

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.223.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 5 марта 2019 г. № 1

О присуждении Токмаковой Арине Сергеевне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Клеточные реакции лёгочных моллюсков на трематодную инвазию» по специальностям 03.02.11 – Паразитология, 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология принята к защите 25 декабря 2018 г. (протокол заседания № 5) диссертационным советом Д 002.223.01, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1, № 105/нк от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Токмакова Арина Сергеевна 1992 года рождения, в 2015 году окончила Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология». С 2015 г. по 2019 г. обучается в аспирантуре Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена», во время обучения в которой она сдала кандидатские экзамены по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология (2017 г.), истории и философии науки (2016 г.) и иностранному языку (английский (2016 г.)). Для подготовки и сдачи кандидатского экзамена по специальности 03.02.11 – Паразитология была прикреплена к

Федеральному государственному бюджетному учреждению науки Зоологический институт Российской академии наук в 2018 г. Работает старшим преподавателем на кафедре зоологии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена».

Диссертация выполнена на кафедре зоологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена».

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор, Атаев Геннадий Леонидович, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена», заведующий кафедрой зоологии.

Официальные оппоненты:

Слюсарев Георгий Сергеевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», профессор кафедры зоологии беспозвоночных;

Бажанова Елена Давыдовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», заведующая лабораторией морфологии и электронной микроскопии, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук), г. Новосибирск, в своем положительном отзыве, подписанном Крюковым Вадимом Юрьевичем, доктором биологических наук, заведующим лабораторией экологической

паразитологии, указала, что диссертация Токмаковой А. С. представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком профессиональном уровне, и отвечает специальностям 03.02.11 – Паразитология, 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология и соответствует требованиям положения «О порядке присуждения учёных степеней» от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а ее автор, Токмакова Арина Сергеевна достойна присуждения искомой степени по специальностям 03.02.11 – Паразитология, 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Соискатель имеет 45 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликована 21 работа, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 8 работ. Научных статей, опубликованных в прочих изданиях – 1, в материалах конференций – 12. Все работы общим объёмом 5.25 печатных листов, из них в рецензируемых научных изданиях – 4.0 п.л. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах в диссертации отсутствуют. Авторский вклад в опубликованные в соавторстве научные работы составляет не менее 40-60%.

Наиболее значительные работы по теме диссертации:

1. Ataev, G. L. Study of the sporocyst broodsac coloring of *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Brachylaemidae) / G. L. Ataev, P. S. Babich, **A. S. Tokmakova** // *Parasitologiya*. – 2013. – Vol. 47, № 5. – P. 372–379.
2. Прохорова, Е. Е. Реакция гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* на ксенотрансплантат / Е. Е. Прохорова, **А. С. Токмакова**, Г. Л. Атаев // *Паразитология*. – 2015. – Т. 49, № 2. – С. 128–132.
3. Серебрякова, М. К. Новый метод разделения популяций циркулирующих гемоцитов легочных моллюсков с помощью проточной цитометрии / М. К. Серебрякова, Е. Е. Прохорова, **А. С. Токмакова**, И. В. Кудрявцев, А. В. Полевщиков., Г. Л. Атаев // *Российский иммунологический журнал*. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 160–162.

4. Серебрякова, М. К. Цитофлуориметрический анализ гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata* резистентной и чувствительной линий / М. К. Серебрякова, Е. Е. Прохорова, **А. С. Токмакова**, И. В. Кудрявцев, А. В. Полевщиков, Г. Л. Атаев // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10 (19), № 2 (1). – С. 116–118.

5. Ataev, G. L. Multiple infection of amber snails *Succinea putris* with sporocysts of *Leucochloridium spp.* (Trematoda) / G. L. Ataev, A. A. Zhukova, **A. S. Tokmakova**, E. E. Prokhorova // Parasitology Research. – 2016. – Vol. 115, № 8. – P. 3203–3208.

6. Прохорова, Е. Е. Анализ клеточного состава гемолимфы трёх видов планорбид (Gastropoda: Pulmonata) / Е. Е. Прохорова, М. К. Серебрякова, **А. С. Токмакова**, И. В. Кудрявцев, Р. Р. Усманова, Г. Л. Атаев // Invertebrate Zoology. – 2018. – Т. 15, № 1. – С. 103–113.

7. Ataev, G. L. Reproduction of *Echinostoma caproni* mother sporocysts (Trematoda) / G. L. Ataev, **A. S. Tokmakova** // Parasitology Research. – 2018. – Vol. 117, № 8. – P. 2419–2426.

8. Prokhorova, E. E. Hemocytes of mollusc *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Pulmonata) / E. E. Prokhorova, М. К. Serebryakova, **A. S. Tokmakova**, G. L. Ataev // Invertebrate survival journal. – 2018. – Vol. 15. – P. 346–351.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. д.б.н. Мордвинов В.А. (ФГБНУ «Институт цитологии и генетики», г. Новосибирск); 2. д.б.н. Токарев Ю.С. (ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», г. Санкт-Петербург); 3. д.б.н. Никишин В.П. (ФГБУН Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения РАН, г. Магадан); 4. д.б.н. Пяткявичуте Р. (Институт Экологии Центра исследований природы, г. Вильнюс, Литва); 5. д.б.н. Жохов А.Е. и д.б.н. Микряков Д.В. (ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок); 6. д.б.н. Спиридонов С.Э. (Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.

Северцова РАН, г. Москва); 7. д.б.н. Кутырев И.А. (ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН», г. Улан-Удэ); 8. к.б.н. Сайфитдинова А.Ф. (ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена», г. Санкт-Петербург); 9. к.б.н. Спивак И.М. (ФГБУН Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург); 10. к.б.н. Кудрявцев И. В. (ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург); 11. к.б.н. Дмитриева Е.В. и к.б.н. Корнийчук Ю.М. (ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь).

Всего поступило 11 отзывов из 11 организаций. Все отзывы положительные. Отзывы подписали 8 докторов и 5 кандидата наук. Из них 6 отзывов без замечаний и 5 (отзывы д.б.н. В.П. Никишина, д.б.н. Р. Пяткявичуте, д.б.н. И.А. Кутырева, к.б.н. Е.В. Дмитриевой и Ю.М. Корнийчук, к.б.н. А.Ф. Сайфитдиновой) с замечаниями и вопросами: «фотографии гистологических срезов «не читаемы» ввиду малого размера»; «имеются неточные выражения, например «освобождаются от инкапсуляции»; «название работы, не совсем точно отражает содержание работы (содержание работы шире), так как из пяти задач только в одной, пятой, упомянуты трематодные инвазии»; «в названии работы использован термин легочные моллюски, а в тексте и пульмонаты»; «в материалах и методах сказано, что осуществлено генотипирование рДНК *Bilharziella polonica*, но в списке работ по теме диссертации указана и статья, в которой представлены результаты сравнительно-молекулярного анализа трех видов рода *Leucochloridium*»; «исходя из названия, не совсем корректно сформулирована цель работы»; «автором установлен универсальный характер реакций клеточного иммунитета на иммунизацию факторами разной природы (вывод 4). В таком случае было бы логичным соответствующим образом расширить и название диссертационного исследования»; «В разделе «Научная новизна» очевидно, излишне упоминать использованные автором методы и расширение круга изучаемых модельных

объектов, тогда как уточнение классификации гемоцитов лёгочных моллюсков как раз имело смысл здесь отметить. На наш взгляд, можно было бы также указать в этом разделе полученные автором данные о специфике состава популяций гемоцитов у исследованных моллюсков разных видов»; «имеются ли данные о молекулярной характеристике морфологически различающихся типов клеток, например, на уровне транскриптома?». Ответы на замечания и вопросы содержатся в стенограмме заседания совета.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты и сотрудники ведущей организации – известные российские ученые паразитологи и цитологи, исследующие проблемы морфологии, физиологии, паразитологии и экологии животных, имеющие научные труды по указанной проблематике в рецензируемых научных изданиях.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

показано, что соотношение разных типов гемоцитов зависит от вида моллюска, а также его физиологического состояния и зараженности трематодами (03.02.11); **доказано** существование в гемолимфе лёгочных моллюсков двух основных типов клеток – гранулоцитов и гиалиноцитов (03.03.04); **показано**, что гемопоэз лёгочных моллюсков приурочен к специализированным органам – АПО (амёбоцито-продуцирующие органы), расположенным вблизи перикардального эпителия, не подтверждена пролиферативная способность у циркулирующих гемоцитов (03.03.04); **изучена** динамика работы АПО в условиях иммунизации моллюсков разными патогенами, включая трематодную инвазию (03.02.11); **определены** основные типы клеточного ответа пульмонат на чужеродные факторы, включая трематодную инвазию (03.02.11).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что иммунизация различными факторами, включая трематодную инвазию заметно влияет на соотношение клеточных популяций

гемолимфы (03.02.11); **обосновано** разделение клеток гемолимфы легочных моллюсков на два основных типа – гранулоциты и гиалиноциты (03.03.04). Оба типа способны к фагоцитозу и участвуют в иммунных реакциях моллюсков. В качестве источника гемопоэза признается гемопоэтический орган – АПО (03.03.04). Предполагается, что здесь образуются прогемоциты, которые дифференцируются в оба типа гемоцитов и включаются в циркуляцию. **Определены** два основных этапа протекания защитной клеточной реакции – первичная (неспецифическая) реакция в районе пенетрации патогена и вторичная (более видоспецифичная), в которой задействованы гемоциты из активированного иммунизацией АПО (03.02.11). **Описаны** основные формы гемоцитарных реакций на трематодную инвазию: инкапсуляция, агглютинации, не препятствующие развитию партенит, формирование на их поверхности мантии из гемоцитов (03.02.11).

Применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов)

использован комплекс традиционных методов полевых и лабораторных исследований, с применением как классических подходов экспериментальной паразитологии, зоологии, иммунологии так и современных иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов; **изложены** результаты анализа клеточного состава гемолимфы лёгочных моллюсков с учетом функциональной активности гемоцитов всех типов; **адаптирована** методика проточной цитометрии для анализа клеточного состава гемолимфы pulmonat; **определены** локализация и структура гемопоэтических органов, **показана** их активация в условиях иммунизации; **раскрыты** основные механизмы клеточных иммунных реакций pulmonat на различные патогены, включая трематодную инвазию; **адаптирована** методика с использованием 5-этинил-2-дезоксисуридином (EdU) для изучения пролиферативной способности циркулирующих клеток гемолимфы.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

предложена классификация типов клеток гемолимфы лёгочных моллюсков; **разработана** методика анализа клеточного состава гемолимфы моллюсков и иммунизированных особей с использованием проточной цитофлуориметрии; **определены** основные этапы протекания клеточного иммунного ответа pulmonat на заражение трематодами; **предложено** использовать данные о клеточном составе гемолимфы pulmonat при проведении мониторинга экологического состояния водоемов, а также для определения зараженности моллюсков трематодами.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

комплексный характер изучения клеток гемолимфы pulmonat; проанализирована актуальная литература по классификации и функциональной активности клеток и плазмы гемолимфы; для получения достоверных данных о мультипликации, морфологии и функциональной активности гемоцитов в работе использованы различные методы (цитохимии, гистохимии, флуоресцентной и конфокальной микроскопии, электронной микроскопии, проточной цитофлуориметрии, молекулярной биологии); пробоподготовка и анализ осуществлялись на современном оборудовании, сертифицированном для лабораторных исследований: стереомикроскоп Leica M165C, световые микроскопы Leica DM5000, Leica DM6000, Leica DMi8, электронные микроскопы JEM-1011 и Zeiss EVO 40. Для приготовления гистологических и замороженных срезов использовали микротом Leica RM2235 и криотом Leica CM 1520. Ультратонкие срезы изготовлены на ультратоме Leica EM UC6. Цитофлуориметрический анализ выполнен на проточном цитометре BD Accuri™ C6.

Для фотографирования цитохимических и гистологических препаратов, а также проведения микроскопического анализа использованы программы «Image Scope», «Image J», «LasX». Для определения фенотипического in vitro анализа гемоцитов использовали программное

обеспечение CellProfiler. Обработка секвенограмм была осуществлена с помощью программы BioEdit. Для анализа гомологии нуклеотидных последовательностей использовали программу BLAST. Обработку данных, полученных с помощью проточной цитометрии проводили в программе Kaluza Analysis Software; **теоретическая часть диссертации** развивает представления о клеточном составе гемолимфы легочных моллюсков, их функциональной активности, гемопоэзе и участии в клеточных иммунных реакциях на трематодную инвазию; **идея базируется** на полученных цитохимических, гистохимических, электронно-микроскопических, цитометрических и молекулярно-генетических данных, их тщательном обобщении и оценке всех современных сведений по морфологии моллюсков и трематод, а также функциональной активности клеток гемолимфы; **использованы** оригинальные материалы, которые были получены в ходе исследовательской работы автора с проведением сравнения с ранее полученными данными других авторов; **установлено** качественное совпадение результатов автора с современными данными, представленными в независимых источниках по исследованию клеточных защитных реакций pulmonat.

Личный вклад соискателя состоит в: участии на всех этапах исследований – от полевых сборов материала и его первичной обработки до организации и проведения всех экспериментов. А. С. Токмакова самостоятельно поддерживала культуры экспериментальных моллюсков и трематод. Она на профессиональном уровне освоила методы, используемые в работе, самостоятельно провела анализ полученных данных и сопоставила собственные результаты с литературными. Во всех совместных публикациях ей принадлежит существенная роль как в получении данных, так и в подготовке рукописи.

Диссертация Токмаковой Арины Сергеевны представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития паразитологии, клеточной биологии

и сравнительной иммунологии.

На заседании 5 марта 2019 г. диссертационный совет принял решение присудить Токмаковой А. С. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 10 докторов наук по специальности 03.02.11 – Паразитология и 3 доктора наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки), участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 3 человека, проголосовали: за – 20, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

6 марта 2019 г.

Председатель диссертационного совета

О. Н. Пугачев

Секретарь диссертационного совета

О. Г. Овчинникова

