

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки Институт общей и  
экспериментальной биологии  
Сибирского Отделения Российской  
академии наук, д.б.н., профессор  
Л.Л. Убугунов  
» *август* 2021 г.



## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения  
Российской академии наук**

**на диссертационную работу Фроловой Татьяны Викторовны  
на тему «Активность пищеварительных ферментов рыб при заражении  
цестодами и защита паразита от протеиназ хозяина», представленную на  
соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.02.04 – «Зоология»**

### Актуальность и научная новизна

Взаимоотношения между паразитом и хозяином – одна из ключевых проблем паразитологии. Важную роль для выживания паразита в организме хозяина играют эволюционно выработанные им морфологические и биохимические адаптации. Кишечные паразиты, для предотвращения разрушения пищеварительными ферментами хозяина, также имеют ряд биохимических адаптаций, в частности, вырабатывают ингибиторы протеаз. Ингибиторы протеаз кишечных цестод исследованы недостаточно; данные, касающиеся цестод, паразитирующих в кишечнике рыб, единичны. В связи с этим, актуальность диссертационной работы Т.В. Фроловой, посвященной исследованию адаптивных механизмов защиты кишечных цестод от воздействия пищеварительных ферментов рыб, не вызывает сомнений. Основное внимание автор сосредоточил на изменении активности и спектра пищеварительных ферментов хозяев – рыб при воздействии цестод, а также способности цестод, их экстрактов и среды инкубации ингибировать протеиназы, включая протеолитические ферменты хозяина. Научная новизна рецензируемой диссертации не вызывает сомнений. Автором впервые описано влияние цестод на активность и спектр пищеварительных ферментов хозяев - рыб. Данные по способности экстрактов и инкубационной среды цестод ингибировать протеиназы хозяев – рыб и коммерческого трипсина также представлены впервые.



## Теоретическая и практическая значимость

Полученные диссертантом результаты расширяют знания об адаптации кишечных паразитов к агрессивному воздействию содержимого кишечника их хозяев. Работой Т.В. Фроловой установлены особенности влияния кишечных цестод на активность и спектр пищеварительных ферментов хозяев-рыб, а также способность цестод продуцировать ингибиторы протеиназ. Данные о тонких механизмах взаимоотношений кишечных цестод и хозяев-рыб могут быть приняты во внимание при разработке методов профилактики, диагностики и лечения гельминтозов в прудовых хозяйствах. Результаты работы могут быть использованы в учебном процессе ВУЗов биологического и ветеринарного профиля.

## Структура и содержание работы

Диссертация, в целом, построена по классической схеме, с соблюдением соответствующих требований и соответствует логике поставленной цели и сформулированным задачам. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Список литературы включает 149 наименований, из которых 94 – иностранных. Диссертация изложена на 120 страницах, содержит 7 таблиц и 24 рисунка.

Во введении обоснована актуальность темы, изложена основная гипотеза диссертационного исследования, сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту и личный вклад автора в выполнение работы и получение результатов.

В главе 1 «Обзор литературы» дается основная информация о ферментах: протеиназах и гликозидазах. Описаны взаимоотношения кишечных цестод с их хозяевами, пищеварительные ферменты цестод, влияние цестодозов на активность пищеварительных ферментов хозяев. Большая часть главы содержит сведения об ингибиторах протеиназ паразитарного происхождения, в том числе, цестод. Из анализа литературных данных следует, что работ по изучению влияния цестод на активность пищеварительных гидролаз хозяев немного, список исследованных видов невелик, и полученные данные довольно противоречивы. Цитирование работ, опубликованных за последние 15 лет, занимает более 20 % от общего количества процитированных публикаций.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» дана подробная характеристика объектов исследования, а также применявшихся методик. В качестве основных объектов исследования были взяты 5 видов рыб: налим, синец, щука, окунь, ёрш, а также 4 вида паразитирующих в них цестод: *Triaenophorus nodulosus*, *Eubothrium rugosum*, *Proteocephalus cernuae*, *Proteocephalus torulosus*. Достаточно подробно описаны экспериментальные процедуры, биохимические методики. Используемые статистические методы адекватны поставленным задачам анализа данных.

Главы 3 и 4 посвящены описанию собственных результатов и сравнению собственных результатов с уже известными данными.



Глава 3 «Активность пищеварительных ферментов хозяина при заражении цестодами» посвящена влиянию инвазии цестод с различной локализацией в теле хозяина на активность пищеварительных ферментов рыб. Проведена оценка влияния заражения синца кишечной цестодой *Proteocephalus torulosus* на активность амилаз, сахаразы, а также протеиназ, включая сериновые протеиназы, металлопротеиназы и цистеиновые протеиназы. Установлена зависимость активности протеиназ кишечника ерша зараженных рыб от суммарной длины паразитирующих в кишечнике цестод *Proteocephalus cernuae*. Изучено изменение активности протеиназ и гликозидаз кишечника окуня при паразитировании *Triaenophorus nodulosus* в печени. Исследована адсорбция пищеварительных ферментов хозяев-рыб на пищеварительно-транспортной поверхности цестод *T. nodulosus*. Каждый раздел главы начинается с описания собственных результатов и сопровождается обсуждением полученных результатов. Глава завершается разделом «Заключение по главе», в которой еще раз кратко излагаются основные результаты.

Глава 4 «Инактивация протеолитических ферментов рыб цестодами». Этот раздел диссертации посвящен экспериментальному исследованию влияния различных по размерам цестод и их экстрактов, среды инкубации паразитов на активность протеолитических ферментов как в виде коммерческих препаратов, так и в кишечнике хозяев – рыб. Большая часть экспериментов проведена с использованием цестоды *Eubothrium rugosum*. Приведены результаты изучения воздействия живых цестод, среды инкубации и экстракта на активность трипсина. Определено влияние экстракта цестод на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника налима. Проведен сравнительный анализ воздействия экстракта паразитов на протеолитическую активность гомогената слизистой оболочки кишечника семи видов рыб. В этой экспериментальной работе, с использованием глубокого статистического анализа, была проверена гипотеза о специфичности ингибирующей способности *E. rugosum* по отношению к протеиназам хозяина. Сделаны выводы о преобладающей активности протеиназ у изученных видов рыб. Для *Triaenophorus nodulosus* было проведено исследование воздействия среды инкубации и экстракта паразитов на активность коммерческого трипсина и гомогената слизистой оболочки щуки. Экстракт цестоды *Proteocephalus torulosus* был использован для оценки способности инактивировать активность коммерческого трипсина и гомогената слизистой оболочки синца. Как и в предыдущей главе, в каждом подразделе описание собственных результатов сопровождается сравнением с литературными данными и анализом результатов. «Заключение по главе» резюмирует основные результаты, описанные в этом разделе. Эта глава представляется весьма интересной и во многих отношениях носит приоритетный характер.

В разделе «Общее заключение» Т.В. Фролова обобщает полученные данные, сопоставляя их с данными других авторов.



Диссертационная работа заканчивается перечислением выводов, формулировки которых вытекают из поставленных задач и содержания работы.

Достоверность основных положений и выводов диссертационного исследования обеспечивается большим объемом полученных новых оригинальных данных. Результаты базируются на четко поставленных задачах, подборе оптимальных методов их решения, корректно поставленных экспериментах и глубоком анализе полученных данных. Поэтому достоверность основных положений и выводов, соответствующих цели, задачам, не вызывает сомнения.

Автореферат в полной мере отражает основное содержание диссертации. Материалы исследования были представлены и обсуждены на конференциях различного уровня. По теме диссертации опубликовано 8 работ в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК, в том числе 7 работ – в изданиях, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, в 2 из которых Т.В. Фролова является первым автором. В публикациях в достаточной мере изложены основные результаты и положения диссертационного исследования.

#### **Замечания по работе**

По диссертационной работе имеется ряд замечаний и вопросов:

1) Сколько времени проходило с момента отлова рыбы до отбора образцов слизистой оболочки кишечника? Известно, что пищеварительные ферменты обладают высокой активностью и после умерщвления подопытных животных быстро начинают разрушать слизистую кишечника, в связи с чем, в образцах могли оказаться протеолитические ферменты из поврежденных клеток кишечника.

2) Исследование влияния инвазии отдельными видами кишечных цестод на активность пищеварительных ферментов хозяев-рыб проводилось не на экспериментальных паразито-хозяйинных системах, а взятых из природных условий. В природных условиях моноинвазии наблюдаются крайне редко, чаще это все-таки миксинвазии. В разделе 3.2. для каждой из групп ерша I, II, III не указаны показатели зараженности другими видами паразитов, помимо *Proteocephalus cernuae*. Указана только зараженность в целом всех трех групп. При изучении влияния какого-то одного вида цестод на активность пищеварительных ферментов у остальных видов рыб заражение другими видами паразитов не указано вовсе.

3) Имеются вопросы по корректности статистической обработки материала и её интерпретации. Так, на рисунках не указано, что обозначают планки погрешностей: стандартные ошибки или стандартные отклонения. Аналогично, в таблицах и по тексту при написании числовых показателей не указано, что обозначают числа после знака «±»: стандартные ошибки или стандартные отклонения. Встречаются высказывания об изменении исследуемых параметров под влиянием каких-либо факторов, несмотря на то, статистически эти изменения недостоверны (стр. 50, 52, 54, 92).



4) Каким методом оценивали жизнеспособность червей при проведении экспериментов с живыми паразитами?

5) Не совсем ясен смысл обозначений «PMSF», «EDTA», «E-64» на рисунках. В одних случаях говорится о протеиназах, в других – об ингибиторах протеиназ.

6) С чем связано небольшое увеличение активности трипсина в контроле через 1-2 ч (рис. 10)?

Указанные замечания не имеют принципиального характера, не снижают качества и высокой научной значимости рассматриваемого диссертационного исследования.

### Заключение

Диссертационная работа Фроловой Татьяны Викторовны «Активность пищеварительных ферментов рыб при заражении цестодами и защита паразита от протеиназ хозяина» является законченной научно-квалификационной работой. Содержание диссертации соответствует специальности 03.02.04 – «Зоология». По актуальности, научной новизне, методическому уровню, объему исследований, теоретическому и практическому значению, объему и уровню публикаций работа соответствует п. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор - Фролова Татьяна Викторовна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.04 – зоология.

Отзыв ведущей организации подготовлен доктором биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов ИОЭБ СО РАН, рассмотрен и утвержден на заседании лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов ИОЭБ СО РАН, протокол № 1 от 28 января 2021 г.

«28» января 2021 г.

*Куз*

Кутырев Иван Александрович

Доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов <http://igeb.ru/component/k2/item/159-kutyrev-ivan-aleksandrovich>  
e-mail: [ikutyrev@yandex.ru](mailto:ikutyrev@yandex.ru)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения Российской академии наук <http://igeb.ru>

670047 г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д. 6.  
Тел.: +7 3012 434211, факс: +7 3012 433034.





Министерство науки и высшего образования  
Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт общей и экспериментальной биологии  
Сибирского отделения Российской академии наук  
(ИОЭБ СО РАН)

Сахьяновой М.ул., 6 Улан-Удэ г., 670047

Тел.: 8(3012)434211, факс 8(3012)433034;

E-mail: [ioeb@biol.bscnet.ru](mailto:ioeb@biol.bscnet.ru)

ОКПО 03533369 ОГРН 1020300902511

ИНН/КПП 0323039326/032301001

В диссертационный совет Д 002.036.02  
при Институте биологии внутренних вод  
им. И.Д. Папанина РАН

04.09.2020 г. № 15535/—01—293

На № \_\_\_\_\_

**СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

по диссертации Фроловой Татьяны Викторовны

«Активность пищеварительных ферментов рыб при заражении цестодами и  
защита паразита от протеиназ хозяина»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.02.04 – зоология.

Полное наименование организации в соответствии с Уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения Российской академии наук
Сокращенное наименование организации в соответствии с Уставом	ФГБУН ИОЭБ СО РАН
Руководитель организации	Убугунов Леонид Лазаревич, доктор биологических наук, профессор, директор
Почтовый индекс, адрес организации	670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д. 6
Телефон	+ 7 (3012) 43-42-11
Адрес электронной почты	<a href="mailto:ioeb@bsc.buryatia.ru">ioeb@bsc.buryatia.ru</a>
Веб-сайт	<a href="https://www.igeb.ru/">https://www.igeb.ru/</a>
Сведения о составителях отзыва	Кутырев Иван Александрович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов Тел.: + 7 (3012) 43-42-29 Адрес эл. почты: <a href="mailto:ikutyrev@yandex.ru">ikutyrev@yandex.ru</a>
Список публикаций сотрудников ведущей организации по теме диссертации соискателя в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15):	
1. Kuttyrev I.A., Goreva O.B., Mazur O.E., Mordvinov V.A. A Study of protein fractional composition during incubation of <i>Diphyllbothrium dendriticum</i>	



- (Cestoda) plerocercoids in a medium containing blood serum of the host, the baikal omul *Coregonus migratorius* (Coregonidae) // *Biology Bulletin*. 2020. Vol. 47. P. 490-496.
- Mazur O.E., Kutyriv I.A., Dugarov Zh.N. Cytomorphological changes in the blood and mesonephros of goldfish infected with *Ligula* (*Digramma*) *interrupta* (Cestoda: Pseudophyllidea) // *Biology Bulletin*. 2020. Vol. 47. P. 56-62.
  - Kutyrev I.A., F. Franke, J. Kurtz, J.P. Scharsack. In vitro effects of the neuroactive substances serotonin and  $\gamma$ -aminobutyric acid on leucocytes from sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) // *Fish and Shellfish Immunology*. 2019. V. 87. P. 286-296.
  - Ding J., He G., Wu J., Yang J., Guo X., Yang X., Kandil O.M., Kutyriv I., Ayaz M., Zheng Y. Immunomodulatory effects of microRNA-4989-3p on macrophages, a miRNA encapsulated into *Echinococcus multilocularis* extracellular vesicles // *Frontiers in Microbiology*. 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.02707.
  - Wu J., Yang J., He G., Guo X., Kutyriv I. High-throughput identification of microRNAs in *Taenia hydatigena*, a cestode threatening livestock breeding industry // *Infect. Genet. Evol.* 2019. 75:103985.
  - Batueva M.D., Katokhin A.V. Morphological re-description and molecular characterization of *Chloromyxum thymalli* Lebzelter, 1912 (Myxosporae: Chloromyxidae) infecting the gall bladder of Hovsgol grayling *Thymallus nigrescens* (Dorogostaisky, 1923) // *Diseases of Aquatic Organisms*. 2019. V. 133. P. 83-89.
  - Dugarov Zh.N., Batueva M.D.-D., Burdukovskaya T.G., Baldanova D.R., Mazur O.E., Zhepkholova O.B., Sondueva L.D., Matveev A.N. Features of parasitic fauna of the common ruff *Gymnocephalus cernuus* (L.) in Tsipo-Tsipikanskiye lakes (Transbaikalia) // *Inland Water Biology*. 2019. V. 12. Suppl. 1. P. 76-83.
  - Кутырев И.А., Горева О.Б., Мазур О.Е. Определение спектра белков, выделенных из плероцеркоидов лентеца чаечного *Diphyllbothrium dendriticum* (Cestoda) методом 2D-электрофореза // *Acta Naturae*. 2019. T. 11. № S2. С. 158.
  - Zheng Y., Guo X., Su M., Chen X., Jin X., Ding J., Wang Z., Bo X., Ayaz M., Kutyriv I., Jia W., Zhang X., Zhang J. Identification of emu-TegP11, an EF-hand domain-containing tegumental protein of *Echinococcus multilocularis* // *Veterinary Parasitology*. 2018. V. 255. P. 107-113.
  - Dugarov Z.N., Burdukovskaya T.G., Batueva M.D., Baldanova D.R., Sondueva L.D., Zhepkholova O.B., Mazur O.E. Changes in the species composition of parasites in european perch, *Perca fluviatilis*, in Lake Gusinoe (Lake Baikal basin) during depression and subsequent recovery of host abundance // *Russian Journal of Ecology*. 2018. V. 49. P. 248-252.
  - Kutyrev I.A., N.M. Biserova, D.N. Olennikov, Z.V. Korneva, O.E. Mazur. Prostaglandins E<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> – regulators of host immunity in the model parasite *Diphyllbothrium dendriticum*: an immunocytochemical and biochemical



- study // Mol. Bioch. Par. 2017. P. 33-45.
12. Kutyrev I.A., B. Cleveland, T. Leeds, G.D. Wiens. Dataset of proinflammatory cytokine and cytokine receptor gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) measured using a novel GeXP multiplex, RT-PCR assay // Data in Brief. 2017. V. 11. P. 192-196.
  13. Dugarov Z.N., Baldanova D.R., Khamnueva T.R. Impact of the degree of urbanization on composition and structure of helminth communities in the Mongolian racerunner (*Eremias argus*) Peters, 1869 // J. Helminthol. 2017. V. 28. P. 1-9.
  14. Zhang J.Y., Zhao Y.L., Batueva M.D., Luo D., Xing Z.F., Zhang Q.Q., Liu X.H. Redescription of *Chloromyxum ellipticum* Li & Nie, 1973 (Myxosporaea: Chloromyxidae) infecting the gall bladder of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* Valenciennes, 1844, supplemented by morphological and molecular characteristics // Parasitology Research. 2017. V.116. – P.1479-1486.
  15. Kutyrev I.A., B. Cleveland, T. Leeds, G.D. Wiens. Proinflammatory cytokine and cytokine receptor gene expression kinetics following challenge with *Flavobacterium psychrophilum* in resistant and susceptible lines of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Fish Shellfish Immunol. 2016. V. 58. P. 542-553.

Ведущая организация подтверждает, что соискатель Фролова Татьяна Викторовна не является сотрудником ИОЭБ СО РАН и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ИОЭБ СО РАН, или в соавторстве с сотрудниками ИОЭБ СО РАН.

Директор ИОЭБ СО РАН,  
д.б.н., профессор



Л.Л. Убугунов