

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428

Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

ОКПО 00496165, ОГРН 1037700258870, ИНН/КПП 7721017821/772101001

№ 1640/22 от «06» декабря 2019 г.
на № _____ от



О Т З Ы В В Е Д УЩ Е Й О Р ГА НИЗАЦИИ

Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН»
на докторскую работу Лазаревой Ольги Игоревны
«Цитопатическое действие соматического экстракта *Anisakis simplex L3* на эукариотические и прокариотические клетки», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук в докторский совет Д 002.213.04
при ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН»

Актуальность выполненной работы. Влияние паразитов и продуктов их метаболизма на организм в целом и различные органы и системы хозяина было и остается предметом многочисленных научных трудов. Среди них существенно меньше работ, посвященных исследованию воздействия гельминтов и белковых экстрактов, приготовленных из них, на такие процессы как митоз, эмбриональное развитие и репродуктивная функция у хозяина. Между тем, имеются убедительные доказательства наличия цитогенетического действия многих паразитов, включая *Anisakis simplex*, на соматические и половые клетки хозяина, при этом наиболее «страдают» клетки с высоким митотическим потенциалом. Данный вопрос становится особенно актуальным с учетом широкого распространения анизакидоза во многих странах мира.

Значение таких исследований трудно переоценить, поскольку выявляются новые аспекты взаимоотношений в системе «паразит-хозяин», проводится оценка токсических и патогенетических последствий заражения, а в перспективе возможно создание новых фармакологических препаратов для лечения инвазий и обеспечения защиты клеток хозяина от неблагоприятного воздействия продуктов метаболизма гельминтов.

Кроме того, для понимания механизма и биологии таких эффектов большой интерес представляет исследование влияния продуктов гельминтов не только на эукариотических клетках, в частности, клетках хозяина, но и на других моделях, например, прокариотических клетках.

В связи с изложенным актуальность темы диссертационной работы несомненна и не вызывает вопросов.

Научная новизна работы. В различных аспектах оценено влияние экстракта личинок *Anisakis simplex* на клетки разных типов и уровня организации, в частности, клетки млекопитающих, инфузорий, дрожжей и культуры микроорганизмов. Выявлено выраженное эмбриотоксическое действие экстракта анизакид на куриных эмбрионах. Впервые установлено токсическое действие экстракта анизакид на одноклеточные микроорганизмы *P. caudatum*. Показана бактериостатическая активность экстракта *A. simplex L3* для *Micrococcus spp.*, *E. coli* и *P. vulgaris*.

Теоретическая и практическая ценность работы. В результате проведенных исследований получены ценные научные сведения, свидетельствующие о цитотоксическом действии продуктов метаболизма анизакид на эукариотические и прокариотические клетки; установлены особенности и одновременно аналогии таких токсических эффектов. Полученные данные могут использоваться в подготовке и чтении лекций, а также проведении лабораторных занятий для студентов и аспирантов по дисциплине «Паразитология» и «Иммунология». Предложен «Способ иммунологического определения антигенов анизакид в мышечной ткани рыб» (патент 2613296) и «Способы определения антигенов анизакид в мышечной ткани рыб» (патент 2613297).

соб подавления роста микроорганизмов антигенами-экстрактами из гельминтов» (патент № 2665761).

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций. Большой объем проведенной экспериментальной работы, включающий разработку логичного дизайна исследования, выбор релевантных экспериментальных моделей, различающихся по уровню организации, выбор объектов, материалов исследования и показателей оценки цитотоксического действия белкового экстракта личинок анизакид, позволили автору провести глубокий анализ полученных данных и обосновать все научные положения, выносимые на защиту. Тщательный анализ литературных источников, представленных в обзоре литературе, позволяет сделать вывод, что докторантка хорошо изучила современное состояние проблемы, которой посвящена диссертационная работа. Выводы, сформулированные в диссертации, полностью соответствуют и отражают ключевые результаты, полученные в работе.

Достоверность фактических данных подтверждена статистической обработкой с использованием метода вариационной статистики с t-критерием Стьюдента. Использованные современные методы обеспечили проведение цитологических, иммунологических, токсикологических и гистологических исследований, и позволили установить статистически значимые кариопатические и существенные микроморфологические изменения на экспериментальных моделях. Результаты исследования полностью подтверждены обширным материалом в виде таблиц и рисунков.

Структура и содержание работы. Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы из двух глав с подразделами, раздела собственных исследований из восьми глав, включая главу «Материалы и методы исследований», обсуждения, выводов, практических предложений и списка литературы. Диссертация изложена на 136 страницах компьютерного текста. Список литературы включает 265 источников, из ко-

торых 119 отечественных и 146 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 27 рисунками.

Обзор литературы. Глава состоит из 2 глав с подразделами, тематика которых довольно разнообразна, но во всех случаях имеет непосредственное отношение к целям и задачам выполняемой работы.

В целом обзор литературы представляет собой аналитическое и системное исследование данных отечественных и иностранных авторов с кратким резюме в конце главы, которое логично подводит к описанию и анализу результатов собственных исследований.

С учетом научного интереса, полноты анализа и характера изложения особо можно выделить следующие разделы: 1.2.1. «Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на процесс деления клетки»; 1.2.3. «Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на эмбрионы» и 1.2.4. «Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на бактерии».

Основной раздел диссертации «Собственные исследования» традиционно подразделяется на главы «Материалы и методы исследований» и «Результаты исследований».

Глава «Материалы и методы исследований» состоит из 8 подразделов, каждый из которых представляет методическую основу определенного вида исследований.

Необходимо отметить большой набор используемых методов и протоколов: препаративные методики для приготовления экстракта личинок *A. simplex L3*, иммунологические, токсикологические, тератологические, гистологические, микробиологические протоколы; электронная микроскопия и некоторые другие. Все методики описаны тщательно, наглядно и полно.

В целом содержание главы «Материалы и методы исследований» позволяет сделать очевидный вывод о высоком методическом уровне работы в целом. Также следует отметить трудоемкий характер и большой объем выполненных исследований.

Глава «Результаты исследований» естественно составляет суть работы и состоит из 8 отдельных разделов с соответствующими подразделами, исходя из поставленных целей и задач.

Представление полученных данных начинается с главы 2.2.1., которая несколько выделяется тематикой, а также методической основой, от других исследований. Она посвящена определению зараженности и оценке степени зараженности рыбной продукции анизакидами с использованием реакции иммунодиффузии с кроличьей гипериммунной сывороткой к экстракту *A. simplex L3* и жидкостью, полученной при размораживании рыбы. Анализ полученных результатов реакции позволяет оценить ее в качестве перспективного подхода для практического применения в экспертизе рыбной продукции на инвазирование анизакидами.

Глава 2.2.2. посвящена влиянию экстракта *A. simplex* на состояние периферической крови мышей, т.е. представляет оценку токсического воздействия изучаемого продукта на организм хозяина по гематологическим показателям. Проведен расширенный анализ крови, включающий 18 показателей. Выявлено дозозависимое изменение отдельных популяций форменных элементов крови и лейкоцитарной формулы в ответ на введение белкового экстракта анизакид. Кроме того, квалификация и профессиональные навыки автора позволили установить в мазках бластные и патологические клетки при введении экстракта в высоких дозах.

Глава 2.2.3. является логическим продолжением предыдущего раздела, и в ней приведены данные, касающиеся патоморфологических изменений в органах мышей под действием экстракта *A. simplex*. С учетом того, что мишенью воздействия исследуемого экстракта является клеточное деление, то вполне логично, что особое внимание автора уделяется семенникам, как ткани с высоким пролиферативным потенциалом. Приводятся микрографии семенных канальцев с выявленными патологиями. Автор делает справедливый вывод о том, что действие экстракта носит токсический характер и при-

водит к выраженным изменениям микроструктуры семенников, что может оказать негативное влияние на общую репродуктивную функцию.

Главы 2.2.4. и 2.2.5. по смысловому содержанию перекликаются между собой и вызывают большой интерес. Они посвящены исследованию митоза клеток костного мозга и мейоза клеток семенников мышей после введения экстракта *A. simplex* в различных дозах. В данном случае следует отметить, автор не случайно использовала указанные клетки, поскольку они являются излюбленными моделями в исследованиях, посвященных клеточному делению. Однако оценке этих эффектов обычно подвергаются новые фармацевтические продукты, пестициды и биологически активные препараты самой различной направленности. И, конечно, в данном случае очень интересен и оригинален сам объект исследований - экстракт аизакид. Исследуемый белковый экстракт индуцировал выраженные патологии клеточного деления в популяции клеток костного мозга и семенниках. Автор установила качественные и количественные особенности проявления кариопатического и цитотоксического действия в этих клетках в зависимости от дозы экстракта.

Анализ этих глав хотелось бы завершить тем, что они иллюстрированы фотографиями патологических клеток и фигур митоза (мейоза) хорошего качества.

Дальнейшее развитие работы посвящено вопросам, которые во многих отношениях ранее не исследовались. Оригинальность этих разделов заключается в том, что предшествующие исследования подобного плана проводились на соматических и половых клетках млекопитающих, в то время как автор оценила эффекты экстракта личинок аизакид на куриных эмбрионах и микроорганизмах (эукариотах и прокариотах). Важно отметить, что полученные данные дают дополнительную общую биологическую характеристику исследуемого экстракта и обосновывают перспективу его применения в других областях, в частности, для подавления роста микроорганизмов.

Так, например, глава 2.2.6. посвящена изучению влияния белкового экстракта аизакид на развитие куриных эмбрионов на разных стадиях эм-

бриогенеза, различающихся по чувствительности к факторам различного происхождения и природы. Помимо новизны такого протокола тестирования экстракта аизакид на данной модели, необходимо отметить, что она имеет определенные преимущества: легкодоступный экономичный объект, действие прямое, и наконец, полученные данные условно можно экстраполировать на другие нематоды, например, паразитирующие у птиц, и оценить возможный риск проявления негативных последствий инвазий в птицеводстве.

В подразделах этой главы 2.2.6.1.-2.2.6.3. приводятся данные, полученные с использованием различной методологии изучения этого вопроса. В зависимости от стадии эмбриогенеза, на которой вводили экстракт аизакид, а также его дозы, имело место: выраженный эмбриотоксический эффект и индукция аномалий развития. Негативное действие проявлялось в задержке развития, снижении массы и размеров эмбрионов, патологических морфологических изменениях.

По своему смысловому содержанию результаты глав 2.2.7. и 2.2.8. связаны с изучением влияния экстракта аизакид на одноклеточные организмы *P. caudatum*, дрожжи, *E. coli* и микрококки *Micrococcus spp.*

Можно только положительно оценить исследования автора по этому вопросу, поскольку они дают основание предположить, что отрицательное действие аизакид и продуктов их метаболизма на организмы различной организации является универсальным, и речь идет только об особенностях механизма, характере и степени проявления этого эффекта.

Раздел «Обсуждение» по своей сути представляет совокупный анализ результатов всех экспериментов и литературных данных.

Апробация результатов исследования и научные публикации. Материалы диссертации опубликованы в 19 научных статьях, в том числе 5 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также доложены и обсуждены на региональных, всероссийских и международных научно-практических конференциях.

Замечания. Высоко оценивая диссертационную работу Лазаревой О.И., хотелось бы получить разъяснения на возникшие у меня вопросы и вы сказать некоторые замечания:

- 1) раздел 2.2.7.1. озаглавлен «Определение острой токсичности экстракта *A. simplex*» в отношении одноклеточных организмов *P. caudatum*, с чем трудно согласиться, поскольку термин «острая токсичность» имеет совершенно другой смысл и значение;
- 2) когда речь идет об эмбриогенезе, в данном случае куриных эмбрионов, то правильно говорить «стадия» развития, а не «этап» развития;
- 3) к сожалению, в диссертации отсутствует графическое представление данных, которое, несмотря на понятную специфику работы, по некоторым вопросам можно было сделать и представить;
- 4) имеются отдельные опечатки и редакционные неточности.

Отмеченные недостатки объяснимы или исправимы, и ни в коей мере не умаляют общих положительных качеств работы.

В целом работа написана грамотно; материал изложен логично; диссертация с интересом читается.

В выводах, автореферате и опубликованных статьях отражены основные положения диссертации.

Заключение. Диссертационная работа Лазаревой О.И. является самостоятельным законченным трудом автора, имеющим большое теоретическое и практическое значение. Результаты исследований автора расширяют современные знания о влиянии гельминтов на организм хозяина и организмы другой организации, а также вносят существенный вклад в решение актуальной задачи по борьбе с распространенным паразитарным заболеванием аницидозом и предупреждению токсических и патогенетических последствий этой инвазии.

По объему выполненных исследований, степени новизны и их практической значимости работа полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 Постановления правительства РФ № 842 «О порядке присуждения ученых

степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, и ее автор Лазарева О.И. заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.11 - паразитология.

Отзыв на диссертацию и автореферат составлен Новик Тамарой Самуиловной, д.б.н., профессором, ведущим научным сотрудником лаборатории экспериментальной терапии ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на совещании лаборатории экспериментальной терапии ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, протокол № 2 от 29.11.2019. Присутствовало 12 сотрудников. Голосовали «за» - единогласно.

Составитель отзыва:

ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной терапии Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН», доктор биологических наук, профессор

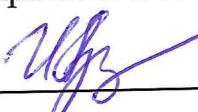


Новик Т.С.

ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,
Б. Черемушкинская, 28, Москва, Россия
Тел. сотовый: 8(916)341-28-14
Тел. служебный: 8 (499) 124-56-55
e-mail: novik.tamara@mail.ru

Председатель лабораторного совещания:

заведующий лабораторией экспериментальной терапии Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН», доктор ветеринарных наук, профессор



Архипов И.А.

ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,
Б. Черемушкинская, 28, Москва, Россия
Тел. сотовый: 8(915)062-07-45
Тел. служебный: 8 (499) 124-56-55
e-mail: arkhipovhelm@mail.ru

02 декабря 2019 г.

Подпись Новик Т.С. + Архипов И.А.
УДОСТОВЕРЯЮ
СЕКРЕТАРЬ
Миллерова А.Н.

