

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Токмаковой Арины Сергеевны по теме «Клеточные реакции лёгочных моллюсков на трематодную инвазию», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.11 – Паразитология, 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы.

Диссертационная работа Токмаковой А.С. представляет несомненный интерес для специалистов в области паразитологии и клеточной биологии, так как посвящена актуальной проблеме – изучению клеточных иммунных реакций лёгочных моллюсков на различные чужеродные факторы, в том числе на трематодную инвазию.

В настоящее время возрастает интерес к исследованию иммунных реакций животных в сравнительном аспекте, во многом это связано с эволюционным подходом и переоценкой роли врождённого иммунитета в защитных реакциях позвоночных животных. Таким образом, необходимы новые модели для исследования механизмов иммунного ответа. Моллюски являются важным объектом изучения в области защитных реакций организма. В настоящее время исследование иммунных реакций моллюсков очень актуально, поскольку они играют большую роль в распространении гельминтов, являясь промежуточными хозяевами трематод. Исследование иммунного ответа на инвазию позволит выявить механизмы резистентности системы «паразит-хозяин». Данные литературы по этим вопросам неоднозначны и достаточно противоречивы, что подчеркивает актуальность диссертационного исследования Токмаковой А.С.

Комплексный подход к исследованию клеточного иммунитета лёгочных моллюсков определяет новизну работы. Впервые были изучены клеточные иммунные реакции лёгочных моллюсков как на природных моделях, так и в условиях экспериментального заражения. Исследованы гемопоэз, функциональная активность гемоцитов лёгочных моллюсков в физиологических условиях и при реакции на трематодную инвазию. В работе показано, что при инвазии изменяется соотношение гемоцитов разных типов. Основными клеточными элементами гемолимфы лёгочных моллюсков являются гранулоциты и гиалиноциты, количественное соотношение между которыми определяется физиологическим состоянием улиток. Важным является полученный вывод об универсальности клеточного иммунного ответа лёгочных моллюсков на чужеродные факторы различной природы. Это определяет новизну и актуальность выводов и положений, выносимых автором данной работы на защиту.

Достоверность и новизна результатов исследования Токмаковой А.С. определена тем, что исследование клеточного иммунного ответа лёгочных моллюсков на чужеродные факторы различной природы проведено впервые.

В том числе, автором впервые:

1. показано, что для клеток гемолимфы лёгочных моллюсков, представленных гранулоцитами и гиалиноцитами, характерна фагоцитарная активность и участие в защитных реакциях, включая инкапсуляцию. Выявлено, что клеточный состав гемолимфы зависит от различных факторов, среди которых заметную роль играет трематодная инвазия. В работе установлено, что источником гемопоэза лёгочных моллюсков является специализированный гемопоэтический орган, топографически приуроченный к перикардиальному эпителию. Именно в нем происходит мультипликация прогемоцитов, часть которых дифференцируется в гемоциты, выходящие в кровотоки. Иммунизация моллюсков различными факторами, включая трематодную инвазию, вызывает активацию гемопоэза.

2. исследованы клеточные защитные реакции на иммунизацию чужеродными факторами различной природы и показано, что эти реакции носят универсальный характер и происходят в два этапа. Первичная, неспецифическая реакция в месте пенетрации патогена - это попытка его изоляции за счет гемоцитов из близлежащих тканей и циркуляции. Во вторичной клеточной реакции задействованы гемоциты, образованные после активации гемопоэза, и эта реакция направлена на завершение инкапсуляции патогена. Результаты работы показали, что основными вариантами вторичных реакций на трематодную инвазию являются: инкапсуляция, образование крупных агглютинаций вблизи материнской спороцисты, формирование мантии на её поверхности.

Очевидным достоинством работы является тот факт, что в работе использованы как классические подходы экспериментальной зоологии, иммунологии, паразитологии, так и современные иммуногистохимические и молекулярно-генетические методы. Токмакова А.С. впервые охарактеризовала функциональную активность гемоцитов моллюсков разных видов при иммунизации различными антигенами. Использование моллюсков, заражённых трематодами разных видов, позволило оценить специфичность клеточного ответа на различные патогены.

Следует отметить, что данная работа интересно читается, полученные результаты подробно обсуждены с привлечением современных данных литературы. Это, как и достаточно большой по объёму обзор литературы, демонстрирует глубокие знания соискателя в предметной области. В качестве незначительного замечания хотелось бы отметить недостаточную структурированность литературного обзора, встречаются подглавы по 14 страниц, без деления на более мелкие пункты, что затрудняет восприятие.

Методы исследования современны и обоснованы с позиции поставленной цели и задач диссертационной работы, подробно описаны, что демонстрирует глубокое знание и владение автором всеми проведенными в диссертации экспериментальными работами.

Результаты диссертационного исследования обработаны автором с использованием стандартных методов статистического анализа. Все выше перечисленное обеспечило достоверность полученных результатов, обоснованность основных положений диссертации, выводов и практических рекомендаций.

Полученные результаты обсуждены с привлечением современной отечественной и зарубежной литературы. Выводы и практические рекомендации, а также положения, выносимые на защиту, аргументировано вытекают из полученных результатов диссертационного исследования.

Ценность для науки и практики.

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в том, что полученные новые данные, перечисленные выше, дополняют существующее представление об иммунных реакциях моллюсков на инвазию. Практическая ценность работы обусловлена необходимостью контроля зараженности трематодами природных популяций моллюсков, который рассматривается как один из наиболее эффективных способов борьбы с распространением трематодозов. Как известно, трематодная инвазия резко снижает возможность хозяйственного использования моллюсков, многие представители которых используются в пищевой, фармацевтической, косметической промышленности. Представляют интерес данные о клеточном составе гемолимфы при постановке мониторинга за экологическим состоянием водоемов, так как анализ гемолимфы является важным показателем физиологического состояния моллюсков. Сведения о морфологии клеток гемолимфы, полученные с помощью различных методов, позволяют также уточнить имеющуюся классификацию гемоцитов пульмонат. Данная диссертационная работа позволяет оценить характер протекания жизненных циклов трематод и определить основные факторы, регулирующие их реализацию в моллюсках.

Личный вклад соискателя в разработку данной проблемы.

Выполненная диссертационная работа свидетельствует о свободном владении автором методами научного анализа, методиками обработки материала, методами клеточной и молекулярной биологии. В работе использовано значительное количество методов: гистохимические и иммуногистохимические реакции, световая микроскопия с использованием методов фазового контраста и светлого поля; флуоресцентная и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия, цитофлуориметрический анализ. Автором оценивалась пролиферативная активность гемоцитов с использованием 5-этинил-2-дезоксинуридина (EdU). Выделение белка для иммунизации моллюсков проводили с использованием FBio-Trizol-Реагента (FractalBio). Для видовой идентификации трематод *Bilharziella polonica* осуществляли генотипирование по участку рДНК, включающему фрагмент гена 18S, ITS1, ген 5,8S, ITS2 (GenBank MK264353). Помимо этого, автор владеет

различными компьютерными программами для обработки данных, это программы «Image Scope», «Image J», «LasX», Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter), CellProfiler; обработку секвеннограмм осуществляли с помощью программы BioEdit; для анализа гомологии использована программа BLAST. Широкая база фактологических и эмпирических данных исследования свидетельствует о грамотном проведении научного исследования, что позволило автору сформулировать положения, выносимые на защиту.

Основные положения диссертации нашли отражение в публикациях автора, а также были доложены на научно-практических конференциях, что в совокупности определяет высокий вклад автора в разработку данной проблемы.

Общая оценка выполненной работы в соответствии с требованиями ВАК.

Диссертация Токмаковой А.С. имеет научное обоснование, написана грамотным языком, логично построена с соблюдением последовательности изложения изучаемого материала.

В целом на основании изучения диссертации, автореферата и работ, опубликованных Токмаковой А.С. в печати по теме диссертации, можно сделать следующие выводы:

- тема диссертации является актуальной;
- научные положения, выводы, сформулированные в диссертации, обоснованны и достоверны;
- представленные замечания не снижают ценности проведенного исследования;
- содержание опубликованных работ соискателя соответствуют основным положениям диссертации.

Результаты диссертационного исследования не вызывают серьезных возражений. К недостаткам работы можно отнести ряд погрешностей редакционного характера (не всегда правильный синтаксис, стилистические погрешности, опечатки). Встречаются нераскрытые сокращения. Замечания к главе «Материалы и методы»: не указана фирма, производящая используемые антитела, и их разведение при использовании. Не указан производитель Click-iT EdU Alexa Fluor 594 Imaging Kit, однако далее сообщается: «Окрашивание проводилось согласно протоколу производителя». Замечания к главам, описывающим результаты: не указано увеличение в подписях к рисункам, хотя шкала представлена только в некоторых фотографиях, не всегда указан способ окраски.

Также хотелось бы задать несколько вопросов по тексту диссертации.

1. В диссертации и автореферате нет данных о количестве использованных животных, количестве экспериментальных животных в группах, не указано количество обрабатываемых срезов, повторностей при использовании различных методик. Хотелось бы получить эти данные.

2. Почему в названии диссертации указывается «Клеточные реакции лёгочных моллюсков на трематодную инвазию», однако большая часть работы посвящена исследованию гемолимфы и гемопоэза, и, кроме трематодной инвазии, исследованы другие виды воздействия? При этом собственно трематодной инвазии посвящен только один вывод.

3. В чем именно заключаются специфическая реакция лёгочных моллюсков на трематодную инвазию?

Соответствие автореферата основному содержанию диссертации.

Диссертационная работа Токмаковой А.С. является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно. Автореферат диссертации полностью соответствует основному содержанию диссертационной работы.

Основные результаты работы опубликованы в 21 печатных работах, 8 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Результаты исследования неоднократно докладывались на научных конференциях различного уровня.

Вывод о соответствии представленной диссертации требованиям ВАК и целесообразности присуждения ученой степени.

Рецензируемая диссертационная работа Токмаковой А.С. «Клеточные реакции лёгочных моллюсков на трематодную инвазию» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (п. № 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.11 – паразитология, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв подготовила: Бажанова Елена Давыдовна
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией морфологии
и электронной микроскопии

Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Институт токсикологии
Федерального медико-биологического агентства»

(ФГБУН ИТ ФМБА России),
Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1, 192019
89119008134

bazhanovae@mail.ru

специальность 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология



13.02.2019