

*На правах рукописи*

**ЛАЗАРЕВА ОЛЬГА ИГОРЕВНА**

**ЦИТОПАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СОМАТИЧЕСКОГО  
ЭКСТРАКТА *ANISAKIS SIMPLEX* L3 НА ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ И  
ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ**

Специальность 03.02.11- Паразитология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пермь –2019

**Работа выполнена** на кафедре инфекционных болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова».

**Научный  
руководитель:**

***Сивкова Татьяна Николаевна***  
доктор биологических наук, доцент

**Официальные  
оппоненты:**

***Микряков Вениамин Романович,***  
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии Института биологии внутренних вод имени И.Д. Папанина РАН

***Иешко Евгений Павлович***

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории паразитологии растений и животных Института биологии КарНЦ РАН, профессор кафедры экологии и зоологии ПетрГУ

**Ведущая  
организация:**

ВНИИП - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

Защита состоится «24» декабря 2019 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 002.213.04 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук при ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН» по адресу **Адрес:** 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33. Тел/факс: +7(495)952-73-24, e-mail: admin@sevin.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук Российской академии наук по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, на сайте ФГБУН ИПЭЭ РАН по адресу: <http://www.sev-in.ru> и на сайте ВАК Минобрнауки РФ по адресу: <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета, к.б.н.  Т.А. Малютина

**Актуальность темы.** Проблема анизакидоза остается актуальной во всем мире, поскольку заболевание, вызываемое проникновением личиночных стадий нематод семейства *Anisakidae* при употреблении морской рыбы и морепродуктов, характеризуется токсико-аллергическими проявлениями и поражениями желудочно-кишечного тракта (В.П. Сергиев, 2014; М.Т. Audicana, 2008; V.Pravettoni, 2012). Заражению подвержены не только человек, но и пушные и домашние животные (А.В. Гаевская, 2005).

Личинки *Anisakis simplex* обнаруживаются почти у всех промысловых рыб, добываемых из морей умеренной зоны (С.К. Fæste, 2015). Исследования последних лет показали устойчивую тенденцию к росту инвазированности рыб этими нематодами (Г.М. Пушникова, 2013; В.П. Сергиев, 2014). Проблема имеет экономическое значение из-за негативного влияния на доверие потребителей и снижение конкурентоспособности, связанной с зараженными рыбными продуктами (F. Baird, 2014; P. D'amico, 2014).

Согласно действующим требованиям пищевой безопасности в ЕС обработка рыбы проводится глубокой заморозкой (E.Weir, 2005). Лучшей мерой профилактики анизакидоза является запрет на употребление в пищу морепродуктов слабосоленой обработки, а иногда в сыром и полусыром виде (V.Pravettoni, L Primavesi, M. Piantanida, 2012). Аналогичный запрет действует и в России согласно СанПиН 2014г.

Однако среди сенсibilизированных к *Anisakis* пациентов существует опасность развития аллергии (F. Baird, R. Gasser, A. Jabbar, A. Lopata, 2014; N. Hochberg, D. Hamer, 2010; N. Nieuwenhuizen, A. Lopata, 2014). В связи с возможностью развития у заболевших тяжелых патологий и сложностью в постановке своевременного диагноза, были разработаны иммуноаллергические тесты, которые предназначались для диагностики зараженности анизакидами человека и основывались на обнаружении антител в сыворотке крови людей с подозрением на анизакидоз.

В то же время патогенное действие личинок анизакид не ограничивается только аллергическим эффектом. Так, Guarneri F. (2003) рекомендует обратить внимание на более подробное изучение биологических свойств *A. simplex*.

Исследованиями последних лет подтверждено развитие патологических процессов под влиянием продуктов метаболизма различных гельминтов не только в органах и тканях, но и в клетках хозяина (Д.К. Кужель, В.Я. Бекиш, В.В. Зорина, 2013; В.В. Зорина, А.М. Субботин, 2016). Доказано, что выраженные цито- и кариопатические изменения происходят, в первую очередь, в быстроразмножающихся клетках, к которым относятся гемопоэтические и половые (О.А. Ковалева, 2008). Было установлено, что белки, входящие в состав соматических и экскреторно-секреторных продуктов *A. simplex*, обладают не только аллергическим, иммунологическим, но и цито- и кариопатическим действием (Т.Н. Сивкова, 2011). Механизм такого цитопатического действия исследован недостаточно полно, в частности, остается нерасшифрованным влияние продуктов гельминта на отдельные ультраструктуры клетки хозяина, а также других организмов, например,

бактерий и дрожжей, однако его изучение необходимо для понимания патологических процессов, происходящих внутри поврежденной клетки, а также для успешных поисков борьбы с кариопатическими последствиями, что и определило актуальность проведенной нами работы.

**Цель и задачи исследований.** Целью настоящей работы послужило изучение влияния полного соматического экстракта личинок третьей стадии нематоды *A. simplex L3* на клетки живых организмов, находящихся на разных уровнях организации.

Для достижения данной цели были определены следующие **задачи**:

1. Приготовление антигенного экстракта из гельминта, контроль его стерильности и безвредности, определение содержания белка.

2. Исследование дозозависимого эффекта цельного соматического экстракта из личинок *A. simplex L3* на гематологические показатели, соматические и половые клетки лабораторных мышей при однократном внутрибрюшинном введении.

3. Исследование влияния цельного соматического экстракта на развитие куриных эмбрионов на разных стадиях эмбриогенеза и при разных способах его введения.

4. Изучение влияния соматического экстракта *A. simplex L3* на одноклеточные организмы *Paramecium caudatum*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и культуры клеток микроорганизмов *Micrococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* и *Bacillus subtilis*.

### **Научная новизна**

- Установлено дозозависимое влияние соматического экстракта личинок нематоды *A. simplex* на гематологические показатели, кариопатические изменения соматических и половых клеток лабораторных мышей.

- Доказано схожее по характеру проявлений мембранотоксическое действие экстракта на клетки и субклеточные структуры живых объектов (млекопитающих, птиц, инфузорий, дрожжей и прокариот) независимо от уровня их организации.

- Изучены ультраструктурные изменения в делящихся клетках красного костного мозга и семенников лабораторных мышей.

- Впервые изучено влияние соматического экстракта на развитие куриных эмбрионов на разных этапах эмбриогенеза. Установлен эмбриотоксический эффект и патоморфологические изменения в тканях куриных эмбрионов.

- Впервые на одноклеточных микроорганизмах *P. caudatum* проведена оценка общей токсичности экстракта. Ультрамикроскопическими исследованиями установлено мембранотоксическое действие на парамеции и дрожжи *S. cerevisiae*.

- Доказана бактериостатическая активность экстракта *A. simplex L3* в отношении *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris*.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученная в ходе исследований информация подтверждает мембранотоксическое и цитопатическое действие компонентов соматического экстракта из личинок *A. simplex* на клетки млекопитающих, птиц, простейших, дрожжей и микробов. Полученные данные могут быть использованы для углубления знаний патогенеза при анизакидозе, его коррекции и профилактики осложнений при гельминтозах. Предложен способ иммунологического определения антигенов анизакид в мышечной ткани рыб, получен Патент на изобретение №2613296, также получен патент на изобретение №2665761 «Способ подавления роста микроорганизмов антигенами-экстрактами из гельминтов».

**Положения, выносимые на защиту:**

- Дозозависимый эффект соматического экстракта *A. simplex* на гематологические, патоморфологические и ультраструктурные изменения в клетках органов лабораторных мышей при однократном внутрибрюшинном введении.

- Эмбриотоксическое влияние соматического экстракта из личинок анизакид на развитие куриных эмбрионов на разных этапах эмбриогенеза.

- Токсическое действие и ультраструктурные изменения одноклеточных организмов *P. caudatum*, дрожжей *S. cerevisiae* под действием экстракта *A. simplex*.

- Цитостатическое действие экстракта на культуры микроорганизмов.

**Апробация результатов.** Результаты диссертационной работы были апробированы на: Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Молодежная наука 2015: технологии, инновации» (г. Пермь, 2015); Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии и технические средства для АПК» (г. Воронеж, 2015); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы развития ветеринарной медицины, зоотехнии и аквакультуры» (г. Саратов, 2016); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Молодежная наука 2016: технологии, инновации» (г. Пермь, 2016); Научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» (г. Москва, 2016); Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии» (г. Севастополь, 2016); VII International Scientific Agricultural Symposium «Agrosym 2016» (Bosnia and Herzegovina, Jahorina, 2016); X Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Современные аспекты патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики паразитарных заболеваний» (г. Витебск, 2016); Научно-практической конференции памяти профессора В.А. Ромашова «Современные проблемы общей и прикладной паразитологии» (г. Воронеж, 2016); Международной научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» (г. Москва, 2017); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Молодежная наука 2017: технологии и инновации» (г. Пермь, 2017); XII

Международном Нематодологическом симпозиуме «Нематоды и другие линяющие организмы (Ecdysozoa) в процессах возрастающего антропогенного воздействия на экосистемы» (г. Нижний Новгород, 2017); Международной научно-практической конференции «Актуальные направления инновационного развития животноводства и современных технологий продуктов питания, медицины и техники» (г. Ростов-на-Дону, 2017).

**Личный вклад соискателя.** Настоящая диссертационная работа является результатом четырехлетних (с 2014 по 2017 год) научных исследований диссертанта. Исследования по дозозависимому воздействию цельного экстракта *A. simplex* на соматические и половые клетки, а также гематологические показатели лабораторных мышей, эксперименты по эмбриотоксичности на куриных эмбрионах и токсичности на парамециях выполнены диссертантом лично. Гистологические исследования проводили в лаборатории гистопатологии Краевой детской клинической больницы при участии к.м.н. Патлусовой Е.С. Изучение ультраструктуры клеток методом электронной микроскопии осуществляли в лаборатории института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН при участии к.б.н. Сузиной Н.Е.

Работа выполнена под руководством доктора биологических наук, доцента Т.Н. Сивковой.

**Публикации.** Материалы диссертационной работы опубликованы в 19 научных статьях, где изложены основные положения и выводы по изучаемой проблеме, в том числе 5 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 136 страницах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора литературы и собственных исследований, включающих материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, практические предложения, приложение. Список литературы содержит 265 источников, в том числе 119 отечественных и 146 иностранных. Работа иллюстрирована 9 таблицами, 27 оригинальными рисунками.

## **I. Обзор литературы**

Представлены литературные данные о составе и свойствах белковых компонентов *A. simplex*, а также о влиянии гельминтов их метаболитов и экстрактов на клетки и процесс их деления, воздействие на клетки крови, культуры клеток, эмбрионы млекопитающих и птиц, а также на бактерии.

## **II. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Лабораторные и экспериментальные исследования проводили в период с 2014 по 2017 год на базе кафедры инфекционных болезней факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Пермский ГАТУ, гистологические исследования - в лаборатории гистопатологии Краевой детской клинической больницы г. Перми, электронную микроскопию - в лаборатории Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН г. Пущино.

## 2.1. Материалы и методы исследований

### 2.1.1. Объекты исследования, их получение

Материалом для исследования служил соматический экстракт из личинок нематоды *Anisakis simplex* L3. Экстракт готовили из нежизнеспособных паразитов, выделенных из замороженной путассу (*Micromesistiu poutassou*), приобретенной в торговых сетях города Перми. Объектами для данной работы являлись лабораторные белые нелинейные мыши, куриные эмбрионы разных сроков инкубации кросса «Росс-308», одноклеточные организмы *P. caudatum* и дрожжи *S. cerevisiae*, кровь мышей для проведения гематологического анализа, мазки – отпечатки красного костного мозга и семенников, гистологические срезы печени, селезенки, семенников, препараты ультратонких срезов красного костного мозга и семенников лабораторных мышей, гистологические срезы органов куриных эмбрионов, культуры клеток микроорганизмов *Micrococcus* sp., *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. tiphimurium* и *B. subtilis* после воздействия на них соматического экстракта *A. simplex* L3.

При работе с лабораторными животными соблюдали правила научных исследований с использованием экспериментальных животных, утвержденных распоряжением Президиума АН СССР от 2 апреля 1980г № 12000-496 и приказом Минвуза СССР от 13 сентября 1984г №22.

**1. Приготовление экстракта *A. simplex*.** Из замороженной путассу (*M. poutassou*) извлекали нежизнеспособных личинок *A. simplex* L3, определяли их видовую принадлежность по морфологическим признакам согласно ключу, приведенному (А.В. Гаевская, 2005). Затем личинок нематод аккуратно тщательно промывали холодной водопроводной водой, после чего проводили обработку смесью растворов антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и нистатин). От антибиотиков биологический материал тщательно отмывали стерильным физиологическим раствором, замораживали при -18°C. Замораживание и оттаивание личинок выполняли 5-6 раз, после чего их гомогенизировали в керамической ступке с добавлением кварцевого песка. Для экстрагирования измельченный материал помещали в пробирку с стерильным забуференным физиологическим раствором (рН 7,2) и оставляли на 18 часов при температуре +4°C. Очистку экстракта проводили центрифугированием в течение 15 минут на скорости 14000 оборотов/минуту.

Контроль экстракта на стерильность выполняли посевами на среды МПА и МПБ, безвредность устанавливали внутрикожным введением в область уха лабораторным кроликам. Концентрацию белка в материале устанавливали, используя биохимический полуавтоматический анализатор StatFax 1904+ (AWARENESS technology inc) и набор реактивов Spinreact, S.A. при длине волны 540 нм согласно инструкции. Полученный экстракт хранили в замороженном состоянии при температуре - 18°C (Т.Н. Сивкова, 2009).

**2. Получение гипериммунной сыворотки кроликов.** Для получения гипериммунной сыворотки кроликов породы серый великан живой массой 3 кг внутримышечно иммунизировали возрастающими дозами соматического экстракта, приготовленного из личинок *A. simplex*, с полным адьювантом

Фрейнда (Диаэм, США) по методике, предложенной Бережко В.К. и др. (2008) Применяли схему трех циклов из трехдневной иммунизации с перерывами в 3 дня. Для повышения активности гипериммунных сывороток через 28 дней проводили реиммунизацию животных. В течение этого эксперимента общая доза белка на каждого кролика составила 10 мг. Кровь для приготовления сыворотки собирали через семь дней после завершения иммунизации из локтевой вены.

После отстаивания гипериммунную сыворотку аккуратно аспирировали и замораживали при температуре  $-10^{\circ}\text{C}$ .

**3. Проведение реакции иммунодиффузии в агаровом геле.** Для проведения реакции иммунодиффузии (РИД) готовили 1,2%-ный агаровый гель (Difco) на физиологическом растворе (А.И. Гусев, В.С. Цветков, 1961) Выполнение реакции осуществляли в штампе «четверка», в котором в центральной лунке находился экстракт из анизакид, а в периферийных – нативные и разведенные 1/1; 1/2; 1/4 и 1/8 гипериммунные сыворотки.

Следующим этапом проводили РИД, где в качестве антигена использовали жидкость, полученную при размораживании тушек инвазированной анизакидами путассу, а в качестве источника антител – гипериммунные сыворотки кроликов.

### **2.1.2. Изучение дозозависимого влияния экстракта *A. simplex* на гематологические показатели лабораторных мышей**

Самцам нелинейных белых мышей массой 18-22 г соматический экстракт из *A. simplex* в дозах 100; 200; 500 и 1000 мкг белка на голову вводили однократно внутрибрюшинно. Животные контрольной группы оставались интактными. Каждая группа состояла из 5 животных. Содержание лабораторных животных соответствовало зоогигиеническим требованиям и сохранялось на всем протяжении эксперимента.

Экспериментальных и контрольных лабораторных мышей эвтаназируют методом цервикальной дислокации через 48 часов от начала эксперимента. В момент эвтаназии собирали периферическую кровь в пробирки с напылением антикоагулянта EDTA K3 объемом 50 мкл для исследования на автоматическом гематологическом анализаторе «Abacus Junior Vet» с применением стандартной программы «Mouse».

Также в момент эвтаназии мышей для определения морфологии клеток готовили тонкие мазки из периферической крови, которые фиксировали метиленовым синим по Май-Грюнвальду и окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимзе согласно инструкции.

В высушенных мазках крови под иммерсионным объективом на микроскопе марки «Биомед-5» подсчитывали лейкограмму на механическом счетчике лейкоцитарной формулы «ЗМА Киев».

### **2.1.3. Изучение патоморфологических изменений в органах мышей под действием разных доз соматического экстракта *A. simplex***

Параллельно с изучением гематологических изменений от мышей контрольной и опытной групп непосредственно после декапитации отбирали материал для гистологического исследования. Использовали печень, селезенку и семенник, от органов отсекали кусочки 10x10x5мм или пластинки толщиной 5мм или брали целиком. Собранный материал фиксировали 10%-ным раствором нейтрального формалина. Полученный материал доставляли в патогистологическую лабораторию.

Готовые препараты просматривали на микроскопе фирмы «Leica» и «Zeiss» при увеличении окуляра x10, с объективами x4; x40 и x100 для подробного описания имеющейся морфологической картины.

### **2.1.4. Изучение дозозависимого кариопатического действия соматического экстракта *A. simplex* на соматические и половые клетки лабораторных мышей**

От животных экспериментальных и контрольных групп после эвтаназии получали кусочки грудины и семенников, из которых готовили тонкие мазки-отпечатки, впоследствии фиксируемые, как и в случае с мазками крови, метиленовым синим по Май-Грюнвальду и окрашиваемые по Романовскому. Готовые отпечатки анализировали при увеличении окуляра 10 объектива 40 – 100 на микроскопе Meiji. На каждом препарате вели подсчет не менее 1000 отдельно лежащих или распластанных клеток. В костном мозге определяли митотический (%), в семенниках - мейотический индекс (%), равный числу делящихся клеток относительно общего количества подсчитанных клеток. Фиксировали количество патологических фигур митоза (%). Различные патологии деления клеток отмечали отдельно и определяли их процентное соотношение к общему количеству. Наиболее интересные материалы фотографировали с помощью фотокамеры Vision.

### **2.1.5. Изучение влияния соматического экстракта *A. simplex* на куриные эмбрионы**

Для исследования применяли куриные эмбрионы кросса «Росс-308» на разных этапах эмбриогенеза: 8-суточные, 11-суточные и 13-суточные. Инкубацию яйца проводили в автоматическом инкубаторе с микропроцессорным управлением R-Com 50 Pro (Ю. Корея) согласно инструкции. Введение экстракта в объеме 0,2 мл проводили согласно методике по заражению куриных эмбрионов Л.З. Блиева (2010) в аллантаисную полость, на хорион-аллантаисную оболочку (ХАО) и в желточный мешок. Контроль в ходе эксперимента оставался интактным. На 2 и 8 сутки эмбрионы помещали в холодильник на 4-6 часов при 4°C. Перед вскрытием, проводили взвешивание яйца на весах марки Acom Ltd., модель JW-1, max 600г., d=0,02, Корея. При вскрытии эмбрионов оценивали возрастное развитие путем сравнения со

стандартными показателями, отмечали соответствие возраста эмбриона и степени его развития в данный период инкубации (Дидяшина Л.Ф., 2010).

Для второго опыта применяли инкубационное яйцо и 6-суточные куриные эмбрионы. Соматический экстракт в обоих случаях вводили в желточный мешок также в дозе 0,2 мл.

От куриных эмбрионов получали головной мозг, глаз, печень и фабрициеву бурсу, которые фиксировали 10%-ным раствором нейтрального формалина, затем доставляли в патогистологическую лабораторию. Гистологическое исследование проводили по методике, описанной ранее.

### **2.1.6. Изучение токсического влияния экстракта на одноклеточные микроорганизмы**

Для определения общей токсичности экстракта *A. simplex* брали культуру инфузорий *P. caudatum* Ehrenberg, 1838, культивируемую на среде Лозина - Лозинского с добавлением в качестве источника питания дрожжей *S. cerevisiae*.

На сухое предметное стекло наносили по 3 капли суточной культуры инфузорий. Далее проводили подсчет концентрации живых микроорганизмов с помощью микроскопа Meiji (увеличение 10×100), затем добавляли равнозначное количество цельного соматического экстракта *A. simplex* и в разведении 1:2 с 0,9% стерильным физиологическим раствором. Контрольные инфузории оставались интактными. Опыт проводили в 5 повторностях. По истечении 1 и 3 часов производили подсчет числа подвижных, неподвижных и лизированных инфузорий, который затем сравнивали с первоначальным значением.

Выживаемость парамеций N, %, вычисляли по формуле:  $N = N_2/N_1 \times 100\%$ , где N1- среднеарифметическое (из пяти испытаний) значение количества парамеций в начале опыта, штук; N2- среднеарифметическое (из пяти испытаний) значение количества парамеций в конце опыта, через один час экспозиции, штук (подвижных, неподвижных, двигающихся нехарактерно и подвергнутых лизису); 100% - коэффициент перевода результата в проценты (ГОСТ\_31674-2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности). Чувствительность инфузорий к исследуемому экстракту определяли по сроку их гибели, которую регистрировали в момент прекращения движения простейших и наличия признаков распада клеток (Е.Г. Черемных, А.В. Кулешин, О.Н. Кулешина, 2011).

Далее проводили ультраструктурное исследование клеток, подвергнутых воздействию разведенного 1:2 экстракта *A. simplex*. Для электронной микроскопии в среду с парамециями добавляли равное количество разведенного экстракта, экспозиция составляла 15 минут, центрифугировали в течение 3 минут при 1000 оборотов в минуту и далее фиксировали при помощи 2,5% глутарового альдегида.

### 2.1.7. Электронная микроскопия

Образцы органов мышей фиксировали в 2,5%-ном глутаровом альдегиде на 0,05M (pH 7,2) фосфатном буфере в течение 1 часа при 4°C. Затем образцы дополнительно фиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub> в 0,05 M фосфатном буфере (pH 7,2) в течение 3 часов при 20°C. После проводили обезвоживание в последовательности спиртов с возрастающей концентрацией (начиная с 30% до 100% в течение 20 минут на каждом этапе), затем клетки дополнительно обрабатывали пропитыванием в терт-бутиловом спирте (tert-Butanol, SIGMA-ALDRICH) в двух сменах по 20 минут при 26 °C и приступали к изготовлению ультратонких срезов.

Для сканирующей электронной микроскопии *P. caudatum* начальные этапы препарирования аналогичные: фиксация, удаление фиксатора и обезвоживание. После обезвоживания образцы замораживали в терт-бутиловом спирте, затем проводили замораживание - высушивание в установке JFD-320 (JEOL, Япония) согласно рекомендациям фирмы - производителя. В напылительной установке JFC 1100 (JEOL, Япония) на поверхность высушенных образцов наносили золото. Электронно-микроскопическое изучение образцов осуществляли на сканирующем электронном микроскопе JSM-6510LV (JEOL, Япония).

### 2.1.8. Изучение влияния белкового экстракта *A. simplex* на культуры некоторых микроорганизмов

Клеточные культуры микроорганизмов *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris* были спонтанно выделены в лаборатории ГБУВК «Пермский ВДЦ» г. Пермь из пищевых продуктов, штамм *S. typhimurium* №79 был приобретен в ГИСК имени Л.А.Тарасевича, г. Москва. Бациллы *B. subtilis* представлены пробиотическим штаммом 12В из препарата «Споровит».

Стерильным цельным экстрактом *A. simplex* пропитывали диски из фильтровальной бумаги, которые затем использовали путем нанесения на чашки Петри с микробным газоном из культур *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium* и *B. subtilis*. Для анализа бактерицидной и бактериостатической активности экстракта данные чашки помещали кверху дном на темную матовую поверхность, обеспечивая освещение под углом в 45° (учет в отраженном свете). Диаметр зоны просветления измеряли штангенциркулем или линейкой с точностью до 1 мм, ориентируясь на зону полного подавления роста микроорганизмов (МУК 4.2.1890-04).

Фактический материал подвергали стандартной статистической обработке методом вариационной статистики по t-критерию Стьюдента.

## 2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.2.1. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) с гипериммунной сывороткой к антигенам *A. simplex* с жидкостью, полученной при разморозке рыбы, зараженной анизакидами

Оценка активности гипериммунных сывороток, полученных от кроликов в РИД, показала, что белковый экстракт из личинок *A. simplex* L3 содержит антигенные компоненты, способные вызвать выработку специфических антител у иммунизированных животных. Отмечена разная активность гипериммунных сывороток от разных животных в зависимости от количества преципитирующих комплексов. Из трех проб иммунных сывороток в одной зарегистрировано не менее трех преципитирующих комплексов АГ-АТ, которые проявились четкими полосами в агаровом геле даже при разведении иммунной сыворотки. Две другие пробы иммунных сывороток были менее активные и проявились меньшим количеством полос преципитации. Полученные данные свидетельствуют, что в анализируемом белковом экстракте, приготовленном из замороженных личинок *A. simplex* L3, содержится не менее трех компонентов, являющихся термостабильными активными антигенами, способными вызвать продукцию антител. Разная активность полученных сывороток кроликов при одной схеме иммунизации, одинаковой дозе введенного им белкового антигена, свидетельствовала об индивидуальной реактивности животных.

Далее для определения степени зараженности рыбы анизакидами в качестве антигена в РИД использовали жидкость, полученную при размораживании инвазированной анизакидами рыбной продукции из путассу и минтая. В результате реакции в агаровом геле в варианте «тройка» появилась полоса преципитации между гипериммунной сывороткой к белково – антигенному экстракту из личинок анизакид и жидкостью, полученной при размораживании инвазированной анизакидами рыбной продукции. Эти данные подтверждают, что поле многократного замораживания и оттаивания экскреторно-секреторные продукты анизакид попадают в мясо рыбы.

По степени проявления реакции косвенно можно оценить степень пораженности рыбной продукции анизакидами и определить порядок дальнейшего действия с данной продукцией.

Таким образом, для определения степени зараженности рыбной продукции анизакидами и продуктами их жизнедеятельности можно применять реакцию иммунодиффузии в агаровом геле между гипериммунной сывороткой к белково-антигенному экстракту из *A. simplex* L3 и жидкостью, полученной при размораживании мышечной ткани рыб в качестве антигена. Образующаяся полоса преципитации свидетельствует о присутствии в исследуемом материале антигенов анизакид.

### **2.2.2. Изучение дозозависимого влияния экстракта *A. simplex* на гематологические показатели лабораторных мышей**

Нами были изучены изменения в состоянии гематологических показателей самцов белых мышей после однократного внутрибрюшинного введения соматического экстракта (дозы 100, 200, 500, 1000 мкг белка).

Все опытные и контрольные животные сохраняли удовлетворительное состояние на протяжении всего проведения эксперимента. Тем не менее, в состоянии лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов были выявлены изменения. Животные контрольной группы имели некоторые отклонения от нормы, которые характеризовались незначительным снижением количества лимфоцитов и их процентного отношения, а также среднего объема эритроцитов. В условиях эксперимента в периферической крови лабораторных мышей после введения соматического экстракта *A. simplex* наблюдалось увеличение относительного количества лимфоцитов в сравнении с контролем. Характерным для данного показателя стало прямо пропорциональное дозам введенного биопрепарата его возрастание. Проведенные ранее исследования также регистрировали относительное увеличение количества лимфоцитов через 48 часов, что вероятно, происходит за счет стимуляции специфического клеточного и гуморального иммунного ответа. Полученные результаты подтверждают факт высокой антигенной активности исследуемого соматического экстракта, который за счет повышения дозы по белку увеличивает степень ответной реакции.

Относительное количество гранулоцитов у мышей экспериментальных групп во всех случаях не превышало нормативных показателей, напротив, при увеличении дозы экстракта от 100 мкл до 1000 мкл происходило его снижение от 38,0% до 35,5%.

В состоянии эритроцитов достоверных изменений в эксперименте и контроле мы не наблюдали, хотя у животных опытных групп средний объем эритроцитов был немного выше относительно контроля.

Тромбоциты у животных контрольной группы немного превышали нормативные показатели, в то время как в экспериментальных группах он несколько снижался, не выходя за пределы физиологических показателей. При увеличении дозы экстракта, напротив, увеличивался средний объем тромбоцитов.

Изменения в лейкоцитарной формуле характеризовались, как и в предыдущем исследовании, увеличением количества лимфоцитов, а также появлением сдвига ядра нейтрофилов влево (обнаружение юных форм) при соответствующем уменьшении количества сегментоядерных гранулоцитов в ответ на возрастание дозы вводимого экстракта. Также отмечали увеличение в 3 раза по сравнению с контролем количества эозинофилов и миелоцитов.

Начиная с дозы 200 мкг белка на голову и выше, в мазках периферической крови регистрировали появление бластных форм клеток.

В результате воздействия белкового экстракта *A. simplex* в крови мышей начинали появляться клетки с различными патологиями (двухлопастное ядро

лимфоцитов, гиперсигментированное ядро нейтрофилов). В эритроцитах регистрировали тельца Жолли.

### **2.2.3. Изучение патоморфологических изменений в органах мышей под воздействием разных доз экстракта *A. simplex***

В селезенке отмечали полнокровие красной пульпы. В центре фолликулов прослеживалась макрофагальная реакция, которая с возрастанием дозы белкового продукта *A. simplex* становилась более выраженной. При дозах 100 и 200 мкг гистиоциты с гиперхромными ядрами располагались в перифолликулярной зоне одиночно, тогда как при дозах 500 и 1000 мкг образовывали скопления.

В печени структура долек не была нарушена во всех случаях. Отмечали выраженную гиалиновокапельную и гидропическую дистрофию гепатоцитов. С возрастанием дозы экстракта, ядра клеток печени теряли равномерность окраски, располагались эксцентрично. Зачастую они становились оптически прозрачными с глыбчатым распределением хроматина. На уровне портальных трактов, а при введении высоких доз материала – также на уровне долек, отмечались скопления зрелых лимфоцитов по типу узелков.

В семенниках структура нормальной ткани сохранялась во всех отделах, однако при увеличении дозы биологического материала отмечали деструктуризационные изменения. На уровне базального слоя сперматогенного эпителия выявляли одиночные митозы. В канальцах отмечены участки обширной десквамации, клетки подвергались дезорганизации, развивалась гидропическая дистрофия.

Сперматогенез был сохранен только в отдельных канальцах, зачастую был ослаблен. Повсеместно регистрировали явление агглютинации хвостовых частей сперматозоидов, а также их разрозненно расположенные яросодержащие и хвостовые части. Многие канальцы кистозно расширены и пусты.

В строме семенников выявляли наличие умеренного или выраженного отека, содержание толстостенных одиночных сосудов со слабым кровенаполнением, избыточное содержание волокнистых структур и небольшое количество фибробластов, расположенных группами по несколько штук. Также обнаруживали увеличение яросодержащей части эндотелиальных клеток внутреннего слоя крупных кровеносных сосудов, вакуолизацию цитоплазмы миоцитов мышечного слоя артерий. После введения дозы 100 мкг были отмечены патологии в состоянии эндотелиальных клеток артерий семенников. В них была отмечена гипертрофия мышечной оболочки и вакуолизация цитоплазмы миоцитов. Сперматогенный эпителий канальцев дистрофичен, сперматогенез местами ослаблен. Семявыносящие протоки содержали аморфные белковые массы.

Проведенный нами на белых мышях эксперимент доказывает наличие зависимости степени выраженности патологических явлений в органах от дозы введенного белкового экстракта *A. simplex*.

В печени и семенниках под влиянием продуктов личинок паразита развиваются дисциркуляторные процессы, а также дистрофические изменения, которые свидетельствуют о нарушении метаболизма на уровне клеток, вызванные не аллергическим, а токсическим эффектом. Впоследствии, участки воспаления замещаются соединительной тканью, что сопровождается ослаблением функций органов. В частности, в семенниках это приводит к ослаблению или полному прекращению сперматогенеза.

#### **2.2.4. Изучение дозозависимого эффекта от введения экстракта *A. simplex* на клетки красного костного мозга лабораторных мышей**

##### **2.2.4.1. Кариопатические изменения гемопоэтических клеток лабораторных мышей после воздействия разными дозами экстракта**

Митотический индекс (МИ) и соотношение фаз деления во всех опытных группах были повышены приблизительно втрое, однако максимальное значение МИ было зафиксировано при дозе 100 мкг на голову. Достоверность полученных результатов по сравнению с контролем составила  $p \leq 0,01$ . Количество патологий деления миелоцитов также возрастало в 15 раз при дозе 100 мкг и 200 мкг белка на голову, в 9 раз - при дозе 500 мкг и примерно в 12 раз – при дозе 1000 мкг.

Самое большое количество патологий, основная часть которых происходила за счет многополюсного митоза, наблюдали в группе животных, получивших дозу 200 мкг на голову.

При дозе 200 мкг и 500 мкг появлялись двухъядерные лимфоциты, которые не наблюдались в предыдущих экспериментах. Также при дозе 200 мкг на голову на стадии анафазы была выявлена такая субхроматидная абберрация, как мосты, что свидетельствует о нарушении структур самих хромосом. При дозе в 1000 мкг по белку отмечали активацию лимфоидного ростка.

##### **2.2.4.2. Ультраструктурные изменения клеток красного костного мозга лабораторных мышей под действием экстракта *A. simplex***

Так как было установлено, что наибольшее количество кариопатических изменений в соматических клетках наблюдалось при дозе 200 мкг белка на голову, мы изучали изменения ультраструктуры клеток именно при таких параметрах эксперимента.

Однократное внутривентральное введение соматического экстракта личинок *A. simplex* самцам белых мышей привело к дегенеративным изменениям структур клеток красного костного мозга. Данные процессы связаны с изменениями ультраструктуры, в первую очередь митохондрий, в виде их дезорганизации. Также отмечено нарушения структуры ядра в виде колликации ядерного вещества: неровные контуры ядерной и цитоплазматической оболочки, что в совокупности способствует гибели клетки.

## **2.2.5. Изучение дозозависимого влияния нематодного экстракта на половые клетки самцов мышей**

### **2.2.5.1. Кариопатические исследования клеток семенников при введении разных доз экстракта *A. simplex***

Результаты эксперимента показали, что при дозе 1000 мкг мейотическая активность в семенниках повышалась в 1,5 раза по сравнению с контролем и незначительно (в 1,3 раза) относительно этого же показателя после применения дозы 100 мкг на голову.

Выявлено также изменение в соотношении отдельных фаз деления клеток, характеризующееся уменьшением количества ана-телофаз и пропорциональным увеличением числа про- и метафаз в ответ на увеличение дозы экстракта по белку, что является свидетельством остановки процесса мейоза на его ранних стадиях.

Отмечали также и возрастание уровня патологий мейоза в семенниках лабораторных мышей. Так, в контроле он оставался в пределах 0,08%, что укладывается в рамки физиологической нормы, тогда как при дозе в 100 мкг на голову он вырос уже в 2,5 раза, а при дозе 200 мкг - в 5 раз. При дозах в 500 и 1000 мкг белка на голову данный показатель превысил контрольный уровень в 8 раз. В последнем случае все показатели оказались достоверными по сравнению с контролем ( $p \geq 0,05$ ).

Патологии мейоза проявлялись наличием таких аномалий как отставание хромосом в метафазе, многогрупповая метафаза, хромосомные мосты в анафазе, а также многогрупповые и неравнополюсные анафазы. Возрастание дозы экстракта из нематоды вызывало закономерное увеличение разнообразия патологических форм деления, например, стали встречаться отставания отдельных хромосом в анафазе, четырехполюсные анафазы, многогрупповые метафазы, анафазы с мостами, преждевременные расхождения хромосом в метафазе.

### **2.2.5.2. Ультраструктурные изменения в митохондриях сперматоцитов лабораторных мышей под действием продуктов *A. simplex***

Предыдущим опытом было определено, что наибольшие кариопатические изменения отмечаются в половых клетках лабораторных мышей через 48 часов после однократного внутривентрального введения соматического экстракта в дозе 200 мкг/животное. В связи с этим для изучения ультраструктуры клеток семенников мы воспроизвели данные параметры эксперимента.

В образце ткани семенника обнаружены поперечные срезы семенных канальцев. В просветах канальцев просматриваются сперматоциты и сперматиды. На мембране семенного канальца видны клетки Сертоли, сперматоциты и сперматогонии. В цитоплазме сперматоцитов в небольшом количестве находятся митохондрии, расположенные диффузно.

При увеличении видно, что мембрана митохондрий разрыхлена, ее двухконтурность сохранена частично. В митохондриях отмечали деструктуризацию крист, просветление митохондриального матрикса (рис.1).

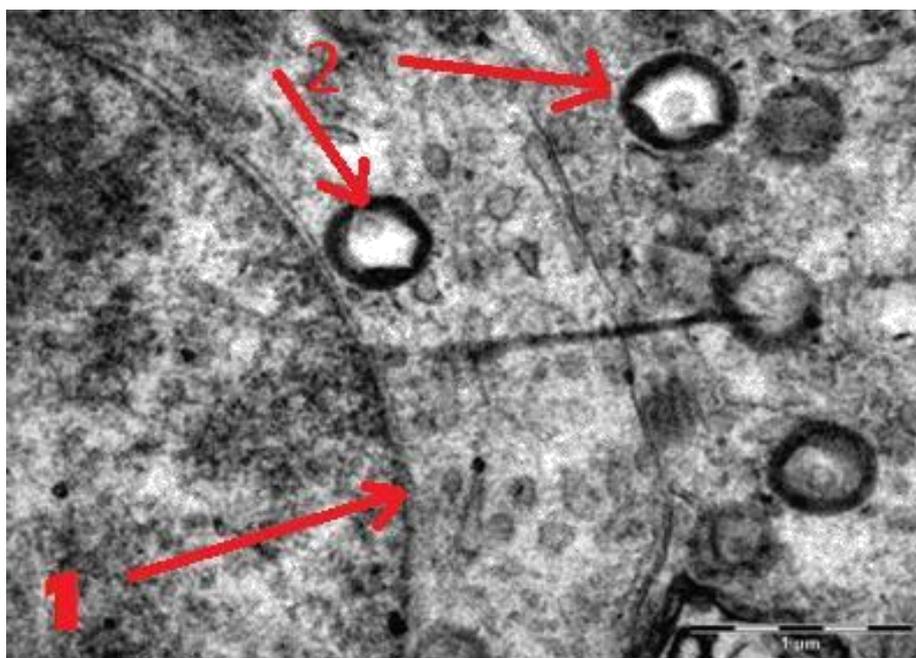


Рис.1.Фрагмент сперматоцита. Ядерная мембрана четкая, просматривается двухконтурность (1), митохондрии с деструкцией крист, просветлением матрикса (2). Увеличение X 22 000

В части сперматоцитов экспериментальных мышей мы отмечали, что митохондрии выглядели набухшими, кристы в них сохранены частично или деструктурированы, митохондриальный матрикс просветлен, что является необратимыми изменениями. В результате подобной патологии митохондрий нарушается процесс окислительного фосфорелирования в клетке, и она вынуждена получать энергию с помощью анаэробных процессов.

## 2.2.6. Влияние белкового экстракта из личинок

### *A. simplex* на развитие куриных эмбрионов

#### 2.2.6.1. Изучение действия соматического экстракта *A. simplex* на куриные эмбрионы на разных этапах эмбриогенеза

В интактной группе изменений не наблюдали, масса, возраст эмбрионов и степень их развития соответствовали стандартным показателям. В опытной группе изменения затрагивали массу эмбрионов.

Через 2 суток после введения гельминтного материала в желточный мешок 8-суточным отмечено, что один из эмбрионов был визуально меньше и отставал в развитии - зачатки перьев на спине были менее выражены.



Рис.2. 16-суточные куриные эмбрионы. Инкубация 8 суток после введения соматического экстракта *A. simplex* в желточный мешок.

При вскрытии 8-суточных куриных эмбрионов контрольной группы через 8 суток инкубации их возраст полностью соответствовал срокам развития. В то же время, у одного из куриных эмбрионов опытной группы морфологические признаки соответствовали 8 суткам инкубации, на которых развитие полностью прекратилось (рис. 2).

При введении экстракта в аллантаис 11-суточным при вскрытии через 8 дней отметили небольшое отставание в развитии эмбрионов: у одного голова была опущена вниз, у остальных она находилась не под правым крылом. В контрольной группе у эмбрионов голова находилась под правым крылом и была направлена к воздушной камере.

Среди 13-суточных эмбрионов, которым экстракт из *A. simplex* вводили на ХАО, возраст через 8 суток соответствовал 21 суткам, однако у 2 эмбрионов ХАО не была проклюнута, и у одного желточный мешок не был втянут, также отмечали наличие аллантаисной жидкости. Таким образом, изменения в состоянии подопытных куриных эмбрионов были тем более выраженными, чем раньше был срок инкубации на начале эксперимента.

#### **2.2.6.2. Изучение действия соматического экстракта *A. simplex* на ранних этапах эмбриогенеза куриных эмбрионов**

Проанализировав результаты предыдущего опыта, отметили, что наибольшее негативное воздействие соматический экстракт оказал на ранних этапах развития и при введении его в желточный мешок. Поэтому следующий опыт проводили с инкубационным яйцом (1 сутки) и 6-суточными куриными эмбрионами, также оценивая воздействие экстракта на 2 и 8 сутки.

Через 48 часов контроль соответствовал срокам инкубации, образовался бластодиск, были заметны кровеносные сосуды. В опытной группе было обнаружено отставание: развитие соответствовало 24 часам, в одном яйце наблюдалось неравномерное окрашивание желтка и наличие газа. В группе 6-суточных эмбрионов в отличие от контроля, у одного эмбриона масса оказалась в 2 раза меньше, чем у остальных. Относительный прирост 6-суточных эмбрионов по сравнению с контролем был меньше в 1,2 раза.

При вскрытии на 8 сутки в контроле патологии не наблюдали, развитие соответствовало сроку 8 суткам инкубации. В экспериментальной группе у двух эмбрионов выявили отставание в развитии. Возрастные признаки одного эмбриона соответствовали 72 часам инкубирования, другого - 48 часам инкубирования.

Во второй группе 6-суточных эмбрионов через 8 суток в контроле наблюдали нормальное развитие. В опытной группе развитие одного эмбриона остановилось на этапе 7-8 суток: характерная форма головы, клюв, зачатки перьев, наличие мацерации, ткани грязно-розового цвета вследствие гистолиза, дряблые.

### **2.2.6.3. Гистологические изменения тканей и органов куриных эмбрионов под влиянием антигенного экстракта из личинок *A. simplex***

При гистологическом исследовании органов и тканей куриных эмбрионов отмечали во всех образцах наличие незрелых клеток в коре головного мозга, морфологическую незрелость легких, миокарда, печени, почек, что характерно для данных стадий развития птиц. В субэпителиальных зонах сетчатки глаза у экспериментальных образцов регистрировали наличие групп лейкоцитов и малых лимфоцитов.

Изучение гистопрепаратов тканей куриных эмбрионов 6- и 8- суточного возраста позволило выявить также избыток волокнистых незрелых структур на уровне стромы паренхиматозных органов, дистрофические изменения в клетках миокарда и печени. Гемопоз в печени был выражен минимально. В сетчатке глаза хорошо прослеживался распространенный отек и очаговые скопления лимфоцитов.

При изучении образцов, полученных от 11-суточных эмбрионов, регистрировали изменения в состоянии головного мозга. Мягкая мозговая оболочка в срезах отличалась выраженным полнокровием сосудов, отеком, участками кровоизлияний и наличием одиночных клеток лимфомакрофагального ряда. В мозжечке эндотелий сосудов находился в состоянии очаговой десквамации с обнажением базальной мембраны, просветы сосудов выглядели суженными.

Таким образом, в результате проведенных опытов по изучению влияния соматического экстракта *A. simplex* на развитие куриных эмбрионов нами установлено выраженное эмбриотоксическое действие, при этом наибольший эффект белок нематод оказывал на эмбрионы ранних сроков развития при введении его в желточный мешок. Следовательно, чем менее зрелыми были клетки хозяина, тем тяжелее проявлялись последствия для организма. Морфологические изменения зависели от длительности его воздействия. В тканях эмбрионов под действием белков анисакид развивались дистрофические изменения и иммунологические реакции, аналогичные изменениям в органах и тканях мышей, полученных в предыдущих экспериментах.

### **2.2.7. Токсическое действие соматического экстракта личинок *A. simplex* на одноклеточные организмы *P. caudatum***

#### **2.2.7.1. Определение острой токсичности экстракта *A. simplex***

В интактной группе через 1 час рост и жизнеспособность инфузорий, скорость их движения не изменялись, лишь у 2% движение стало веретенообразным. Среди инфузорий, подвергнутых действию цельного соматического экстракта, значительно повысилось количество микроорганизмов с веретенообразным движением - 56%, гибель - 13% и лизис 15%. Однако, разведенный 1:2 соматический экстракт оказывал более выраженное влияние: веретенообразное движение наблюдали в 42% случаев, гибель - в 46%. В контроле через 3 часа количество парамеций увеличилось в результате их размножения. Через 3 часа в эксперименте наблюдали 100%

гибель простейших. Количество клеток с веретенообразным движением уменьшалось вдвое при использовании неразведенного и вчетверо - разведенного экстракта за счет гибели и лизиса.

### 2.2.7.2. Ультраструктурные изменения мембран одноклеточных микроорганизмов

В интактной контрольной группе изменений в структуре наружной оболочки не наблюдали. При проведении электронной сканирующей микроскопии экспериментальных объектов обнаружены структурные нарушения наружных мембран на полюсах клеток. При большем увеличении под наружной мембраной на эктоплазме видны поры (рис.3). Поры регистрировали и в наружной стенке дрожжевых клеток (рис.4).

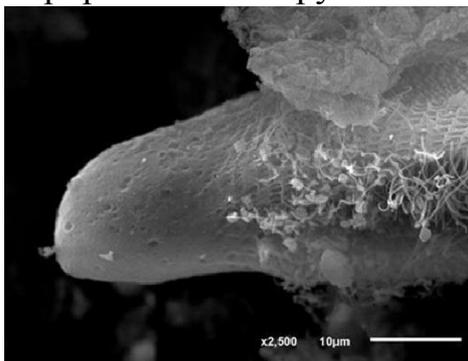


Рис.3. Поры на поверхности *P. caudatum* под воздействием соматического экстракта *A. simplex*. Увел. x 2500.

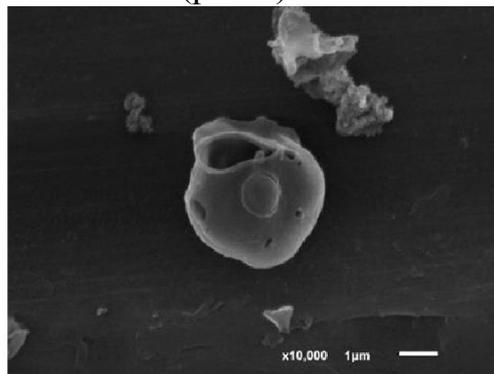


Рис.4. Формирование крупной поры у *S. cerevisiae* под воздействием соматического экстракта *A. simplex*. Увел. × 10000

### 2.2.8. Влияние соматического экстракта *A. simplex* L3 на прокариотические микроорганизмы *in vitro*

В культуре *Micrococcus sp.* спустя 12 часов от начала эксперимента вокруг бумажных дисков была сформирована четкая зона задержки роста, диаметр составил 1,52-1,64 см. В результате культивирования бактерий *E. coli* вокруг бумажных дисков с экстрактом в течение 12 часов оставались также выраженные зоны стерильности с диаметром 2,12-2,18 см. Подобный же эксперимент, проведенный на бактериях *P. vulgaris* также позволил установить наличие зон временной задержки роста микроорганизмов. Диаметр зон оказался несколько меньшим - 1,58-1,63 см.

Весьма интересным в эксперименте является факт, что зона стерильности во всех случаях исчезала спустя 24 часа культивирования.

Таким образом, наши исследования установили наличие в белковом экстракте потенциальных бактериостатических компонентов, действие которых вызывает временный бактериостаз (не более 12 часов) грамотрицательной и грамположительной облигатной микрофлоры (*Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris*), предположительно за счет нарушения обмена энергии и веществ.

## ВЫВОДЫ

1. Соматический белковый экстракт *Anisakis simplex* L3 является активным термостабильным антигеном, способным диффундировать в ткани инвазированной рыбы и вызывать иммунный ответ в организме животных.

2. Однократное внутрибрюшинное введение экстракта *A. simplex* L3 лабораторным мышам вызывает дозозависимые токсические, иммунологические и кариопатические изменения: увеличение количества эритроцитов, среднего объема тромбоцитов и снижение тромбокрита, увеличение процентного соотношения лимфоцитов и уменьшение - гранулоцитов, повышение показателя гетерогенности тромбоцитов.

3. Дозозависимый характер изменений отмечен в селезенке лабораторных мышей за счет макрофагальной реакции, в тканях печени - лимфоидная реакция. В тканях семенников - деструкция сперматогенного эпителия, ослабление сперматогенеза, необратимые изменения мембран митохондрий сперматоцитов.

4. Однократное внутрибрюшинное введение соматического экстракта личинок *A. simplex* в дозе 200 мкг самцам белых мышей приводит к дегенеративным изменениям структур клеток красного костного мозга, которые связаны с нарушениями ультраструктуры митохондрий. С увеличением дозы нарастает количество патологических форм митоза: в 15 раз при введении 100 и 200 мкг белка на голову, в 9 раз - при дозе 500 мкг и в 12 раз - 1000 мкг.

5. В половых клетках хозяина количество патологий мейоза возрастает при дозе в 100 мкг на голову в 2,5 раза (при 0,08% в контроле), при дозе в 200 мкг - в 5 раз, при дозах в 500 и 1000 мкг белка - в 8 раз. Дозозависимый характер носят и отдельные патологические формы мейоза: отставание в метафазе от  $0,04 \pm 0,01$  в контроле,  $0,1 \pm 0,08$  при 100 мкг и  $0,3 \pm 0,2$  при дозе 1000 мкг.

6. Соматический экстракт *A. simplex* оказывает выраженное эмбриотоксическое действие на куриные эмбрионы, которое проявляется отставанием в развитии или его прекращением. Наибольшее воздействие белки паразита оказывают на 1- суточные эмбрионы при введении в желточный мешок и последующей инкубации в течение 8 суток. В тканях куриных эмбрионов под действием соматического экстракта из личинок анизакид отмечалось ослабление гемопоэза, развитие дистрофических изменений и иммунологических реакций, подобно изменениям в органах и тканях мышей.

7. Экстракт анизакид токсичен для инфузорий *P. caudatum*. Через 3 часа наблюдается гибель 100% инфузорий от воздействия цельного и разведенного 1:2 исследуемого биоматериала. Наиболее выраженное токсическое действие показал разведенный 1:2 экстракт, за счет гибели клеток 46%, а в случае воздействия цельного экстракта гибели 13% и лизиса 15% клеток. При ультраструктурном исследовании инфузорий и дрожжей выявлено нарушение структуры мембран. *P. caudatum*, *S. cerevisiae* являются удобной моделью для изучения воздействий продуктов гельминтов на эукариотическую клетку.

8. В состав исследуемого гельминтного экстракта входят активные белковые компоненты, приводящие к развитию временного бактериостаза Г<sup>+</sup> и Г<sup>-</sup> облигатной микрофлоры (*Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris*), предположительно за счет подавления у микроорганизмов метаболических и энергетических процессов.

### **СВЕДЕНИЯ О ПРАКТИЧЕСКОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Разработанный способ иммунологического определения антигенов анизакид в мышечной ткани рыб может быть рекомендован в условиях производственных ветеринарно-санитарных лабораторий и ветеринарных диагностических центров.

Способ подавления роста микроорганизмов антигенами-экстрактами из гельминтов может быть использован для изучения цитостатических свойств гельминтов на примере прокариот.

Полученные результаты используются в учебном процессе ФГБОУ ВО Пермский ГАТУ для проведения занятий по курсам «Паразитология и инвазионные болезни», «Паразитарные болезни».

### **РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ**

1. Результаты работы можно использовать для написания практических рекомендаций о запрете употребления сырой, замороженной инвазированной рыбы беременным, в раннем возрасте, животным – производителям и лицам с иммунопатологиями.
2. Для изучения патологического действия гельминтов и их экстрактов можно использовать в качестве тест - объектов инфузории *P. caudatum* и дрожжи *S. cerevisiae*.
3. Основным механизмом патологического действия гельминтов является развитие окислительно-восстановительного стресса, в связи с чем, при терапии гельминтозов необходимо применение антиоксидантов.
4. Дальнейшее изучение свойств соматических и экскреторно-секреторных продуктов *A. simplex* необходимо для создания биопрепаратов. На основании проведенных испытаний рекомендуется разработка препаратов, подавляющих рост и размножение быстроделющихся клеток, в том числе и опухолевых.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации:**

1. *Лазарева О.И., Сивкова Т.Н., Татарникова Н.А., Патлусова Е.С.* Изменения в семенниках лабораторных мышей под воздействием

соматического экстракта *Anisakis simplex* // Пермский аграрный вестник. – 2016. – №4. – С.117-120.

2. Сивкова Т.Н., Бережко В.К., Успенский А.В., Прохорова Т.С., Лазарева О.И. Обнаружение личиночных антигенов *Anisakis simplex* в рыбной продукции как показатель зараженности рыбы анизакидами // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – «С-ИНФО». – Москва. – 2017. – №3. – С. 7-11.

3. Лазарева О.И., Сивкова Т.Н., Патлусова Е.С. Влияние антигенного экстракта из личинок *Anisakis simplex* на развитие куриных эмбрионов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - «С-ИНФО». – Москва. – 2017. – №4. – С. 34-38.

4. Лазарева О.И., Сивкова Т.Н., Прохорова Т.С. Влияние соматического экстракта из личинок анизакид на бактерии // Пермский аграрный вестник. – 2018. – №2. – С. 140-147.

5. Лазарева О.И., Сивкова Т.Н., Прохорова Т.С., Бережко В.К., Написанова Л.А. Влияние соматического экстракта *Anisakis simplex* L3 на микроорганизмы *in vitro*. – Аграрный вестник Урала. – 2019. – № 02 (181) – С. 22-28.

#### Монографии, статьи, материалы конференций:

6. Lazareva O.I., Sivkova T.N. Effect of somatic *Anisakis simplex* extract to development chick embryos // Journal International AGROFOR. – 2016. – Vol.1 (2). – P. 119 -124.

7. Лазарева О.И. Характеристика антигенов *Anisakis simplex* // Сборник Всероссийской научно-практической конференции «Молодежная наука 2015: технологии, инновации. – Пермь: Изд-во ИПЦ «Прокрость», 2015. – Ч.3.– С.67-69.

8. Лазарева О.И., Сивкова Т.Н. Изучение дозозависимого влияния экстракта *Anisakis simplex* на гематологические показатели лабораторных мышей // Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Инновационные технологии и технические средства для АПК». – Воронеж: ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ, 2015. – Ч3. – С.143-149.

9. Лазарева О.И., Сивкова Т.Н. Изучение дозозависимого эффекта от введения экстракта *Anisakis simplex* на соматические клетки лабораторных мышей // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы развития ветеринарной медицины, зоотехнии и аквакультуры». – Саратов: Изд. «Научная книга», 2016. – С.96-99.

10. Лазарева О.И. Антимитотическое действие белкового экстракта *Anisakis simplex* // Сборник Всероссийской науч. - практической конф. «Молодежная наука 2016: технологии, инновации». – Пермь: Изд-во ИПЦ «Прокрость», 2016. – Ч.1. – С.301-303.

11. Лазарева О.И., Сивкова Т.Н. Изучение дозозависимого эффекта экстракта личинок *Anisakis simplex* на половых клетках лабораторных мышей //

Сборник мат. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – М., 2016. – С.219-221.

12. **Лазарева О.И., Сивкова Т.Н., Чугунова Е.О.** Токсическое действие соматического экстракта личинок *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) Dujardin, 1845 на одноклеточные микроорганизмы *Paramecium caudatum* (Ehrenberg, 1838) // Сб. мат. VI Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии». – Севастополь: Изд-ль Бондаренко Н. Ю., 2016. – С.94-95.

13. **Лазарева О.И., Сивкова Т.Н.** Ультраструктура митохондрий сперматоцитов лабораторных мышей под действием продуктов *Anisakis simplex* // Труды X Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Современные аспекты патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики паразитарных заболеваний». – Витебск: ВГМУ, 2016. – С.123-126.

14. **Лазарева О.И., Сивкова Т.Н.** Патоморфология органов мышей под влиянием разных доз экстракта *Anisakis simplex* // Мат. X науч.-практ. конф. «Современные проблемы общей и прикладной паразитологии и эпизоотологии». – Воронеж: Биохимик актив, 2017. – С.134-137.

15. **Бережко В.К., Сивкова Т.Н., Успенский А.В., Прохорова Т.С., Лазарева О.И.** Иммунологический метод оценки зараженности рыбной продукции личинками *Anisakis simplex* // Сб. мат. междн. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – 2017. – вып. 18 – С.54-56.

16. **Лазарева О.И.** Изменение ультраструктуры клеток красного костного мозга лабораторных мышей под действием экстракта *Anisakis simplex* // Сб. мат. междн. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – М. – 2017. – вып.18. – С.221-224.

17. **Лазарева О.И.** Ультраструктурные изменения клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* под действием соматического экстракта *Anisakis simplex* // Сб. Всероссийской науч.-практ. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов «Молодежная наука 2017: технологии и инновации». – Пермь: ИПЦ «Прокрость», 2017. – Ч.1. – С.255-256.

18. **Лазарева О.И., Сивкова Т.Н.** Проблема безопасности морской рыбы при поражении личинками анизакид. Матер. Междунар. научно-практ. конф. «Актуальные направления инновационного развития животноводства и современных технологий продуктов питания, медицины и техники». – Ростов-на Дону, 2017. – С. 276-282.

19. **Лазарева О.И., Бережко В.К., Сивкова Т.Н.** Оценка бактериостатического действия соматического экстракта *Anisakis simplex* на культуры клеток микроорганизмов. - Материалы X Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы». – М., 26-28 февраля 2018г. – С. 200.