

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНО-  
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА  
Д.Н. ПРЯНИШНИКОВА**

*На правах рукописи*

**ЛАЗАРЕВА ОЛЬГА ИГОРЕВНА**

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

Специальность 03.02.11 Паразитология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
доктор биологических наук, доцент  
**Сивкова Татьяна Николаевна**

Пермь – 2019

## Оглавление

<b>Введение</b> .....	5
<b>I. Основная часть. Литературный обзор</b> .....	11
<b>1.1. Характеристика антигенов личинок <i>A. simplex</i>.</b> .....	11
<b>1.1.1. Соматические белки личинок <i>A. simplex</i>.</b> .....	17
<b>1.1.2. Экскреторно-секреторные белки личинок <i>A. simplex</i></b> .....	18
<b>1.1.3. Устойчивость антигенных экстрактов</b> .....	20
<b>1.1.4. Биохимический состав нематод <i>A. simplex</i></b> .....	26
<b>1.2. Изучение влияния гельминтов и их метаболитов на клетки</b> .....	28
<b>1.2.1. Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на процесс деления клетки</b> .....	28
<b>1.2.2. Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на клетки крови, иммунной системы, культуры клеток</b> .....	33
<b>1.2.3. Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на эмбрионы</b> .....	38
<b>1.2.4. Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на бактерии</b> .....	39
<b>II. Собственные исследования</b> .....	43
<b>2.1. Материалы и методы исследований</b> .....	43
<b>2.1.1. Объекты исследования, их получение</b> .....	43
<b>2.1.2. Изучение дозозависимого влияния экстракта <i>A. simplex</i> на гематологические показатели лабораторных мышей</b> .....	45
<b>2.1.3. Изучение патоморфологических изменений в органах мышей под действием разных доз соматического экстракта <i>A. simplex</i></b> .....	46
<b>2.1.4. Изучение дозозависимого кариопатического действия соматического экстракта <i>A. simplex</i> на соматические и половые клетки лабораторных мышей</b> .....	48
<b>2.1.5. Изучение влияния соматического экстракта <i>A. simplex</i> на куриные эмбрионы</b> .....	49

<b>2.1.6.</b> Изучение токсического влияния экстракта на одноклеточные микроорганизмы.....	50
<b>2.1.7.</b> Электронная микроскопия.....	51
<b>2.1.8.</b> Изучение влияния белкового экстракта <i>A. simplex</i> на культуры некоторых микроорганизмов.....	54
<b>2.2.</b> Результаты исследований.....	57
<b>2.2.1.</b> Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) с гипериммунной сывороткой к антигенам <i>A. simplex</i> с жидкостью, полученной при разморозке рыбы, зараженной анизакидами.....	57
<b>2.2.2.</b> Изучение дозозависимого влияния экстракта <i>A. simplex</i> на гематологические показатели лабораторных мышей.....	60
<b>2.2.3.</b> Изучение патоморфологических изменений в органах мышей под воздействием разных доз экстракта <i>A. simplex</i> .....	64
<b>2.2.4.</b> Изучение дозозависимого эффекта от введения экстракта <i>A. simplex</i> на клетки красного костного мозга лабораторных мышей.....	67
<b>2.2.4.1.</b> Кариопатические изменения гемопоэтических клеток лабораторных мышей после воздействия разными дозами экстракта.....	67
<b>2.2.4.2.</b> Ультраструктурные изменения клеток красного костного мозга лабораторных мышей под действием экстракта <i>A. simplex</i> .....	69
<b>2.2.5.</b> Изучение дозозависимого влияния нематодного экстракта на половые клетки самцов мышей.....	71
<b>2.2.5.1.</b> Кариопатические исследования клеток семенников при введении разных доз экстракта <i>A. simplex</i> .....	71
<b>2.2.5.2.</b> Ультраструктурные изменения в митохондриях сперматоцитов лабораторных мышей под действием продуктов <i>A. simplex</i> .....	74
<b>2.2.6.</b> Влияние белкового экстракта из личинок <i>A. simplex</i> на развитие куриных эмбрионов.....	76
<b>2.2.6.1.</b> Изучение действия соматического экстракта <i>A. simplex</i> на куриные эмбрионы на разных этапах эмбриогенеза .....	77

<b>2.2.6.2.</b> Изучение действия соматического экстракта <i>A. simplex</i> на ранних этапах эмбриогенеза куриных эмбрионов.....	79
<b>2.2.6.3.</b> Гистологические изменения тканей и органов куриных эмбрионов под влиянием соматического экстракта из личинок <i>A. simplex</i> .....	81
<b>2.2.7.</b> Токсическое действие соматического экстракта личинок <i>A. simplex</i> на одноклеточные организмы <i>P. caudatum</i> .....	83
<b>2.2.7.1.</b> Определение острой токсичности экстракта <i>A. simplex</i> .....	84
<b>2.2.7.2.</b> Ультраструктурные изменения мембран одноклеточных микроорганизмов .....	85
<b>2.2.8.</b> Влияние анизакидного соматического экстракта на прокариотические микроорганизмы <i>in vitro</i> .....	88
<b>Обсуждение</b> .....	90
<b>Выводы</b> .....	99
<b>Практические предложения</b> .....	101
<b>Список литературы</b> .....	102
<b>Приложение</b> .....	133

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Проблема анизакидоза остается актуальной во всем мире, поскольку это заболевание, вызываемое личиночными стадиями нематод семейства *Anisakidae* в результате употребления морской рыбы и морепродуктов, характеризуется токсико-аллергическими проявлениями и поражениями желудочно-кишечного тракта [94; 95; 104; 132; 187; 221; 232; 239; 240; 264]. Заражению подвержены не только человек, но и пушные и домашние животные [36; 92].

Имеются сведения, что личинки *Anisakis simplex* обнаруживаются почти у всех промысловых рыб, добываемых из морей умеренной зоны [166;180], причем исследования последних лет показали устойчивую тенденцию к росту инвазированности рыб [36; 90; 91; 95; 138; 237; 253]. Эта проблема также имеет экономическое значение из-за потенциального негативного влияния на доверие потребителей и проблемы конкурентоспособности, связанной с зараженными рыбными продуктами [136; 157; 162].

Установлено, что среди сенсibilизированных к *Anisakis* пациентов существует опасность развития аллергии [132; 136; 139; 180; 213; 221], в связи, с чем рекомендуется употребление только замороженной или хорошо проваренной рыбы [174; 220]. Некоторые авторы [180; 222; 232] считают, что эти рекомендации не защитят сенсibilизированных пациентов, так как аллергические симптомы могут вызвать отдельные белки *A. simplex* [123; 167]. Вопрос по поводу аллергий на замороженные продукты, содержащие личинок, дискутируется и требует дальнейших систематических исследований [139; 166; 232].

В то же время патогенное действие личинок анизакид не ограничивается только аллергическим эффектом. Так, Guarneri F. [174] рекомендует исследователям 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 [17; 21; 37; 70; 52]. Доказано, что выраженные цито - и кариопатические изменения происходят, в первую очередь, в быстроразмножающихся клетках, к которым относятся и половые [13; 14; 18; 28; 62]. Было установлено, что белковые продукты, входящие в состав соматических и экскреторно-секреторных продуктов *A. simplex*, обладают не только аллергическим, иммунологическим, но и цито - и кариопатическим действием [97; 98; 100; 103]. Механизм такого цитопатического действия исследован недостаточно полно, в частности, остается нерасшифрованным влияние продуктов гельминта на отдельные ультраструктуры клетки хозяина, 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 из личинок третьей стадии нематоды *Anisakis simplex* 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. Исследования дозозависимого эффекта цельного и разведенного 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 №2613296, также получен патент на изобретение №2665761 «Способ подавления роста микроорганизмов антигенами-экстрактами из гельминтов».

**Положения, выносимые на защиту:**

- Дозозависимый эффект влияния 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 *A. simplex* 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); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Агротехнологии XXI века» (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).

**Соответствие диссертации паспорту специальности.**

Диссертационная работа включает результаты иммунологических, микробиологических, гистологических, цитологических и ультрамикроскопических исследований влияния цельного экстракта из личинок третьей стадии нематоды *A. simplex* на многоклеточные и одноклеточные организмы, что соответствует паспорту специальности

**03.02.11 Паразитология, согласно пунктам:**

3. Всестороннее изучение самих паразитов: морфологии, биохимии, генетики, физиологии, систематики;

5. Изучение взаимоотношений в системе: хозяин – паразит (иммунология, патология, иммуногенетика хозяев);

7. Разработка новых методов диагностики и лечения паразитарных

болезней.

**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. Основная часть. Литературный обзор

### 1.1. Характеристика антигенов личинок *A. simplex*

Патогенное действие личинок анизакид на организм теплокровных животных изначально связывали лишь с развитием выраженного механического и аллергического действия во время миграции и проникновения гельминтов в слизистую оболочку пищеварительного канала. В связи с этим, необходимость косвенной диагностики личиночного анизакидоза у человека и животных, а также выявления продуктов метаболизма личинок *A. simplex* в морепродуктах послужили основанием изучения антигенного состава данного гельминта.

Было установлено, что для личинок *A. simplex* характерны три группы антигенов: соматические, экскреторно-секреторные и поверхностно-солюбиризованные (смытые) или кутикулярные [132; 221].

Установлено, что видоспецифическими свойствами обладает меньшая часть антигенов гельминтов, большинство же из них идентично другим видам паразитических червей, бактерий и простейших. Антигены анизакид обладают большой иммунологической кросс - реактивностью с другими нематодами, беспозвоночными, ракообразными и пылевыми клещами [182; 220; 174; 175; 212]. Так доказательством служит то, что у большинства больных с аллергией на анизакид (по некоторым данным 64,7–86%) одновременно обнаруживают в крови IgM, E к клещам и плесневым грибам [138; 149; 263]. Общая антигенная структура между этими таксономически далекими источниками может являться причиной ложноположительных результатов лабораторных исследований вследствие перекрестной реактивности [221]. Не исключается и влияние ряда технических факторов на кросс-реактивность из-за гликанов гликопротеидов других нематод [132; 136; 149; 180; 213; 221; 232; 263]. Известно, что соматические антигены, входящие в состав покровов гельминтов, высвобождаются только после гибели паразитов. Они очень многообразны, специфичны и часто имеют

гликопротеиновую природу, к ним относятся и ферменты различных желез [78].

Hwang Y.K. et al. [181] пишут, что между антигенами живых и мертвых личинок в рыбе существуют различия, они объясняют это тем, что личинки *A. simplex* после попадания в ткани хозяина изменяют свой ферменты и профиль их секреции.

В связи с кросс - реактивностью антигенов рода *Anisakis* с другими нематодами, у многих людей отмечаются высокие титры Ig E, при этом у них нет аллергических реакций на морепродукты. Хроническую крапивницу, отек Квинке и даже анафилактические реакции вызывают в основном низкомолекулярные термостабильные аллергены *A. simplex* [174]

Guarneri F. et al. [175] обнаружили не только аналогичные белки среди различных организмов, но и установили наличие гомологичных белков с хозяином. Поэтому наличие положительной реакции на антигены *A. simplex* говорит о генетической предрасположенности в регионах, где часто потребляют рыбные продукты, например, в Японии и Испании [220].

Kim J.S., Kim K.H. [189] фракционировали экскреторно-секреторные продукты личинок *A. simplex* L3 и выделили 12 полос с молекулярной массой от 10-186 кДа.

Baeza M.L. et al. [135] обнаружили частичную кросс-реактивность между соматическими и экскреторно-секреторными продуктами *A. simplex*. При сравнении реактивности соматических экстрактов и экскреторно-секреторных продуктов выяснилось, что белки вторых проявляют более сильную реактивность и связывают в 5,8 раз больше IgE.

Campos M. et al. [150] обнаружили, что при внутрибрюшинном и пероральном введении крысам личинок *A. simplex* L3, циркулирующие соматические и экскреторно-секреторные антигены обнаруживаются в ИФА через 24 часа. При этом наблюдается прямая взаимосвязь между количеством личинок и количеством антигена в сыворотке крови у привитых крыс, и в течении болезни количество антигена уменьшается. Внутрибрюшинное

введение антигена является наиболее подходящим способом для обнаружения экскреторно-секреторных антигенов. Минимальные выявляемые концентрации антигена *A. simplex*, от 2,5 мкг/мл, как для соматических, так и экскреторно-секреторных антигенов.

Iglesias R. et al. [183] с помощью антифосфорилхолиновых моноклональных антител ВН8 выявляли незначительное количество антигенов анизакид. Позднее этими же исследователями были описаны специфические моноклональные антитела против антигенов *A. simplex*. Из них четыре относились к IgG1 и один - к IgM. С помощью иммуноблоттинга были определены молекулярные массы этих моноклональных антител: 48 и 67 к (UA2 – IgM), 139 к (UA3 и UA5), 35, 38 и 139 к (UA6) и 205 к (UA8).

Audicana M. T. [132] на молекулярном уровне описали восемь аллергенов *A. simplex* (*A s 1* - *A s 8*); шесть из них экскреторно-секреторного происхождения, два - соматического.

Антигенный состав *A. simplex* исследуется на различных этапах его жизненного цикла, но очень мало работ по характеристике антигенов на молекулярном уровне [227]. При клонировании и секвенировании кДНК енолазы *A. simplex* L3, выяснилось, что рекомбинантная енолаза нематоды - белок размером 1,963-бр, предположительно состоящий из 436 остатков аминокислот, проявляет высокое сходство (70-80%) с енолазой молекул от других организмов и гельминтов. В результате иммуногенность рекомбинантной енолазы *A. simplex* сыворотки крови от мышей, которые были индуцированы против антигенов неочищенных экстрактов (соматических) показали сильную реактивность. В вестерн-блоттинге также хорошую реакционную способность получили с сыворотками мышей, иммунизированных неочищенными соматическими антигенами *Ascaris suum* и *Toxocara canis*. Исследователи пришли к выводу, что во время естественной инфекции у человека личинки *A. simplex* не дают достаточный антигенный стимул для индукции анти-енолазных антител.

Audicana M.T., Kennedy M.W. [132] выявили компоненты массой около 10 кДа, которые, проявляли мутагенные свойства и антикоагулятивную активность, вызывали хемотаксис эозинофилов.

Daschner A. et al. [158] описали аллергенные белки, обнаруженные с помощью различных молекулярных методов. Позднее Fæste C.K., Jonscher K.R., Dooper M. et al. 2014 (таблица 1) с совершенствованием методов очистки белка с помощью иммуноскрининга обнаружили еще несколько новых аллергенов *A. simplex*: *Nana s* (24 к), *Nana s CCOS3*, *Ani s* цито хром В, *Nana s FBPP*, *Anis NADHDS4L*, *Anis NARaS*, *Anis PEPB*, *Anis* тропонин, но они еще не подтверждены экспериментально [197]. Далее проводили исследование с IgM, IgE - иммунологический скрининг с протеономикой на основе масс-спектрометрии и обнаружили еще несколько потенциально новых аллергенов: миозин, белок теплового шока 70,  $\alpha$ -амилазу, дисульфид-изомеру, миофилин, енолазу, аргинин - киназа, гемоглобин и фруктоза-1,6-бифосфат-альдолаза 1 [165].

Благодаря иммуноблоттингу, как пишут Mari A., Rasi C. [205] в базы Allergome поступили данные о 21 белке *A. simplex*. Многие из перечисленных аллергенов находится в стадии обсуждения, так как при иммуноблоттинге встречается высокая частота ложноположительных результатов [132; 159; 171; 265]. Кроме того, аллергенный потенциал некоторых белков *A. simplex* определенных как аллергены, а именно *Ani s 5*, *Ani s 6*, *Ani s 7*, *Ani s 10*, *Ani s 11* и *Ani s 12*, определяются только при помощи иммуноскрининга [197].

Fæstea C. K. et al. [165] выявили 39 индивидуальных полос белков с диапазоном от 5 до 200 кДа. Большинство обнаруженных белков от 25 до 80 кДа связывают Ig E. Наиболее выраженная полоса отмечена у белка 55,5 кДа, затем 37.7 и 73.3 кДа. Исследователи поделили все белковые полосы на три группы, первая состояла из четырех 40.8, 47.5, 63.7, и 68.0, следующая из восьми 25.3, 34.4, 35.9, 39.3, 43.2, 50.3, 58.6 и 204.6 кДа, одна 5,5 кДа. Среди них были найдены белки, обладающие устойчивостью (18.2 кДа и 13.7 кДа).

**Таблица 1 - Аллергены *A. simplex*, описанные в литературе и занесенные в базы данных Allergome [165]**

№ п/п	Название аллергена	Вступление/ присоединение	Название белка	Молекулярная масса (кДа)	Семейство белков по AllFam/Pfam
1	<i>Ani s1</i> .0101	Q7Z1K3	Кunitz ингибитор сериновых животных протеаз	21,2	AF003 / PF00014
2	<i>Ani s 2</i> .0101	Q9NJA9	<b>парамиозин</b>	100	AF100 / PF01576
3	<i>Ani s3</i> .0101	Q9NAS5	<b>тропонин</b>	33.333.2	AF054 / PF00261
3.1.	<i>Ani s 3</i> .0102	G4XTD3			
4	<i>Ani s 4</i> .0101	P83885	<b>Цистатин</b>	Fragmenta	AF005 / PF00031
5	<i>Ani s 5</i> .0101	A1IKL2	Белки SXP / RAL-2	16,6	AF137 / PF02520
6	<i>Ani s 6</i> .0101	A1IKL3	<b>ингибитор сериновых протеаз</b>	9,7	AF027/PF01826& PF08742
7	<i>Ani s 7</i> .0101	A9XBJ8	Неизвестный	119	Неизвестный
8	<i>Ani s 8</i> .0101	A7M606	SXP / RAL-2 белки	16,1	AF137 / PF02520
9	<i>Ani s 9</i> .0101	B2XCP1	SXP / RAL-2 белки	15,5	AF137 / PF02520
10	<i>Ani s 10</i> .0101	D2K835	Неизвестный	23.3	Неизвестный
11	<i>Ani s 11</i> .0101	E9RFF3	Неизвестный	30,0	Неизвестный
12	<i>Ani s 12</i> .0101	E9RFF6	Неизвестный	32,9	Неизвестный
13	<i>Ani s 24</i> kDa	G1FMP3	Неизвестный	23,5	Неизвестный
14	<i>Ani s COS 3</i>	Q1X6K9	цитохром С-оксидазы 3 субъединицы	29,0	- / PF00510

15	<i>Ani s</i> цитохром В	Q1X6L0	цитохром В	42,2	- / PF00032 <b>Сох 2</b>
16	<i>Ani s</i> FBPP	-	Фруктоза 1,6 бифосфатаза	~ 40 -	- / PF00316b
17	<i>Ani s</i> NADHDS4L	Q1X6K2	НАДН дегидрогеназа 4л субъединицы	9,2	- / PF00420
18	<i>Anis</i> NARaS	-	Никотиновый рецептор ацетилхолина альфа- субъединицы	~ 60	- / PF02931b
19	<i>Anis</i> PEPB	-	фосфатидилэтаноламин - связывающий белок ING	~24	- / PF01161b
20	<i>Ani s</i> тропонин	Q9U3U5	тропонин С	18,5	AF007 / PF00036 & PF01036

Arcos S.C., Cordial S. et al. [125] в результате секвенирования *A. simplex* и *A. pegreffii* классифицировали двадцать восемь аллергенных белков, все они относились к разным семействам и выполняли различные биологические функции. Эти белки впервые были описаны как антигены и потенциально новые аллергены для *Anisakis*.

### 1.1.1. Соматические белки личинок *A. simplex*

Iglesias R. et al. [182] у мышей, инвазированных или иммунизированных соматическим антигеном *A. simplex*, в сыворотке крови обнаружили два компонента массой 22 кДа и 27 кДа, характерные для антигенов полостной жидкости данного гельминта.

Pérez-Pérez J. et al. [218] были выделены два положительных клона, несущих гены, кодирующие параамиозин *A. simplex*. Рекомбинантные белки названы *Ani s 2*, их можно использовать в качестве аллергенов, так как они обладают ингибирующей способностью к IgM, E.

Guarneri F. et al. [175] идентифицировали ряд белков, принадлежащих к различным организмам и сходных с *Ani s 2* и *Ani s 3*, отвечающих за наличие генетических факторов риска развития аллергии на *A. simplex* и перекрестных реакций.

При сравнении соматических компонентов *A. simplex L3* и *L4* обнаружено значительное сходство и выяснилось, что они вызывают одинаковый иммунный ответ у зараженных мышей [182; 132].

Łopieńska-Biernat E.I., Zóltowska K. [200] выявили, что, содержание белка L4 в 2 раза выше, чем у L3. Из личинок *A. simplex L3* и *L4* выделили 22 белковых фракции, включая 5 стадиоспецифичных, что подтверждено [182]. В экстракте из личинок *A. simplex L3* выделили три изофермента амилазы: альфа 1 (64 кДа), альфа 2 (29 кДа), альфа 3 (21 кДа). В экстракте *A. simplex L4* выделен только белок (64 кДа). Ферментная активность альфа-амилазы и

гликогенфосфорилазы были выше *A. simplex* L4. Выделенные ферменты *A. simplex* L3 и L4 отличались по свойствам [200].

На сегодняшний день молекулярно идентифицированы два основных соматических антигена/аллергена *Ani s 2* (100 кДа) параамиозин и *Ani s 3* (41 кДа) тропомиозин [130; 175; 218]. Аллергены имеют широкую перекрестную реактивность с другими аллергенами [138; 175; 185], в том числе других видов беспозвоночных животных: ракообразные, пылевые клещи и др. Однако, аллергены *Ani s 2* и *Ani s 3* молекулярно различны в отношении антигенов цестод и трематод [212].

Jeong K.Y. et al. [184] считают, что следует уделять внимание веществам, которые обладают высокой перекрестной реактивностью. Тропомиозин является важным пищевым аллергеном креветок, омаров, крабов, устриц, кальмаров и других беспозвоночных. Аллергические реакции на моллюсков часто являются перекрестно-реактивными, что, возможно, объясняется аминокислотными последовательностями тропомиозинов среди беспозвоночных. Известно, что тропомиозины позвоночных животных не являются аллергенными, но некоторые тропомиозины домашних членистоногих аллергенны. Инвазия гельминтами может вызвать сенсibilизацию к тропомиозину и развитие аллергических реакций на других беспозвоночных. Ученые предполагают потенциальное применение тропомиозина для диагностики и терапии аллергических расстройств.

Однако по результатам ученых паналлергены параамиозин *Ani s 2* и тропомиозин *Ani s 3* являются менее значимыми белками [158; 165].

### **1.1.2. Экскреторно-секреторные белки личинок *A. simplex***

*Ani s 1* (24 кДа) относится к основным аллергенам, обнаруживаются у 85% лиц в случае прошедшей или недавно прошедшей инвазии [146; 208; 221; 233; 242]. *Ani s 1* представлен различными изоформами, устойчив к теплу, выдерживает кипячение в течение 30 минут с 10-мин интервалами

[132; 146; 147; 250]. По аминокислотной последовательности относится к Kunitz-типу, являющихся ингибиторами сериновых протеаз, идентичность составляет от 30 до 40% [242].

Gómez-Aguado F. et al. [173] при исследовании ультраструктурной локализации белка *Ani s 1*, обнаружили его в секреторных гранулах и каналах выделительной железы. Авторы предполагают, что этот антиген является ее секреторным продуктом и выполняет ферментативную функцию, связанную с механизмом инвазирования.

*Ani s 1* (21 кДа) был клонирован, в отличие от *Ani s 1* (24 кДа) имеет другую структуру белка, принадлежит к тропонину семейства нематод и характеризуется  $Ca^{+}$  связывающими свойствами [129].

*Ani s 8* (15кДа) распознается менее чем у 50% инфицированных пациентов [193], термостабилен. *Ani s 8* состоит из 150 аминокислотных остатков. *Ani s 8* на 36% по аминокислотной последовательности является гомологом нескольких белков семейства SXP/RAL-2, схож с *Ani s 5* (15кДа) и имеет с ним перекрестную реактивность.

*Ani s 9* (14 кДа) распознаются менее чем у 50% инфицированных пациентов. Белок состоит из 147 аминокислот, термостабилен. *Ani s 9* принадлежит к семейству белков SXP/РАЛ-2, по аминокислотной последовательности похож на 60% с *Ani s 1*, *Ani s 4* и аллергеном *Ascaris suum*. Аллерген был клонирован, обнаружен в неочищенном экстракте из паразита [234].

*Ani s 4* (9 кДа) цистеин, часто обнаруживается среди сенсibilизированных пациентов, частота обнаружения в мышечной ткани рыб 82,5% [232]. Белок обнаружен в выделительной железе и базальном слое кутикулы *A. simplex*. Термостабильный, выдерживает кипячение в течение 30 минут, устойчив к пепсину, замораживанию и СВЧ обработке [147; 255]. *Ani s 4* относится к ингибиторам цистеиновых и сериновых протеаз [193; 230], по структуре схож с другими цистеинами; экспериментально доказана активность его протеаз против папаина [230].

*Ani s 5* (15 кДа) распознается менее чем у 50% инфицированных пациентов [148]. При иммуногистохимии он был обнаружен в экскреторной железе и на поверхности кишечного эпителия личинок. *Ani s 5*, принадлежит к SXP/РАЛ-2 семейству белков, термостабилен, был клонирован. Проявляет перекрестную реактивность среди представителей нематод из-за сходства в аминокислотной последовательности, состоит из 152 аминокислотных остатков [193].

*Ani s 6* (7 кДа) являются специфическими для некоторых пациентов, страдающих аллергией на *Anisakis*. Состоит из 84 аминокислотных остатков, гомологичен с ингибиторами сериновых протеаз у других животных. В зависимости от количества способен ингибировать химотрипсин, но не трипсин [193].

*Ani s 7* (139 кДа) обнаруживается у 100% инфицированных пациентов [221]. *Ani s 7* гликопротеин, термостабилен обнаружен у 100% пациентов с аллергией [123; 228]. Аллергенность обуславливается особенным строением белковой молекулы, не имеющей сходства с известными аллергенами [252].

### 1.1.3. Устойчивость экстрактов

Solas M.T. et al. [252] считают, что белки *A. simplex* находятся не только в области локализации личинок, но также и мясе и внутренних органах хозяина [132; 162], поэтому аллергическую реакцию может вызвать употребление мяса инвазированной рыбы [190; 198; 220; 229; 235; 254].

Личинки нематод *Anisakis* паразитируют у огромного числа видов рыб Мирового океана. Локализуются они в мезентерии, брыжейке, на поверхности желудка, кишечника, печени и в соматической мускулатуре [87]. Поздняков С.Е. и др. [88] установили связь между величиной содержания депозитного жира в органе или ткани и количественными характеристиками зараженности личинками нематод. Smith J. W., Wooten R.

[244] также обратили внимание на однонаправленную миграцию личинок этих нематод из полости тела в мышцы рыб с богатой жирами мускулатурой.

Вялова Г.П. [34] определила стационарно неблагополучную эпизоотологическую обстановку среди кеты, горбуши и лосося [35] в районах Сахалина. Также в 1995 впервые был установлен факт заражения человека на Сахалине.

Дубинина М.Е. [43] изучала влияние личинок *Anisakis* на качество рыбной продукции и установила, что при патологическом процессе в мускулатуре рыб регистрируется повышенная концентрация водородных ионов и повышение оптической плотности тканей. Также отмечено увеличение концентрации связанных аминокислот, наблюдаемых вследствие распада белка под воздействием продуктов жизнедеятельности анизакид в процессе декарбоксилирования и выделения аммония. Появление летучих органических компонентов и образования метанола. При многократной дефростации наблюдается белковый распад на свободные аминокислоты. Также при дефростации отмечено увеличение содержания катионов натрия и вымывание катионов калия.

Фролова С.Е. [118] собирала данные о динамике численности нематод *Anisakis spp.* в мускулатуре искусственно воспроизводимой кеты рек о. Сахалина. Среднемноголетняя зараженность мускулатуры кеты оказалась высоко достоверна, и индекс обилия составлял  $24,7 \pm 0,9$  и  $29,1 \pm 1,2$  ( $P = 0,01$  по Стьюденту).

Учитывая значимость нематод рода *Anisakis* как паразитов, опасных для здоровья человека и портящих товарный вид рыб, многие исследователи установили возрастание активности личинок рода *Anisakis* после вылова рыбы - нематоды из полости тела проникают в мышцы [87; 154; 258]. Однако, в наблюдениях, проведенных с японской скумбрией, посмертная миграция личинок *Anisakis* из полости тела в мышцы не наблюдалась, хотя активность личинок в капсулах увеличивалась [87].

Audicana M.T., Kennedy M.W. [132], Purello-D'Ambrosio F. et al. [223] обнаружили высокую сенсibilизацию к личинкам *A. simplex* у многих людей в Южной Африке, а также у тех, чья профессиональная деятельность связана с обработкой рыбы.

Кожный контакт или вдыхание небольшого количества аллергенов *A. simplex* вызывает у людей конъюнктивиты [124; 248], бронхиальную астму [127], белковые контактные дерматиты и конъюнктивиты [153; 155]. Пациенты с аллергией на анизакид, в основном, подвергаются воздействию соматических и кутикулярных аллергенов, минимально - экскреторно-секреторных [221].

Anadón A.M. [123] на примере рекомбинантного антигена *Ani s 7*, выяснил, что данный антиген секретируется выделительными железами гельминта, иммунная система распознает его, только когда личинки живы. После гибели личинок антиген исчезает, так как эпитопы рекомбинантного антигена разрушаются эндогенными протеазами. Другие антигены, которые являются протеазоустойчивыми, а именно кутикулярные и соматические, обнаруживаются при хроническом течении заболевания [215].

Есть сведения, что антигенность личинок сохраняется после замораживания так как, у некоторых сенсibilизированных пациентов после приема зараженной замороженной рыбы развивались симптомы аллергии [103; 132; 231;].

Белковые продукты личинок *A. simplex* проникают в мышечную ткань интенсивно инвазированной рыбы (свыше 50 экземпляров), чему способствует ее многократное замораживание и оттаивание при несоблюдении режимов хранения [98].

Так, Audicana M. et al. [131], Carretero P. et al. [152] проводили кожный тест с помощью антиген экстракта *A. simplex*, и выяснили, что при экспозиции даже маленькими дозами антигена и без участия живых паразитов развивается анафилаксия. Аналогичным образом белковые

продукты погибших личинок вызывают развитие патологий у чувствительных пациентов [166].

Fæste С.К. et al. [166] обнаружили аллергенные пептиды в рыбной муке, приготовленной из обработанной пелагической морской рыбы, содержащей 20% личинок *A. simplex*. Авторы высказали свои предположения о том, что так как, сейчас рыбную муку широко используют для кормления атлантического лосося, а также в птицеводстве, существует риск для потребителей, так как конечные продукты данных производств могут быть потенциальными источниками аллергенных белков.

Armentia A. et al. [128] описали случаи аллергической реакции, вызванной загрязнением пищевых продуктов нематодой *A. simplex*. У пациентки появились аллергические симптомы, после употребления салата из курицы и рыбы, после отрицательных результатов аллергологического обследования (кожные пробы и определение IgE на курицу и рыбу) обнаружен высокий уровень IgE к *A. simplex* [263].

Как пишет Fitzsimmons С.М. [168], термостабильность аллергенов позволяет им сохраняться в окружающей среде и во время приготовления пищи и во время её усвоения в процессе пищеварения. Это связано с присутствием определенных семейств белков PR-4.

Низкомолекулярные термостабильные аллергены *A. simplex* вызывают хроническую крапивницу, отек Квинке и даже анафилаксию [220].

Сенсибилизацию к анизакидам иногда обнаруживают у лиц, которые никогда не ели сырую рыбу, анчоусов, что также подтверждает существование термостабильных молекул аллергенов, в том числе кросс-реактивных [132; 136; 180; 213; 221; 263].

Среди аллергенов живых личинок одни являются термоустойчивыми [192; 210; 220; 221; 224; 225] и выдерживают кипячение в течение 30 минут, другие являются устойчивыми к пепсину [255]. Caballero M.L. [147] определяли степень чувствительности пациентов к этим устойчивым аллергенам по количеству выработанного IgE. В результате они установили,

что 67% IgE найдено у пациентов чувствительных к термоустойчивому аллергену и 81% IgE обнаружено у пациентов, чувствительных к пепсинустойчивому аллергену.

Есть сообщения, что независимо от способа обработки при производстве рыбной консервной продукции, термоустойчивые антигены проявляют свою активность. При автоклавировании рыбы, экспериментально зараженной *A. simplex* L3, снижалось количество и иммуногенность *Ani s 4*, *Ani s 1*, но мышечная часть рыбы сохраняла остаточную антигенность. Остаточные антигены способны активировать базофилы и связывать IgE после 80 минут автоклавирования. Высокое давление в 200 Па убивает личинок в течение 5 минут, но, тем не менее, антигены представляют риск для сенсibilизированных пациентов [151; 249; 255; 256]. Также проводились опыты по определению устойчивости *Ani s 4* к замораживанию, СВЧ обработке и пепсину. Из всех трех факторов большую чувствительность, а именно снижение иммуногенности, оказывала обработка пепсином [255]. К подобным выводам в отношении аллергенов пришел Baeza M.L. et.al. [135].

Solas M.T. et al. [246] замораживали инвазированное *A. simplex* филе анчоусов, после его обрабатывали уксусом или пепсином. Ученые также пришли к выводу, что данная обработка не спасает чувствительных потребителей от антигенов *A. simplex*, а лишь исключает возможность обнаружения жизнеспособных личинок.

Rodríguez-Mahillo A.I. et al. [232] обнаружили аллергены *A. simplex* в отварном хеке, а также доказали, что аллергены *A. simplex* сохраняются при долговременном хранении в замороженном состоянии -  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  в течение 11 месяцев. Активность *A. simplex* проверяли с помощью базофильного теста и способности вызывать аллергические симптомы, были получены положительные пробы. Также выяснилось, что личинки с трудом выживают при  $t$  ниже -  $50^{\circ}\text{C}$  - не более чем 11 сек и -  $60^{\circ}\text{C}$  - 1 сек.

Arlan L.G. et al. [126] проверяли аллергенность белков в лиофилизированных экстрактах, приготовленных из *A. simplex* L3.

Выяснилось, что соматический экстракт содержит большое количество аллергенных белков, так как отмечена положительная реакция в кожных тестах, и у пациентов наблюдается различная чувствительность и соответственно реактивность.

Gani F. et al. [169] пишет, что в качестве профилактических мер используют нагревание в течение 10 мин до 65°C или замораживание минус -20°C в течение 24 часов [120; 163], что разрушает инвазионность личинок, но не всегда предотвращает аллергические реакции.

Напротив, Anadón A.M. [123] в своей статье ссылается на Alonso-Gómez A. et al. [122], García F. et al. [172], Sastre J. et al. [241], которые считают что, попадание в организм экскреторно-секреторных продуктов или антигенов мертвых личинок не вызывает аллергию у ранее сенсibilизированных пациентов. Аллергию у сенсibilизированных лиц могут вызвать только живые личинки. Alonso-Gómez A. et al. [122] не выявили у пациентов аллергии на термостабильные белки паразита.

Таким образом, не до конца ясно, могут ли термостабильные антигены/аллергены вызывать аллергическую реакцию [132; 170]. При температуре 100°C 5 мин наблюдается деструкция белков и связывание IgE не происходит [134], соответственно аллергии тоже нет.

Fæste S.K. et al. [136] также считают, что заражение *A. simplex*, не является непосредственной проблемой здравоохранения. Так как они в своих исследованиях по определению количества белка анизакид в лососе и других рыбопродуктах с норвежского рынка, предназначенных для приготовления суши, использовали высокочувствительные методы: сэндвич ИФА, иммуногистохимию и масс-спектрометрию и обнаружили в нескольких образцах незначительные количества (<10 мг / кг) аллергенов *A. simplex*.

По последним данным установлено, что степень обработки: заморозка, лиофилизация, сильное измельчение, нагревание до 40°C в течение нескольких часов не разрушает чужеродные белки, так как были обнаружены

пептиды и фрагменты ДНК в корме подвергнутом вышеперечисленным воздействиям [147; 256; 257]. Согласно последних исследований современными методами доказано, что пептиды анизакид активно могут передаваться с кормом, а ранее используемые методы ИФА или ELISA являются недостаточно чувствительными [195].

#### **1.1.4. Биохимический состав нематод *A. simplex***

Fæstea C. K et al. [165] исследовали белки, входящие в состав *A. simplex*. В основном это были структурные и мышечные белки опорно-двигательного аппарата. Они составляют существенную часть общего веса тела нематод и легко обнаруживаются. Также были выявлены белки, связанные с процессами транскрипции или трансляции, клеточным энергоснабжением, синтезом рибосом, факторами инициации трансляции, и факторами элонгации. Кроме того, у *A. simplex* были обнаружены регуляторные и транспортные белки, но большую часть характерных белков составляли катаболические ферменты. Некоторые из них участвовали в метаболизме сахаров и аминокислот. Наконец, были найдены белки, связанные с реакцией детоксикации, а также гемоглобин беспозвоночных.

Lorenzo S. et al. [199] выяснили, что молекулы биотинил ферментов, содержащиеся в соматических экстрактах *A. simplex* и других нематод, участвуют в перекрестной реактивности. Эти данные сообщают о том, что серодиагностика на основе цельного соматического экстракта с присутствием в нем биотинил ферментов не будет достоверной.

Sakanari J. A. et al. [239; 240] экспериментально установили, что живые личинки *A. simplex* секретируют нейтральную протеиназу двух классов: металлоаминную протеиназу и трипсиноподобную сериновую протеиназу. Также исследователи обнаружили структурное и функциональное сходство трипсина анизакид и млекопитающих.

Фролова Т.В., Извекова Г.И. [117] указывают, что у нематод обнаружены ингибиторы всех классов протеиназ аспартиловых, сериновых, цистеиновых и металлопротеиназ, которые встречаются на различных стадиях жизненного цикла паразитов.

Zang X., Maizels R.M. [261] пришли к выводу об эволюции протеиназ, которой подверглись только те продукты паразитов, которые блокируют ферменты в организме млекопитающих. Они считают, что при инвазии возникает конфликт между хозяином и патогеном на молекулярном уровне, которому способствует эволюция белков как самих паразитов, так и их хозяев.

Кишечные паразиты менее подвержены действию иммунных систем хозяина, но должны противостоять действию пищеварительных ферментов. Один из главных механизмов защиты от протеиназ хозяина - секреция ингибиторов [216]. Ингибиторы продуцируются паразитами для предотвращения протеолиза и соответственно для их выживания. Существует предположение, что от ингибиторов протеиназ паразитов зависит специфичность паразита к хозяину [177].

Известно большое количество ингибиторов протеиназ, в том числе паразитарного происхождения, которые могут использоваться в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологии [191].

Описанные Fæstea C. K. et al. [165] аллергены сравнивали с белками, опубликованными в предыдущих исследованиях в диапазоне от 14 кДа до 190кДа [171; 208; 209; 226]. Выявленные аллергены в сыворотках больных анизакидозом представлены преимущественно экскреторно-секреторными аллергенами, которые относятся к углеводным формам [181] и представлены доминирующими полосами в 14, 56, и 72 кДа [135; 159]. В соматических экстрактах четкое проявление полос наблюдали на уровне в 43, 48, и 56 кДа [135; 208], которые так же, как считают исследователи, потенциально могут вызывать патологию в организме хозяев: аргинин киназа, енолаза, дисульфидизомераза и миофилин.

С помощью градиентного электрофореза белкового экстракта *A. simplex* были получены 22 белковые полосы с молекулярной массой от 3 до 200 кДа. Белковые полосы примерно 40, 48, 56 и 73 кДа были особенно интенсивные, но и многие другие были также четко видны. Было выделено и исследовано 16 белковых групп. Эти группы белков были проанализированы с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии. Полученные массы пептидов, их структуры и последовательности затем сравнивали с записями базы данных для нематод. Среди белков *A. simplex* были идентифицированы пептидные гомологии от известных белков нематод. Число выявленных совпадающих пептидов находилось в пределах от 1 до 56. Однако, среди 10 белков описанных у одного пептида *A. simplex*, два из них были известны. Вообще в данном исследовании было выявлено 103 белка, принадлежащие *A. simplex*, 94 из них, ранее не были описаны. В настоящее время Универсальная протеиновая база знаний (UniProtKB) и база данных NCBI содержат данные о 44 уникальных белках *A. simplex* [165].

Таким образом, как сами анисакидные нематоды, так и продукты их жизнедеятельности, относятся к сложным системам, устойчивым к неблагоприятным факторам, состоящим из множества компонентов, каждый из которых потенциально способен оказывать патологическое действие на организм хозяина не только в качестве антигена или аллергена, но и в качестве ферментов, способных разрушать различные структуры тканей и клеток хозяина.

## **1.2. Изучение влияния гельминтов и их метаболитов на клетки**

Патогенное действие паразитов разных видов на отдельные клетки организма хозяина было доказано многочисленными исследованиями. В первую очередь воздействие гельминтов и их метаболитов проявляется на быстроделющихся клетках макроорганизма: крови, костного мозга, половых желез, также эмбрионов [20; 54; 103; 176; 179; 236].

### 1.2.1. Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на процесс деления клетки

В настоящее время установлено патологическое действие гельминтов, их метаболитов не только на организменном, клеточном, но и на молекулярном уровне.

Доказано цитотоксическое действие описторхисов [53; 214], трихинелл [26; 55] и их метаболитов [83], трихоцефалюсов [66; 106], тениид [21], токсокар [64], ведущих к нарушениям генетического аппарата клетки [24; 64; 67]. Цитопатический эффект зависит от дозы инвазионного материала [25; 55], а впоследствии выяснилось, от дозы белкового экстракта [17; 21; 69].

Установлено генотоксическое действие в клетках красного костного мозга мышей метаболитов *Hymenolepis nana* [85; 137], белковых соматических продуктов тениид [21] и токсокар [69].

Метаболиты трематод, цестод и нематод способны повреждать хромосомные наборы, изменяя их количество или структуру, как в соматических, так и генеративных клетках хозяина [11; 12; 25; 37; 54; 64; 66; 67; 93; 109; 243].

Вследствие повреждения наследственного аппарата соматических клеток при развитии инвазии возникают генные, геномные и хромосомные мутации [19].

Стибель В.В. [109] считает, что мутагенные изменения хромосом происходят за счет метаболитов паразита, так прямой контакт гельминтов с ядерным аппаратом хозяина отсутствует. Механизм патогенеза связан с генетическими изменениями и, соответственно, существует генетическая опасность при гельминтозах для соматических клеток животных – хозяев.

Установлено, что мигрирующие личинки нематод, их метаболиты [11; 14; 25; 55; 63; 66; 67; 106; 107], антигены нематод [25; 55; 106], а также метаболиты цестод [85] обладают мутагенным воздействием на соматические клетки костного мозга животных. Данное воздействие обусловлено

увеличением микроядродержащих поли- и нормохроматофильных эритроцитов, гипопloidных, гиперпloidных и aberrантных клеток, увеличение их размеров до средних и крупных. Данные анеугенные эффекты приводят к неправильному делению и апоптозу. Доказаны первичные повреждения ДНК и апоптоза соматических и генеративных клеток при трех инвазиях - гименолепидоз, токсакароз и трихинеллез [18; 52].

Подобные генетические изменения возникают в клетках семенников мышей. Установлено генотоксическое, цитотоксическое действие метаболитов гельминтов *H. nana*, *A. suum* и *T. canis* [64; 137]. Повреждение наследственного аппарата герминативных клеток связано с воздействием метаболитов гельминтов и их половозрелых форм и с активацией свободно-радикальных процессов или с неспецифическим иммунным ответом на них [17; 19].

Метаболиты гименолеписов оказывают мутагенное действие на генеративные клетки сперматогонии и сперматиды мышей [19; 85]. При помощи микроядерного теста установлено, что метаболиты гименолеписов [17] и их белковые соматические продукты [13], метаболиты токсокар [15; 18] обладают кластогенным эффектом на генеративные клетки сперматогенеза за счет роста количества микроядродержащих сперматогониев, сперматоцитов и меньшей степени сперматид в семенниках мышей. При этом наибольший генотоксический эффект как при гименолепидозе, так и при тениидозах выражен на конечной стадии сперматогенеза – сперматозоиды. Данные изменения стадиоспецифичны и зависят от дозы инвазивного материала.

Отмечено снижение активности сперматогенеза за счет снижения выхода сперматозоидов в придатки [13; 16; 19; 85].

Blaszkowska J. [140] показала, что ингибиторы химотрипсина *A. suum* индуцируют доминантные летальные мутации у самцов мышей в посмейотических и мейотических стадиях сперматогенеза. Сперматиды являются наиболее чувствительными клетками на действие АСНІ. Автор

считает, что АСНІ могут быть одним из факторов, вызывающих нарушения сперматогенеза, приводящие к снижению репродуктивности у хозяина.

Бекиш В.Я., Бекиш О.-Я.Л. [19] предполагают, что в метаболитах гельминтов содержатся вещества, обладающие мутагенной активностью, которые стимулируют пролиферацию, нарушают ход митоза.

Shubber Е.К. [243] при шистосомозе Менсона обнаружил цитогенетические нарушения, снижение митотического и репликативного индекса [24].

Секретарюк К.В., Сварчевский О.А. и др. [96] при экспериментальном трихинеллезе в соматических клетках красного костного мозга мышей отметили повышение общей митотической активности, увеличение патологических форм митоза (моноцентрический митоз, колхицинподобный митоз, полая метафаза). Выявили, что миграция личинок вызывает хромосомные нарушения, изменяет соотношения фаз митоза, а также увеличивается количество микроядер в эритроцитах.

Сивкова Т.Н. [102] установила, что под действием соматических экстрактов цестод и нематод в клетках костного мозга лабораторных мышей также возникают патологии митозов. Предполагается, что продукты метаболизма гельминтов негативно влияют на формирование белковых структур митотического аппарата.

Соматические и экскреторно-секреторные продукты личинок *A. simplex* из свежемороженой рыбы являются активными антигенами, вызывающими стимуляцию деления клеток красного костного мозга лабораторных крыс при пероральном [99] и при внутрибрюшинном введении [97]. Процесс замораживания и оттаивания не приводит к разрушению белковых молекул. Продукты анизакид обладают выраженным кариопатическим действием, нарушая процесс деления как соматических, так и половых клеток. Происходит интенсификация митоза и мейоза с образованием гигантских многоядерных клеток, ядрышек, нарушением полярности деления.

Повреждения митотического аппарата, максимально выражено через 48 часов после инъекции.

Бекиш В.Я., Бекиш О.-Я.Л. [17] считают ведущим механизмом мутагенного воздействия гельминтов и повреждения наследственного аппарата клеток хозяина развитие окислительного стресса.

Дубинина И.Н. [43] обнаружила в пузырьной жидкости личинок цестод большое количество антиоксидантов. Высказала свое предположение, что личинки цестод активируют и поддерживают уровень свободных радикалов в организме, а их избыток приводит к различным соматическим поражениям органов. Также при личиночных цестодозах выявлено увеличение содержания в крови нитритов и снижение антиоксидантной активности крови. Окислительный стресс, как считает автор, приводит к структурной дезорганизации поверхности мембран клеток, что отражается не только в изменении функциональности органов и тканей, повышается гидрофильность, что снижает качественный показатель мясной продукции.

При экспериментальной трихинеллезной инвазии обнаружены изменения пероксидазной активности полиморфноядерных лимфоцитов. В этом случае изменяются бактерицидные показатели полиморфноядерной системы (нейтрофилы, эозинофилы и базофилы), активизируются факторы кислороднезависимой системы, а кислородзависимой - угнетаются. Дисбаланс в работе указанных компонентов приводит к снижению антимикробной защиты организма [113] и играет роль в патогенезе инвазии [60].

Активация свободнорадикальных процессов установлена при многих гельминтозах и при воздействии их метаболитами [17; 19; 27; 69; 71] в органах и тканях лабораторных животных. В свободнорадикальных процессах учувствуют активные формы кислорода, их производные и радикал монооксид азота NO [71; 145; 164]. Патологии проявляются в виде мембранотоксического и цитотоксического действия [133], а также генных [211] и хромосомных мутаций [161].

Бекиш В.Я и Бекиш О.-Я.Л. [19] ссылаются на некоторые работы [4; 114], где указано, что мутагены делятся на два класса: прямого и непрямого действия. Первые воздействуют и изменяют нуклеофильные сайты ДНК, вторые же оказывают мутагенные и канцерогенные эффекты. Данными действиями могут обладать белки и белковые ферменты (антиферменты, трофагогоны, гистолизины, тилакогены) гельминтов, выделяемые ими в процессе жизнедеятельности [61].

Немаловажными являются и протеазы гельминтов. Данные ферменты белковой природы выполняют у гельминтов различные патогенетические функции [260]. Ингибиторы ферментов, вырабатываемые паразитами, вызывают нарушения на молекулярном уровне [261]. На основании этих данных Бекиш В.Я., Бекиш О.-Я.Л. [19] резюмируют, что гельминты выделяют ферменты, которые воздействуют непосредственно на ДНК, вызывая ее изменения, и не прямое действие проявляется за счет ингибиторов протеаз.

### **1.2.2. Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на клетки крови, иммунной системы, культуры клеток**

Имеются многочисленные сведения, что гельминты оказывают иммуносупрессивное действие на организм хозяина [5; 10; 119]. Подобное действие проявляется подавлением пролиферации Т- и В-лимфоцитов особыми цитотоксическими веществами, продуцируемыми паразитами [40; 45].

Бекиш О.-Я.Л. [24] пишет о том, что паразиты выделяют иммуномодулирующие субстанции: цитокины, биогенные амины и нейропептиды. Так, в эндемичной зоне по трихоцефалезу у пациентов отмечены высокие уровни TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли-альфа) и  $\gamma$ -интерферона, продукция этих веществ возрастала с увеличением возраста людей [167].

Бекиш О.-Я.Л. и соавт. [23] на примере трихинеллеза описывают иммунодепрессивное действие метаболитов гельминтов, объясняя подобное действие наличием в тканях трихинелл веществ, которые относятся к группе кортикостероидов.

Логишинец И.А. [76] ссылается на Корневу Е.А. [65], что антигены гельминтов, попадая в организм, оказывают влияние на клетки иммунокомпетентной системы, и запускает комплекс нейрогуморальных сдвигов.

Однако, Бекиш В.Я.; Бекиш О.-Я.Л. [19] считают, что по-прежнему неизвестен механизм чувствительности и причины нарушения иммунного гомеостаза хозяина.

Так, инвазия *Anisakis* вызывает стимуляцию Т-хелперов 1 типа th1 и 2 типа th2, что и провоцирует сильный специфический иммунный ответ на антитела всех изотипов иммуноглобулинов IgE, IgG, IgA и IgM [132].

Многие гельминты обладают способностью модулировать иммунный ответ хозяина, влияя на спектр выработки иммунокомпетентными клетками различных цитокинов, которые регулируют выработку синтеза ферментов для образования нитрита, как установлено, обладающего защитным действием от паразитов, в том числе *A. simplex*. Подавление образования нитрита под действием препаратов из *A. simplex* не связано со специфическим токсическим действием на клетки, а связано с ингибированием веществ, необходимых для синтеза ферментов для противопаразитарного нитрита [156].

Perteguer M.J., Rodero M. [219] исследовали клеточные иммунные ответы на антигены *A. simplex* мышей, которых предварительно подкожно иммунизировали гомологичным неочищенным экскреторно-секреторным экстрактом. Анализировали пролиферацию, вызванную *A. simplex* in vitro с помощью нефракционированных PLN клеток, полученных из лимфатических узлов мышей, которым подкожно вводили экскреторно-секреторный экстракт. Изучали клетки селезенки от иммунизированных животных,

которым вводили в первом случае один антиген, во втором личинок, в третьем антиген с личинками. Иммунизация мышей индуцировала высокий процент CD4<sup>+</sup> и TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> Т-клеток. Число В-клеток (CD45<sup>+</sup> и TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>) в предварительно иммунизированных и затем инвазированных мышей было ниже, чем наблюдалось у животных только инвазированных. Число лимфоцитов CD4<sup>+</sup> Т-клеток увеличилось среди инвазированных и у заранее иммунизированных и зараженных мышей. В последнем случае, было отмечено снижение CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Т-клеток. Наибольшее увеличение CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> и TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup> Т-клеток, было обнаружено у мышей, подвергнутых только инвазии. Гистологический анализ показал, что наиболее значительные повреждения наблюдаются в желудке и кишечнике у животных, перорально инвазированных только личинками.

При миграции живых личинок *A. simplex* из желудка в другие органы отмечается острая воспалительная реакция с преобладанием полиморфно-ядерных эозинофилов [262]. Такие же клетки преобладают в асцитической жидкости [180]. Хотя эозинофилия периферической крови характерна для большинства гельминтозов, при анизакидозе она встречается лишь в 30% случаев заболевания [132; 149; 180; 221]. Эозинофилия в сочетании с лейкоцитозом чаще встречаются при желудочной форме анизакидоза, чем при кишечной [149].

Deardorff et al. [160] изучали особенности взаимодействия эозинофилов с *A. simplex* L3 и выявили, что прикрепление эозинофилов к личинкам происходит только в присутствии иммунной сыворотки, полученной от мышей через 14 или 21 день после заражения *A. simplex*. Путем трансмиссионной электронной микроскопии продемонстрирована активная дегрануляция клеток на поверхности эпикутикулы личинок. После 24-часовой инкубации не было выявлено повреждений поверхности кутикулы и гибели личинок. Однако в то же время в местах прикрепления макрофагов наблюдали признаки повреждения кутикулы.

Кучбоев А.Э. [72] при протостронгилидозе выявил структурные изменения органов вследствие воспалительно-деструктивных изменений, которые подтвердились при ультрамикроскопическом исследовании. На клеточном уровне отмечал активацию лимфоцитарной и моноцитарно-макрофагальной систем органа и определил интенсивную фибробластическую реакцию, приводящую к функциональным нарушениям.

Никулин Ю.Т. [79] при экспериментальном токсокарозе обнаружил изменения конструкции клеток и клеточного состава лимфатических узлов. Установил, что в начале инвазии проявляется клеточный иммунный ответ, при котором идут гиперпластические изменения, пролиферация тимусзависимых клеток, затем гуморальная реакция, при которой отмечается активный плазмоцитоз и иммунобластическая фолликулярная гиперплазия.

Логишинец И.А. [74; 75; 76] при экспериментальном аскаридозе установил, что миграция личинок *A. suum* вызывает изменения гистоструктуры щитовидной железы, что снижает ее функциональную активность. Наиболее значимые изменения происходят в момент наибольшей антигенной активности аскарид. Трехкратная сенсibilизация крыс соматическими белками аскарид вызывает аналогичные изменения. Ученые предполагают, что данные нарушения как гистологические, так и секреторные обусловлены изменениями уровня тиреотропного гормона гипофиза. Логишинец И.А. [76] предполагает, что метаболиты, образующиеся при взаимодействии антигена с иммунокомпетентными клетками, изменяют концентрацию биогенных аминов, которые регулируют гомеостаз щитовидной железы и возможно, и являются причиной структурных преобразований органа.

Перевозчикова Н.Г., Костюкевич С.В. [84] обнаружили морфологические изменения в клетках печени на фоне бессимптомного течения эхинококкоза, которые проявляются на поздних сроках инвазии. Отмечаются дегенеративно-дистрофические изменения, снижается митотический индекс и ploидность ядер печеночных клеток. На

электроннограммах обнаруживаются признаки дегенеративно-дистрофических изменений гепатоцитов: уменьшение количества рибосом и митохондрий, деструкция крист и разрывы наружной митохондриальной мембраны. Появляются единичные клетки в состоянии апоптоза.

Sakanari J.A., McKerrow J.H. [239] в Японии проводили работу по исследованию гистологических поражений от воздействия личинок гельминтов *A. simplex*, в результате они были разделены на пять типов:

(I) Ранняя или первичная инвазия характеризовалась инфильтрацией и пролиферацией нейтрофилов, эозинофилов и гигантских клеток. Отмечали небольшие отеки, фибринозная экссудация, кровоизлияния и повреждения сосудов.

(II) В течение первой недели острой кишечной инвазии, наблюдали утолщение и отечность подслизистой и эозинофильную инфильтрацию с лимфоцитами, моноцитами, нейтрофилами и плазматическими клетками.

(III) При хронической форме анисакидоза, отмечаются язвы желудка и кишечника, абсцессы, некроз, кровоизлияния с эозинофильная инфильтрация.

(IV) При желудочной форме анисакидоза до 6 месяцев наблюдается продолжительная эозинофильная инфильтрация, преобладают гранулемы, и снижено количество лимфоцитов. Гигантские клетки могут окружать тело личинки.

(V) На поздних стадиях заболевания (от 6 месяцев до года), абсцессы или гранулематозные воспаления могут заменяться грануляционной тканью с эозинофильной инфильтрацией. В центре очага поражения могут присутствовать остатки личинки.

Имеются данные о цитопатическом действии гельминтов аскарид, бычьего цепня, лентеца широкого и продуктов их жизнедеятельности на клетки культивируемых тканей [29].

Бекиш В.Я., Дурнев А.Д. [17] установили, что белковые соматические продукты токсокар обладают генотоксическим действием на культуры лимфоцитов крови, вызывая изменения ДНК, при этом рост патологий зависит от количества белка. На культурах лимфоцитов обнаружен цитотоксический эффект: рост апоптоитических клеток, как при малых, так и больших концентрациях белкового продукта.

Предполагаемые токсины гельминтов способны оказывать цитопатическое влияние на искусственно выращиваемые клетки (перевиваемые клетки амниона человека), раковые клетки Нр-2, первично трипсинизированные клетки фибробластов эмбриона человека и куриные фибробласты [7].

### **1.2.3. Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на эмбрионы**

В 2010 г. Бекиш В.Я., Зорина В.В. выдвинули гипотезу, что метаболиты гельминтов могут быть потенциальными генотоксическими и цитотоксическими факторами для эмбриональных клеток млекопитающих. Данные воздействия были изучены при аскаридозе [48; 50; 51], трихинеллезе [82; 83] и описторхозе [21; 52; 70].

Blaszowska J. [141] сравнивала влияние ингибиторов протеолиза трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина, а также гомогената из тегумента *A. suum* на куриные эмбрионы. Наибольшее количество патологических изменений и пороков отмечалось после введения ингибиторов химотрипсина.

Ингибиторы ферментов трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина из тканей *A. suum* и *A. lumbricoides* обладают эмбриотоксическим и тератогенными воздействиями на зародыши мышей. Введение гомогената из тегумента аскарид беременным мышам на ранних стадиях органогенеза и сенсибилизация беременных самок приводит к подобным порокам развития [140; 142; 143].

Экспериментально доказано гено- и цитотоксическое действие метаболитов трихинелл [80; 83], белкового секреторно-экскреторно-соматического продукта личинок трихинелл в соматических клетках костного мозга самок и их эмбрионов на разных стадиях органогенеза, а также в плодном периоде [83]. Пашинская Е.С. [81; 82] доказала эмбриотоксическое и фетотоксическое действие. Метаболиты трихинелл нарушают антенатальное развитие потомства мышевидных грызунов, приводя к снижению массы и численности новорожденных, а также повышают индекс гибели животных в постнатальном периоде [83].

Метаболиты мигрирующих личинок *A. suum* [49], сенсбилизация белковым соматическим продуктом из тканей аскарид [50] оказывают генотоксическое действие в соматических и эмбриональных клетках беременных крыс на всех этапах органогенеза и плодного периода. При сенсбилизации на разных стадиях развития эмбриона установлено эмбриотоксическое и фетотоксическое действие. В клетках эмбрионов и беременных самок инвазированных *A. suum* установлено развитие окислительного стресса [51].

Ведущим повреждающим механизмом на геном авторы считают развитие окислительного стресса в клетках эмбрионов млекопитающих [18]. Пашинская Е.С. [81] нашли подтверждение полученных данных у зарубежных исследователей, которые считают, что секреторно-экскреторные продукты трихинелл содержат внеклеточную эндонуклеазу, которая гидролизует ДНК и РНК лимфоцитов человека [203; 204]; а также ДНК – оплетающие белки, которые вызывают изменения в ДНК, генах, что и приводит к остановке жизненного цикла [202]. Подобные выводы сделал Lee D.L. [194], где он пишет о выделении трихинеллами веществ, вызывающих патологию при трансляции и транскрипции ДНК [194], в том числе и на активность эндонуклеаз [201]. Авторы предполагают, что цитотоксический эффект при трихинеллезе у самок и эмбрионов может быть объяснен,

повышением синтеза фактора некроза опухоли  $\alpha$ , повышение NO, белка теплового шока 60 и возможно цистеиновых протеаз [206].

#### **1.2.4. Влияние гельминтов, их метаболитов и экстрактов на бактерии**

Общеизвестно антагонистическое отношение нормальной микрофлоры на условно-патогенную и патогенную микрофлору, обеспечивающее иммунитет хозяина [6].

Из тканей и органов гельминтов можно выделить бактериальную флору, которую они не только переносят, но и являются ее хозяевами. Headley S.A., Kano F.S. et al. [178] описали случай заражения собак микрофлорой, передающейся через рыбу. Катаева Л.В., Степанова Т.Ф. [48] приводят подобные сведения о существовании групп бактерий в пищеварительном тракте моллюсков - первых промежуточных хозяевах *O. felineus*, а также их способности накапливать у себя возбудителей болезней человека и животных.

Многочисленными исследованиями установлено, что гельминты оказывают неблагоприятное влияние на нормальную микрофлору организма хозяина, вызывая дисбактериоз [41; 111], который осложняет течение паразитарного заболевания и нередко обуславливает длительную дисфункцию кишечника [46; 57], и, соответственно, снижает защитные свойства кишечной микрофлоры к возбудителям инфекционных заболеваний [59]. Кишечная микробиологическая система постоянно находится в состоянии гомеостаза, дисбаланс в которой может стать фактором патогенеза для многих соматических и инфекционных болезней [57].

Характерными особенностями микробиоценоза кишечника при возникновении гельминтозов являются уменьшение общего содержания кишечной палочки и повышение количества неферментирующих бактерий, снижение уровня лактобактерий, рост кокковой флоры [46].

В то же время гельминты испытывают на себе действие не только хозяина, но и сочленов паразитоценоза, в том числе микроорганизмов. Если в организме животного меняются свойства возбудителей инфекционных заболеваний и гельминтов, то нарушается характер их течения [38]. Одновременное воздействие ассоциаций на организм хозяина вызывает изменения в иммунологической системе [57].

Мутуалистические взаимоотношения представляют большую опасность, так как совместное действие паразитов активизирует вирулентные свойства условно-патогенных микроорганизмов [57; 58].

Катаева Л.В., Степанова Т.Ф. [58] при исследовании микробиоценоза моллюсков и среды их обитания, которые являются промежуточными хозяевами *O. felineus* выявили 54 вида бактерии, которые разделили на 4 группы: бактерии семейства *Aeromonadoceae*, грамотрицательные неферментирующие бактерии, бактерии семейства *Bacillaceae*, бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Доминировали *Aeromonadoceae* и грамотрицательные неферментирующие бактерии. В местах обитания преобладали *Enterobacteriaceae*. Моллюск имеет резидентную микробиоту, которая выполняет его защитные функции. Известно, что на иммунный статус беспозвоночных влияет не только микрофлора, но и ее характеристики.

Звержановский М.И., Басова Н.Ю., Тулов А.В. [47] исследовали «микропаразитоценоз» в кровеносной системе и общий «паразитоценоз» в организме шакала. Паразитоценоз представлен 3 видами патогенной микрофлоры, 2 видами нематод, 1 видом цестод и 1 видом клещей. Микропаразитоценоз определяется 1 видом нематоды и 3 видами патогенной микрофлоры. Два вида микроорганизмов *C. freundii*, *P. mirabitis* выявлены в кровеносной системе миокарда, а *P. vulgaris* на поверхности кутикулы нематоды. Гельминтоценоз желудочно-кишечного тракта состоял из сочленов у 2 видов *M. lineatus*, *U. stenocephala*.

Существуют и антагонистических отношения между отдельными членами паразитоценоза, которые проявляются сдерживанием роста, появлением отдельных популяций (штаммов) [105]. Так, Svanevik C. S. et al., [247] проводили исследование по влиянию микрофлоры, содержащейся как внутри, так и на поверхности личинок *A. simplex* на сроки годности рыбного фарша. Известно, что при изготовлении фарша во время его измельчения происходит равномерное распределение микрофлоры по всему продукту. Выяснилось, что наличие личинок и разная степень инвазированности рыбного фарша несколько замедляет процесс порчи рыбной продукции. В кишечнике личинок *Anisakis* обнаружены бактерии *Photobacterium phosphoreum* и *Shewanella sp.*, вызывающие порчу рыбы и продуктов из нее. Однако срок годности рыбного фарша от присутствия бактерий не снижался, а наоборот добавление гомогената из личинок ограничивало бактериальный рост. Предполагается, что данный факт объясняется специфическими метаболическими свойствами гельминтов. Установлено, что рыбный фарш с паразитами имеет более низкое значение рН, что вызывает торможение и снижение бактериального роста в этих образцах рыбы, так как известно, что гнилостные бактерии лучше растут при рН > 6,0 [247].

Сложность взаимоотношений микроорганизмов и гельминтов в организме хозяина подтверждена многими исследованиями, но неизвестны механизмы влияния на организм хозяина данных сообществ [57; 58].

Анализируя значительный объем литературы, посвященной влиянию гельминтов на клетки живых организмов, очевидно, что негативное воздействие оказывается как на клетки млекопитающих, так и птиц и даже бактерий, однако, многие вопросы, связанные с воздействием белковых продуктов *A. simplex* на клетки животных и микроорганизмов остаются нераскрытыми, что и послужило основанием для проведения нашей работы.

## 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 (*M. 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 1984 г №22.

**Приготовление экстракта *A. simplex*.** Из замороженной путассу (*Micromesistius poutassou*) извлекали нежизнеспособных личинок *A. simplex* L3, определяли их видовую принадлежность по морфологическим признакам согласно ключу, приведенному А.В. Гаевской [36]. Затем личинок нематод тщательно аккуратно 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 [101].

**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. [31]. 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  $-10^{\circ}\text{C}$ .

**Проведение реакции иммунодиффузии в агаровом геле.** Для проведения реакции иммунодиффузии (РИД) готовили 1,2%-ный агаровый гель (Difco) на физиологическом растворе [39]. 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 инвазированных анизакидами путассу и минтая, 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».

Гематологический анализ включал 18 показателей: лейкоциты (WBC) с дифференцировкой на 3 субпопуляции: лимфоциты (LIM) %, гранулоциты (GRA) %, средние клетки (MID) %; гистограммы распределения лейкоцитов по объему (WBC Histogram), эритроциты (RBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), гистограмма распределения эритроцитов по объему (RDWc), тромбоциты (PLT), тромбокрит (PCT), средний объем тромбоцита (MPV), распределение тромбоцитов (PDWc).

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».

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

### **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 группы непосредственно после декапитации отбирали материал для гистологического исследования. Использовали печень, селезенку и семенник, от которых отсекали кусочки 10x10x5 мм или пластинки толщиной 5 мм или брали целиком. Собранный материал

фиксируют 10%-ным раствором нейтрального формалина. Полученный материал доставляли в патогистологическую лабораторию.

**Патогистологическое исследование.** Зафиксированные в 10% формалине органы лабораторных мышей промывали в течение 1-2 суток в проточной воде. Обезвоживание и заливку в парафин проводили по Ромейсу в спиртах восходящей концентрации, начиная с 50% (2 часа), 70 % (3 часа), 96% (4 часа), 100% (2 часа), метил бензоат (2 часа), бензол (2 часа), бензол + парафин (1:1) (1 час), особо чистый парафин (среда «гистомикс») при 56 °С (8 часов) на аппарате Thermoscientific Histostar. Для работы использовали гистопротектор - автомат LEICA TR 1020 с заданным циклом проводки 18 часов. Далее готовили блоки и производили резку на микротоме – полуавтомате Microm HM 325. Затем проводили монтаж готовых срезов на предметные стекла, приклеивали, просушивали в термостате при температуре 37°С.

Депарафинизирование срезов перед окрашиванием проводили с помощью бензола. Затем срезы переносили в первую порцию 100% спирта на 2 - 3 минуты, затем во вторую на 1 - 2 минуты, споласкивали в 2-х порциях 96% спирта и переносили в дистиллированную воду. Далее приступали к окрашиванию гематоксилин - эозином.

Методика окраски.

- 1.Окраска гематоксилином 1 - 15 минут,
- 2.Промывка в воде 3 - 5 минут, промывка в проточной воде 10 минут, ополаскивание дистиллированной водой,
3. Окраска 1% эозином 1 - 2 минут, ополаскивали дистиллированной водой, далее проводили обезвоживание, просветление и заключение.

Для окраски соединительных и мышечных тканей использовали окраску по Ван-Гизону.

1. Окраска гематоксилином Вейгерта 3 - 10 минут,

2. 3-х кратное промывание водопроводной водой,
3. Окраска пирюфуксином 2 - 7 минут (под микроскопом), промывка в воде, обезвоживание, просветление, заключение в светопреломляющие среды.

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 карипатического 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.

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

### **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) с соответствующим режимом инкубации: при температуре +37,4 - 37,8°C, влажности 60 - 70%, а также вентиляцией и переворачиванием яиц. Для контроля проведения эксперимента и последующего биоконтроля использовали овоскоп Good Mart 24.

Введение исследуемого экстракта в объеме 0,2 мл проводили согласно методике по заражению куриных эмбрионов Блиева Л.З. [30]. Перед введением биоматериала инкубированное яйцо овоскопировали, проверяли наличие контурируемых кровеносных сосудов, эмбриона и отмечали карандашом границы воздушного мешка, расположение зародыша и место введения материала. Соматический экстракт инокулировали в асептических условиях бокса с использованием стерильного инструмента. Дезинфекцию воздушной камеры яйца проводили двукратно 70%-ным раствором этилового спирта и фламбированием. Место прокола заклеивали стерильным тканевым лейкопластырем и затем заливали парафином. Использовали несколько способов введения гельминтного белка куриным эмбрионам: в аллантаисную полость, на хорион-аллантаисную оболочку (ХАО) и в желточный мешок. На каждый способ брали по три инкубационных яйца. 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 [42].

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.

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

От куриных эмбрионов получали различные ткани и органы, в том числе головной мозг, глаз, печень и фабрициеву бурсу, отсекали кусочки 10x10x5 мм или пластинки толщиной 5мм или брали целиком. Собранный материал 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* использовали 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 парameций  $N$ , %, вычисляли по формуле:  $N=N_2/N_1 \times 100\%$ , где  $N_1$ -среднеарифметическое (из пяти испытаний) значение количества парameций в начале опыта, штук;  $N_2$ -среднеарифметическое (из пяти испытаний) значение количества парameций в конце опыта, через один час экспозиции, штук (подвижных, неподвижных, двигающихся не характерно и подвергнутых лизису); 100% - коэффициент перевода результата в проценты [2]. Чувствительность инфузорий к исследуемому экстракту определяли по сроку их гибели, которую регистрировали в момент прекращения движения простейших и наличия признаков распада клеток [115].

Далее проводили ультраструктурное исследование клеток, подвергнутых воздействию разведенного 1:2 экстракта *A. simplex*. Для электронной микроскопии в среду с парameциями 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.

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

### 2.1.7. Электронная микроскопия

**Препарирование.** Образцы органов мышей фиксировали в 2,5%-ном глутаровом альдегиде на 0,05М (рН 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 М фосфатном буфере (рН 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 трет-бутиловом спирте (tert-Butanol, SIGMA-ALDRICH) в двух сменах по 20 минут при 26°C приступали к изготовлению ультратонких срезов.

Для сканирующей электронной микроскопии *P. caudatum* начальные этапы препарирования аналогичные: фиксация, удаление фиксатора и обезвоживание.

### **Фиксация**

1. Клетки парамеций, находящиеся в жидкой среде, концентрировали с помощью центрифугирования в течение 15 минут на 10000 оборота/мин при комнатной температуре. Объем осадка биомассы должен был примерно соответствовать объему спичечной головки.

2. Полученный осадок клеточной массы парамеций заливали 2,5% раствором глутарового альдегида в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,2). Далее перемешивали до образования гомогенной суспензии и оставляли при температуре + 4°C в течение 1 часа на фиксацию.

3. Материал трижды промывали в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,2). Для промывки биомассу необходимо осадить центрифугированием на 10000 оборотов/мин в течение 3 минут, далее заменить надосадочную жидкость буфером, ресуспендировать осадок и снова осадить центрифугированием.

4. Осадок клеток, отмытый от глутарового альдегида, заливали 500 мкл 2% раствора OsO<sub>4</sub> в фосфатном буфере и тщательно ресуспендировали. Фиксацию OsO<sub>4</sub> проводили при комнатной температуре в течение 2 часов.

5. Далее биомассу промывали в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,2).

Для упрощения процедуры обезвоживания осадок клеток заключали в 2% агар.

### **Обезвоживание включало следующие этапы:**

1. Кубики агаризированной биомассы переносили в пробирку, содержащую 70% спирта. Две смены по 1 часу. На данном этапе образцы в спирте можно оставлять сколь угодно долго в холодильнике при +4°C.

2. Инкубация в 80% спирте в течение 30 минут.

3. Инкубация в 96% спирте в течение 30 минут.
4. Инкубация в 100% спирте. Четыре смены по 30 минут каждая.
5. Инкубация в 100% ацетоне. Две смены по 5 минут каждая.

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).

### **Методика приготовления ультратонких срезов для электронной микроскопии**

После вышеописанных этапов фиксации, обезвоживания, приступили к пропитке и заливке в смолу из 4х компонентов в необходимом количестве (табл. 2):

**Таблица 2- Количественное соотношение компонентов для приготовления эпоксидной смолы**

Компоненты смолы	Количество, мл			
Epon 812	45	22,5	11,2	5,6
DDSA	30	15	7,5	3,7
MNA	20	10	5	2,5
DMP-30	1,6	0,8	0,4	0,2
Объём готовой смолы, мл	96,6	48,3	24,1	12

Кубики биомассы заливали смесью эпоксидной смолы и 100% ацетона в соотношении 1:3. В этой смеси образцы инкубировали в течение 4 – 6 часов. После окончания инкубации смолу отбирали.

1. Инкубация в смеси эпоксидной смолы и 100% ацетона в соотношении 1:1 в течение суток.

2. Инкубация в смеси эпоксидной смолы и 100% ацетона в соотношении 3:1 в течение 4 - 6 часов.

3. Кубики агаризированной биомассы после пропитки в смеси эпоксидной смолы и 100% ацетона выкладывали на фильтровальную бумагу и затем помещали в капсулу. Заливали смолой до верха капсулы.

4. Капсулы помещали в термостат на 37°C и инкубировали в течение суток.

5. На термостате увеличивали температуру до 60°C и оставляли на 2 суток. После застывания смолы, капсулу разрезали и извлекали цилиндр, из которого получали ультратонкие срезы на микротоме ЛКБ-8800.

Ультратонкие срезы монтировали на специальные сеточки, проводили контрастирование в 3% растворе уранилацетата в 70% спирте в течение 30 мин и затем контрастировали в течение 4 минут цитратом свинца по Рейнольдсу. Готовые срезы анализировали на электронном микроскопе ЭМВ-100 БР при ускоряющем напряжении 75 К.

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

Клеточные культуры микроорганизмов *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris* были 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».

**Приготовление антигенных дисков.** 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*.

**Получение микробного газона.** Из суточных культур микроорганизмов, выращенных на скошенном агаре (МПА) готовили микробный газон, для чего сначала стерильным физиологическим раствором заливали каждую пробирку по отдельности, затем их закрывали пробкой и, слегка взбалтывая, готовили смывы культуры. Полученные таким образом суспензии инкубировали в термостате при температуре +37°C в течение 20-40 минут. Оценку количества микроорганизмов проводили по степени мутности суспензии. В качестве бактериального стандарта мутности использовали отраслевые стандартные образцы ОСО 42-28-85, разработанные Государственным институтом стандартизации и контроля имени Л.А. Тарасевича. При этом десять единиц мутности соответствовали количеству  $5 \times 10^8$  микробных клеток в единице объема.

Чашки Петри перед заполнением устанавливали на строго горизонтальную поверхность. После заполнения расплавленным МПА чашки оставляли до застывания при комнатной температуре. Приоткрытые чашки подсушивали в течение 10 - 15 мин и непосредственно перед инокуляцией контролировали отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек. Суспензии микроорганизмов использовали в течение 15 минут после приготовления. Их пипеткой инокулировали в объеме 1 - 2 мл на поверхность чашек Петри с МПА, тщательно равномерно распределяли по поверхности покачиванием, затем выдерживали 15 минут для адаптации микроорганизмов. Избыток суспензии по истечении этого времени удаляли. Не более чем через 15 минут после инокуляции на поверхность МПА с клетками микроорганизмов помещали бумажные диски, пропитанные исследуемым экстрактом *A. simplex*. Между дисками и краями чашки оставляли расстояние 30 - 35 мм. Незамедлительно после процедуры внесения дисков чашки Петри переносили в термостат, переворачивая кверху дном, и инкубировали в течение 12 и 24 часов при температуре +37 °С.

Для анализа бактерицидной и бактериостатической активности экстракта данные чашки помещали кверху дном на темную матовую поверхность, обеспечивая освещение под углом в  $45^\circ$  (учет в отраженном свете). Диаметр зоны просветления измеряли штангенциркулем или линейкой с точностью до 1 мм, ориентируясь на зону полного подавления роста микроорганизмов [3].

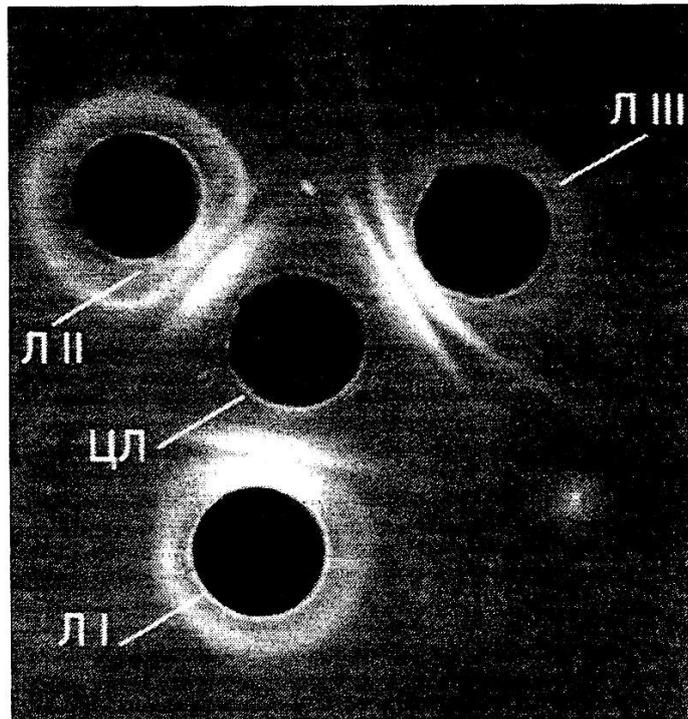
## 2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Известно, что соматические белки гельминтов и продукты их метаболизма сохраняются в продуктах даже после их обеззараживания и могут оказывать негативное влияние на организм [245]. Потому целью данной работы явилось иммунологическое определение личиночных антигенов анизакид в рыбной продукции.

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 (рис.1). 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.

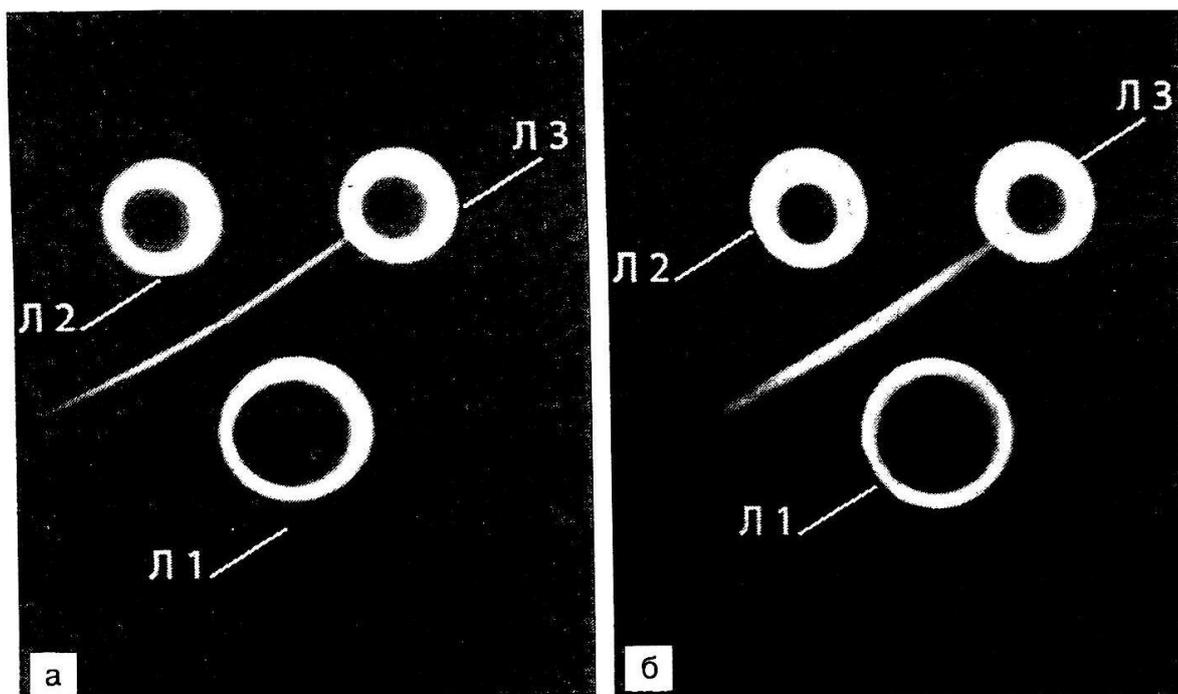


**Рисунок 1.** Реакция иммунодиффузии в агаровом геле между белковым экстрактом из *A. simplex* L3 и гипериммунными сыворотками кроликов. ЦЛ – белковый экстракт из личинок *A. simplex* L3. Л I, II, III – гипериммунные к данному экстракту сыворотки от трех кроликов

Далее для определения степени заражённости рыбы анизакидами в качестве антигена в РИД использовали жидкость, полученную при размораживании инвазированной анизакидами рыбной продукции из путассу и минтая (рис. 2).

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.



**Рисунок 2.** (а; б). Реакция иммунодиффузии между гипериммунной сывороткой к экстракту из *A. simplex* L3 и жидкостью из рыбной продукции, инвазированной анизакидами.

а) Л1 – гипериммунная сыворотка (референс); Л2 – жидкость из инвазированной анизакидами путассу; Л3 – жидкость из неинвазированной анизакидами путассу.

б) Л1 – гипериммунная сыворотка (референс); Л2 – жидкость из инвазированного анизакидами минтая; Л3 – жидкость из неинвазированного анизакидами минтая

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

В связи с тем, что многочисленные исследования позволили установить сложную белковую структуру соматического экстракта из личинок *A. simplex*, а также его влияние на изменения гематологических показателей экспериментальных животных при дозе 100 мкг на голову [103] возникла необходимость установления дозозависимого эффекта от введения данного гельминтного экстракта. 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 (табл. 3).

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

**Таблица 3 - Изменение гематологических показателей лабораторных мышей после воздействия разными дозами экстракта *A. simplex***

Показатели крови, единицы измерения	Норма	Контроль	Доза, мкг/гол			
			100	200	500	1000
Лейкоциты (WBC), $\times 10^9/L$	6-15	6,7 $\pm$ 2,2	5 $\pm$ 1,3	7,8 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1,1	4,7 $\pm$ 1,8
Лимфоциты (LIM), $\times 10^9/L$	3,4-7,44	3 $\pm$ 1	2,7 $\pm$ 1	4,3 $\pm$ 1,8	3,5 $\pm$ 0,9	2,9 $\pm$ 1,4
Моноциты, эозинофилы, базофилы, незрелые клетки (MID), $\times 10^9/L$	0-0,6	0,4 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,1	0,24 $\pm$ 0,2	0,43 $\pm$ 0,1	0,23 $\pm$ 0,08
Гранулоциты (GRA), $\times 10^9/L$	0,5-3,8	3,4 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 0,3	3,25 $\pm$ 1,3	2,05 $\pm$ 0,6	1,55 $\pm$ 0,4
*Лимфоциты (LIM) %	57-93	42 $\pm$ 5,6	53,8 $\pm$ 5,6	54,45 $\pm$ 3,9	57,9 $\pm$ 10,4	59,1 $\pm$ 9,8
Моноциты, эозинофилы, базофилы, (MID) %;	0-7	6,1 $\pm$ 2,7	7,9 $\pm$ 1,3	3,8 $\pm$ 2,6	7,6 $\pm$ 2,6	5,3 $\pm$ 1
*Гранулоциты (GRA) %	8-48	51,9 $\pm$ 4,6	38,2 $\pm$ 6,5	41,6 $\pm$ 4	34,5 $\pm$ 11,3	35,5 $\pm$ 9,8
Эритроциты(RBC), $\times 10^{12}/L$	7-12	9,7 $\pm$ 0,3	8,9 $\pm$ 1,6	9,2 $\pm$ 1,1	8,85 $\pm$ 0,6	8,32 $\pm$ 0,8
Гемоглобин(HGB), g/L	122-162	136,4 $\pm$ 3,7	116,2 $\pm$ 11	132 $\pm$ 10,5	126,2 $\pm$ 12,2	122 $\pm$ 11,32
Гематокрит(НСТ), %	35-45	36,7 $\pm$ 1,4	34,6 $\pm$ 5,1	36,6 $\pm$ 5	34,9 $\pm$ 2	32,5 $\pm$ 3,9
*Средний объем эритроцитов (MCV), fL	45-55	37,4 $\pm$ 1,7	39,4 $\pm$ 1,5	39,8 $\pm$ 2,2	39,4 $\pm$ 1,1	38,8 $\pm$ 2,5
Средний уровень гемоглобина в 1 эритроците (MCH), pg	11,1-12,7	14 $\pm$ 0,5	13,6 $\pm$ 2	14,5 $\pm$ 0,6	14,3 $\pm$ 0,4	14,6 $\pm$ 0,24
Отношение уровня гемоглобина в эритроците к объему эритроцитов (MCHC), g/L	223-320	373 $\pm$ 22	344 $\pm$ 43,2	366,8 $\pm$ 26,4	359,8 $\pm$ 14,6	377,6 $\pm$ 25
Ширина распределения эритроцитов по объему(RDWc), %		20,2 $\pm$ 0,7	18,3 $\pm$ 1,4	19,7 $\pm$ 0,05	18,9 $\pm$ 1,2	18,7 $\pm$ 1
Тромбоциты(PLT), $\times 10^9/L$	200-450	691,2 $\pm$ 152	398 $\pm$ 87,4	568 $\pm$ 92	302 $\pm$ 141,2	321 $\pm$ 77
*Тромбокрит(РСТ),%	0,15-0,32	0,4 $\pm$ 0,1	0,24 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,08	0,2 $\pm$ 0,05
*Средний объем тромбоцитов(MPV), fL		5,8 $\pm$ 0,2	6,1 $\pm$ 0,2	6 $\pm$ 0,2	6 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,6
Показатель гетерогенности тромбоцитов(PDW), %	до 20	32,8 $\pm$ 1,5	33,9 $\pm$ 1,3	33,8 $\pm$ 2	34,5 $\pm$ 1,3	36,4 $\pm$ 3,2

Примечание: \*P $\leq$ 0,05

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 пропорциональное снижение от 35,5% до 38,0%.

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.

Что касается тромбоцита, то у животных контрольной группы он немного превышал нормативные показатели, в то время как в экспериментальных группах он несколько снижался, не выходя, однако, за пределы физиологических показателей. При увеличении дозы экстракта, напротив, увеличивался средний объем тромбоцитов. Интересно, что гетерогенность тромбоцитов у всех животных была незначительно выше нормы, но нарастала с увеличением дозы белка. Выявленные изменения в состоянии кровяных пластинок подтверждают полученные ранее данные, свидетельствующие об активации клеток тромбоцитарного ростка в красном костном мозге под влиянием белков анизакид [103].

Изменения в лейкоцитарной формуле (табл. 4) характеризовались, как и в предыдущем исследовании, увеличением количества лимфоцитов, а также появлением сдвига ядра нейтрофилов влево (обнаружение юных и палочкоядерных форм) при соответственном 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 (рис.3), гиперсигментированное ядро нейтрофилов (рис.4)). В эритроцитах регистрировали тельца Жолли.

**Таблица 4 - Изменение лейкоцитарной формулы у лабораторных мышей после воздействия разными дозами экстракта *A. simplex***

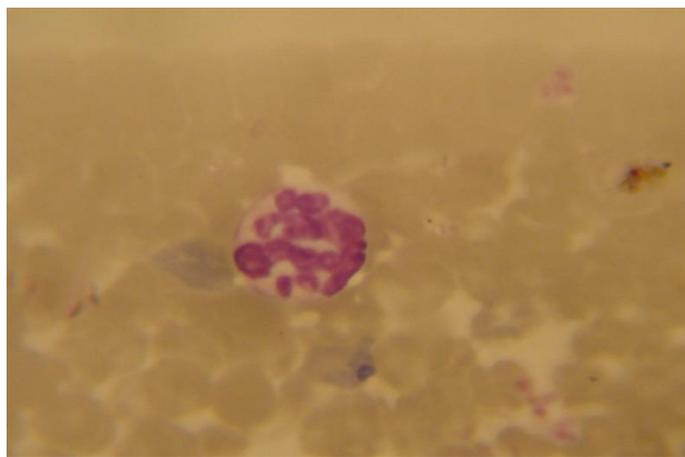
Формы лейкоцитов, %	Контроль	Доза, мкг/гол			
		100	200	500	1000
Миелоциты	2,8±1,2	4,8±1,9	3±2,4	3,6±1,7	9,6±7,2
Нейтрофилы: Юные	-	4±1,6	4,8±1,7	3,8±1	6±2
Палочкоядерные	3,2±1,1	9,4±2,4*	9,6±2,5*	8,4±2,6	15±4**
Сегментоядерные	34,4±12,2	29,2±0,6	26,8±9,4	23,4±7,9	27,2±7,8
Базофилы	3±1,6	-	0,6±2,4	0,6±1,3	-
Моноциты	7±2	3±1,2	1,4±0,6*	1,2±1,4*	0,2±0,3**
Эозинофилы	-	0,2±0,32	0,6±0,7	1,4±1,7	5,4±4
Лимфоциты	39,8±7,4	50,6±12,8	53,2±9	58±11,6	48,4±10,7

Примечание: \*P≤0,05

\*\*P≤0,01



**Рисунок 3. Лимфоцит с двухлопастным ядром. Увел. × 1000**



**Рисунок 4.** Нейтрофил с гиперсегментацией ядра. Увел.  $\times 1000$

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

Проведенными за последние годы исследованиями доказано развитие патологий клеток костного мозга, сперматогенного эпителия, гепатоцитов, спленоцитов под действием соматических продуктов и метаболитов замороженных личинок анизакид [99]. Поэтому параллельно мы изучали состояние органов и тканей лабораторных мышей, получивших внутрибрюшинно экстракт в дозах согласно предыдущим исследованиям.

Гистологическое изучение патологического материала позволило установить следующие изменения.

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 гидropическую 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 порталных 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 гидropическая дистрофия.

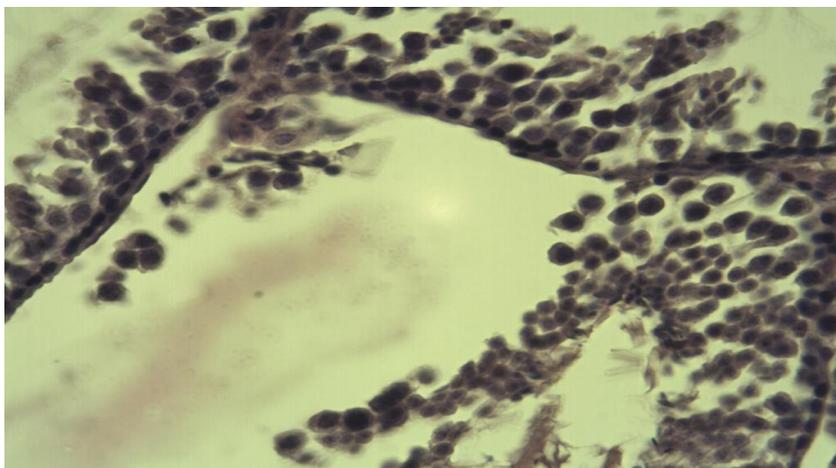
Сперматогенез был сохранен только в отдельных канальцах, зачастую был ослаблен. Повсеместно регистрировали явление агглютинации хвостовых частей сперматозоидов, а также их разрозненно расположенные ядродержащие и хвостовые части. Многие канальцы кистозно расширены и пусты.

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 ядродержащей 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.

При увеличении дозы до 200 мкг/голову в семявыносящих протоках группы зрелых сперматозоидов становились намного меньше. Возрастание же дозы до 500 мкг и 1000 мкг белка на животное вызывало отслоение наружной стенки семенника, характеризующее состояние отека.

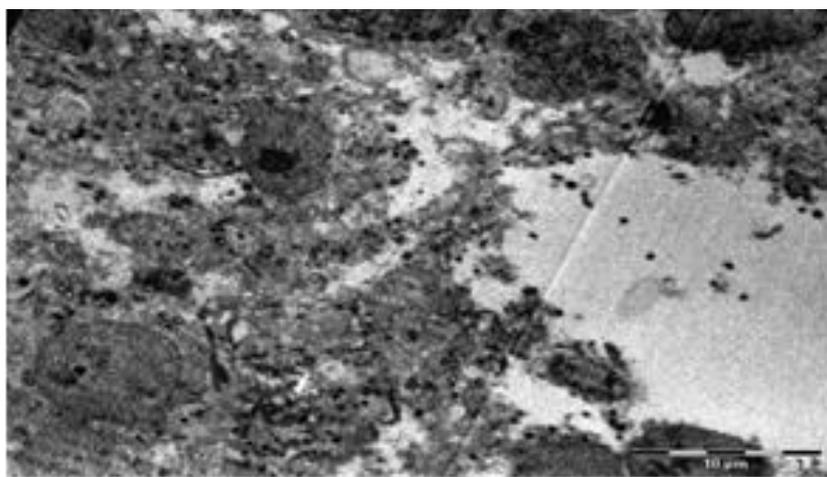
Семявыносящие протоки были значительно расширены, и сперматозоиды сохранялись в виде небольших скоплений лишь на уровне центральных отделов. В случае введения максимальной дозы экстракта (1000 мкг) отмечали полное запустевание канальцев (рис.5), что свидетельствует о выраженном дозозависимом эффекте от воздействия нематодного материала, приводящее к прекращению сперматогенеза.

Электронная микроскопия семенников показала также деструкцию части канальцев, полное разрушение цитоплазмы сперматогенного эпителия, выход органелл, нахождение в просветах лишь бесструктурных масс или отдельно лежащих клеток (рис.6).



**Рисунок 5.** Запустевание семенных канальцев в семеннике мыши.

Увел.  $\times$  400



**Рисунок 6.** Разрушенный семенной каналец, содержащий бесструктурные массы. Увел.  $\times$  2200

Проведенный нами на белых мышах 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**

Имеются многочисленные данные, что при паразитарных инвазиях тяжесть проявления нарушений в соматических и половых клетках напрямую зависит от дозы инвазии [86] и концентрации белка [108]. Установлено, что с увеличением дозы личинок *A. simplex* при пероральном введении и при скармливании инвазированного мяса лабораторным крысам происходило возрастание количества кариопатических патологий в красном костном мозге [103]. Поэтому целью данного исследования послужил анализ влияния дозы экстракта нематоды на гемопоэтические клетки лабораторных мышей.

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

Исследование окрашенных мазков-отпечатков красного костного мозга из грудины лабораторных животных позволило установить четкое дозозависимое влияние (табл. 5).

**Таблица 5 - Изменение частоты кариопатических последствий в красном костном мозге лабораторных мышей после воздействия разными дозами экстракта *A. simplex***

Показатель	Контроль	Доза, мкг на голову			
		100	200	500	1000
Митотический индекс (%)	0,44±0,20	1,74±0,40**	1,45±0,18**	1,54±0,45**	1,48±0,42**
Соотношение фаз деления прометафаза/ана-телофаза	0,10±0,02	0,30±0,14	0,34±0,23	0,26±0,16	0,32±0,17
Патологии митоза (%)	0,04±0,02	0,58±0,14***	0,60±0,12***	0,36±0,20*	0,46±0,19**
Отставание в анафазе(%)	0,02±0,01	0,18±0,14	0,04±0,05	0,08±0,03	-
Многополюсный митоз(%)	0,02±0,01	0,34±0,25	0,34±0,09***	0,18±0,10*	0,30±0,12**
Неравнополюсная анафаза, телофаза(%)	-	0,06±0,03	0,10±0,08	0,08±0,04	0,08±0,03
Мосты в анафазе(%)	-	-	0,10±0,05	0,02±0,01	0,08±0,03
Двухъядерные лимфоциты(%)	-	-	0,02±0,01		-

\*P≤0,05; \*\*P≤0,01; \*\*\*P≤0,001

Из таблицы видно, что 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 aberrация, 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.

В результате электронной микроскопии в образцах красного костного мозга выявляли клетки с морфологией пролимфоцита и промиелоцита.

Изучение ультраструктуры полученного материала позволило установить патологические изменения. Так, плазматическая мембрана клеток-предшественников имела нечеткую структуру. Ядро пролимфоцитов было увеличено в размерах с явлениями колликации (рис.7).

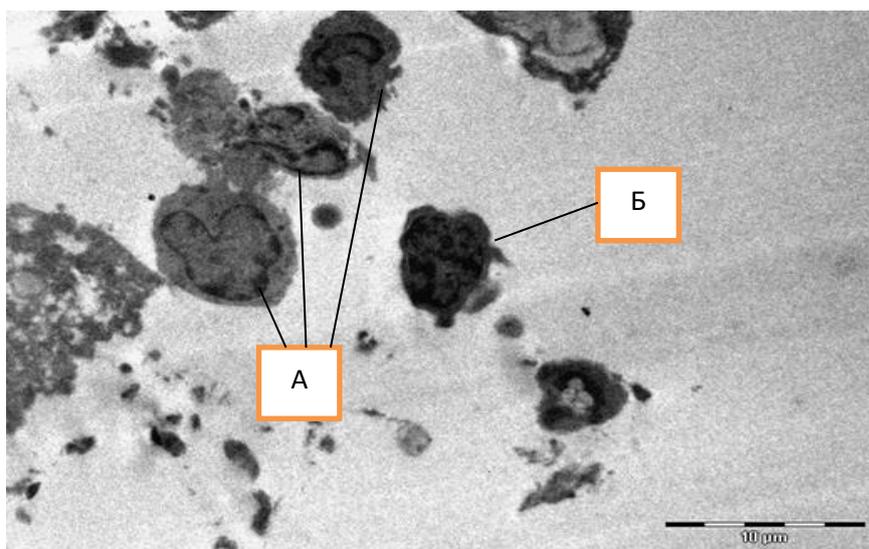
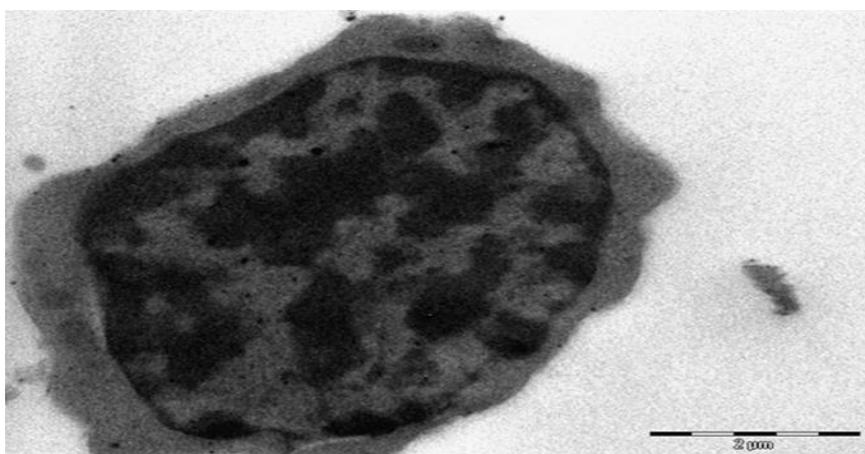


Рисунок 7. Костный мозг. А - промиелоцит, Б - пролимфоцит. Увел. × 2200

При увеличении изображения пролимфоцита (рис.8) также выявляли нечеткую структуру клеточной плазматической оболочки. Цитоплазма клетки содержала небольшое количество митохондрий и других органелл. В митохондриях отмечали дезорганизацию крист. В ядре клетки - глыбчатый распад гетерохроматина и гидропическую дистрофию ядра.

Хотя выявленные изменения ультраструктуры клеток красного костного мозга не носят специфический характер, полученные данные позволяют получить углубленные морфологические знания о воздействии экстрактов гельминта на субклеточном уровне.



**Рисунок 8.** Клетка костного мозга, имеющая морфологию среднего пролимфоцита. Увел.  $\times 11\ 000$

Однократное внутрибрюшинное 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**

Известно, что цитопатические и генотоксические нарушения наблюдаются в клетках семенников, которые также зависят от количества полученного антигенного биоматериала [64; 86]. Поэтому, считаем немаловажным изучить влияние дозы соматического экстракта личинок анизакид на кариопатические, патогистологические и ультраструктурные изменения в семенниках мышей.

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

Дозозависимые патологии, развивающиеся в семенниках лабораторных мышей, также отразились в состоянии мазков-отпечатков данных органов (табл.6).

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 ( $P \geq 0,05$ ).

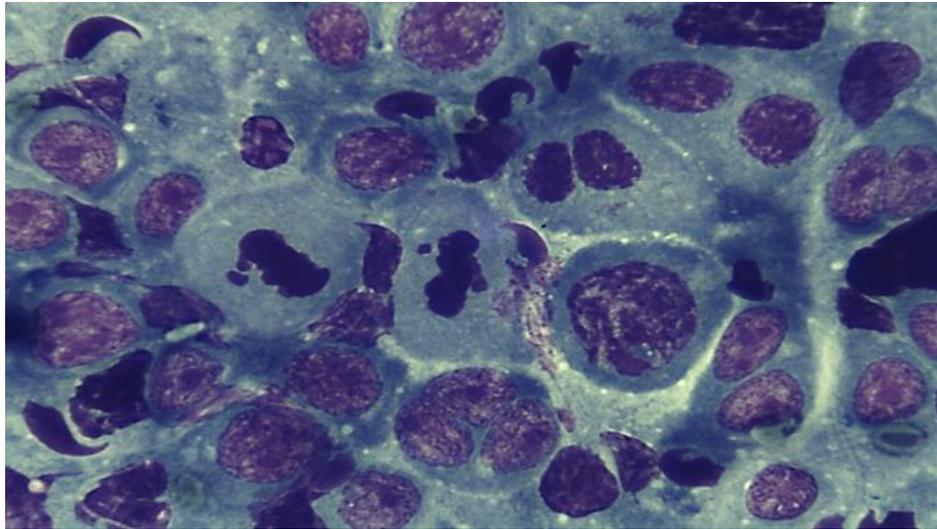
**Таблица 6 - Изменение частоты кариопатических показателей в семенниках лабораторных мышей после воздействия разными дозами экстракта из *A. simplex***

Показатель	Контроль	100 мкг/голову	200 мкг/голову	500 мкг/голову	1000 мкг/голову
Мейотический индекс (%)	5,50±1,00	6,28±1,30	7,56±1,07	7,68±1,30	8,24±1,83
Патологии мейоза (%)	0,08±0,01	0,20±0,16	0,44±0,25	0,62±0,38	0,64±0,31*
Соотношение фаз деления прометафаза/ана-телофаза (%)	0,20±0,09	0,40±0,18	0,27±0,08	0,28±0,18	0,24±0,06
Отставание в метафазе (%)	0,04±0,01	0,10±0,08	0,16±0,09	0,26±0,07	0,30±0,20
Отставание в анафазе (%)	-	-	0,02±0,01	0,04±0,02	0,02±0,01
Трехполюсная анафаза (%)	0,02±0,01	-	0,10±0,04	0,18±0,09	0,10±0,05
Четырехполюсная анафаза (%)	-	-	0,06±0,03	0,06±0,03	0,02±0,01
Неравнополюсная ана-телофаза (%)	0,02±0,01	-	-	-	0,02±0,01
Многогрупповая метафаза (%)	-	0,06±0,03	0,10±0,06	0,06±0,03	0,08±0,06
Анафаза с мостами (%)	-	0,04±0,02	-	0,02±0,01	0,04±0,02
Преждевременное расхождение хромосом (%)	-	-	-	-	0,06±0,03

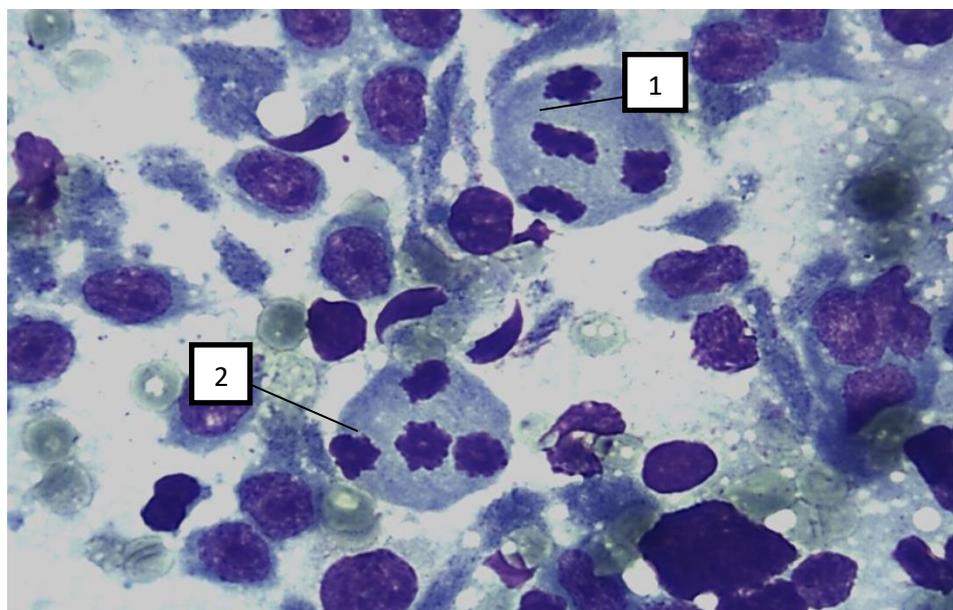
Примечание: \* $P \geq 0,05$

Патологии мейоза проявлялись наличием таких аномалий как отставание хромосом в метафазе (рис.9), многогрупповая метафаза (рис.10), хромосомные мосты в анафазе, а также многогрупповые и неравнополюсные анафазы (рис.11). Возрастание дозы экстракта из нематоды вызывало закономерное увеличение разнообразия патологических форм деления,

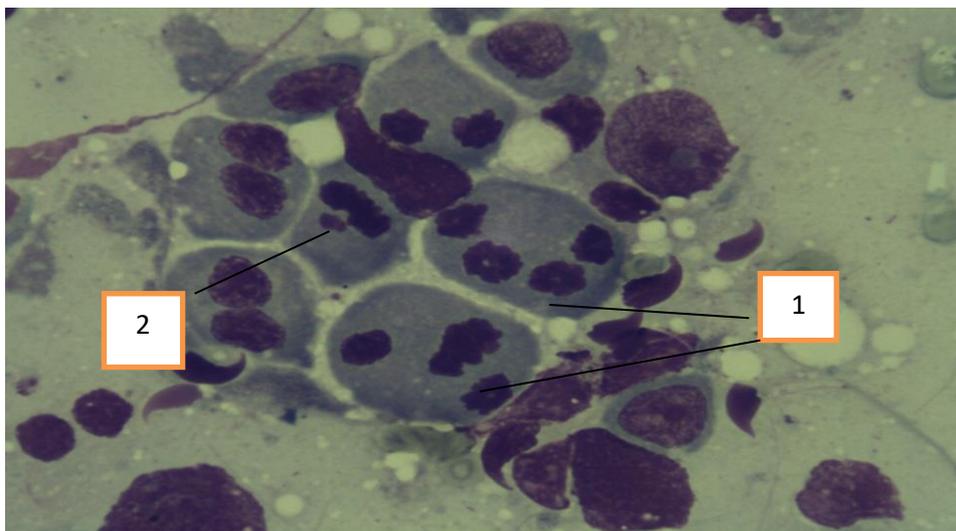
например стали встречаться отставания отдельных хромосом в анафазе, четырехполюсные анафазы, многогрупповые метафазы, анафазы с мостами, преждевременные расхождения хромосом в метафазе.



**Рисунок 9.** Метафазы с отставшими хромосомами. Окраска азур-эозином. Увел.  $\times 1000$



**Рисунок 10.** 1) Многогрупповая метафаза. 2) Четырехполюсная анафаза. Окраска азур-эозином. Увел.  $\times 1000$



**Рисунок 11.** 1) Трех-четыреполюсная ана-телофаза.

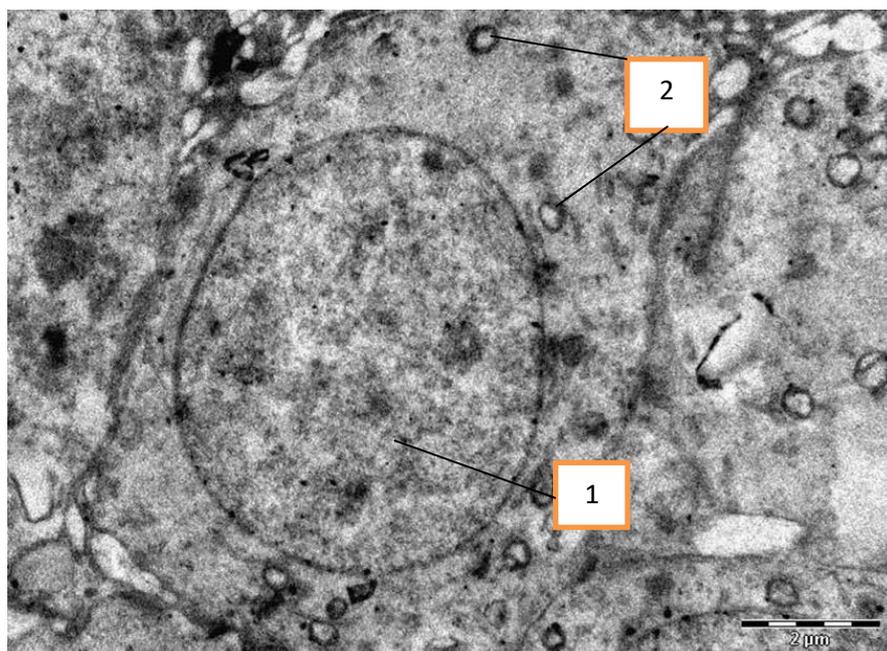
2) Неравнополюсная ана-телофаза. Окраска азур-эозином. Увел. × 1000

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

#### **продуктов *A. simplex***

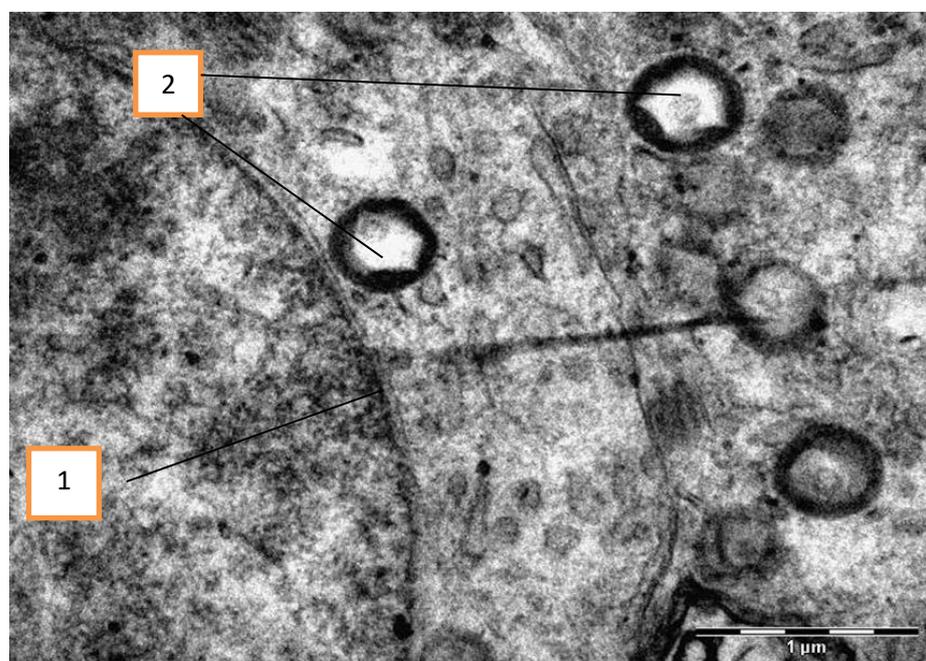
Предыдущим опытом было определено, что наибольшие кариопатические изменения отмечаются в половых клетках лабораторных мышей через 48 часов после однократного внутрибрюшинного введения соматического экстракта в дозе 200 мкг/животное. В связи с этим для изучения ультраструктуры клеток семенников мы воспроизвели 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 (рис.12).



**Рисунок 12.** Сперматоцит. Ядро (1), митохондрии (2). Увел.  $\times 7100$

При увеличении видно, что мембрана митохондрий разрыхлена, ее двухконтурность сохранена частично. В митохондриях отмечали деструктуризацию крист, просветление митохондриального матрикса (рис.13).



**Рисунок 13.** Фрагмент сперматоцита. Ядерная мембрана четкая, просматривается двухконтурность (1), митохондрии с деструкцией крист, просветлением матрикса (2). Увел.  $\times 22\ 000$

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 подобных патологии митохондрий нарушается процесс окислительного фосфорелирования в клетке, и она вынуждена получать энергию с помощью анаэробных процессов.

Проведенные нами исследования демонстрируют необратимое негативное влияние белкового экстракта из личинок анизакид на соматические и половые клетки млекопитающих, происходящие вследствие повреждения в них процессов метаболизма.

## **2.2.6. Влияние белкового экстракта из личинок**

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

Установлено, что гельминты и их белки оказывают эмбриотоксическое и тератогенное действие на организм млекопитающих [20; 141; 143; 144; 186]. Эмбриотоксический эффект обнаружен у лабораторных крыс при воздействии соматического экстракта личинок *A. simplex* [103]. В то же время, в литературе описано, что куриные эмбрионы могут служить удобной моделью для изучения действия на организм бактерий, вирусов и токсинов, так как при этом не причиняется вред материнскому организму [112] и исключается возможность опосредованного трансплацентарного воздействия. Однако изучению действия продуктов жизнедеятельности гельминтов на куриные эмбрионы посвящены немногочисленные исследования [141; 186], поэтому мы посчитали важным изучить воздействие экстракта анизакид на клетки куриных эмбрионов. Для исследования мы использовали разные способы введения экстракта, оценивали его влияние на разных периодах эмбриогенеза и изучали патогистостологические изменения тканей и органов.

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

Для исследования применяли 8-, 11-, 13 - суточных эмбрионов, которым соматический экстракт вводили в желточный мешок, в аллантоис, хориоаллантойсную оболочку, изучали влияние экстракта на 2 и 8 сутки после воздействия.

В интактной группе изменений не наблюдали, масса, возраст эмбрионов и степень их развития соответствовали стандартным показателям. В опытной группе изменения затрагивали массу эмбрионов (табл.7).

**Таблица 7 - Развитие 8 - 13-суточных куриных эмбрионов под влиянием экстракта *A. simplex***

Возраст эмбрионов, сутки	Контроль			Опыт		
	Масса яйца, г	Масса эмбриона, г	Масса эмбриона, %	Масса яйца, г	Масса эмбриона, г	Масса эмбриона, %
Инкубация 2 суток						
8	56,35±0,20	2,25±0,13	3,99±0,25	54,07±0,49*	1,68±0,06*	3,11±0,09*
11	53,40±0,7	5,48±0,02	10,25±0,17	54,87±0,31	6,13±0,21	11,18±0,45
13	56,08±2,82	14,00±0,57	24,98±0,25	55,87±0,79	13,83±0,82	24,76±1,42
Инкубация 8 суток						
8	59,83±1,18	14,78±0,52	24,69±0,38	56,27±0,91	9,97±6,21	17,64±11,27
11	54,13±0,92	27,60±0,17	51,0±0,56	55,83±0,26	26,33±0,34*	47,17±0,81*
13	54,30±0,60	46,60±0,50	83,40±3,25	52,80±1,50	44,58±1,38	84,43±0,20

Примечание: \*P≥0,05

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. Прирост относительной массы эмбрионов был снижен в 1,3 раза.

При введении экстракта в аллантоис 11 - суточным спустя два дня возраст эмбрионов, как в опыте, так и контроле по морфологическим

признакам соответствовал 13 суткам, что соответствует физиологической норме.

При инкубировании 13 - суточных эмбрионов спустя аналогичный промежуток времени развитие в контрольной группе соответствовало 15 суткам, уменьшался желточный мешок, веки глаз были сомкнуты. При этом в опыте после введения экстракта *A. simplex* на ХАО развитие задерживалось на сутки: не у всех эмбрионов были сомкнуты веки, прирост массы эмбрионов незначительно снижен.

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.14).



**Рисунок 14.** 18-суточные куриные эмбрионы. Инкубация 8 суток после введения соматического экстракта *A. simplex* в желточный мешок

При введении экстракта в аллантоис 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 аллантоисной 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 (табл.8).

**Таблица 8 - Развитие 1 - 6 - суточных куриных эмбрионов под влиянием соматического экстракта *A. simplex***

Возраст эмбрионов, сутки	Контроль			Опыт		
	Масса Яйца, г	Масса эмбриона, г	Масса эмбриона, %	Масса Яйца, г	Масса эмбриона, г	Масса эмбриона, %
Инкубация 2 суток						
1	64,40±1,13	-	-	62,73±1,21	-	-
6	60,97±1,42	1,05±0,03	1,72±0,97	61,80±2,20	0,88±0,22	1,42±0,37
Инкубация 8 суток						
1	66,88±0,17	1,43±0,05	2,13±0,08	65,87±2,86	0,40±0,50	0,57±0,71
6	60,63±0,15	11,70±0,27	19,30±0,49	64,17±1,07*	9,10±3,27	14,20±5,13

Примечание: \*P≥0,05

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 суток инкубации. В экспериментальной группе у двух эмбрионов выявили отставание в развитии. Возрастные признаки одного эмбриона соответствовали 72 часам инкубирования, другого - 48 часам инкубирования (рис. 15).

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 (рис. 16).



**Рисунок 15.** Опыт. 1-суточные куриные эмбрионы. Введение экстракта *A. simplex* в желточный мешок, инкубация 8 суток



**Рисунок 16.** Опыт. 6-суточные куриные эмбрионы. Введение экстракта *A. simplex* в желточный мешок, инкубация 8 суток

### 2.2.6.3. Гистологические изменения тканей и органов куриных эмбрионов под влиянием соматического 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 6-8 суточного возраста позволило выявить также избыток волокнистых незрелых структур на уровне стромы паренхиматозных органов, дистрофические изменения в клетках миокарда (рис.17) и печени. Гемопоз в печени был выражен минимально. В сетчатке глаза хорошо прослеживался распространенный отек и очаговые скопления лимфоцитов (рис.18). Следовательно, в эмбриональных тканях под действием соматического экстракта *A. simplex* развиваются дистрофические изменения, нарушается кровообращение, ослабляется гемопоз, а также на введение чужеродного белка формируется иммунная реакция в виде лимфоцитарных инфильтратов.

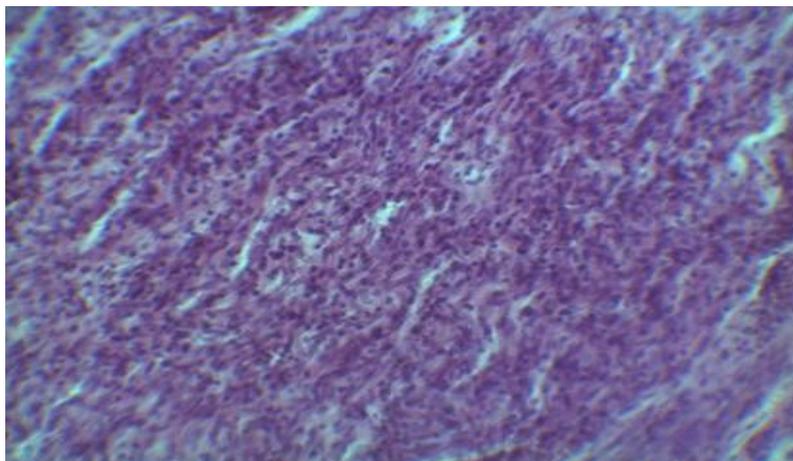
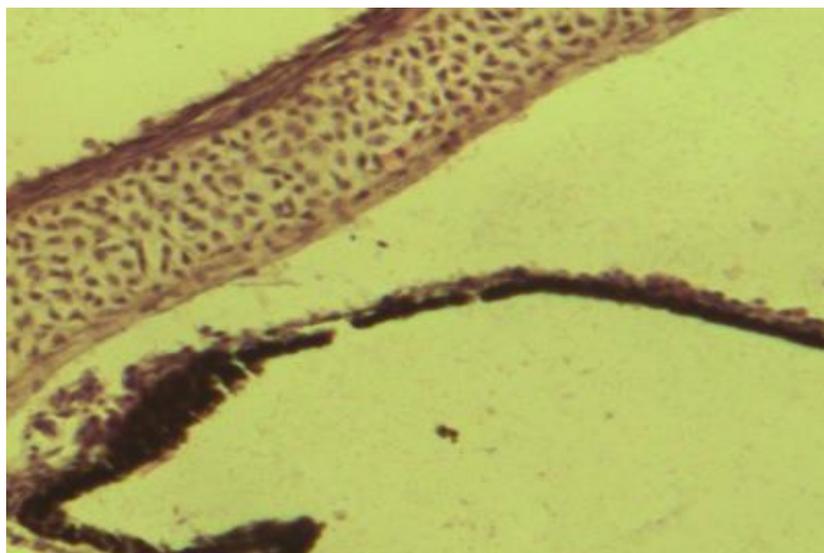


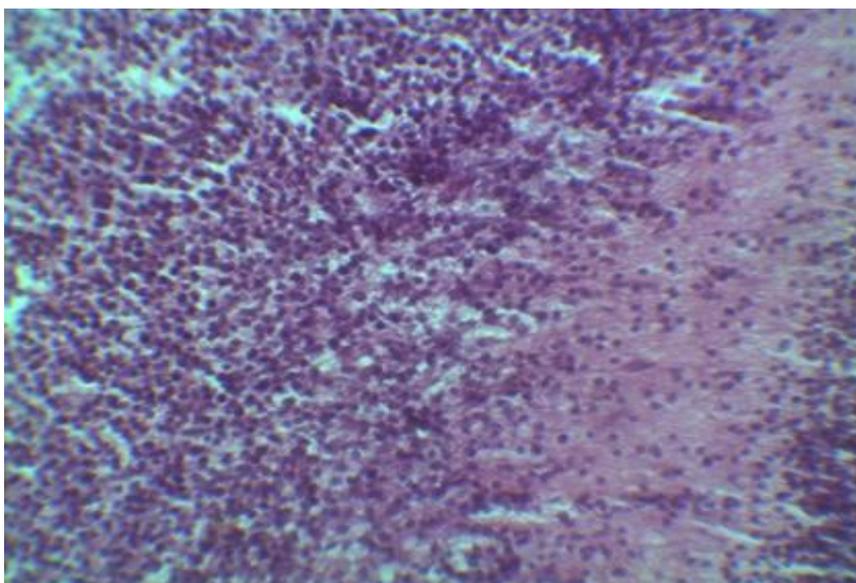
Рисунок 17. Миокард. Окраска гематоксилином-эозином, Увел. × 100



**Рисунок 18.** Сетчатка глаза. Окраска гематоксилином-эозином.

Увел. × 400

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 (рис.19). В мозжечке эндотелий сосудов находился в состоянии очаговой десквамации с обнажением базальной мембраны, просветы сосудов выглядели суженными.



**Рисунок 19.** Головной мозг. Окраска гематоксилином-эозином. Увел. × 100

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 анизакид развивались дистрофические изменения и иммунологические реакции, аналогичные изменениям в органах и тканях мышей, полученных в предыдущих экспериментах.

Проведенные исследования наглядно продемонстрировали эмбриотоксическое действие белковых продуктов анизакид на примере птиц, при этом воздействие на куриные эмбрионы происходит непосредственно, и более выраженный эффект наблюдается на незрелых клетках.

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

Токсическое действие гельминтов в большинстве случаев изучается на примере макроорганизмов, а именно на соматических и половых клетках [18], эмбрионах крыс [103], реже куриных эмбрионах [140].

Известно, что гельминты не выделяют специальных токсинов, но некоторые продукты их метаболизма являются антигенами и способствуют развитию воспалительных реакций [116]. Также исследователи считают, что при гельминтозах происходит развитие окислительного и нитрозилирующего стресса в тканях [18]. Для более глубокого изучения непосредственного механизма влияния белков паразита на состояние клетки необходимо в качестве экспериментальных моделей использовать одноклеточные организмы.

Для определения токсичности различных веществ широко используют инфузорий, что имеет ряд преимуществ [89]. Поэтому мы провели опыт по определению общей токсичности соматического экстракта из личинок *A. simplex* экспресс методом на *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% (таблица 9).

**Таблица 9 - Изменения, вызванные соматическим экстрактом личинок *A. simplex* на *P. caudatum***

Показатели	1 час			3 часа		
	Контроль	Соматический экстракт <i>A. simplex</i>		Контроль	Соматический экстракт <i>A. simplex</i>	
		цельный	1:2		цельный	1:2
Подвижные, %	98±3	16±13***	-	103±3	-	-
Движение вокруг своей оси, %	2±3	56±12**	42±28	1±2	30±11*	11±6
Неподвижные, %	-	13±7	46±20	2±3	50±8***	65±19*
Лизис, %	-	15±11	12±13	-	20±15	24±19

Примечание: \* $P \geq 0,05$ , \*\* $P \geq 0,01$ , \*\*\* $P \geq 0,001$ . Курсивом выделены показатели, не отвечающие достоверности по причине небольшого количества патологий

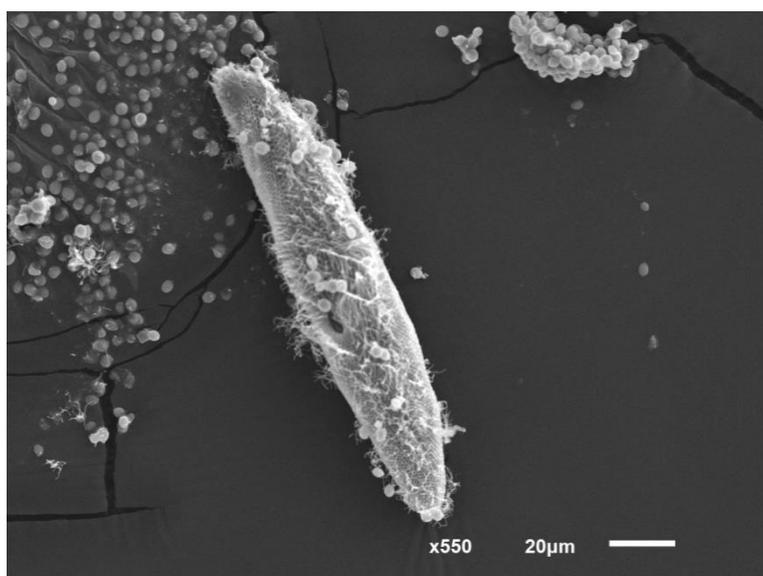
В контроле через 3 часа количество парамеций увеличилось в результате их размножения.

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.

В результате проведенного опыта по изучению острой токсичности с использованием инфузорий *P. caudatum* разведенный 1:2 соматический экстракт *A. simplex* оказался более токсичным.

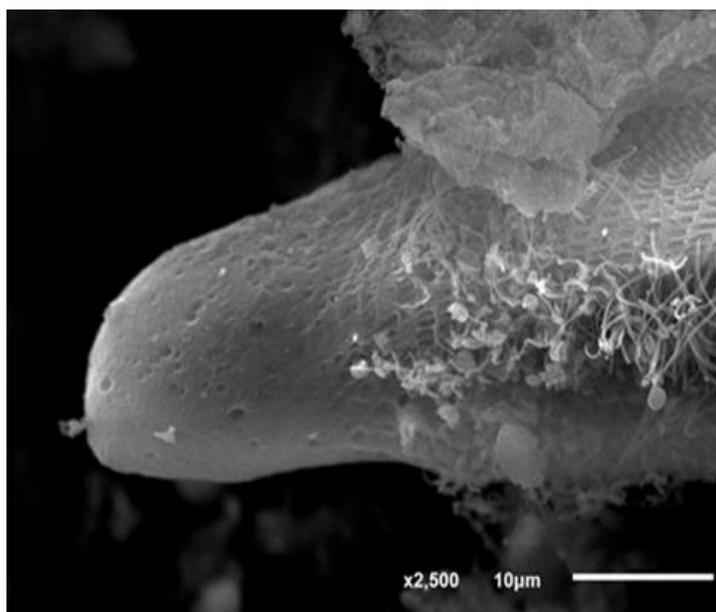
### 2.2.7.2. Ультраструктурные изменения мембран одноклеточных микроорганизмов

В интактной контрольной группе изменений в структуре наружной оболочки не наблюдали (рис.20).

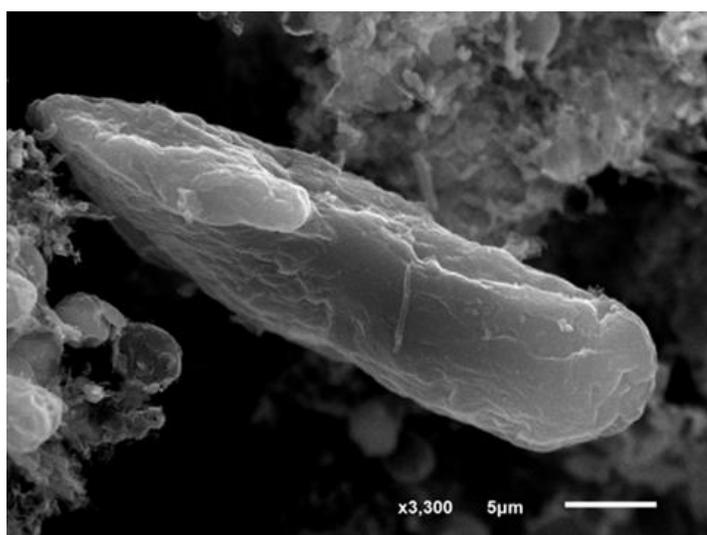


**Рисунок 20.** Контроль *P. caudatum*. Увел. × 2500

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.21). Также обнаружены парамеции, совершенно лишенные наружной мембраны (рис.22).

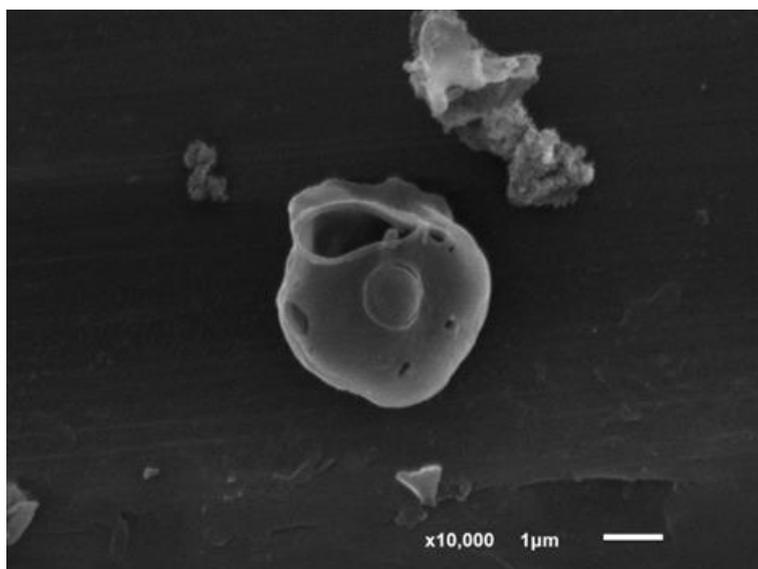


**Рисунок 21.** Поры на поверхности *P. caudatum* под воздействием соматического экстракта *A. simplex*. Увел. × 2500

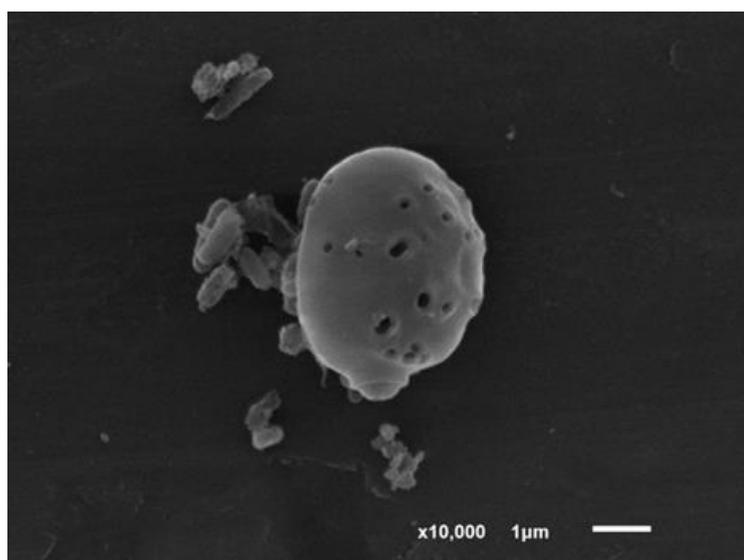


**Рисунок 22.** *P. caudatum*, лишенная наружной мембраны под воздействием соматического экстракта *A. simplex*. Увел. × 3300

Подобные морфологические нарушения структуры мембран были обнаружены и среди клеток дрожжей *S. cerevisiae* (рис.23, 24), которые использовали для питания инфузорий.



**Рисунок 23.** Формирование крупной поры у *S. cerevisiae* под воздействием соматического экстракта *A. simplex*. Увел.  $\times 10000$



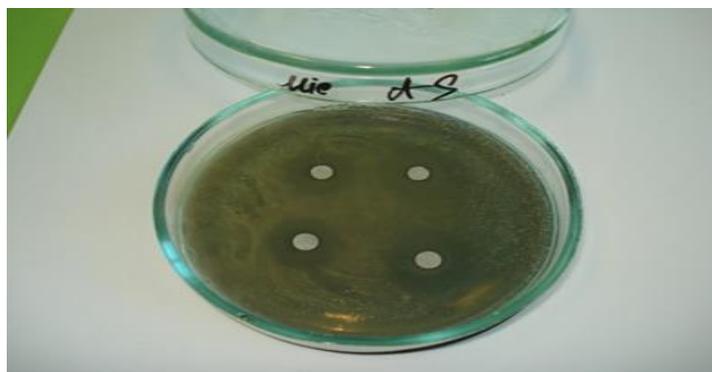
**Рисунок 24.** Мелкие поры на наружной мембране *S. cerevisiae* под воздействием соматического экстракта *A. simplex*. Увел.  $\times 10000$

## 2.2.8. Влияние анизакидного соматического экстракта на прокариотические микроорганизмы *in vitro*

В связи с тем, что под воздействием белкового экстракта из личинок *A. simplex* нарушалась структура мембран у эукариотических организмов, определенный интерес возник и в отношении клеток прокариот, в связи, с чем был проведен эксперимент на культурах клеток некоторых микроорганизмов.

В процессе культивирования микроорганизмов с дисками, пропитанными белковыми продуктами личинок *A. simplex* L3, выявили наличие его ингибирующей активности, проявляющееся в различной степени по отношению к разным бактериям.

В культуре *Micrococcus sp.* спустя 12 часов от начала эксперимента вокруг бумажных дисков была сформирована четкая зона задержки роста, диаметр которой составил 1,52-1,64 см (рис. 25).



**Рисунок 25.** Стерильная зона на культуре *Micrococcus sp.* вокруг дисков с экстрактом *A. simplex*

В результате культивирования бактерий *E. coli* вокруг бумажных дисков с экстрактом в течение 12 часов оставались также выраженные зоны стерильности с диаметром в пределах 2,12-2,18 см (рис.26).

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 (рис. 27).



**Рисунок 26.** Зоны стерильности культуры *E. coli* вокруг диска с экстрактом *A. simplex*



**Рисунок 27.** Зоны стерильности на культуре *P. vulgaris* вокруг диска с экстрактом *A. simplex*

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

Таким образом, наши исследования установили наличие в белковом экстракте из анизакид потенциальных бактериостатических компонентов, действие которых вызывает временный бактериостаз (не более 24 часов) грамотрицательной и грамположительной облигатной микрофлоры (*Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris*), предположительно за счет нарушения обмена энергии и веществ. Впоследствии указанная микрофлора, вероятнее

всего, продуцирует ферменты, разрушающие белки нематод, что и обуславливает непродолжительность указанного эффекта.

## Обсуждение

Инвазия личинками анизакид, как и воздействие их отдельных белковых компонентов способны вызывать широкий спектр патологий у животных и человека, который не сводится лишь к развитию иммунной или аллергической реакции, в связи, с чем ранее были проведены исследования их биохимического состава.

По имеющимся литературным данным секвенирование генома *A. simplex* позволило установить, что основными компонентами являются белки, относящимися к различным семействам [125; 165]. Известно, что в основе всех физиологических процессов и биохимических реакций организма лежат белки и белковые взаимодействия. Изучением этих взаимодействий занимается протеомика, практическим аспектом которой являются исследования изменений протеома при заболеваниях [9].

Например, такой белок *A. simplex*, как енолаза, является важным аллергическим компонентом многих микроорганизмов и дрожжей, наличие ее регистрируют при большом количестве патологических состояний, в том числе и при онкологии [227]. Ранее считалось, что цитопатический эффект зависит от дозы инвазионного материала [25], позднее было доказано, что ведущую роль играют именно белки [21; 69]. В соответствие с этим мы попытались оценить влияние концентрации белков соматического экстракта *A. simplex* L3 на клетки и ткани организма *in vivo* и *in vitro*.

При изучении влияния дозозависимого эффекта соматического экстракта *A. simplex* на гематологические показатели периферической крови нами установлена зависимость этих изменений от дозы введенного белкового продукта. При ее увеличении отмечалось возрастание процентного отклонения лимфоцитов, повышение показателя гетерогенности

тромбоцитов и уменьшение относительного количества гранулоцитов. При подсчете лейкоцитарной формулы также установлен дозозависимый эффект на клетки лейкоцитов: миелоцитов, палочкоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, с увеличением дозы отмечено повышение их количества. Исследование показало значительное влияние на эритроцитарный, тромбоцитарный, а также лимфоидный ростки кроветворения. Полученные результаты подтверждают ранее проведенные эксперименты [103]. Данный факт объясняется тем, что исследуемый соматический экстракт имеет сложный белковый состав, и при повышении дозы, соответственно, увеличивается степень ответной реакции иммунной системы.

Развитие эозинофилии может быть связано не только выходом множественных факторов хемотаксиса Т-лимфоцитов, а также тучных клеток и базофилов, но и продуцированием паразитом неких хемотаксических веществ для них. В подавляющем большинстве наблюдений индукция живых или мертвых гельминтов стимулирует активацию гранулоцитов (базофилов и эозинофилов) и тучных клеток [132; 160].

Общеизвестно, что тромбоциты участвуют в процессе первичного гемостаза. Повышение их количества в периферической крови наблюдают у пациентов при злокачественных новообразованиях, кровопотере, в результате воздействия кортикостероидов, а также при развитии хронических воспалительных заболеваний [103].

Выявлено, что экстракт обладает кариопатическим действием на делящиеся клетки животных, так при увеличении его дозы по белку развивались более выраженные изменения в гемопозитической ткани и сперматогенном эпителии.

При изучении нами патоморфологии органов мышей в зависимости от дозы введенного белкового экстракта *A. simplex*, отмечено наличие дозозависимых гистологических изменений. Внутривентральное введение экстракта у лабораторных мышей вызывает развитие иммунной и

токсической реакции в печени, селезенке и семенниках, которая прямо пропорциональна дозе введенного биоматериала. В печени и семенниках под влиянием продуктов личинок паразита развиваются клеточные реакции: макрофагальная, лимфоидная, фибробластическая. Появление этих клеток в очагах повреждений говорит об ответной реакции, направленной на подавление антигенной активности [72; 79]. В то же время, выявленные дисциркуляторные процессы, а также дистрофические изменения свидетельствуют о нарушении метаболизма на уровне клеток, вызванные токсическим эффектом. Впоследствии участки воспаления замещаются соединительной тканью, что сопровождается ослаблением функций органов, и отмечено в отношении других гельминтозов [76; 77]. В частности, в семенниках это приводит к ослаблению сперматогенеза или его полного прекращения (паразитарная кастрация).

Появление в тканях печени и селезенки иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов и гистиоцитов) объясняется антигенным действием экстракта гельминта. Такая иммунная реакция является стандартным ответом организма животных на введение чужеродного белка и присутствует в случае воздействия соматических экстрактов нематод, цестод [65; 79; 102] и трематод [68]. Есть мнение, что продукты, образующиеся при взаимодействии антигенов гельминтов с иммунокомпетентными клетками, изменяют концентрацию биогенных аминов, которые являются регуляторами гомеостаза в органах [76].

При изучении дозозависимого влияния соматического экстракта личинок анизакид на красный костный мозг лабораторных мышей установлено увеличение митотического индекса и количество патологических форм митоза с возрастанием дозы биоматериала. Увеличение митотического индекса происходило, в первую очередь за счет метафаз. Подобные изменения характерны для остановки клеточного деления на стадии метафазы или накопления К-митозов при воздействии инфекционных агентов на аппарат деления клетки [54]. Далее подобные незавершенные

митозы вследствие дезорганизации или полного разрушения аппарата деления клетки заканчиваются формированием полиплоидных клеток. В случае нарушений механизмов расхождения вновь сформированных дочерних клеток появляются полиплоидия, а также дву- и многоядерность. Если последствия патологического митоза оказываются существенными, вероятно полная гибель клетки [8].

При дозе 200 мкг белка на голову получено самое большое разнообразие патологических форм, значительную часть которых составляли многополюсные митозы. Отмечено наличие лимфоцитов с двумя ядрами, что может рассматриваться как компенсаторное проявление в ответ на действие генотоксических агентов. Подобное явление может считаться вынужденным ответом, направленным на поддержание генетического баланса в клеточной популяции, что происходит и в результате старения культуры *in vivo* и *in vitro*, а также вследствие естественного удлинения продолжительности цитокинеза.

Обнаружены хроматидные аберрации-мосты, являющиеся следствием разрыва хромосом и объединения их фрагментов с центромерами [62]. Приведенные выше исследования убедительно подтверждают наличие кариопатического и генотоксического влияния экстракта из нематоды на соматические клетки. Данные явления при гельминтозах авторы объясняют активацией свободнорадикальных процессов, которые в определенные моменты становятся нерегулируемыми и приводят к повреждению генетического материала соматических клеток хозяина [69].

Нарушение метаболизма и мембранотоксический эффект подтверждены нами при изучении ультраструктурных изменений клеток красного костного мозга лабораторных мышей под действием экстракта личинок анизакид в виде прогрессирования дистрофических изменений, которые могут привести к распаду ультраструктур клетки вследствие недостаточного окисления продуктов, к дальнейшему повышению осмотического давления цитоплазмы и далее гибели клетки [110].

При изучении дозозависимого влияния экстракта из анизакид на кариопатические и гистологические изменения половых клеток, также установлена зависимость от количества введенного белка. С увеличением дозы экстракта наблюдается незначительное повышение количества делящихся клеток, увеличение соотношения про-метафаз и значительное увеличение количества и разнообразия патологических форм мейоза. Количество патологий напрямую зависело от количества белка и возрастало с увеличением концентрации биоматериала. Доза 100 мкг на голову приводила к увеличению данного показателя в 2,5 раза по сравнению с контролем, доза в 200 мкг - в 5 раз, и максимальное увеличение уровня патологий в 8 раз было выявлено при дозах белка в 500 и 1000 мкг на голову.

В отличие от клеток красного костного мозга кариопатические изменения носили прямой дозозависимый характер, и наибольшее изменения вызывала доза в 1000 мкг по белку.

Ранее было доказано, что белковые компоненты дефростированных личинок *A. simplex*, *Hydatigera taeniaformis*, *Diphyllobothrium latum* угнетают процесс деления клеток сперматогенного эпителия у лабораторных грызунов и приводят к его нарушению, воздействуя на мейотический аппарат. Данные объясняются тем, что тканевые и экскреторно-секреторные белки гельминтов многих видов действуют как митотические яды, способные нарушать процессы деления гемопоэтических и половых клеток [102].

При патоморфологическом анализе тканей семенников выявлены признаки дистрофии. С увеличением дозы экстракта происходило подавления процесса формирования половых продуктов самцов, далее приводящее к появлению полостью пустых семенных канальцев. В результате электронномикроскопического анализа также были отмечены признаки разрушения семенных канальцев, деструкция клеток сперматогенного эпителия. Результаты проведенных нами экспериментов полностью подтверждают наличие повреждающего эффекта белков,

входящих в состав личинок *A. simplex*, на половые клетки хозяина, степень которого зависит от дозы и возрастает с ее увеличением.

Изучение ультраструктурных изменений от однократного внутрибрюшинного введения соматического экстракта из личинок *A. simplex* самцам белых мышей в дозе 200 мкг привело к необратимым изменениям ультраструктуры митохондрий сперматоцитов. Известно, что в митохондриях органические соединения окисляются, и высвобождающаяся при этом окислении энергия тратится на синтез АТФ. В результате патологии митохондрий нарушается процесс окислительного фосфорелирования в клетке, и она вынуждена получать энергию с помощью анаэробных процессов. Вероятной причиной обнаруженных изменений в митохондриях клеток является развитие окислительного и нитрозилирующего стресса [27].

Влияние гельминтов на энергетические процессы подтверждаются и другими авторами [73], установили, что суспензия из имаго *Protostrongylus rufescens* выражено изменяет энергетику клетки, блокирует процесс окисления в митохондриях, приостанавливает окислительное фосфорилирование и нарушает функции митохондрий на уровне циклоспорин А - чувствительной поры, приводя ее в высокопроницаемое состояние, увеличивает интегральную проводимость бислойных липидных мембран. Увеличение этой проводимости связывают с формированием ионных каналов.

Факт изменений в митохондриях сперматоцитов свидетельствует о глубоком патологическом воздействии продуктов метаболизма *A. simplex* на репродуктивную систему экспериментальных животных, которое способно приводить к необратимым последствиям вплоть до полного блокирования сперматогенеза и развитию бесплодия.

Таким образом, в повреждении клеток генома хозяина лежат единые механизмы [15; 207; 251]. При данных явлениях наибольшую опасность представляют процессы мутагенного повреждения генетического материала как соматических, так и половых клеток [27].

Известно, что под влиянием соматических продуктов гельминтов, помимо повреждений соматических и герминативных клеток, происходит повреждение и клеток эмбрионов [81]. Ранее было установлено, что под действием продуктов *A. simplex* нарушается процесс эмбриогенеза у лабораторных крыс [102]. Однако не было установлено, являются ли эти изменения результатом прямого действия личинок на делящиеся эмбриональные клетки или реакция происходит опосредованно через организм матери.

Наиболее подходящей моделью, дающей возможность в динамике оценить закономерности преобразований эмбриогенеза у позвоночных, исключая опосредованное материнским организмом воздействие, могут служить эмбрионы птиц, в том числе, куриные. Подобные эксперименты позволяют, в частности, оценить особенности реакции, в том числе и иммунный ответ развивающихся эмбрионов на различные внешние факторы на разных этапах эмбриогенеза. Вопрос воздействия продуктов гельминтов на куриные эмбрионы, однако, мало изучен.

Нами проведен ряд опытов по изучению влияния соматического экстракта из личинок *A. simplex* на развитие куриных эмбрионов и гистогенез органов и тканей. В результате установлен выраженный эмбриотоксический эффект, при этом наибольшее воздействие экстракт нематод оказывал на эмбрионы ранних сроков развития при введении его в желточный мешок. Морфологические изменения зависели от продолжительности воздействия экстракта. Гистологическое исследование тканей эмбрионов показало развитие дистрофических изменений и иммунологических реакций. Полученные данные согласуются с предыдущими, которые были нами установлены у лабораторных мышей.

Как предполагает Пашинская Е.С. [81], цитотоксический эффект как в клетках эмбрионов, костном мозге беременных самок, при воздействии белкового соматического продукта трихинелл может быть обусловлен проявлением защитных реакций организма, в частности, за счет

продуцирования фактора некроза опухоли  $\alpha$ , направленного на уничтожение паразитов, а также повышением образования в организме NO, белка теплового шока 60 и, возможно, цистеиновых протеаз.

Многочисленные проведенные ранее эксперименты на соматических, половых и гемопоэтических клетках были основаны на взаимодействии с иммунной системой. То, что экстракт оказывается активным антигеном для организма неоднократно нами показано на клетках и тканях. Однако, известно, что гельминты оказывают влияние на иммунную систему и модулируют иммунный ответ, в том числе уровень иммунокомпетентных клеток, за счет различных токсических веществ [217], входящих в их состав, действие которых на организм до конца не изучено. Поэтому мы провели оценку токсического действия на одноклеточных организмах и попробовали изучить изменения на ультраструктурном уровне.

При изучении острой токсичности с использованием инфузорий *P. caudatum* установлено, что через 3 часа наблюдается 100% гибель инфузорий от воздействия цельного и разведенного 1:2 экстракта *A. simplex*. 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.

Есть сообщения, что «подпороговые» концентрации токсических веществ вызывают полную гибель трофозоитов инфузорий, не приводящих к разрушению самих клеток, тогда как более высокие, так называемые «надпороговые» дозы, проходят имеющиеся защитные клеточные мембраны, вызывают смертельную везикуляризацию цитоплазмы или разрывают наружную плазмолемму, что приводит к полному лизису экспериментальных цилиат [89].

При ультраструктурном исследовании обнаружено, что разведенный 1:2 соматический экстракт оказывает токсическое действие, которое проявлялось нарушением структуры мембран, как клеток парамеций, так и дрожжей. Деструктивные изменения мембран опытных клеток *P. caudatum*

свидетельствуют об интенсификации процессов свободно-радикального окисления [56]. Экстракт *A. simplex* оказался способным задерживать на 12 часов деление клеток и прокариотических организмов, что подтверждает теорию о едином механизме цитотоксического воздействия.

Предполагается, что в основе комплекса ответных защитных реакций организма на неблагоприятные факторы, в том числе и токсические, лежат единые фундаментальные механизмы [56]. Владимиров Ю.А. [33], в результате исследований гипоксического повреждения митохондрий, клеток крови и искусственных фосфолипидных мембран установил, что к нарушению работы и барьерных свойств липидного слоя клеточных мембран приводят четыре основные причины: перекисное окисление липидов, действие ферментов-фосфолипаз, перерастяжение мембран или присоединение к ним полиэлектролитов.

Результаты нашей исследовательской работы по исследованию цитопатического влияния белков, входящих в состав личинок третьего возраста нематоды *A. simplex*, позволили установить, что их патогенное действие складывается из одновременного иммунологического и токсического эффектов, а также происходит за счет нарушения окислительно-восстановительных процессов и повреждения мембран на клеточном и субклеточном уровнях в клетках различного происхождения независимо от уровня их организации, что позволяет раскрыть некоторые вопросы патогенеза, имеющие важное биологическое, социальное и медицинское значение.

## 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 гемопоза, 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+ и Г- облигатной микрофлоры (*Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris*), предположительно за счет подавления у микроорганизмов метаболических и энергетических процессов.

## Практические предложения

1. Результаты можно использовать для написания практических рекомендаций о запрете употребления сырой, замороженной инвазированной рыбы и запрете употребления данной продукции беременным, в раннем возрасте, животным – производителям и лицам с иммунопатологиями.
2. Материалы можно использовать для чтения лекций и проведения практических занятий магистрам, аспирантам по дисциплине «Паразитология» и «Иммунология».
3. Для изучения патологического действия гельминтов и их экстрактов можно использовать в качестве тест - объектов инфузории *P. caudatum* и дрожжи *S. cerevisiae*.
4. Основным механизмом патологического действия гельминтов является развитие окислительно-восстановительного стресса, в связи, с чем при терапии гельминтозов необходимо применение антиоксидантов.
5. Дальнейшее изучение свойств соматических и экскреторно-секреторных продуктов *A. simplex* необходимо для создания биопрепаратов, подавляющих рост и размножение быстроделющихся клеток, в том числе и опухолевых.

## Список литературы

1. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 22.08.2014 г. № 50 «Об утверждении СанПиН 3.2.3215-14 «Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации» (зарегистрирован в Минюсте России 12.11.2014 №34659).
2. ГОСТ 31674-2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности (с Изменением №1). – М.: Стандартинформ, 2014. – 10 с.
3. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 92 с.
4. Абилев С.К. Метаболическая активация химических мутагенов / С.К. Абилев // Итоги науки и техники. Общая генетика, ВИНТИ. – 1986. – Т.9. С. 5–96.
5. Адоева Е.Я. Изучение клеточного состава соединительнотканых капсул, образующихся вокруг тканевых личинок гельминтов/ Е.Я Адоева, А.Ф. Никитин // Журнал инфектологии. – 2015. – Т.7, №3. – С. 9-10.
6. Акбаев М.Ш. Влияние гельминтов на микрофлору пищеварительного канала животных / М.Ш. Акбаев, О.И. Русович, Р.С. Ишимбаева // Метод. указания – М.: МГАВМиБ им. К.И.Скрябина, 1995. – 20 с.
7. Акбаев М. Ш. Паразитология и инвазионные болезни животных/, А. А. Водянов, Н. Е. Косминков и др.; под ред. М. Ш. Акбаева – М.: Колос, 1998. – 743 с.: ил.. 1998
8. Алов А.И. Цитофизиология и патология митоза – М.: «Медицина», 1972. – 264 с.
9. Андреева А.М. Использование масс-спектрометрии maldi для идентификации белков рыб // Использование молекулярно-генетических

методов для изучения экосистем и защиты здоровья человека: Мат. VII научно-практической школы для молодых учёных, аспирантов и студентов по проблемам молекулярной экологии и эволюции. – ИБВВ РАН Борок, 2014. – С. 7-24.

10. Баетшева Д. А. Иммуный статус при хроническом описторхозе / Д. А. Баетшева, С. К. Атыгаева, А. А. Кнаус // Медицина и экология. – 2007. – №4 (45). – С. 20-23

11. Бекиш В.Я. Мигрирующие личинки аскарид и их метаболиты как мутагены / В.Я. Бекиш // Сб. науч. Тр. IV съезда врачей-инфекционистов Республики Беларусь – Витебск, 1997. – С. 21-22.

12. Бекиш В. Я. Генетические аспекты взаимоотношений в системе паразит-хозяин при аскаридозе / В. Я. Бекиш // Ткан. гельминтозы: диагностика, патогенез, клиника, лечение и эпидемиология: Тр. науч. практич. конф. – Витебск, 2000. – С. 18-27.

13. Бекиш В.Я. Изменения активности сперматогенеза у мышей линии СВА при экспериментальных гельминтозах / Бекиш В.Я. // Фунд.науки и достижения клин. медицины и фармации. – Витебск, 2002. – С. 5-6.

14. Бекиш В.Я. Микроядерный тест в клетках костного мозга и семенников мышей линии СВА при гельминтозах / В.Я. Бекиш, В.И. Колмогоров, В.В. Побяржин // Вестник ВГМУ. –2003. –Т.2, №2. – С. 67-72.

15. Бекиш В.Я. Влияние комбинированной терапии экспериментального токсокароза на состояние генома хозяина и свободнорадикальные процессы в семенниках / В.Я. Бекиш, В.И. Колмогоров, Л.Э. Бекиш // Вестник фармации. – 2003. –№ 3. – С. 45-51.

16. Бекиш В.Я. Состояние генома хозяина при гельминтозах / В.Я. Бекиш, О.-Я.Л. Бекиш // Витебск. – Изд. ВГМУ. – 2004. – С. 40–43.

17. Бекиш В.Я. Генотоксические и цитотоксические воздействия белковых соматических продуктов гельминтов на лимфоциты крови доноров *in vitro* / В.Я.Бекиш, А.Д. Дурнев // Бюллетень эксп. биол. Медицины. – 2004. –Т.138, №8. – С. 198-201.

18. Бекиш В.Я., Бекиш О.-Я.Л. Механизмы генотоксических эффектов в соматических и генеративных клетках хозяина при гельминтозах / В.Я.Бекиш, О.-Я.Л. Бекиш // Витебск: Изд-во ВГМУ, 2005. –Т. 4, №4. – С. 73-79.

19. Бекиш В.Я. Роль геномов хозяина и паразита в патогенезе цестодозов человека / В.Я.Бекиш, О.-Я.Л. Бекиш // Паразитарные болезни человека, животных и растений: Труды VI Международной научно-практической конференции – Витебск: ВГМУ, 2008. – С. 73-81.

20. Бекиш В. Воздействие паразитов на организм млекопитающих и человека при беременности / В. Бекиш, В. Гидранович, Л. Бекиш и др. // Вестник ВГМУ. – 2010. – Т.9, №2. – С. 1-12.

21. Бекиш В.Я. Генотоксические и цитотоксические эффекты в клетках хозяина при тениидозах / В.Я. Бекиш, В.В. Зорина // Российский паразитологический журнал. – 2015. – №3. – С. 45-52.

22. Бекиш В.Я. Изучение на основе нанотехнологий особенностей патогенеза и разработка эффективных способов лечения и диагностики трихинеллеза, описторхоза и трихоцефалеза человека / В.Я. Бекиш, В.В. Зорина, Д.К. Кужель // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2015. – №16. – С. 33-36

23. Бекиш О.Я.Л. К вопросу о природе иммунодепрессивного фактора трихинелл / О.-Я.Л. Бекиш, Р.А. Пенькова, Т.С. Новик // Актуальные вопросы патогенеза и терапии инфекционных и паразитарных болезней. – Л., 1987. – С.111-116.

24. Бекиш О.-Я.Л. Роль генотипов паразита и хозяина в формировании взаимоотношений между ними / О.-Я.Л. Бекиш // Современная паразитология: проблемы и перспективы: труды научной конференции, посвященной 65-летию кафедры медицинской биологии и общей генетики ВГМУ. – Витебск: ВГМУ, 1999. – С. 86-99.

25. Бекиш О.-Я.Л. Цитогенетическое исследование клеток красного костного мозга белых мышей, инвазированных *Trichocephalus muris* / О.-Я.Л.

Бекиш, А.В. Степанов // Сб. Роль наследств, факторов в патогенезе заболеваний человека. – Витебск, 1992. – С. 95-93.

26. Бекиш О.-Я.Л. Цитогенетические изменения в клетках костного мозга белых крыс при трихинеллёзе различной степени тяжести/ О.-Я.Л. Бекиш, Л.В. Калинин, Л.А. Любаковская // Роль наследственных факторов в патогенезе заболевания человека: Сб. науч. тр. ВГМИ. – Витебск, 1992. –С. 73-78.

27. Бекиш О.-Я.Л. Свободнорадикальные процессы в системе паразит-хозяин при гельминтозах / О.-Я.Л.Бекиш, В.Я. Бекиш // Вестник ВГМУ.– 2003. –Т.2, №4. – С. 67-76

28. Бекиш О.-Я.Л. Особенности комбинированного лечения аскаридоза на основе учета первичных повреждений ДНК соматических и эмбриональных клеток хозяина / О.-Я.Л. Бекиш, В.Я. Бекиш, Л.Э. Бекиш и др. // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2010. – №11. – С.48-51.

29. Благов Н.А. Цитопатическое действие экстрактов и продуктов жизнедеятельности гельминтов на клеточные культуры / Н.А. Благов // Экология гельминтов. – Ярославль, 1981. – С. 3-12.

30. Блиева Л. З. Методы культивирования, индикации и идентификации вирусов/ Л. З. Блиева // Методические рекомендации по организации самостоятельного изучения курса «Общая вирусология». – Каб. – Балк. ун-т, Нальчик. – 2010. – 48с.

31. Бережко В.К. Иммунохимический анализ соматического экстракта из половозрелых *Dirofilaria immitis* / В.К. Бережко, К.А. Хайдаров, И.С. Дахно и др. // Матер. докл. научн. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – 2008. – вып. 9. – С. 69-73.

32. Бережко В.К. Иммунологический метод оценки зараженности рыбной продукции личинками *Anisakis simplex* / В.К. Бережко, Т.Н. Сивкова, А.В. Успенский и др. // Теория и практика борьбы с паразитарными

болезнями: материалы докл. Межд. Науч. Конф. – М., 2017. – Вып. 18. – С. 54-56.

33. Владимиров Ю.А. Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т.6, №9. – С. 2-9.

34. Вялова Г.П. Паразиты кеты и горбуши Сахалина: дисс. ...канд. биол. наук: 03.00.19 / Вялова Галина Петровна. – Южно-Сахалинск, 1999. – 211с.

35. Вялова Г.П. Распределение личинок *Anisakis simplex* в мускулатуре лососевых и особенности их локализации в популяциях горбуши / Г.П. Вялова // Известия ТИНРО. – 2002. – Т.133. – С.430-438.

36. Гаевская А.В. Анизакидные нематоды и заболевания, вызываемые ими у животных и человека. – Севастополь: ЭКОСИ – Гидрофизика, 2005. – 223 с.

37. Гиновкер А.Г. Хромосомные нарушения и иммунная реактивность золотистых хомячков, инвазированных *Opisthorchis felinus* / А.Г. Гиновкер, Н.Н. Ильинских, И.И. Шкурко // Паразитология. – 1981. – №1. – С. 63-68.

38. Гончаров С.К. Паразитоценоз ассоциативные паразитозы при энтероколитах у телят / С.К. Гончаров // III Всесоюзный съезд паразитоценологов. Тез. докладов. – Киев, 1991. – С. 40-45.

39. Гусев А.И. К технике постановки реакции микропреципитации в агаре. / А.И. Гусев, В.С. Цветков // Лаб. Дело. – 1961. – №2. – С. 43-45.

40. Даугалиева Э. Х. Иммунный статус и пути его коррекции при гельминтозах сельскохозяйственных животных / Э. Х. Даугалиева, В. В. Филиппов. – М.: Агропромиздат, 1991. – 188 с.

41. Денисенко О.В. Микробиоценоз кишечника людей с паразитарными заболеваниями / О.В. Денисенко, М.Н. Гапон, Э.А. Гаевая // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2012. – №3. – С. 43-44.

42. Дидяшина Л. Руководство по биологическому контролю при инкубировании яиц сельскохозяйственной птицы / Л. Дидяшина, Н. Позднякова, О. Главатских и др. Методические рекомендации. Гос. науч. учрежден. ВНИТИП Россельхозакадемии. Сергиев Посад. –2010. – 84 с.

43. Дубинина И.Н. Личиночные цестодозы, как причина окислительного стресса у животных / И.Н. Дубинина // Достижения и перспективы развития современной паразитологии: Труды V республиканской научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2006. – С. 418-421.

44. Дубинина М.Е. Ветеринарно-санитарная экспертиза различных видов рыб при анизакидозе: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.06, 03.00.19 / Дубинина Марина Евгеньевна. – Чебоксары, 2009. – 24 с.

45. Ершов В. С. Проблемы ветеринарной иммунологии / В. С. Ершов – М.: Агропромиздат, 1985. – С. 17–22.

46. Зайков С.В. Гельминтозы и аллергические заболевания / С.В. Зайков // Клин. Иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2009. – № 3/2. – С. 24–35.

47. Звержановский М.И. Паразитоценоз шакала (*Canis aureus L.*) с участием нематоды *Dirofilaria immitis* (Lecdy, 1856) в трофице – эпизоотологических цепях предгорной зоны Краснодарского края/ М.И. Звержановский, Н.Ю. Басова, А.В. Тулов // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2011. – №12. – С. 212-215.

48. Зорина В.В. Воздействие личинок аскарид на генетический аппарат эмбриональных клеток зародышей и соматических клеток самок мышей при беременности / В.В. Зорина, О.-Я.Л. Бекиш, В.Я. Бекиш // Паразитарные болезни человека, животных и растений: Труды VI Международной научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2008. – С. 233-238.

49. Зорина В.В. Воздействие мигрирующих личинок аскарид на геном хозяина при беременности / В.В. Зорина, О.-Я.Л. Бекиш, В.Я. Бекиш // Вестник ВГМУ. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 120–127.

50. Зорина В.В. Влияние сенсibilизации белковым соматическим продуктом из тканей аскарид на состояние генома самок крыс и их эмбрионов, а также на уровни пред- и постимплантационной гибели на разных стадиях развития / В.В. Зорина, В.Я. Бекиш // Труды VII Международной научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2010. – С. 124-128.

51. Зорина В.В. Окислительный стресс в клетках эмбрионов инвазированных аскаридами крыс во время беременности / В.В. Зорина, В.Я. Бекиш // Труды VII Международной научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2010. – С. 131-133.

52. Зорина В.В. Общие механизмы развития генотоксических, цитотоксических и эмбриональных эффектов инвазий гельминтами в экспериментах / В.В. Зорина, А.М. Субботин // Труды X Республиканской научно-практической конференции с международным участием. – Витебск: ВГМУ, 2016. – С. 84-88.

53. Ильинских Н.Н. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет/ Н.Н. Ильинских, И.Н. Ильинских, Е.Ф. Бочаров. – Новосибирск: Наука, 1986. – 250 с.

54. Ильинских И.Н. Инфекционная кариопатология / И.Н. Ильинских, В.В. Новицкий, Е.Н. Ильинских, и др. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2005. – 168 с.

55. Калинин Л.В. Микроядерный тест при экспериментальном трихинеллёзе / Л.В. Калинин // Роль наследственных факторов в патогенезе заболевания человека: сб. науч. тр. ВГМИ. – Витебск, 1992. – С. 66-72.

56. Карпухина О.В. Исследование металл-индуцированного окислительного стресса у одноклеточных организмов / О.В. Карпухина, К.З. Гумаргалиева, А.Н. Иноземцев // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11 (часть 4). – С. 671-674.

57. Катаева Л.В. Перспективы изучения закономерностей функционирования микропаразитоценозов человека / Л.В. Катаева, Т.Ф.

Степанова, Н.Ф. Нижегородцева и др. // Инфекция и иммунитет. – 2012. – №1–2. – С. 364-365.

58. Катаева Л.В. Микропаразитоценоз первых промежуточных хозяев *Opisthorchis felineus* / Л.В. Катаева, Т.Ф. Степанова // Теория и практика паразитарных болезней животных: Материалы докладов научной конференции. – М. – 2016. – №17. – С. 199-202.

59. Катков А.Е. Эндозоологические проблемы организма при паразитарной экспансии / А.Е. Катков, Е.М. Романова, Л.Р. Дебердеева // Вестник РУДН. Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2007. – №2. – С.6-12.

60. Кириченко Л.Г. Цитохимическая характеристика функциональной активности лейкоцитов при экспериментальном трихинеллёзе / Л.Г. Кириченко, К.Е. Парталого, А.В. Шевеленкова // Сборник трудов I Международной конференции по паразитологии. – Витебск, УР ВГМУ, 1999. – С. 57-59.

61. Киршенблат Я.Д. Телергоны-химические средства взаимодействия животных / Я.Д. Киршенблат. – М.: «Наука», 1974. – 126 с.

62. Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих / О.А. Ковалева // Цитология и генетика. – 2008. – № 1. – С. 58-72.

63. Колмогоров В.И. Микроядерный тест во время миграции личинок *Toxocara canis* у мышей линии СВА / В.И. Колмогоров // Тканевые гельминтозы: Труды науч.- практ. конф. – Витебск, 2000. – С. 148-152.

64. Колмогоров В.И. Повреждения генома хозяина при экспериментальном токсокарозе в зависимости от дозы введенного инвазионного материала при заражении / В.И. Колмогоров, В.Я. Бекиш // Современные проблемы общей, мед. и ветерин. Паразитологии: Тр. IV Международ. науч.-практ. конф. – Витебск, 2004. – С. 75-80.

65. Корнева Е.А. Нейрогуморальное обеспечение иммунного гомеостаза / Е.А. Корнева, В.М. Клименко, Э.К. Шхинек. – Л.: Наука, 1978. – 176 с.

66. Кравченко Н.А. Воздействие метаболитов власоглава на наследственный аппарат соматических клеток хозяина / Н.А. Кравченко, Д.К. Кужель, А.А. Беспалов и др. // Труды VII Международной научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2010. – С. 173-177.

67. Кравченко Н.А. Негативное влияние *Trichocephalus trichiurus* на организм хозяина / Н.А. Кравченко, В.Я. Бекиш // Труды X Республиканской научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ 2016. – С. 112-118.

68. Красникова Е.В. Влияние соматического экстракта *Fasciola hepatica* на состояние семенников лабораторных животных / Красникова Е.В., Сивкова Т.Н. // Сб. мат. науч. конф. «Естественные и математические науки в современном мире». – Новосибирск., 2015. №2(26). – 5 с.

69. Кужель Д.К. Повреждение генома хозяина при висцеральном токсокарозе / Д.К. Кужель, А.А. Беспалов, А.А. Кравченко // Труды VII Международной научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2010. – С. 165-169.

70. Кужель Д.К. Генотоксическое и цитотоксическое воздействие марит кошачьего сосальщика на соматические клетки хозяина / Д.К. Кужель, В.Я. Бекиш, В.В. Зорина // Вестник ВГМУ. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 106–115.

71. Кужель Д.К. Обнаружение окислительного стресса у золотистых хомяков инвазированных описторхисами в клетках печени / Д.К. Кужель, В.В. Зорина, А.А. Агеева и др. // Труды X Республиканской научно-практической конференции с международным участием. – Витебск: ВГМУ, 2016. – С. 119-123.

72. Кучбоев А.Э. Ультроструктурные исследования легких овей, зараженных протостронгилидами / А.Э. Кучбоев // Достижения и перспективы развития современной паразитологии: Труды V

республиканской научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2006. – С. 306-310.

73. Кучбоев А.Э. Действие гомогенатов разных фаз развития нематоды *Protostrongylus rufescens* (Leuckart, 1895) на митохондриальные и бислойные липидные мембраны / А.Э. Кучбоев, И. Казаков, М.И. Асраров и др. // Паразитология. – 2007. – Вып. 41, №1. – С. 65-71.

74. Логишинец И.А. Функциональная активность щитовидной железы при экспериментальном аскаридозе / И.А. Логишинец // Тканевые гельминтозы: диагностика, патогенез, клиника, лечение и эпидемиология: тр. науч. - практ. конф. – Витебск, 2000. – С. 32-35.

75. Логишинец И.А. Динамика функциональных изменений гипофизо-тиреоидной системы крыс линии Wistar при миграционном аскаридозе / И.А. Логишинец, О.-Я.Л. Бекиш // Эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика паразитарных заболеваний человека: тр. III междунар. науч.-практ. конф. – Витебск, 2002. – С. 156-161.

76. Логишинец И.А. Морфометрическая характеристика щитовидной железы у крыс, сенсibilизированных антигеном из аскарид свиньи / И.А. Логишинец // Достижения и перспективы развития современной паразитологии: Труды V республиканской научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2006. – С. 299-306.

77. Логишинец И.А. Влияние экспериментального аскаридоза на морфофункциональные показатели гипофизарно-тиреоидной системы / И.А. Логишинец // Труды VII Международной научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2010. – С. 170-173.

78. Мяндина Г. И. Медицинская паразитология. Учебное пособие / Г.И. Мяндина, Е.В. Тарасенко. — М.: Практическая медицина, 2013. – 256 с.

79. Никулин Ю.Т. Реактивные гистологические изменения в лимфатических узлах при экспериментальном токсокарозе / Ю.Т. Никулин // Труды VII Международной научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2010. – С. 162-165.

80. Пашинская Е.С. Воздействие трихинеллезной инвазии на геном хозяина при беременности / Е.С. Пашинская, В.Я. Бекиш, О.-Я.Л. Бекиш, В.В. Побяржин // Вестник ВГМУ, 2009.- Т.8, №4 – С. 144-152.

81. Пашинская Е.С. Влияние белкового секреторно-экскреторно-соматического продукта личинок трихинелл на беременных самок крыс и их эмбрионов / Е.С. Пашинская // Труды VII Международной научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2010. – С. 134-139.

82. Пашинская Е.С. Влияние белкового секреторно-экскреторно-соматического продукта личинок трихинелл на наследственный аппарат клеток самок крыс и их эмбрионов / Пашинская Е.С. // Ученые записки учреждения образования "витебская ордена "знак почета" государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2011. – Т. 47, №1. – С. 103-105.

83. Пашинская Е.С. Повреждения наследственного аппарата соматических и эмбриональных клеток хозяина при трихинеллезе во время беременности: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.11 / Екатерина Сергеевна Пашинская. – Витебск, 2012. – 16 с.

84. Перевозчикова Н.Г. Динамика клеточных преобразований в печени при экспериментальном ларвальном цестодозе / Н.Г. Перевозчикова, С.В. Костюкевич // Инфектология. – 2015. – Т.7, №3. – С. 69-70.

85. Побяржин В.В. Изменения микроядерного теста при экспериментальном гименолепидозе / В.В. Побяржин, В.Я. Бекиш // Современная паразитология: проблемы и перспективы: Труды научной конференции, посвященной 65-летию кафедры медицинской биологии и общей генетики ВГМУ. – Витебск: ВГМУ. – 1999. – С. 99-104.

86. Побяржин В.В. Влияние антигенов из тканей гельминтов на хромосомные наборы лимфоцитов человека *in vitro* / В.В.Побяржин, В.Я. Бекиш // Вестник ВГМУ. – 2003. – Т. 2, №2. – С. 73-79.

87. Поздняков С.Е. Гельминты скумбриеобразных рыб Мирового океана / С. Е. Поздняков. Владивосток: БПИДВО РАН, 1990. – 180 с.

88. Поздняков С.Е. О распределении личинок нематод *Anisakis simplex* в рыбе с различным типом накопления депозитного жира / С.Е. Поздняков, Г.В. Швыдкий, С.В. Михайлов // Паразитология. –1998. – №.4. – С. 368-372.

89. Присный А.В. Механизмы устойчивости инфузорий к химическим повреждениям и их преодоление летальными концентрациями синтетическими поверхностно активных веществ (СПАВ) / А.В. Присный, Ю.Л. Волынкин, Н.Н. Кампос // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2009. – №11. – С. 45-54.

90. Пушникова Г.М. О зараженности тихоокеанской сельди заливов Северо-Восточного Сахалина личинками нематод / Г.М. Пушникова, И.Г. Рыбникова // Научные труды Дальрыбвтуза. – Владивосток, 2012. – Т.25. – С. 19-22.

91. Пушникова Г. М., Рыбникова И. Г. Изменение зараженности тихоокеанской сельди личинками нематод от нереста к нагулу // Научные труды Дальрыбвтуза. – 2013. – Т.28. – С. 16-20.

92. Ройтман В.А. Трансграничное проникновение возбудителей опасных паразитов рыб в Российскую Федерацию. Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре // Сб. тезисов докладов научно-практической конференции 21-22 ноября 2000 г. – М., 2000. – С. 30-31.

93. Семенов В.М. Новые подходы к лечению висцерального токсокароза / В.М. Семенов, В.Я. Бекиш, Л.Э. Бекиш // Современные проблемы общей, мед. и ветерин. паразитологии: Труды науч. практ. конф. – Витебск, 2004. – С. 236-241.

94. Сергиев Ю.В. Паразитарные болезни человека / Ю.В. Сергиев, В.П. Лобзин, С.С. Козлова – С.- Пб., 2008. – 592 с.

95. Сергиев В.П. Анизакидоз – нарастающая социальная проблема / В.П. Сергиев, В.В. Горохов // Инфекционные болезни-новости, мнения, обучение // Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2014. – №1(6). – С. 57-60.

96. Сетарюк К. В. Влияние трихинеллезной инвазии мышей на митотическую активность клеток костного мозга и образование микроядер / К.В. Секретарюк, О.А. Сварчевский, В.В. Сتيبель и др. // Паразитарные болезни человека, животных и растений: Труды VI Междун. науч.-практ. Конф. – Витебск: ВГМУ, 2008. – С. 230-233.

97. Сивкова Т.Н. Кариопатическое действие соматического экстракта из личинок анизакид на клетки красного костного мозга мышей / Т.Н. Сивкова // Паразитарные болезни человека, животных и растений: Труды VI Международной научно-практической конференции (под ред. Член-корр. НАН Беларуси О.-Я.Л. Бекиша). – Витебск: ВГМУ. – 2008. – С. 220-222.

98. Сивкова Т.Н. Аллергенное и токсическое действие замороженных личинок анизакид на лабораторных животных // Российский паразитологический журнал. – 2009. – №1 – С. 58-61.

99. Сивкова Т.Н. Кариопатическое действие продуктов личинок анизакид на соматические и половые клетки крыс при пероральном введении / Т.Н. Сивкова // Теория и практика паразитарных болезней животных: Материалы докладов научной конференции. – М. – 2009. – С. 366-370.

100. Сивкова Т.Н. Иммунохимический анализ соматического экстракта *Anisakis simplex* / Т.Н. Сивкова // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: Материалы докладов научной конференции. – М. – 2009. – С. 370-372.

101. Сивкова Т.Н. Получение и характеристика антигенов гельминтов: учебно-методическое пособие / сост. Т.Н. Сивкова, Пермь: М-во с.-х. РФ, ФГОУ ВПО «Пермская ГСХА» – Пермь: Изд-во ФГОУ ВПО «Пермская ГСХА», 2009. – 14 с.

102. Сивкова Т.Н. Кариопатические и патоморфологические изменения под действием продуктов метаболизма паразитов и влияние на репродуктивную функцию домашних плотоядных / дисс. ... докт. биол. наук. 03.00.19. Сивкова Татьяна Николаевна – М. – 2010. – 245 с.

103. Сивкова Т.Н. Кариопатическое и патоморфологическое действие продуктов метаболизма личинок анизакид: монография / Т.Н. Сивкова, В.К. Бережко. – Пермь: ФГОУ ВПО Пермская ГСХА, 2011. – 132 с.

104. Соловьева Г.Ф. Два случая обнаружения личинок *Anisakis simplex* (*ASCARIDINA, ANISAKIDAE*) в желудке у человека / Г.Ф. Соловьева, Н.А. Таран // Известия Тихоокеанского научно-исследовательского центра. – 2000. –Т.127. – С. 590-592.

105. Степанова Т.Ф., Подклетнова Л.Ф. Паразитоценотические аспекты инвазионно-инфекционной патологии (описторхоз и туберкулез) // Тюмень. – 2002. – 112 с.

106. Степанов А.В. Микроядерный тест при экспериментальном трихоцефалезе / А.В. Степанов // Роль наследственных факторов в патогенезе заболевания у человека: сб. науч. тр. ВГМИ. – Витебск, 1992. –С. 79-84.

107. Степанов А.В. Влияние трихоцефалезной инвазии на состояние наследственного аппарата соматических клеток хозяина / А.В. Степанов, О.-Я.Л. Бекиш // Актул. пробл. медицин. и ветеринар. паразитологии. – Витебск, 1993. – С. 73-74.

108. Степанов А.В. Влияние трихоцефалезной инвазии и метаболитов паразита на кариотип соматических клеток хозяина: автореф. дисс. ...канд. мед. наук: 03.00.19 / Александр Владимирович Витебский медицинский институт – Витебск, 1995. – 21 с.

109. Стибель В.В. Метаболиты нематод как мутагены соматических клеток / В.В. Стибель // Достижения и перспективы развития современной паразитологии: Труды V республиканской научно-практической конференции. – Витебск: ВГМУ, 2006. – 498 с.

110. Струков А. И. Патологическая анатомия / А. И Струков, В.В. Серов. – М.: Литтерра, 2010. – 880 с.: ил

111. Третьяков А.М. Бактерионосительство гельминтами и влияние антгельминтиков на микробный статус организма животных (жкт): дисс.

...канд. вет. наук: 16.00.03 / Третьяков Алексей Михайлович. – Улан-Удэ. – 2001. – 160с.

112. Трунова А. Особенности развития и иммуногенез куриного эмбриона под влиянием амброзийного антигена: автореф. дисс. ... канд. биол. Наук 03 00 30 / Анастасия Петровна Трунова. – Ставрополь. – 2008. – 22с.

113. Хантов Р. М. Экологическая иммунология / М.Р. Хантов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов. – М.: Медицина, 1995. – 219с.

114. Худолей В.В. Современные представления о метаболической активации канцерогенов и факторах, ее модифицирующих / В.В. Худолей, И.Г. Майорова // Успехи совр. биологии. – 1998. – М.: Наука. – Т.105, Вып.3. – С. 450-466.

115. Черемных Е. Г. Биотестирование пищевых добавок на инфузориях / Е. Г. Черемных, А. В. Кулешин, О. Н. Кулешина // Вестник РУДН. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2011. – №3. – С. 5-12.

116. Чебышев Н.В. Гельминтозы: органно-системные процессы в их патогенезе и лечении / Н.В. Чебышев, Ю.К. Богоявленский, Е.А. Гришина. – М.: Медицина, 1998. – 240 с.

117. Фролова С.Е. Зараженность кеты юга Сахалина личинками нематод *Anisakis spp.* / С.Е. Фролова // Современные проблемы теоретической и морской паразитологии: сборник научных статей / ред.: К.В. Галактионов, А.В. Гаевская. – Севастополь: Изд-ль Бондаренко Н.Ю., 2016. – С. 229-231.

118. Фролова Т.В. Инактивация протеолитических ферментов цестодой *Triaenophorus nodulosus* / Т.В. Фролова, Г.И. Извекова // Современные проблемы теоретической и морской паразитологии: сборник научных статей. – Севастополь, 2016. – С. 132-134.

119. Якубовский М.В. Современные проблемы иммунологии гельминтозов / М.В. Якубовский, Г.Н. Чистенко, В.Н. Горбачева и др. // Медицинские новости. – 1997. – №4. – С. 11-15.

120. Codex Committee on Fish and Fishery Products (2004). Standard for salted Atlantic herring and salted sprat. Codex STAN, P. 244.

121. Adams M.R. Food Microbiology / M.R. Adams, M.O. Moss // (3rd ed.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. – 2008. – P. 463.

122. Alonso-Gómez A. *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract / A. Alonso-Gómez, A. Moreno-Ancillo, M.C. López-Serrano [et al.] // Parasitol. Res. – 2004. –Vol. 93. – P.378-384.

123. Anadón A.M. The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections / A.M. Anadón, F. Romarís, M. Escalante, E. Rodrigues, T. Garate, C. Cuellas, F.M. Uberira // Clinical and Experimental Immunology. – 2009. – Vol.156, N3. – P. 471-478.

124. Añibarro B., Seoane F.J. Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex* // J. Allergy Clin. Immunol. – 1998. – Vol.102. – P. 331-332.

125. Arcos S.C. Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex sensu stricto* and *A. pegreffii* / S.C. Arcos, S. Ciordia, L. Roberston [et al.] // Proteomics. – 2014. – Vol.14, N.12. – P. 1547-1568.

126. Arlian L.G., Morgan M.S., Quirce S., Maranon F., Fernandez-Caldas E. Characterization of allergens of *Anisakis simplex* // J. ALLERGY, Munksgaard International Publishers. – 2003. –Vol. 58, N12. – P. 1299-1303

127. Armentia A., Lombardero M., Callejo A., Martín Santo J.M., Martín Gil F.J., Vega J., Arranz M.L., Martínez C. Occupational asthma by *Anisakis simplex* // J. Allergy Clin. Immunol. – 1998. – Vol. 102. – P. 831-834.

128. Armentia A., Callejo A., Vega J.M., Martínez C. *Anisakis* allergy after eating chicken meat // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. – 2006. – N.16. –P. 258-263.

129. Arrieta I., Del Barrio M., Vidarte L., Del Pozo V., Pastor C., González-Cabrero J., Cardaba B., Rojo M., Miñiguez A., Cortegano I., Gallardo

S., Aceituno E., Palomino P., Vivanco F., Lahoz C. Molecular cloning and characterization of an IgE-reactive protein from *Anisakis simplex*: *Ani s 1* // Mol. Biochem. Parasitol. –2000. – Vol.107. – P. 263-268.

130. Asturias J.A., Eraso E., Martinez A. Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform// Molecular and biochemical parasitology. – 2000. – Vol.108. – P. 263-267.

131. Audicana M.T., Fernandez de Corres L., Munoz D., Fernandez E., Navarro J.A., Del Pozo M.D. Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish // J. Allergy ClinImmunol. – 1995. – Vol. 96. – P. 558-560.

132. Audicana M.T. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity / Audicana M.T., Kennedy M.W. // Clin Microbiol Rev. – 2008. – N.21. – P.360-379.

133. Babior B.M. Membranotoxic and cytotoxic effect of activated oxygen species / B.M. Babior // Blood. – 1984. – Vol. 64, N5. – P. 959-966.

134. Baeza M.L., Zubeldia J.M., Rubio M. *Anisakis simplex* allergy // ACI International. – 2001. – Vol.13. – P. 242-249.

135. Baeza M.L. Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex*/ M.L. Baeza // Clinical &experimental allergy. – 2004. – Vol. 34, N2. – P.269 - 302.

136. Baird F., Gasser R., Jabbar A., Lopata A.L. Foodborne *anisakiasis* and allergy // Mol Cell Probes. – 2014. – Vol.28, N4. – P. 167-174.

137. Bekish V.J. The alterations in genetic apparatus of somatic and generative cells of the host caused by helminths metabolites / V.J. Bekish // Wiad Parazytol. – Vitebsk: VSMU. –2001.– Vol. 47(4). –P. 891-896.

138. Bernardini R., Mistrello G., Novembre E., Roncarolo D., Zanotta S., Lombardi E. et al. Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis simplex* and *Dermatophagoides pteronyssinus* // Int. J. Immunopathol Pharmacol. – 2005. – Vol.18, N.4. – P. 671-675.

139. Bilaska-Zajac E., Lalle M., Rózycki M., Chmurzyńska E., Kochanowski M., Karamon J., Sroka J., Pozio E., Cencek T. High prevalence of *Anisakidae*

larvae in marketed frozen fillets of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) // Article in Food Control. – 2016. – Vol.68. – P. 216-219.

140. Blaszkowska J. Embryotoxic and teratogenic action of trypsin inhibitor of *Ascaris lumbricoides* in mice / J. Blaszkowska // Acta Parasitologica. – 1998. – Vol. 43(2). – P. 103-108.

141. Blaszkowska J. The effect of *Ascaris suum* homogenate and its proteolysis inhibitors on chicken embryos / J. Blaszkowska // Helminthologia. – 1998. – Vol. 35. – P. 37-42.

142. Blaszkowska J. The effect of *Ascaris* tegumental homogenate and the alpha-chymotrypsin inhibitor isolated from the nematode on mouse pregnancy / J. Blaszkowska // Helminthologia. – 1999. – Vol.36. – P. 225-34.

143. Blaszkowska J. Disturbance of mouse pregnancy after injection of *Ascaris* homogenate during early organogenesis / J. Blaszkowska // Wiad. Parazytol. – 2000. – Vol. 46, N 3. – P. 369-378.

144. Blaszkowska J. Prenatal toxicity of *Ascaris* pepsin inhibitor in mice / J. Blaszkowska // Reprod. Toxicol. – 2008. – Vol. 25, N2. – P. 263-270.

145. Boczon K. Inducible nitric oxide synthase in the muscles of *Trichinella* sp. - infected mice treated with glucocorticoid methylprednisolone / K. Boczon, B. Wargin // Compr. Parasitol. – 2000. – Vol.67, N2. – P. 230-235.

146. Caballero M.L. Specific IgE determination to *Ani s 1*, a major allergen from *Anisakis simplex*, is a useful tool for diagnosis / M.L. Caballero, I. Moneo // Ann Allergy Asthma Immunol. – 2002. – Vol.89. – P. 74-77.

147. Caballero M.L. Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments / M.L. Caballero, I. Moneo // Parasitol Res. – 2004. – Vol.93, N3. – P. 248-251.

148. Caballero M.L. Isolation of *Ani s 5*, an excretory-secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis* larvae sensitization / M.L. Caballero, I. Moneo, F. Gómez-Aguado, M.T. Corcuera, I. Casado, R. Rodríguez-Pérez // Parasitol Res. – 2008. – Vol.103. – P.1231-1233.

149. Caballero M. *Anisakis* allergy component-resolved diagnosis: clinical and immunologic differences between patients from Italy and Spain / M. Caballero, R. Asero, L. Antonicelli // Int. Arch Allergy Immunol. – 2013. – Vol.162. – P. 39-44.
150. Campos M. Detection of circulating antigens in experimental anisakiasis by two-site enzyme-linked immunosorbent assay / M. Campos, L. Martín, V. Díaz, I. Mañas, B. Morales, J. Lozano // Parasitol Res. – 2004. –Vol.93, N6. – P. 433-438.
151. Carballeda-Sangiao N. Identification of autoclave-resistant *Anisakis simplex* allergens / N. Carballeda-Sangiao, F. Olivares, A.I. Rodriguez-Mahillo, M. Careche, M. Tejada, O.I. Mone, M. González-Muñoz // J. Food Prot. – 2014. –Vol. 77, N4. –P. 605-609.
152. Carretero A. P. Protein contact dermatitis caused by *Anisakis simplex* / A.P. Carretero, C.J. Blanco, G.F. García, D.M. Marcos, G.L. Alonso, S.M. Garcés, G.R. Perez, P.S. Juste, O.M.C. Gutierrez // Contact Dermatitis. – 1997. –Vol. 37, I.5. – P. 247.
153. Carretero P. Anaphylaxis after a prick test to *Anisakis simplex* / P. Carretero, C. Rivas, P. Todo, B. Gómez, C. Núñez, E. Alday, I. Moneo // Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin. – 1998. – Vol. 13. – P. 226-228.
154. Cattan P.E. A study migration of larval *Anisakis simplex* (Nematoda: *Askaridida*) in the Chilean hake, *Merluccius gayi* (Guichenot) / P.E. Cattan, I.J. Carvaja // J. Fish. Biol. – 1984. – Vol. 24, N 6. – P. 649-654.
155. Conde-Salazar L. M., González A., Guimaraens D. Type I and type IV sensitization to *Anisakis simplex* in 2 patients with hand eczema // Contact Dermatitis. – 2002. – Vol.46. – P. 361.
156. Cuéllar C. Effects of *Anisakis simplex* on nitric oxide production in J 774 macrophages / C. Cuéllar, M.J. Perteguer, B. De Las Heras // Scand J. Infect Dis. – 1998. – Vol.30. –P.603–606.

157. D'amico P., Malandra R., Costanzo F., Castigliero L., Guidi A., Gianfaldoni D. et al. Evolution of the *Anisakis* risk management in the European and Italian context // Food Res Int. – 2014. – Vol.64. – P. 348-362.

158. Daschner A., Cuellar C., Rodero M. The *Anisakis* allergy debate: Does an evolutionary approach help? // Trends in Parasitology. – 2012. – Vol.28, N1. – P. 9-15.

159. Del Rey Moreno A. Sensitization to *Anisakis simplex*. l. in a healthy population / A. Del Rey Moreno, A. Valero, C. Mayorga // Acta Trop. – 2006. – Vol.97. – P. 265-269.

160. Deardorff T.L. Adherence of eosinophils to the epicuticle of infective juveniles of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) / T.L. Deardorff, R.E. Jones, S.G. Kayes // J. Helminthol Soc. Wash. – 1999. – Vol.58. – P. 131-137.

161. Duell T. Effect of activated oxygen species in human lymphocytes / T. Duell, E. Lengfelder, R. Fink [et al.] // Mutat. Res. DNA Repair. – 1995. – Vol. 336(1). – P. 29–38.

162. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products // J. EFSA. – 2010. – N.8. – P. 1543–1634.

163. European Commission. Regulation (EC) No 853 / 2004 laying down specific hygiene rules for the hygiene of foodstuffs // Official J. of the European Union. – 2004. – Vol.139. – P. 113.

164. Espinoza E.Y. In vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase decreases lung injury induced by *Toxocara canis* in experimentally infected rats / E.Y. Espinoza, J.L. Perez-Arellano, C. Carranza [et al.] // Parasite Immunol. – 2002. – Vol.24, N11 (12). – P. 511-520.

165. Fæste C.K. Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex* / C.K. Fæste, K.R. Jonscher, M. Dooper [et al.] // EuPA Open Proteomics. – 2014. – N 4. – P. 140-155.

166. Fæste C.K. Fish feed as source of potentially allergenic peptides from the fish parasite *Anisakis simplex* (S.L.) / C.K. Fæste, C. Plassen, E. Egaas [et al.]

// Animal feed science and technology. Elsevier Science Publishing Company, Inc.  
– 2015. – Vol. 202. – P. 52-61.

167. Faulkner H. Age- and infection intensity-depedent cytokine and antibody prodyktion in human trichuriasis: the importance of IgE / H. Faulkner, J. Turner, J. Kamgno [et al.] // J. Infect. Dis. – 2002. –Vol.185, N5. –P. 665-672.

168. Fitzsimmons C.M., Falcone F.H., Dunne D.W. Helminth Allergens, Parasite-Specific IgE, and Its Protective Role in Human Immunity // Front Immunol. – 2014. – Vol. 14, N5. – P. 1-12.

169. Gani F., Lombardi C., Senna G., Mezzelani P. [*Anisakiasis*: a borderline disorder] // Recenti Prog. Med. – 2001. – Vol.92, N4. – P. 302-306.

170. García M, Moneo I, Audicana, M, Fernandez de Corres, L., Del Pozo M.D., Curiel G. Study of thermostability of an *Anisakis simplex* extract // Allergy. – 1996. – Vol. 51, P. 139.

171. García M. The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy / M. García, I. Moneo, M.T. Audicana [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 1997. – Vol. 99. – P. 497-501.

172. García F., Blanco J.G., Garcés M., Juste S., Fuentes M., Herrero D. Freezing protects against allergy to *Anisakis simplex* // J. Investig Allergol Clin Immunol. – 2001. –Vol. 11. – P. 49-52.

173. Gómez-Aguado F., Picazo A., Caballero M.L., Moneo I., Asturias J. A., Corcuera M.T., Casado I., Alonso M.J. Ultrastructural localization of *Ani s 1*, a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex* // Parasitology research. – 2003. – Vol.89, N 5. – P. 379-380.

174. Guarneri F. Diseases caused by *Anisakis simplex*: Debates and perspectives // J. Annaliitaliani di dermatologiaclinica e sperimentale, Pensiero Scientifico Editore srl. – 2003. –Vol.57, N1. – P.13-23.

175. Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S. Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of *Ani s 2* and *Ani s 3* // Int J. Dermatol. – 2007. –Vol.46. – P.146-150.

176. Hamada F.M. The mutagenic effect of praziquantel in *S. mansoni*-infected mice / F.M. Hamada, A. Abdel-Aziz, F. Badr [et al.] // Arab. J. Lab. – 1992. – Vol.18. – P.301-311.

177. Hawley J.H. *Ascaris suum*: Are trypsin inhibitors involved in species specificity of *ascarid* nematodes? / J.H. Hawley, A.J. Peanasky // Exp. Parasitol. – 1992. – Vol. 75, Is. 1. – P. 112-118.

178. Headley S.A. *Neorickettsia helminthoeca* in Brazilian dogs: a cytopathological, histopathological and immunohistochemical study / S.A. Headley, F.S. Kano, D.G. Scorpio [et al.] // Clinical Microbiology and Infection. – 2009. – N.2. – P. 21-24.

179. Herrera L.A. Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients / L.A. Herrera, T. Ramires. U. Rodriguez [et al.] // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2000. – Vol.94, N1. – P. 61-65.

180. Hochberg N. *Anisakidosis*: Perils of the Deep / N. Hochberg, D. Hamer // Clin. Infect. Dis. – 2010. – N.51. – P. 806-812.

181. Hwang Y.K. Human *anisakiasis*: diversity in antibody response profiles to the changing antigens in larval excretions / secretions / Y.K. Hwang, J.S. Kim, J.B. Lee // Parasite Immunol. – 2003. – N 2. – P. 1–7.

182. Iglesias R. Antigenic cross-reactivity in mice between 3rd-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes / R. Iglesias, J. Leiro, I. Navarrete [et al.] // Parasitology research. – 1996. – Vol.8, I.4. – P. 378-381.

183. Iglesias R. Monoclonal antibodies against diagnostic antigens / R. Iglesias, J. Leiro, M.T. Santamarina, M. L. Sanmartín, F.M. Ubeira // Parasitol. Research – 1997. – Vol.83 (8). – P. 755-761.

184. Jeong K.Y., Hong C.S., Yong T.S. Allergenic tropomyosins and their cross-reactivities // Protein Pept. Lett. – 2006. – Vol.13, N8. – P. 835-845.

185. Johansson E. Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Dermatophagoides pteronyssinus* / E. Johansson,

M. Aponno, M. Lundberg, M. Van Hage-Hamsten // *Allergy*. – 2001. – Vol.56. – P. 660-666.

186. Kadlubowski R. Teratogenic action of alpha-chymotrypsin inhibitor of *Ascaris lumbricoides* in mice / R. Kadlubowski // *Med. Dosw. Mikrobiol.* – 1993. – Vol. 45, N3. – P. 401-405.

187. Karasawa Y., Karasawa G., Kamiya K., Hoshi K. Current situation of *anisakiasis*: the second national survey // *Nihon IjiShimpo.* – 2008. – N.4386. – P. 68-74.

188. Kennedy M.W. Immune response to *Anisakis simplex* and other *ascarid* nematodes // *Allergy*. – 2000. – Vol. 55. – P. 7-13.

189. Kim J.S. Immunochemical and biological analysis of allergenicity with excretory-secretory products of *Anisakis simplex* third stage larva / J.S. Kim, K.H. Kim, S. Cho, H.Y. Park, S.W. Cho, Y.T. Kim [et al.] // *Int. Arch Allergy Immunol.* – 2005. – Vol.136. – P. 320-328.

190. Kim B.J. Expression and Characterization of  $\alpha$ -Methylacyl CoA Racemase from *Anisakis simplex* larvae / B.J. Kim, S.M. Kim, M.K. Cho, H. S. Yu [et al.] // *Korean J. Parasitol.* – 2012. – Vol.50, N.2. – P. 165-171.

191. Knox D.P. Proteinase inhibitors and helminth parasite infection / D.P. Knox // *Parasite Immunol.* – 2007. – Vol. 29, Is. 2. – P. 57-71.

192. Kobayashi Y. Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex* / Y. Kobayashi, K. Shimakura, S. Ishizaki, Y. Nagashima [et al.] // *Mol. Biochem.Parasitol.* – 2007. – Vol.155, N2. –P. 138-145.

193. Kobayashi Y. Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex* / Y. Kobayashi, S. Ishizaki, K. Shimakura, Y. Nagashima [et al.] // *Parasitol Res.* – 2007. –Vol.100. – P. 1233-1241.

194. Lee D. L. *Trichinella spiralis*: antigenic epitopes from the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and cytoplasm of the parasitised muscle fibre (nurse cell) of the host / D. L. Lee [et al.] // *Parasitology.* – 1991. – Vol. 102. – P. 1117-1123.

195. Lin A.H. IgE sensitisation to the fish parasite *Anisakis simplex* in a Norwegian population: a pilot study / A.H. Lin, E. Florvaag, T. Van Do, S.G. Johansson [et al.] // Scand J. Immunol. – 2012. – Vol.75. – P. 431-435.
196. Llarena-Reino M.G.Á. The accuracy of visual inspection for preventing risk of *Anisakis spp.* infection in unprocessed fish / M.G.Á. Llarena-Reino, C. Vello, L. Outeiriño [et al.] // Food Control. – 2012. – Vol.23 (1). – P.54-58.
197. Lopez I., Pardo M.A. A phage display system for the identification of novel *Anisakis simplex* antigens // Journal of immunological methods. – 2011. – Vol. 373, N10. – P. 247-251.
198. Lopez-Serrano M.C. Gastroallergic *anisakiasis*: findings in 22 patients / M.C. Lopez-Serrano, A.A. Gomez, A. Daschner, A. Moreno-Ancillo [et al.] // J. Gastroenterol Hepatol. – 2000. – Vol.15. – P. 503-506.
199. Lorenzo S. Analysis of the antigenicity in mice of biotinyl enzymes from *Anisakis simplex* and other nematodes / R. Iglesias, E. Paniagua // Parasitol Res. – 1999. – Vol. 85(6). – P. 441-445.
200. Łopieńska-Biernat E., Zóltowska K., Rokicki J. Glycogen catabolism enzymes and protein fractions in the third and fourth larval stages of *Anisakis simplex*. Journal of Helminthology. – 2008. – Vol. 82(1). – P. 45–51.
201. Mac Lea K. S. A family history of deoxyribonuclease II: surprises from *Trichinella spiralis* and *Burkholderia pseudomallei* / K. S. MacLea, R. J. Krieser, A. Eastman // Gene. – 2003. – Vol. 13, N 305(1). – P. 1-12.
202. Mak C. H. Characterization of endonuclease activity from excretory/secretory products of a parasitic nematode, *Trichinella spiralis* / C.H. Mak, R. C. Ko // Eur. J. Biochem. – 1999. – Vol. 260, N 2. – P. 477-481.
203. Mak C.H. Single-stranded endonuclease activity in the excretory-secretory products of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* / C.H. Mak, Y.Y. Chung, R.C. KO // J. Parasitology, Cambridge University Press. – 2000. – Vol. 120, N5. – P. 527-533

204. Mak C. H. DNA-binding activity in the excretory-secretory products of *Trichinella pseudospiralis* (Nematoda: *Trichinelloidea*) / C. H. Mak, R. C. Ko // *Parasitology*. – 2001. – Vol. 123. – P. 301-308.
205. Mari A., Rasi C., Palazzo P., Scala E. Allergen databases: current status and perspectives // *Curr Allergy Asthma Rep.* – 2009. – Vol.9, N 5. – P. 376-383.
206. Martinez J. Oxidative and cold shock cause enhanced induction of a 50 kDa stress protein in *Trichinella spiralis* / J. Martinez [et al.] // *Parasitol Res.* – 2002. – Vol. 88. – P.427-430.
207. Messina C.M. *Anisakis pegreffii* (Nematoda: *Anisakidae*) products modulate oxidative stress and apoptosis-related biomarkers in human cell lines / C.M. Messina, F. Pizzo, A. Santulli, I. Bušelić, M. Boban, S. Orhanović, I. Mladineo // *Parasit Vectors*. – 2016. – Vol. 25, N9 (1). – P. 607.
208. Moneo I. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex* / I. Moneo, M.L. Caballer, F. Gómez [et al.] // *J. Allergy ClinImmunol.* – 2000. –Vol.106. – P.177-182.
209. Moneo I. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex* / I. Moneo, M.L. Caballero, González-Muñoz [et al.] // *Parasitol Res.* – 2005. –Vol.96, N5. – P. 285-289.
210. Moneo I. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex* / I. Moneo, M.L. Caballero, González-Muñoz // *Parasitol Res.* – 2005. – Vol.96, N5. – P. 285-289.
211. Mott J.L. Oxidative stress is not an obligate mediator of disease provoked by mitochondrial DNA mutations / J.L Mott, D. Zhang, M. Stevens [et al.] // *Mutat. Res. Fund. and Mol. Mech. of Mutagen.* – 2001. – Vol. 474, N12. – P. 35-45.
212. Nieuwenhuizen N.E., Lopata A.L. *Anisakis*-a food-borne parasite that triggers allergic host defences // *Int J. Parasitol.* – 2013. – Vol. – 43, N43 (12). – P. 1047-1057.

213. Nieuwenhuizen N., Lopata A. Allergic reactions to *Anisakis* found in fish // *Curr Allergy Asthma Rep.* – 2014. – Vol.14, N8. – P. 455.
214. Ohshima T. *Anisakis* and *anisakiasis* in Japan adjacent areas / T. Ohshima // *Prog. Med. Parasitol. Jpn.* – 1972. – Vol.4. – P. 305-393.
215. Ohshima H. Increased nitrosamine and nitrate biosynthesis mediated by nitric oxide synthase induced in hamsters infected with liver fluke (*Oplsthorchis viverrini*) / H. Ohshima, T.Y. Bandaletova, I. Brouet // *Carcinogenesis.* – 1994. – Vol. 15, N2. – P. 271-275.
216. Pappas P.W. *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) liberates an inhibitor of proteolytic enzymes during in vitro incubation / P.W. Pappas, G.L. Uglem // *Parasitology.* – 1990. – Vol. 101, Is. 3. – P. 455-464.
217. Park S. K. Macrophage Migration Inhibitory Factor Homologs of *Anisakis simplex* Suppress Th2 Response in Allergic Airway Inflammation Model via CD4CD25Foxp3 T Cell // S. K. Park, M.K. Cho, H.-K. Park, K.H. Lee [et al.] // *Journal of Immunology.* – 2009. – Vol.182. – P. 6907-6914.
218. Perez-Perez J. Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex* / J. Perez-Perez, E. Fernandez-Caldas, F. Maranon [et al.] // *International archives of allergy and immunology.* – 2000. – Vol.123. – P.120-129.
219. Perteguer M.J. Cellular immune responses in mice immunized with *Anisakis simplex* larval antigens / M.J. Perteguer, M. Rodero, J.M. Flores [et al.] // *Parasitol Res.* – 2001. – Vol. 87(5). – P. 396-404.
220. Petithory J.C. [New data on *anisakiasis*] // *Bull Acad Natl Med.* – 2007. – Vol.191, N1. – P.53-66.
221. Pravettoni V. *Anisakis simplex*: current knowledge / V. Pravettoni, L. Primavesi, M. Piantanida // *European annals of allergy and clinical immunology.* – 2012. – Vol.44, N 8. – P. 150-156.
222. Prester L. Seafood Allergy, Toxicit, and Intolerance: A Review // *J. Am Coll Nutr.* – 2015. – Vol.7. – P. 1-13.
223. Purello-D'Ambrosio Incidence of sensitivity to *Anisakis simplex* in a risk population of fishermen/fishmongers / F. Purello-D'Ambrosio, E. Pastorello, S.

Gangemi, G. Lombardo [et al.] // Ann Allergy Asthma Immunol. – 2000. – Vol.84, N4. – P. 439-444.

224. Raybourne R., Desowitz R.S., Kliks M.M., Deardorff T.L. *Anisakis simplex* and *Terranova sp.*: inhibition by larval excretory-secretory products of mitogen-induced rodent lymphoblast proliferation // Exp. Parasitol. – 1983. – N55. – P.289-298.

225. Raybourne R., Deardorff T.L., Bier J.W. *Anisakis simplex*: larvas excretory secretory protein production and cytostatic action in mammalian cell cultures // Exp. Parasitol. – 1986. – N62. – P.92-97.

226. Rodero M. Western blot antibody determination in sera from patients diagnosed with *Anisakis* sensitization with different antigenic fractions of *Anisakis simplex* purified by affinity chromatography / M. Rodero, C. Cuellar, T. Chivato // J. Helminthol. – 2007. – Vol.81. – P.307-310.

227. Rodríguez E. A recombinant enolase from *Anisakis simplex* is differentially recognized in natural human and mouse experimental infections / E. Rodríguez, F. Romarís, S. Lorenzo // Med. Microbiol. Immunol. – 2006. – Vol.195, N3, I.1. – P.1-10.

228. Rodríguez E. Novel sequences and epitopes of diagnostic value derived from the *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen / E. Rodríguez, A.M. Anadón, E. García-Bodas, F. Romarís [et al.] // Allergy. – 2008. – Vol.63. – P.219-25.

229. Rodríguez G.C. Hidden allergens: a challenge for allergists / G.C. Rodríguez, J. Borja, B. Bartolomé, G.E. Torrijos [et al.] // Ann Allergy Asthma Immunol. – 2016. – Vol. 116, I1. – P. 85–86.

230. Rodríguez-Mahillo A.I. Cloning and characterization of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor / A.I. Rodríguez-Mahillo, M. González-Muñoz, F. Gómez-Aguado, R. Rodriguez-Perez [et al.] // Int. J. Parasitol. – 2007. – Vol. 37, N 8-9. – P. 907-917.

231. Rodríguez-Mahillo A.I. Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion / A.I.

Rodríguez-Mahillo, M. González-Muñoz, I. Moneo, M.T. Solas [et al.] // J. Food Prot. – 2008. – Vol.71, N12. – P. 2578-2581.

232. Rodríguez-Mahillo A.I. Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle / A.I. Rodríguez-Mahillo, M. González-Muñoz, C. De Las Heras, M. Tejada [et al.] // Foodborne Pathog Dis. – 2010. – N7 (8). – P. 967-973.

233. Rodriguez-Perez R., Caballero M.L., Gonzalez-Munoz M. Cloning and expression of a biologically active *Anisakis simplex* allergen *Ani s 1* in the yeast *Pichiapastoris* // Mol. Biochem. Parasitol. – 2007. –Vol. 154. – P.115-118.

234. Rodriguez-Perez R., Moneo I., Rodriguez-Mahillo A., Caballero M.L. Cloning and expression of *Ani s 9*, a new *Anisakis simplex* allergen // Mol. Biochem. Parasitol. – 2008. –Vol.159, N2. – P. 92-97.

235. Rosales M. J. Acute intestinal anisakiasis in Spain: a fourth-stage *Anisakis simplex* larva / M. J. Rosales, C. Mascaró, C. Fernandez, F. Luqu // Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. –1999. – Vol.94, N6. – P. 823-826.

236. Rosin M.P. Inflammation, chromosomal instability, and cancer: The schictosomal model / M.P. Rosin, W.A. Anwar, A.Ward // Canser res. –1994.– Vol.54, N7. – P. 1929-1933.

237. Saito W. Pulmonary *anisakiasis* presenting as eosinophilic pleural effusion / W. Saito, K. Kawarami, R. Kuroki, H. Matsio, K. Oishi [et al.] // Respirology. – 2005. – Vol.10, N2. – P. 261-262.

238. Sakanari J.A. Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes / J.A. Sakanari, C.E. Staunton, A. E. Eakin [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA . – 1989. – Vol. 86. – P. 4863-4867.

239. Sakanari J.A. *Anisakiasis* / J.A. Sakanari, J.H. McKerrow // Clin Microbiol Rev. – 1989. – Vol.2, N3. – P. 278-284.

240. Sakanari J. A. Identification of the secreted neutral proteases from *Anisakis simplex* / J. A Sakanari, J.H. Mc Kerrow // J. Parasitol. – 1990. – N76. – P. 625-630.

241. Sastre J. A double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite, *Anisakis simplex* / J. Sastre, M. Lluch-Bernal, S. Quirce [et al.] // *Allergy*. – 2000. – Vol.55. – P. 560-564.
242. Shimakura K. Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex* / K. Shimakura, H. Miura, K. Ikeda [et al.] / *Molecular and biochemical parasitology*. – 2004. – Vol.135. – P. 69-75.
243. Shubber E.K. Cytogenetic studies on blood lymphocytes from patients with *Schistosoma mansoni* / E.K. Shubber, H. Salih // *Jap. J. Med. Sci. and Biol.* – 1987. – Vol. 40, N4. – P.137-145.
244. Smith J. W., Wooten R. *Anisakis* and *Anisakiasis* // *Adv. Parasitol.* – 1984. – Vol. 16. – P. 93-166
245. Solas M.T. *Anisakis* antigens detected in fish muscle infested with *Anisakis simplex* L3/ M.T. Solas, M.L. García, A.I. Rodríguez-Mahillo // *J. Food Prot.* – 2008. – Vol.71, I.6. – P. 1273-1276.
246. Solas M.T. *Anisakis simplex* antigens in fresh and frozen-thawed muscle of anchovies in vinegar / M.T. Solas, M.L. Garcia, C. De Las Heras, A.I. Rodríguez-Mahillo // *Food Science and Technology International*. –2009. – Vol. 15, I.2. – P. 139-148.
247. Svanevik C. S. Effect of *Anisakis simplex* (sl) larvae on the spoilage rate and shelf-life of fish mince products under laboratory conditions / C. S. Svanevik, B.T. Lunestad, A. Levsen // *Food Control*. – 2014. – N46. – P. 121-126.
248. Tan B.M., Sher M.R, Good R.A., Bahna S. L. Severe food allergies by skin contact // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2001. –Vol.86. – P. 583-586.
249. Tejada M. Antigenicity of *Anisakis simplex* L3 in parasitized fish after heating conditions used in the canning processing / M. Tejada, F. Olivares, C. de las Heras, M. Careche [et al.] // *J. Sci Food Agric.* – 2015. – Vol. 95, I.5. – P. 922-927.
250. Toro C. High prevalence of seropositivity to a major allergen of *Anisakis simplex*, *Ani s 1*, in dyspeptic patients / C. Toro, M. L. Caballero, M.

Baquero, J. García-Samaniego [et. al.] // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2004. – Vol.11, N1. – P. 115-118.

251. Tripathi R. Helminth Infections Mediated DNA Damage: Mechanisms and Consequences / R. Tripathi, N. Jaiswal, B. Sharma, S.K. Malhotra // Single Cell Biol. 2015. –Vol. 4(3). – P. 1-7.

252. Ubeira F.M. Novel sequences and epitopes of diagnostic value derived from the *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen / F.M. Ubeira, E. Rodriguez, A.M. Anadon [et al.] // Allergy. – 2008. – Vol. 63. – P. 219-225.

253. Valero A., Martín-Sánchez J., Reyes-Muelas E., Adroher F.J. Larval *anisakids* parasitizing the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, from Motril Bay in the Mediterranean region of Southern Spain // J. Helminthol. – 2000. – N74. – P. 361-364.

254. Ventura M.T. Immediate and cell-mediated reactions in parasitic infections by *Anisakis simplex* / M.T. Ventura, R.A. Tummolo, L.E. Di, M. D'Ersasmo, A. Arsieni // J. Investig Allergol Clin. Immunol. – 2008. – Vol.18, N4. – P.253-259.

255. Vidaček S. *Anisakis simplex* allergens remain active after conventional or microwave heating and pepsin treatments of chilled and frozen L3 larvae / S. Vidaček, C. de las Heras, M.T. Solas, A. Mendizábal [et al.] // J. of the Science of Food and Agriculture. – 2009. – Vol.89. – P. 1997-2002.

256. Vidaček S. Effect of high hydrostatic pressure on mortality and allergenicity of *Anisakis simplex* L3 and on muscle properties of infested hake / S. Vidaček, C. de las Heras, M.T. Solas, A. I. Rodriguez-Mahillo, M. Tejada // J. of the Science of Food and Agriculture. – 2009. – Vol.89, N10, I.13. – P. 2228-2235.

257. Vidacek S. Viability and Antigenicity of *Anisakis simplex* after Conventional and Microwave Heating at Fixed Temperatures / S. Vidacek, C. de Las Heras, M.T. Solas [et al.] // J. of food protection. – 2011. – Vol.74. – P. 2119-2126.

258. Vik R. *Anisakis* larvae in Norwegian food fishes // Int. Congr. Parasit. Rome, Proceedings. – 1964. –Vol. 1. – P. 568-569.

259. Weir E. Sushi, nemotodes and allergies // CMAJ, Canadian Medical Association or its licensors. – 2005. –Vol.172, N3. – P. 329.
260. White A.C. Jr. Characterization of a cysteinase from *Taeniocrassiceps* cysts / A.C. Jr. White, S. Baig, C.L. Chappell // Mol. biochem. Parasitol. – 1997. – Vol.85, N2. – P. 243-253.
261. Zang X. Serine proteinase inhibitors from nematode and the arms race between host and pathogen / X. Zang, R.M. Maizels // Trends Biochem Sci. –2001. – Vol.26, N3. – P. 191-197.
262. Zuloaga J. A rat model of intragastric infection with *Anisakis* spp. live larvae: histopathological study / J. Zuloaga, C. Rodríguez-Bobada, M.T. Corcuera [et al.] // Parasitol Res. – 2013. –Vol. 112(6). – P. 2409-2411.
263. Мачарадзе Д.Ш., Максимова А.В., Байгильдина Д.Ф., Захарова Т.Н., Малышев В.С. Анизакидоз. Клинический случай из практики [Электронный ресурс] Медицинский научно-практический журнал «Лечащий врач». – 2016. – №6. – Режим доступа: <http://www.lvrach.ru/2016/06/15436492/>(дата обращения: 07.06.2016)
264. Bao M., Pierce G.J., Pascual S., González-Muñoz M., Mattiucci S., Mladineo I., Strachan N.J.C. Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: *anisakiasis* [Ehlektronnyj resurs] / Scientific Reports. 2017. N.7. P. 1-17. Retrieved from: <https://www.nature.com/articles/srep43699.pdf> (accessed: 19.11.2017).
265. Lin A.H. Ig E sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex* in Norway / Aung Htun Lin // Diss. for the degree philosophiae doctor (PhD) at the University of Bergen 2015. – P.33 Retrieved from: [http://bora.uib.no/bitstream/handle/1956/9895/dr-thesis-2015-Aung-Htun Lin.pdf?Sequence=1&isAllowed=y](http://bora.uib.no/bitstream/handle/1956/9895/dr-thesis-2015-Aung-Htun%20Lin.pdf?Sequence=1&isAllowed=y) (accessed: 19.11.2017).

## **ПРИЛОЖЕНИЕ**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2613296

**Способ иммунологического определения антигенов  
анизакид в мышечной ткани рыб**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение Всероссийский научно-  
исследовательский институт фундаментальной и  
прикладной паразитологии животных и растений им. К.И.  
Скрябина (ФГБНУ "ВНИИП им. К.И. Скрябина") (RU)*

Авторы: *Березко Вера Кузьминична (RU), Сивкова Татьяна  
Николаевна (RU), Прохорова Татьяна Сергеевна (RU),  
Лазарева Ольга Игоревна (RU)*

Заявка № 2016109579

Приоритет изобретения 17 марта 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 15 марта 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 17 марта 2036 г.



*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

*Г.П. Ильин*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2665761

**Способ подавления роста микроорганизмов антигенами-  
экстрактами из гельминтов**

Патентообладатель: *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" (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2017107679

Приоритет изобретения 09 марта 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 04 сентября 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 09 марта 2037 г.

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

*Г.П. Налчев*



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(52) СПК  
C12Q 1/04 (2006.01); C12N 1/20 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017107679, 09.03.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
09.03.2017

Дата регистрации:  
04.09.2018

Приоритет(ы):  
(22) Дата подачи заявки: 09.03.2017

(45) Опубликовано: 04.09.2018 Бюл. № 25

Адрес для переписки:  
117218, Москва, Б. Черёмушкинская ул., 28,  
ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

(19) **RU** (11) **2 665 761** (13) **C1**

(51) МПК  
C12Q 1/04 (2006.01)  
C12N 1/20 (2006.01)

(72) Автор(ы):  
Бережко Вера Кузьминична (RU),  
Сивкова Татьяна Николаевна (RU),  
Прохорова Татьяна Сергеевна (RU),  
Лазарева Ольга Игоревна (RU),  
Согрина Анастасия Викторовна (RU),  
Написанова Людмила Александровна (RU),  
Гордина Евгения Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):  
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" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: **БЕРЕСНЕВА Е.В.** Роль  
ассоциации энтеропатогенных бактерий и  
гельминтов в инфекционной патологии птиц.  
Автореф. дисс. на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук, Ставрополь,  
2003, с.6-25. **БЕЛЯЕВА М.И., БЫЧКОВ В.Г.**  
и др. Экспериментальные данные о  
токсическом и ростостимулирующем  
эффектах *Ophiothorhis felineus* (Rivolta, 1884),  
(см. прод.)

RU  
2 665 761  
C1

(54) Способ подавления роста микроорганизмов антигенами-экстрактами из гельминтов

(57) Формула изобретения

Способ подавления роста микроорганизмов антигенами-экстрактами из гельминтов, включающий приготовление антигенов-экстрактов из гельминтов *Anisakis simplex* и *Dirofilaria immitis*, получение суточной культуры микроорганизмов *E. coli*, *P. vulgaris*, *Micrococcus* sp., приготовление смывов, определение концентрации микроорганизмов в смывах по стандарту мутности, посев суточной культуры микроорганизмов в чашки Петри с мясопептонным агаром (МПА), отличающийся тем, что в каждую суточную культуру из *E. coli*, *P. vulgaris*, *Micrococcus* sp. на МПА в чашках Петри вносят отдельно