оксистеролов. Биоинформационный поиск цитохромов Р450 в геномах и транскриптомах плоских червей впервые показал, что у гельминтов (как трематод, так и цестод), в отличие от свободноживущих видов, сохранился всего один ген цитохрома Р450 (CYP). Высокая транскрипционная активность этого гена у взрослых червей *O. felineus*, обнаруженная диссертантом, свидетельствовала о его важной роли в жизни паразита, а использование в работе флюорогенных субстратов позволили локализовать его активность в районе выделительных канальцев и в экскреторном пузыре гельминта. Важная физиологическая роль изучаемого белка была подтверждена при подавлении уровня экспрессии кодирующего гена методом РНК-интерференции. Диссертанту удалось показать, что подавление экспрессии приводит к фенотипическим изменениям выделительной системы червя и снижению выживаемости гельминтов.

На следующем этапе исследования диссертантом была впервые осуществлена гетерологичная экспрессия в бактериях *E. coli* и очистка активных CYP *O. felineus* и *C. sinensis*. Рекомбинантный белок *C. sinensis* был использован диссертантом для измерения констант связывания с различными соединениями, что позволило автору отобрать ряд лигандов-ингибиторов для дальнейших исследований. Изучение антигельминтной активности этих соединений показало, что ингибирование монооксигеназной активности CYP *O. felineus* соединениями с азольной структурой вызывает изменения фенотипа гельминтов, сходные с эффектом подавления экспрессии гена, кодирующего этот фермент, а также их высокую смертность.

Наряду с изучением цитохрома P450, диссертант получил ряд интересных и важных результатов в ходе анализа систем, ответственных за дальнейшую судьбу ксенобиотиков. В частности, им было показано, что в отличие от круглых червей, плоские черви (и паразитические и свободноживущие) практически лишены таких ферментов второй фазы конъюгации как УДФ-глюкуронозил трансферазы. Автор также обнаружил в транскриптом *O. felineus* 23 гена, кодирующих ABC-транспортеры. В составе группы было обнаружено 4 гена Р-гликопротеинов и для двух из них показано значительное усиление экспрессии во взрослых червях. С помощью флюоресцирующего субстрата резорфина была показана активность Р-гликопротеинов в районе выделительной системы *O. felineus*, а также ее чувствительность к ингибиторам ABC-транспортеров, используемых в медицине, что может быть использовано для комбинаторной терапии гельминтозов.

Описанные результаты работы и сделанные на их основе выводы представлены на 12 международных научных конференциях и симпозиумах, опубликованы в виде 13 статей в ведущих отечественных и международных научных журналах из списка ВАК РФ и 1 патенте. Судя по содержательному, логично построенному, хорошо написанному и иллюстрированному автореферату, представленная работа полностью 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, а ее автор, Мария Юрьевна Пахарукова, заслуживает искомой степени доктора биологических наук по специальности «03.01.03 – молекулярная биология».

Директор Федерального государственного
научного учреждения «Всероссийский научно-
исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР),
доктор биологических наук, профессор, академик РАН,
заслуженный деятель науки Российской Федерации,
196608, Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д. 3
e-mail: info@vizr.spb.ru



Павлюшин Владимир Алексеевич

Подпись руки Павлюшина В.А.

Удостоверяю

Секретарь
директора

Косицкая

27.02.2017

