

Директор ФГБУН ИХБФМ СО РАН

17 февраля 2017 г.



ведущей организации на диссертацию **Марии Юрьевны Пахаруковой «Структурно-функциональная организация системы метаболизма ксенобиотиков у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884)»,** представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология

Структурно-функциональная организация метаболических систем эпидемиологически значимых видов паразитических червей является одной из важнейших тем современной молекулярной паразитологии и биохимии. В теме исследования тесно переплетены линии фундаментальных и прикладных задач. Действительно, знание структуры и законов функционирования систем метаболизма и транспорта экзогенных и эндогенных соединений необходимо для понимания адаптации биохимических процессов паразитов к существованию в организме хозяина. В то же время белки этих систем могут участвовать в механизмах устойчивости к антипаразитарной терапии. Несмотря на прогресс, достигнутый в последнее время в результате многочисленных проектов секвенирования геномов методами массового секвенирования, огромный пласт вопросов, касающихся функциональной геномики паразитических видов, в частности, структура и функциональная активность метаболических систем, остается практически не исследованным. Диссертационная работа М.Ю. Пахаруковой посвящена изучению именно этих вопросов и актуальность данного исследования не вызывает сомнений.

Цель работы диссертационной работы Марии Юрьевны идентификация и исследование структурно-функциональной организации систем метаболизма и транспорта ксенобиотиков у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*. Для достижения поставленной цели и решения связанных с ней задач автор успешно применил комплексный подход, объединяющий методы молекулярной и клеточной биологии,

биохимии и биоинформатики, что позволило детально оценить систему на нескольких уровнях организации. Все это указывает на высокий методический уровень исследований.

Так, на первых этапах исследования был проведен анализ геномов плоских паразитических червей эпидемиологически значимых видов семейства Opisthorchiidae (*O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*). Были выявлены гены, кодирующие белки фазы модификации (фаза 1), конъюгации (фазы 2) ксенобиотиков, а также генов АТФ-зависимого клеточного транспорта. С помощью ингибиторного анализа *in situ* и *in vivo*, и методов РНК-интерференции была проведена оценка функциональности белков, кодируемых этими генами. Оказалось, что отдельные компоненты этой системы играют существенную роль в выживаемости описторхид. Наиболее подробно исследованы ферменты фазы модификации, а именно, цитохромы Р450 *O. felineus* и *C. sinensis*. Эти белки получены в рекомбинантном виде в активном состоянии, что позволило оценить эффективность их инактивации специфичными ингибиторами.

Один из важных результатов работы - определение специфических оксистерольных метаболитов в лизатах возбудителей описторхоза кошачьей двуустки *O. felineus*, а также в желчи, сыворотке крови и моче животных с инвазией *O. felineus*. Значимость исследования специфических оксистеролов подчеркивается фактами, указывающими на ассоциацию канцерогенных свойств гельминтов и их способности продуцировать оксистерольные метаболиты. Многие из найденных метаболитов были конъюгированы с пуриновыми основаниями ДНК. Косвенно это может служить доказательством генотоксичности паразит-специфических оксистеролов и их участия в патогенезе описторхоза и описторхоз-ассоциированных заболеваний. Механизм, с помощью которого продуцируются специфические оксистеролы, неизвестен. Однако, существует высокая вероятность, что оксистеролы генерируются с помощью монооксигеназы гельминта Р450 – белка, впервые идентифицированного при выполнении этой диссертационной работы.

Таким образом, данная работа является первым комплексным исследованием функциональной геномики возбудителя описторхоза *O. felineus*, в частности, структурно-функциональной организации системы биотрансформации и транспорта как экзогенных, так и эндогенных субстратов. Информация о составе системы биотрансформации соединений у плоских паразитических червей эпидемиологически значимых видов семейства Opisthorchiidae в современной литературе не представлена, за исключением работ автора, что подчеркивает научную новизну результатов.

Практическая значимость работы

Практический потенциал работы определяется возможностью применения ее результатов при создании новых лекарственных препаратов для лечения описторхоза и других заболеваний человека и животных, вызванных трематодами.

Кроме того, данные, представленные в диссертации, были использованы при подготовке семинаров и практических занятий по курсу «Методы молекулярной генетики» на 4 курсе факультета естественных наук (ФЕН) Новосибирского Государственного Университета (Новосибирск), а также при чтении курса лекций «Молекулярная биология» на 5-м курсе медико-профилактического факультета (Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск).

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа М.Ю. Пахаруковой построена по классической схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы исследования», результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, списка использованной литературы (158 источников), списка иллюстративного материала и приложений. Общий объем диссертации 207 страниц, работа содержит 47 рисунков и 8 таблиц.

В обзоре проведен глубокий анализ литературы, посвященной основным вопросам структурно-функциональной организации системы биотрансформации и транспорта ксенобиотиков у живых организмов, начиная от бактерий и заканчивая млекопитающими. Кроме того, приведены данные об эпидемиологии и канцерогенном потенциале кошачьей двуустки *Opisthorchis felinus* и сделано заключение о востребованности изучения функциональной геномики и исследований организации метаболических систем, связанных с биотрансформацией и транспортом экзогенных и эндогенных субстратов у паразитических червей *O. felinus*.

Глава «Материалы и методы исследования» включает подробное описание всех использованных в работе материалов и методов. Набор методов соответствует поставленным в работе задачам и обеспечил получение надежных и однозначных результатов.

В разделе «Результаты» представлены полученные Марией Юрьевной данные, приведены рисунки, таблицы и проведен анализ результатов в контексте современных данных функциональной геномики плоских паразитических червей. Раздел «результаты и обсуждения» разбит на три крупных главы, посвященных, в частности, поиску специфических оксистерольных метаболитов гельминтов (I), структуре и функциональности системы метаболизма ксенобиотиков плоских червей (II), а также, тестированию антигельминтных препаратов (III).

Выводы корректны и полностью соответствуют полученным результатам.

Материал диссертации изложен логично, хорошим литературным языком, в достаточной мере проиллюстрирован рисунками и таблицами.

Основные результаты её диссертации обсуждены на 12 международных конференциях. Результаты исследования обработаны статистически с применением современных компьютерных программ. Достоверность полученных данных не вызывает сомнений.

Автор лично осуществляла постановку задач, планирование экспериментов, анализ результатов, представленных в диссертационной работе. Все эксперименты проведены лично или под руководством автора. Вклад в работу соавторов отражен в публикациях по теме диссертации.

Существенных недостатков в работе нет. Есть некоторые замечания:

1. Работу бы украсило наличие антител на исследуемые белки, что помогло бы более точно оценить их локализацию в тканях гельминтов.

2. Автор демонстрирует фенотипические изменения поверхности гельминта при тестировании антипаразитарных препаратов с помощью трансмиссионной микроскопии в отраженном свете, хотя метод сканирующей электронной микроскопии дал бы больше возможностей для демонстрации изменений поверхности червей.

В таблице 3 приведены величины констант связывания ингибиторов. Можно догадаться, что это константы диссоциации комплексов по их размерности, а не константы ассоциации, но размерность этих величин (μM) указана не верно – в русском варианте это мкМ . Некоторые рисунки в “Приложении” снабжены не достаточно полными подписями, а на оси X вместо подписи мкМ дана подпись mkM , что не соответствует ни русскому, ни английскому варианту.

Заключение

Диссертация Марии Юрьевны Пахаруковой «Структурно-функциональная организация системы метаболизма ксенобиотиков у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884)» является научно-квалифицированной работой, совокупность результатов которой можно квалифицировать как самостоятельное научное направление в молекулярной биологии: функциональная геномика. Автором использована комплексная методология, которая позволила выявить и исследовать структурно-функциональную организацию системы метаболизма экзогенных и эндогенных веществ у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*.

В работе представлено решение поставленных задач, полученные автором результаты достоверны, положения и выводы обоснованы. Автореферат соответствует основному содержанию выполненного исследования. Опубликованные автором научные статьи полностью соответствуют теме диссертации.

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».

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре “Лаборатории ферментов репарации ИХБФМ СО РАН.

Профессор, доктор химических наук
Зав. лаборатории ферментов репарации
ИХБФМ СО РАН Г. А. Невинский
17.02.2017

- Невинский Георгий Александрович
- Новосибирск 630090, проспект Лаврентьева, 8
Тел. +7-383-363-5126,
- nevinsky@niboch.nsc.ru
- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН

