

Отзыв

официального оппонента

на диссертацию Тимохиной Екатерины Петровны «Морфофункциональные изменения органов иммунной системы крыс при длительном воздействии низких доз ДДТ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность темы научного исследования

Известно, что ДДТ – хлорорганический пестицид, инсектицид, запрещенный в 1989 году в России к использованию в сельском хозяйстве и против малярийных комаров. Однако, в настоящее время в некоторых странах (Индия, Северная Корея, Китай) ежегодно используется около 500 тонн этого препарата для борьбы с малярией и висцеральным лейшманиозом, что является фактором, обеспечивающим его персистенцию. Характерными чертами ДДТ являются высокая стойкость к разложению, способность к биоаккумуляции в живых организмах, высокая растворимость в жирах.

Кроме того, ДДТ является эндокринным дизраптором с эстрогенной активностью. В литературе имеются сведения о влиянии ДДТ на репродуктивные органы, щитовидную железу, нервную систему организма др.

Сведения о влиянии низких доз препарата, сопоставимых с максимально допустимым уровнем содержания в пищевых продуктах, фрагментарны и противоречивы. Представляются важными данные о влиянии ДДТ на одну из регулирующих систем организма – иммунную систему. В этой связи диссертационное исследование Тимохиной Е.П., в котором представлены морфофункциональные изменения органов иммунной системы крыс при длительном воздействии низких доз ДДТ, представляется актуальным.

Структура и объем диссертации

Диссертация Тимохиной Е.П. построена по традиционному плану, изложена на 121 странице компьютерного текста.

Во введении обосновывается актуальность темы, формулируются цели и задачи исследования, аргументируется новизна и практическая значимость полученных результатов, приводятся сведения об апробации работы, публикациях, а также формулируются положения, выносимые на защиту.

В главе «Обзор литературы» изложена история создания, применения и запрета препарата ДДТ. В обзоре обозначен круг вопросов, требующих уточнения и дальнейшей разработки, что определяет необходимость выполнения данного диссертационного исследования.

В обзоре проанализировано 145 источников, из них 49 – отечественных, 96 – зарубежных.

В главе «Материал и методы исследования» приведены сведения об объектах и методах исследования, статистической обработке результатов.

Тимохина Е.П. очень ответственно подошла к выбору дозы ДДТ, потребляемой животными в эксперименте. Учитывались пороговые значения низких доз для ДДТ (50мк/ кг/сут), нормативы содержания ДДТ в продуктах питания в Российской Федерации.

Методическое обеспечение работы очень хорошее. Изучение гистологических препаратов было проведено с использованием компьютерной морфометрии. Исследование экспрессии белка p53 выполнено с использованием первичных кроличьих поликлональных антител. Был использован радиоизотопный метод определения пролиферации клеток тимуса и селезенки в клеточной суспензии *ex tempore*, метод определения пролиферативной активности лимфоцитов в реакции бласттрансформации.

В сыворотке крови животных методом твердофазного иммуноферментного анализа определялись концентрации целого ряда цитокинов - ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-12, ТФР-β, неоптерина и некоторых гормонов.

В главе «Результаты собственных исследований» автором охарактеризованы моррофункциональные изменения тимуса и селезенки при воздействии на организм экспериментальных животных низких доз ДДТ (20

мкг/л и 80мкг/л) при разном времени воздействия. Представлены данные о концентрации цитокинов и гормонов в сыворотке крови крыс.

В четвертой главе обсуждаются результаты диссертационного исследования. Эта глава содержит логические обобщения, вытекающие из содержания работы.

Научная новизна полученных результатов

Научная новизна диссертационного исследования Тимохиной Е.П. определяется, прежде всего, высоким методическим уровнем работы и комплексным подходом.

Тимохиной Т.П. установлено, что основные морфологические изменения в иммунокомпетентных органах выражаются в гибели лимфоидных клеток.

Деструкция лимфоцитов усиливается при увеличении среднесуточной дозы ДДТ и длительности потребления препарата.

Автором установлено, что у экспериментальных животных происходит снижение уровня кортикостероидов по сравнению с контрольными значениями. Эти данные наряду с иммуногистохимическим исследованием экспрессии белка p53 позволили прийти к важному заключению, что в тимусе крыс при действии ДДТ задействован p53-зависимый путь апоптоза.

Показано, что гибель клеток тимуса вначале вызывает усиление их пролиферации, а затем приводит к значительному снижению пролиферативной активности.

Новые данные получены Тимохиной Е.П. при сопоставлении морфофункциональных характеристик тимуса и уровней цитокинов в сыворотке крови крыс. Заметим, что цитокины – важный, но далеко не единственный фактор, обуславливающий создание микроокружения, необходимого для пролиферации и дифференцировки лимфоидных клеток тимуса. Тем не менее, автором были выявлены некоторые корреляции. Обнаружена зависимость между продукцией ИЛ-2 и пролиферацией клеток. Этот цитокин известен как гемопоэтин, фактор дифференцировки Т- и В-

лимфоцитов. Компенсаторное повышение пролиферативной активности в связи с гибелю клеток приводило к снижению ИЛ-2, а понижение пролиферативной активности влекли за собой повышение синтеза ИЛ-2.

Тимохина Е.П. не выявила стойких изменений в балансе Th1-Th2 цитокинов, что представляется вполне логичным. Секреция цитокина – процесс динамичный и отражает активацию и дифференцировку Th0 при развитии иммунного ответа (из Th0 в Th1 или в Th2). В принципе можно говорить об иммуноцитокиновой доминанте по Th1 или Th2 типу. Таковой в условиях эксперимента не было.

Значительные изменения впервые выявлены автором в стромальном компоненте тимуса, особенно в мозговом веществе долек органа. При изучении телец Гассала Тимохина Е.П. обнаружила увеличение количества тимических телец и ретикулярных эпителиоцитов в их составе в группе животных, потреблявших ДДТ в дозе 7,77мкг/кг /сутки в течение 6 недель. При более длительном действии препарата(10 недель) в той же дозе происходит увеличение количества тимических телец, при этом только в данной опытной группе животных автор наблюдала формирование полостей внутри телец Гассала.

При исследовании периферического лимфоидного органа – селезенки были выявлены морффункциональные изменения, аналогичные таковым в тимусе.

Диссидентка убедительно продемонстрировала, что длительное воздействие низких доз ДДТ вызывает гибель клеток в герминативных центрах, снижение доли белой пульпы селезенки. Было отмечено изменение структуры лимфоидных узелков: расширение герминативных центров и уменьшение ширины мантийной зоны.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Работа выполнена на высоком уровне с использованием современных высокоинформативных методов. Объем исследованного материала вполне достаточный

Диссертация хорошо документирована качественными микрофотографиями.

Результаты экспериментального исследования проанализированы с использованием адекватных статистических методов.

Автором обсуждены все полученные им результаты.

Сказанное определяет **высокую степень обоснованности и достоверность** полученных автором данных и сделанных на основе их анализа выводов.

Все выводы соответствуют поставленным в работе задачам исследования и вытекают из полученного автором фактического материала.

Тимохина Е.П. предлагает две схемы, иллюстрирующие морфофункциональные изменения иммунной системы крыс опытных групп, потреблявших ДДТ в разных малых дозах через 6 недель и через 10 недель воздействия.

Результаты диссертационной работы в полном объеме **отражены в имеющихся публикациях** автора. По материалам работы опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Диссертационное исследование выполнено при **личном непосредственном участии автора**. Автор лично провела морфологические и морфометрические исследования селезенки и тимуса, иммуногистохимическое исследование тимуса, определяла пролиферативную активность клеток тимуса и селезенки крыс, уровни цитокинов и гормонов методом твердофазного иммуноферментного анализа, провела статистическую обработку полученных результатов.

Научно-практическая значимость результатов исследования

Полученные в работе данные расширяют наши представления о воздействии низких доз ДДТ на морфофункциональное состояние органов иммунной системы, в частности тимуса и селезенки.

Практическая значимость результатов исследования Тимохиной Е.П. заключается в том, что ею установлен факт воздействие низких доз ДДТ, (сопоставимых с дозами, разрешенными нормативными документами в продуктах питания для человека) на органы иммунной системы. Убедительно продемонстрировано, что степень выраженности морфофункциональных изменений зависит от длительности воздействия препарата. Выявленные изменения органов иммунной системы позволяют утверждать, что разрешенные дозы ДДТ не являются безопасными для человека. Это свидетельствует о необходимости дальнейших исследований, направленных на установление безопасных доз ДДТ и его метаболитов в продуктах питания и изменения разрешенных уровней ДДТ в сторону их снижения.

Принципиальных замечаний по работе нет

Заключение:

Диссертационная работа Тимохиной Екатерины Петровны «Морфофункциональные изменения органов иммунной системы крыс при длительном воздействии низких доз ДДТ», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, выполненная под руководством доктора медицинских наук Ягловой Натальи Валентиновны является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача клеточной биологии, цитологии, гистологии – установлены структурные и функциональные изменения тимуса и селезенки при воздействии низких доз ДДТ.

Выполненная Тимохиной Екатериной Петровной работа по актуальности тематики, теоретическому и практическому значению результатов и выводов соответствует требованиям, предъявляемым к

диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, утвержденном постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), а её автор заслуживает присвоения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор
кафедры гистологии,
цитологии и эмбриологии
ГБОУ ВПО «Первый Московский
государственный медицинский университет
имени И.М.Сеченова» Минздрава РФ

В.Э.Торбек

г. Москва, ул. Трубецкая, 8 стр.2

Тел.: 8(499)248-05-53, e-mail: rektorat@mma.ru

Подпись Виктории Эдуардовны Торбек заверяю
Ученый секретарь ГБОУ ВПО «Первый Московский
государственный медицинский университет
имени И.М.Сеченова

доктор медицинских наук, профессор



О.Н. Воскресенская

«26» января 2015