

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Гришиной Елены Анатольевны
на тему «Иммуно-биологические основы патогенеза кишечных нематодозов», пред-
ставленную на соискание ученой степени доктора
биологических наук в диссертационный совет Д 002.213.04
при ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН»

Актуальность работы. Одним из наиболее интересных вопросов фундаментальной паразитологии является исследование, в самом широком смысле, взаимоотношений в системе «паразит-хозяин». Различным аспектам этой проблемы было посвящено много достойных и интересных работ, но, вряд ли эта тема в обозримом будущем исчерпается, настолько много неизвестных фактов и сторон она включает. Вот, и рассматриваемая диссертация, посвященная особенностям иммуногенеза при кишечных нематодозах, открывает новые аспекты этой проблемы. Следует отметить, что данный вопрос довольно детально изучался при гельминтозах, вызываемых тканевыми гельминтами, значительно меньше работ по механизмам индукции и регуляции иммунного ответа, а также иммунопатологии при кишечных гельминтозах. Между тем, ситуация становится особенно актуальной в связи с широким распространением кишечных нематодозов у человека и животных. С учетом указанного исследование особенностей проявления иммунных реакций и патогенеза при данных инвазиях приобретает большое научное и практическое значение. Также, несмотря на значительные достижения в терапии кишечных нематодозов, всегда остается место и востребовано появление новых, научно обоснованных и более совершенных методов лечения и профилактики кишечных инвазий.

В связи с этим актуальность рассматриваемой диссертационной работы не вызывает никаких сомнений.

Научная новизна работы. Представлен комплексный анализ динамических изменений молекулярных, цитологических, структурных и функциональных показателей у экспериментальных животных при нескольких видах кишечной нематодозной инвазии на трех животных моделях. Выявлены причинно-следственные связи между тестируемыми показателями на различном уровне организации (молекулярном, клеточном, органном), подкрепленные корреляционно-регрессионным математическим анализом. Разработано целостное представление и концепция о некоторых, неизвестных ранее, механизмах развития иммунопатологии на острой и хронической стадиях кишечных гельминтозов.

Практическая значимость работы. Материалы диссертации позволили сформировать новый подход к оценке стадии развития и тяжести инвазий, а также обоснованию режимов дегельминтизации и мониторинга результативности лечения в гуманной и вете-

ринарной медицине. Практические рекомендации внедрены в ряд ветеринарных учреждений и научно-исследовательских организаций г. Москвы, Московской области и других городов РФ. Материалы диссертации используются в учебном процессе учреждений высшего и дополнительного профессионального образования в курсах «Биология», «Ветеринария», «Паразитология», «Инфекционные болезни». Отдельные фрагменты работы включены в несколько учебных пособий для студентов и аспирантов.

Разрешите перейти к непосредственному анализу диссертационной работы.

В целом диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы из четырех глав, раздела собственных исследований из шести глав (включая подраздел «Материалы и методы исследования»), обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Возможно, работа только несколько отличается объемным приложением в виде второго тома на 166 страницах с 80 таблицами, 86 рисунками и актами внедрения, что, конечно, не является нарушением требований ВАК РФ в отношении оформления диссертационных работ.

Диссертация изложена на 278 страницах компьютерного текста. Список литературы включает 439 источников, из которых 336 отечественных и 103 зарубежных авторов.

Обзор литературы. Раздел относительно небольшой (34 страницы) по отношению к общему объему диссертации, но емкий по содержанию, и состоит из 4 подразделов. Приводятся литературные данные по особенностям иммунитета при гельминтозах, роли патологии иммунной системы в общем патогенезе гельминтозов, молекулярным и цитологическим механизмам нарушений иммунной системы при гельминтозах и вопросам терапии гельминтозов (в последнем случае приводится общая характеристика левамизола и бензимидазолкарбамамов, которые автор использовала в своих экспериментах). Вообще, приведенные литературные источники в той или иной степени имеют самое непосредственное отношение к задачам собственных исследований автора; их описание носит аналитический характер; кроме того, в конце каждого подраздела приводится резюме, в котором обоснованно отражен исходный уровень и сделан переход к вопросам собственных исследований.

Раздел «Материалы и методы исследования» (глава 2.1.). Поскольку дизайн экспериментов является довольно сложным, то особенно важно доступное и понятное описание методической основы работы. Несмотря на то, что некоторые методы применялись эпизодически, а с помощью других проведена значительная часть работы — все описаны тщательно, наглядно и довольно полно (в тоже время без излишней детализации).

Необходимо отметить большой набор используемых методов и протоколов: иммунологические, биохимические, гистологические, терапевтические и другие. С одной сто-

роны, это диктуется разносторонним характером работы, с другой стороны свидетельствует о больших возможностях автора.

В целом в разделе приведена необходимая информация, позволяющая составить мнение о методической стороне работы. Кроме того, дополнительная информация по постановке опытов приведена в той или иной степени при описании результатов исследований. Во всяком случае, при ознакомлении уже с результатами исследований, у меня не возникло вопросов, касающихся схем и методов проведения экспериментов.

В целом содержание раздела «Материалы и методы исследования» позволяет сделать очевидный вывод о высоком методическом уровне работы в целом.

Также хотелось бы отметить трудоемкий характер и очень большой объем выполненных исследований.

Результаты собственных исследований представлены в пяти главах (2.2.-2.6), которые составляют суть работы.

Главы 2.2. и 2.3. посвящены молекулярным и цитологическим изменениям соответственно при острой и хронической фазе гельминтозов.

В данном случае я не буду пересказывать результаты работы, их подробно представила в своем докладе автор, а приведу к обеим главам 2.2. и 2.3. общий комментарий и положительно выделю следующее:

1) прежде всего, следует объективно отметить, что выявление факторов, индукторов или супрессоров иммунных ответов, запуска иммунопатологических процессов при кишечных нематодозах, является довольно сложной задачей с учетом характера иммунитета при гельминтозах в общем – слабого, непродолжительного и низкоспецифичного;

2) был очень важен выбор релевантных животных моделей, на которых можно было бы получить полноценные данные, отвечающие поставленным целям и задачам работы. Такими моделями стали мыши, кролики и цыплята, которые были экспериментально или спонтанно (в случае птицы) заражены нематодами *Oxyurata*, *Trichocephalata* и *Ascaridata*. Попутно отмечу большое общее количество экспериментальных животных: 3260 мышей, 950 кроликов и 750 цыплят. Однако такое большое поголовье не самоцель автора, а является залогом достоверности и адекватности полученных результатов и выводов, сделанных на их основе;

3) поскольку каждый из указанных возбудителей имеет свои особенности цикла развития, а вызываемые ими инвазии - особенности течения и продолжительность острой и хронической стадии, клинические проявления и т.п., то возможно различное влияние на иммунную систему и отличающийся иммунопатогенез; с учетом этого автор в полном

объеме проводила исследования при указанных инвазиях по всем тестируемым показателям;

4) в отношении последнего: можно положительно оценить удачный выбор ключевых и наиболее информативных показателей, характеризующих многие стороны иммунного ответа, к которым автор отнес суммарный уровень продуктов глубокого окисления белков (AOPP) и продуктов окисления липидов (Oxystat) (ПОЛ); уровень отдельных провоспалительных, противовоспалительных и регуляторных цитокинов и их баланс (IL-1; IL-4; IL-10; IL-2; IL-5; TNF- α); уровень иммуноглобулинов, относящихся к классам IgG, IgE, IgM и IgA; активность некоторых ферментов, в частности, печени; маркеры апоптоза (Caspase-3 и Bcl-2), который как известно, играет большую роль в иммунопатологии при гельминтозах; и наконец, анализ лейкоцитарной формулы (правда, в этом случае В-лимфоциты и Т-лимфоциты следовало бы выделить независимо, поскольку их подсчет по отдельности не входит в лейкоцитарную формулу); определение отдельных указанных показателей при гельминтозах имеет место в работах других авторов, но в данном случае ценность рассматриваемой работы заключается в том, что проведен комплексный анализ целого ряда показателей;

5) по мере развития инвазии изменения указанных показателей носят динамичный характер, поэтому правильно было оценить их во временной динамике, что автор и сделала;

6) автор провела исследование при острой и хронической фазе инвазии, условно разделив их по появлению яиц в фекалиях. При этом она использовала аналогичные экспериментальные схемы исследований, даже одинаково озаглавив соответствующие главы (2.2. и 2.3.), что на первый взгляд может показаться неким упрощением и дублированием. Однако именно такой формат позволил автору провести сравнение и выявить в каждом случае интересные особенности;

7) имеет место описание фактической и в некоторых случаях гипотетической последовательности событий развития патологии при острой и хронической фазах инвазии, с учетом взаимного влияния изменения одного показателя на другой параметр. В приложении приведены графики (рисунки 135-220) с результатами регрессионного и корреляционного анализа, подтверждающие наличие или отсутствие такой связи практически между всеми тестируемыми показателями. На мой взгляд, было очень хорошо и наглядно, если бы автор привел графическое представление развития общей картины основных изменений;

8) мне понравился, может, чисто оформительский прием, который автор использовала не только в главах 2.2. и 2.3., но также и в последующих разделах: по тексту резуль-

таты иллюстрируются рисунками, которые всегда более наглядны и легче воспринимаются, чем таблицы, а табличный материал приведен отдельно в приложении.

Тщательно изучив особенности иммунного ответа при острых и хронических инвазиях, автор переходит к исследованию влияния монотерапии и комбинированной терапии на изменения, возникшие в результате инвазии на молекулярном и клеточном уровне.

Результаты изложены соответственно в главах 2.4. и 2.5. Вновь отмечу стороны этих подразделов, которые показались мне наиболее важными и интересными:

1) формат аналогичный для предыдущих глав: дизайн продуман таким образом, чтобы можно было сравнить применение указанных антгельминтиков одних и в сочетании с иммуномодуляторами на острой и хронической стадии инвазии (на практике лечить требуется и то, и другое); применение иммуномодулирующих препаратов вызвано тем, что некоторые антгельминтики сами оказывают токсическое и иммунодепрессивное действие, и на фоне последствий инвазии организм подвергается, по сути дела, двойному отрицательному воздействию;

2) в таком случае может помочь комбинированная терапия с иммуномодулирующими средствами; такой вариант лечения использовался и другими авторами, но в формате настоящих исследований оригинальной была оценка ее влияния на тестированные показатели и исход терапии;

3) свой выбор антгельминтиков автор остановила на широко известных препаратах из различных химических групп, производных бензимидазолкарбаматов, албендазоле и мебендазоле, и левамизоле, а в варианте опытов с комбинированной терапией использовались иммуномодуляторы – гамавит и ронлейкин; препараты применялись в рекомендованных эффективных дозах;

4) очевидно показано преимущественное положительное влияние сочетанной терапии на возникшие в результате инвазии изменения показателей оксидативного стресса, уровень и баланс цитокинов, уровень иммуноглобулинов, апоптоз иммунокомпетентных клеток, показатели функционального состояния печени, причем, в довольно короткий срок, с одновременным смягчением действия самих антгельминтиков. Иными словами, показана наглядная картина постепенного восстановления и возвращения к исходному уровню (до заражения) многих важных параметров организма;

5) положительное влияние иммуномодуляторов дополнительно было подтверждено результатами определения состояния периферической крови по относительному количеству форменных элементов в лейкоцитарной формуле;

6) полученные результаты позволили автору сделать обоснованные и ценные практические рекомендации.

Вполне логическим продолжением в рассматриваемой работе такого типа было гистологическое исследование ряда органов и тканей при сифациозе, трихоцефалезе и пасалуриозе, а также при лечении этих инвазий, результаты представлены в главе 2.6. Эта глава органично входит в структуру диссертации. Местные и системные патоморфологические изменения исследовались с использованием световой и электронной микроскопии. Особый акцент автор сделала на органах иммунной системы и органах, наиболее активно участвующих в общих процессах детоксикации организма. Не буду останавливаться на сути полученных результатов, они подробно представлены в диссертации и были изложены в докладе, но мне хотелось бы только подчеркнуть грамотное и профессиональное описание микроскопических препаратов. Также необходимо отметить очень хорошее качество представленных микрофотографий. Полученные данные, несомненно, представляют интересную научную информацию и вносят свой вклад в понимание патогенеза и клиники кишечных нематодозов.

Последний раздел работы включает «Обсуждение результатов», «Заключение» и «Выводы», который по своей сути представляет кульминацию работы и совокупный анализ результатов собственных экспериментов с приведением данных других авторов. Раздел выгодно отличается не только обилием интересных фактов и сведений, но оригинальным аналитическим характером их изложения. Действительно, результаты каждого опыта находят свое подробное обсуждение и детализацию информации, представленной в основных главах работы. Данный подраздел придает диссертации законченный характер.

Высоко оценивая диссертационную работу Гришиной Елены Анатольевны, хотелось бы высказать некоторые замечания и получить ответы на возникшие у меня вопросы.

1) На стр. 120 диссертации в главе 2.4., посвященной терапевтическим исследованиям, имеется не совсем понятная мне фраза «эффективность препарата в данном случае значения не имела...». Конечно, основной целью автора было изучение целого ряда указанных показателей, и эффективность и выражалась в положительной динамике их восстановления после терапии. Однако можно было бы включить в опыт дополнительную группу животных с определением эффективности классическими методами.

2) Характер, динамика и степень изменения показателей, тестированных автором, наверняка, зависят от интенсивности инвазии. Однако в тексте диссертации данные по этому вопросу я нашла только на стр. 60 для экспериментального заражения; подобные данные отсутствуют для спонтанного заражения цыплят.

3) В связи с последним: спонтанное заражение птицы было моноинвазией?

4) Хотелось бы уточнить: при каких инвазиях, из тех, которые были у Вас в эксперименте, и на какой стадии (острой или хронической) комбинированная терапия была

Я.Р.Коваленко РАН»

117218, г. Москва ул. Б.Черемушкинская, д.28
novik.tamara@mail.ru

8(916)341-28-14