

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.213.04

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук по диссертации Лазаревой Ольги Игоревны на соискание ученой степени кандидата наук.

аттестационное дело №

решение диссертационного совета от 24 декабря 2019 года № 6

о присуждении Лазаревой Ольге Игоревне, гражданину Российской Федерации ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Цитопатическое действие соматического экстракта *Anisakis simplex* L3 на эукариотические и прокариотические клетки» по специальности 03.02.11 – паразитология принята к защите 17 октября 2019 г., протокол № 4, диссертационным советом Д 002.213.04 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, адрес: 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, утвержден приказом Министерства образования и науки Российской Федерации 677/нк от 24 июня 2015 г.

Соискатель, Лазарева Ольга Игоревна, 1986 года рождения. В 2008 году соискатель окончила Пермскую государственную сельскохозяйственную академию им. академика Д.Н. Прянишникова, факультет ветеринарной медицины и зоотехнии по специальности «Ветеринария» с присвоением квалификации «ветеринарный врач».

В 2017 году О.И.Лазарева закончила очную аспирантуру по специальности 36.06.01 - «ветеринария и зоотехния» на кафедре

инфекционных болезней Пермской государственной сельскохозяйственной академии им. академика Д.Н. Прянишникова. Экзамены кандидатского минимума были сданы в 2015, 2016 году, о чем свидетельствует запись в зачетной книжке аспиранта, выданной в 2017 году кафедрой инфекционных болезней Пермской государственной сельскохозяйственной академии имени Д.Н. Прянишникова. Экзамен по специальности 03.02.11 – паразитология (биологические науки) был сдан соискателем в Центре паразитологии ФГБОУ Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова (Справка от 24.04. 2019 №12510-6542/11).

Соискатель работает в акционерном обществе «ПРОДО Птицефабрика Пермская» в должности ведущего микробиолога пищевого отдела производственно-технологической лаборатории.

Диссертация выполнена на кафедре инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова».

Научный руководитель – Татьяна Николаевна Сивкова, доктор биологических наук, доцент во время выполнения диссертации и по настоящее время работает на кафедре инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Пермского государственного аграрно-технологического университета имени академика Д.Н. Прянишникова» в должности профессора.

**Официальные оппоненты:**

Иешко Евгений Павлович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории паразитологии растений и животных Института биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»;

Микряков Вениамин Романович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии внутренних вод имени И.Д. Папанина Российской академии наук».

**Ведущая организация:**

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН» (г. Москва) в своем положительном заключении, составленном доктором биологических наук Новик Тamarой Самуиловной, обсужденным, заслушанным и одобренным на совещании лаборатории экспериментальной терапии (протокол № 2 от 29.11.2019, присутствовало 12 сотрудников, голосование – единогласно) и утвержденным директором Федерального научного центра - Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук Гулюкиным Алексеем Михайловичем, кандидатом ветеринарных наук, указало, что «Высоко оценивая диссертационную работу Лазаревой О.И., хотелось бы получить разъяснения на возникшие у меня вопросы и высказать 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 работы можно было сделать и представить;
- 4) имеются отдельные опечатки и редакционные неточности.

Отмеченные недостатки объяснимы и 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».

В заключение составитель отзыва отмечает, что «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 анизакидозом 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».

Соискатель имеет 19 опубликованных по теме диссертации работ, в том числе, 5 из них опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК; имеет 2 патента на «Способ иммунологического определения антигенов анизакид в мышечной ткани рыб» (Патент № 2613296) и «Способ подавления роста микроорганизмов антигенами-экстрактами из гельминтов» (Патент № 2665761). Общий объем публикаций соискателя - 5 печатных листов, авторский вклад составляет не менее 85 %.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

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.

На автореферат диссертации поступило 13 положительных отзывов без замечаний. Отзывы поступили:

1. От Бибик Оксаны Ивановны, д.б.н., доцента, профессора . кафедры биологии с основами и паразитологии Кемеровского государственного медицинского университета МЗ РФ, г. Кемерово.

2.От Шемяковой Светланы Александровны, д.в.н., профессора, профессора кафедры паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологий МСХ РФ, г. Москва.

3.От Однокурцева Валерия Алексеевича, к.б.н., старшего научного сотрудника лаборатории экосистемных исследований холодных регионов Института биологических проблем криолитозоны СО РАН, г.Якутск.

4. От Андреянова Олега Николаевича, д.в.н., ведущего научного сотрудника лаборатории паразитарных зоонозов Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиала Федерального бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН», г. Москва.

5. От Курочкиной Каринэ Гегамовны, д.в.н., научного консультанта лаборатории иммунологии и молекулярных исследований Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиала Федерального бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН», г. Москва.

6. От Ждановой Ольги Борисовны, д.б.н., профессора кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Кировского государственного медицинского университета, г. Киров.

7. От Ромашова Бориса Витальевича, д.б.н., профессора кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы Воронежского государственного аграрного университета, г. Воронеж.

8. От Ромашовой Натальи Борисовны, к.б.н., начальника научного отдела Воронежского государственного заповедника, г. Воронеж.

9. От Ильиных Николая Николаевича, д.б.н., профессора, профессора кафедры биологии и генетики Сибирского государственного медицинского университета МЗ РФ, г. Томск.

10. От Новака Михаила Дмитриевича, д.б.н., профессора, профессора кафедры биологии Рязанского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова, г. Рязань.

11. От Гламаздина Игоря Геннадьевича, д.в.н., профессора, и.о. заведующего кафедрой ветеринарной медицины Московского

государственного университета пищевых производств, г. Москва.

12. От Гаврюсовой Татьяны Владимировны, к.б.н., старшего научного сотрудника отдела ихтиологии Института биологии южных морей им. А.О.Ковалевского, г. Севастополь.

13. От Масленниковой Ольги Владимировны, к.б.н., доцента, доцента кафедры экологии и зоологии Вятской государственной сельскохозяйственной академии, г. Киров.

В положительных отзывах отмечается, что выбранная соискателем тема диссертации является актуальной в связи с тем, что инвазионные личинки нематод анизакид, поражающие морскую рыбу и другие морепродукты (креветки, кальмары, осьминоги), при употреблении в пищу зараженной рыбы и морепродуктов вызывают у человека и домашних животных комплекс тяжелых заболеваний, связанных с воздействием продуктов метаболизма личинок на организм хозяина на органном, тканевом и клеточном уровнях.

Во всех положительных отзывах отмечено, что полученные автором результаты имеют важное теоретическое и практическое значение для углубленного понимания механизмов паразито-хозяйинных отношений при паразитарных инвазиях, для совершенствования диагностики, поиска и разработки направленных средств борьбы с анизакидозом.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован их высокой профессиональной квалификацией, близостью тематики диссертационного исследования О.И. Лазаревой к кругу их профессиональных интересов и выполняемых исследований, наличием за последние 5 лет публикаций в рецензируемых изданиях по тематике, близкой к теме диссертационной работы.

Объекты исследований соискателя:

- цельный соматический белковый экстракт, приготовленный из личинок нематод *Anisakis simplex* L3;
- лабораторные мыши;

- куриные эмбрионы на разных этапах эмбриогенеза;
- одноклеточные организмы инфузория *Paramecium caudatum* и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*;
- культуры клеток микроорганизмов *Micrococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella tiphimurium* и *Bacillus subtilis*.

Диссертационный совет отмечает, что актуальность выбранной темы диссертационной работы О.И.Лазаревой не вызывает сомнения в связи с тем, что анизакидоз – заболевание, вызываемое паразитированием личиночных стадий нематод семейства Anisakidae в желудочно-кишечном тракте человека, получило широкое распространение среди населения во многих странах мира в результате употребления в пищу морской рыбы и морепродуктов, содержащих инвазионные стадии этих гельминтов. Кроме того, из литературы известно о патогенном влиянии на человека и животных не только живых личинок нематоды *A. simplex*, но и погибших личинок, содержащихся в замороженной морской рыбы и морепродуктах.

Целью диссертационной работы явилось исследование влияния цельного соматического экстракта из личинок *L3* нематоды *A. simplex* на клетки живых организмов, находящихся на разных уровнях организации: соматические и половые клетки лабораторных животных (мыши); куриные эмбрионы на разных этапах эмбриогенеза; одноклеточные организмы *P. caudatum*, дрожжи *S. cerevisiae* и культуры клеток микроорганизмов *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. tiphimurium* и *B. subtilis*.

Автор диссертационной работы, используя современные методы лабораторных исследований (иммунологические, токсикологические, тератологические, гистологические методы, электронную микроскопию, микробиологические протоколы, а также математический анализ полученных данных) установил следующее.

Экспериментально установлено, что соматический белковый экстракт *Anisakis simplex L3* является активным термостабильным

антигеном, способным проникать в ткани инвазированной морской рыбы и вызывать иммунный ответ в организме лабораторных животных.

Показано, что однократное внутрибрюшинное введение экстракта *A. simplex* L3 лабораторным мышам вызывает дозозависимые токсические, иммунологические и кариопатические изменения, которые выражаются в увеличении количества эритроцитов, среднего объема тромбоцитов и снижении тромбокрита, увеличении процентного соотношения лимфоцитов и уменьшении - гранулоцитов, повышении показателя гетерогенности тромбоцитов.

Обнаружено, что однократное внутрибрюшинное введение соматического экстракта личинок *A. simplex* (начиная с дозы 100 мкг на одно животное) самцам белых мышей приводит к дегенеративным изменениям структур клеток красного костного мозга, а именно, вызывает нарушение ультраструктуры митохондрий. При этом показано, что увеличение дозы соматического экстракта личинок *A. simplex* вызывает повышение количества патологических форм митоза.

Выявлен дозозависимый характер в увеличении количества патологий мейоза в половых клетках самцов лабораторных мышей.

Установлено, что соматический экстракт *A. simplex* оказывает выраженное эмбриотоксическое действие на куриные эмбрионы, которое проявляется в виде отставания в развитии эмбриона или его прекращении.

Обнаружено, что наибольшее воздействие белки паразита оказывают на 1-суточные эмбрионы, в тканях которых отмечалось замедление гемопоэза, развитие дистрофических изменений и иммунологических реакций, подобных изменениям в органах и тканях мышей.

Обнаружено токсическое действие экстракта анизакид на инфузории *P. caudatum* и дрожжи *S. cerevisiae*. Так, через 3 часа наблюдалась гибель 100% инфузорий от воздействия цельного и разведенного 1:2 исследуемого биоматериала и нарушение структуры клеточных мембран при ультраструктурном исследовании.

Таким образом, автором впервые:

- выявлено дозозависимое влияние соматического экстракта личинок нематоды *A. simplex* на гематологические показатели, кариопатические изменения в соматических и половых клетках лабораторных мышей;
- доказано сходство характерных проявлений мембранотоксического действия экстракта на клетки и субклеточные структуры живых объектов (млекопитающих, птиц, одноклеточных организмов - инфузорий, дрожжей и прокариот) независимо от уровня их организации;
- исследованы ультраструктурные изменения в делящихся клетках красного костного мозга и семенников лабораторных мышей, наблюдаемые при воздействии соматического экстракта личинок нематоды *A. simplex*;
- впервые показано влияние соматического экстракта на развитие куриных эмбрионов на разных стадиях эмбриогенеза, выявлен эмбриотоксический эффект и патоморфологические изменения в тканях куриных эмбрионов;
- впервые проведена оценка общей токсичности экстракта на одноклеточные микроорганизмы *P. caudatum*, на ультрамикроскопическом уровне выявлено мембранотоксическое действие экстракта на парамеции и дрожжи;
- впервые обнаружена бактериостатическая активность экстракта *A. simplex* L3 в отношении бактерий *Micrococcus* sp., *E. coli*, *P. vulgaris*.

Теоретическая ценность работы заключается в получении новых экспериментальных данных, свидетельствующих о цитотоксическом действии продуктов метаболизма анизакид на эукариотические и прокариотические клетки; выявлении сходства и различий токсических эффектов на живые организмы, находящиеся на разных уровнях развития. Полученные результаты расширяют представление о механизмах взаимоотношений в системе паразит - хозяин при паразитарных инвазиях.

Практическая значимость работы заключается в возможности использования полученных данных для проведения лабораторных занятий

со студентами и аспирантами вузов биологического профиля по дисциплинам «Паразитология» и «Иммунология», а также для чтения специализированных курсов лекций по этим дисциплинам.

Полученные диссертантом в соавторстве патенты на «Способ иммунологического определения антигенов анизакид в мышечной ткани рыб» (Патент № 2613296) и «Способ подавления роста микроорганизмов антигенами-экстрактами из гельминтов» (Патент № 2665761) могут быть востребованы в соответствующих центрах ветеринарно-санитарной экспертизы.

Достоверность фактических данных подтверждена автором 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 цитопатические и существенные ультрамикроскопические изменения у экспериментальных моделей.

Результаты исследования полностью подтверждены большим материалом в виде таблиц и рисунков.

Личный вклад соискателя состоит в планировании исследования, разработке схемы и проведении экспериментов, обработке материала, проведении гематологических и гистологических исследований, сборе, систематизации, анализе полученных результатов, статистическом анализе данных, интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций по теме работы и апробации результатов исследования на российских и международных конференциях, конгрессах и форумах.

Диссертационная работа представляет собой законченное исследование, содержит уникальные материалы, представляет большой научный интерес для специалистов, имеет важное практическое значение и большую перспективу дальнейшего развития.

Диссертация соответствует критерию внутреннего единства, что

