

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Института  
биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина  
Российской академии наук (ИБВВ РАН),  
д.б.н., профессор

1.2022



ведущей организации - Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук (ФГБУН ИБВВ РАН) на диссертационную работу

Изучение адаптивных возможностей гидробионтов и их механизмов к действию природных факторов – одна из ключевых и актуальных проблем современной гидробиологии и экологии. Физиолого-биохимические реакции организма лежат в основе адаптации животных к изменяющимся условиям среды их обитания. Одним из наиболее важных природных факторов, влияющих на все стороны жизнедеятельности морских гидробионтов, является соленость. Актуальность проблеме придает наблюдающиеся в последнее время изменения климата, связанные с глобальным потеплением, которые могут уменьшать соленость морских акваторий за счет возрастающего таяния ледников и притока пресных вод или увеличивать в связи усилением испарения.

1

Поэтому исследование механизмов их адаптации к изменению этого природного фактора имеет фундаментальное научно-теоретическое значение. Кроме того, многие виды моллюсков являются объектами аквакультуры, что обуславливает практическую ценность таких исследований. Одним из видов морских двустворчатых моллюсков, широко используемых в научных исследованиях и имеющих практическое значение в аквакультуре является *Anadara kagoshimensis*.

Однако до сих пор, несмотря на очевидную научно-практическую значимость, адаптивные возможности морских двустворчатых моллюсков к изменению солености среды обитания и лежащие в их основе механизмы остаются малоизученными. В первую очередь это касается клеточного ответа гемоцитов гемолимфы моллюсков, поскольку в основе соленосных адаптаций у них, как у всех конформеров, должны лежать именно клеточные реакции. Поэтому оценка морфофункционального статуса клеток гемолимфы моллюсков в условиях изменяющейся солености позволит дать интегральную характеристику состояния их организма и вскрыть механизмы адаптации к ним.

Учитывая выше сказанное, становится очевидной актуальность, новизна, научно-теоретическая и практическая значимость диссертационной работы Кладченко Е.С, цель которой – исследовать реакции клеток гемолимфы двустворчатого моллюска-вселенца *A. kagoshimensis*, обеспечивающие широкий диапазон осмотической толерантности, при его акклимации к условиям осмотического стресса.

Для реализации поставленной цели диссертантом был сформулирован ряд логически вытекающих из неё задач:

1. Изучить морфофункциональные особенности гемоцитов гемолимфы *A. kagoshimensis* с использованием методов светооптической микроскопии, проточной цитометрии и разработать на этой основе их классификацию.



2. Исследовать в условиях *in vivo* влияние гипер- и гипоосмотических условий морской среды на морфофункциональные характеристики гемоцитов *A. kagoshimensis*.

3. Оценить осмотическую стойкость гемоцитов *A. kagoshimensis* с помощью метода лазерной дифракции.

4. В условиях *in vitro* исследовать процессы регуляции клеточного объема у гемоцитов *A. kagoshimensis* в условиях гипер- и гипоосмотических нагрузок.

Структура работы традиционна для подобного рода исследований. Она состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, перечня сокращений и условных обозначений, а также списка литературы, состоящего из 257 источников, в т. ч. 255 — на иностранных языках. Общий объем рукописи — 137 страниц. Работа включает 6 таблиц и иллюстрирована 41 рисунком.

Во *Введении* автор обозначает исследуемую проблему, лаконично, но убедительно обосновывает её актуальность и степень её разработанности, формулирует цель и задачи исследования, методологию и методы исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, выносимые на защиту положения, обосновывает соответствие паспорту научной специальности, степень достоверности результатов, описывает где и когда проводилась апробация материалов, объём и структуру работы, указывает личный вклад соискателя в подготовку диссертационной работы, приводит количество публикаций по теме диссертации, выражает благодарности руководителю и коллегам, помогавшим в выполнении работы.

В *первой главе Обзор литературы* рассмотрен широкий круг вопросов, определяющих соленость как ведущий экологический фактор. Приводятся математические модели глобального изменения климата и его влияние на соленость морских вод. Описаны экологические и физиологические последствия гипоосмотических и гиперосмотических изменений солёности различной длительности. Анализируются имеющиеся данные о влиянии солёности на функциональное состояние морских организмов разных

эволюционных и экологических групп и механизмах их адаптации к её изменениям. При этом особый акцент делается на двустворчатых моллюсках и уделяется большое внимание классификации, морфофункциональным особенностям и участию клеток их гемолимфы в адаптационных процессах, связанных с изменением солености. Обобщая обзор данных, в конце главы автор еще раз подчеркивает необходимость проведения работ по избранной теме. Следует отметить в качестве положительного момента, что обзор литературы выполнен достаточно полно и отражает основную информацию по теме диссертации.

Во второй главе **Материалы и методы исследований** дается общая характеристика объекта исследования *Anadara kagoshimensis*, описывается время, место и процедура сбора и условия лабораторного содержания моллюсков. Представлена информация о методике отбора, пробоподготовки гемолимфы и оценки осмотической стойкости клеток и реакции изменения средноклеточного объема. Описаны экспериментальные схемы моделирования гипо- и гиперосмотических условий в эксперименте *in vitro* и *in vivo*, а также методика отбора и пробоподготовки образцов гемолимфы. Представлена схема моделирование реакции объёмных изменений гемоцитов в гипо- гиперосмотических условиях. В работе использованы современные методы и оборудование: оптическая микроскопия, проточная цитометрия, градиентное центрифугирование, лазерная дифракция для анализа микрочастиц. Полученные результаты обрабатывались адекватными статистическими методами для последующего анализа. В целом, раздел написан четко и достаточно детально, но без излишней информации, что позволяет ясно понять суть проведенных исследований.

В главах третьей - пятой описаны результаты собственных исследований. Структура глав выстроена так, что в начале каждой главы идет краткое описание изучаемого вопроса, далее в подразделах подробно излагаются результаты и отдельно дается подраздел с обсуждением и анализом полученных результатов. Завершает каждую главу краткое резюме



полученным результатам, что облегчает восприятие информации. Такая структура, на наш взгляд, является оптимальной и облегчает понимание материала, что следует отметить в качестве положительно момента.

В третьей главе **Клеточный состав гемолимфы *A. kagoshimensis*** представлены результаты изучения гемоцитов анадары при помощи методов проточной цитометрии, световой микроскопии и градиентного центрифугирования. Охарактеризованы морфологические и размерные характеристики выделенных морфотипов клеток. Описаны особенности популяций клеток гемолимфы к продукции активных форм кислорода и мембранного потенциала митохондрий. На основании полученных результатов дана классификация гемоцитов.

Установлено, что в гемолимфе анадары присутствуют 3 морфотипа гемоцитов, различающиеся по размеру и форме клетки, способности образовывать псевдоподия реакции клетки на окрашивание, наличию цитоплазматических включений, ядерно-цитологическому отношению (ЯЦО). В то же время на основании гранулярности цитоплазмы, относительного размера, способности к продукции активных форм кислорода (АФК) и мембранного потенциала выделено две субпопуляции гемоцитов. Методом центрифугирования в градиенте плотности гемолимфы анадары выделено 3 фракции клеток.

Анализ всех полученных данных позволил автору впервые выделить два типа клеток гемолимфы анадары: небольшие, агранулярные, округлой формы, без псевдоподий, с высоким значением ЯЦО и низким мембранным потенциалом амебоциты и крупные, гранулярные, разнообразные по форме, образующие псевдоподии, с более низким индексом ЯЦО и высоким мембранным потенциалом эритроциты. Оба типа гемоцитов проявляли одинаковую способность к формированию окислительного взрыва. Доля амебоцитов и эритроцитов в гемолимфе моллюсков была примерно 15 и 85% соответственно.

В четвертой главе Влияние кратковременной гипо- и гиперосмотической нагрузки на морфофункциональные особенности гемоцитов *A. kagoshimensis* приводятся результаты исследования влияния краткосрочного гипер- и гипоосмотического воздействия на клетки гемолимфы двустворчатого моллюска, распространенного в водах с соленостью от 12‰ до 35‰.

Автором впервые установлено, что адаптивная реакция *A. kagoshimensis* на изменение солености среды связана со сдвигами в функциональном состоянии гемоцитов. Показано, что солевой стресс сопровождался изменением клеточного состава гемолимфы, а также влиял на форму и диаметр гемоцитов. Отмеченные изменения наблюдались на фоне усиления продукции АФК, как следствие развития окислительного стресса и повышения риска повреждения клеток. Гиперосмотические условия подавляли способности гемоцитов к генерации окислительного взрыва. В свою очередь, увеличение мембранного потенциала митохондрий в условиях гипо- и гиперосмотического стресса, свидетельствует об умеренном соленосном стрессе. Результаты настоящей работы наглядно демонстрируют широкий адаптивный потенциал анадары к гиперосмотическому стресс-воздействию.

В пятой главе Клеточные реакции на изменения солености моллюска *A. kagoshimensis* описываются результаты исследования изменений объема эритроцитов анадары (*A. kagoshimensis*) в условиях *in vivo* после гипо- и гиперосмотической акклимации моллюсков и оценена осмотическая стойкость гемоцитов после их инкубации *in vitro* в гипо- и гиперосмотических условиях. Впервые установлено, что инкубация моллюсков в условиях соленосного стресса привела к сдвигу кривой осмотической стойкости гемоцитов. Данный результат свидетельствует о способности гемоцитов анадары изменять стратегию соленосной адаптации. В ходе эксперимента впервые показано, что гемоциты анадары способны к



частичному восстановлению клеточного объема, как в условиях гипоосмотического стресса, так и в условиях гиперосмотического стресса. Однако механизмы коррекции клеточного объема требуют дальнейшего изучения.

*В заключении* автор коротко обобщает результаты и их обсуждение, представленные в предыдущих главах.

По результатам работы автор делает семь выводов, которые полностью раскрывают поставленные задачи и соответствуют цели диссертации.

Вместе с тем, при прочтении и анализе диссертации возникает ряд замечаний и вопросов, на которые при защите хотелось бы получить ответы диссертанта:

1. В автореферате отсутствует список сокращений, что затрудняет понимание представленного в нем материала, если у читающего его нет полного текста диссертации, где этот список представлен.
2. В автореферате во Введении не все формальные сведения отражены. Отсутствуют подразделы Личный вклад автора и Структура, объем диссертации, разделы Апробация работы, Публикации объединены в один раздел Степень достоверности и апробация результатов. В этом разделе отсутствуют названия и годы проведения конференций, где проходила апробация работы. Включен дополнительно раздел Методология и методы исследования, хотя логичнее перенести его в основную часть работы в раздел Материал и методы исследования.
3. Автор использует два разных написания обозначения стресса, вызванного изменением солености: соленостный стресс и соленосный стресс. Оба названия используются в научной литературе, но целесообразней придерживаться одного из них.
4. Автор использует понятие «осмолярность», которую выражает в мОсм/кг. Вместе с тем, в соответствующей научной литературе термин "осмолярность" относится к числу частиц растворенного вещества на литр раствора, тогда как термин "осмоляльность" относится к числу

частиц растворенного вещества на **килограмм** растворителя. При рассмотрении физиологии жидкостей организма разница между осмоляльностью и осмолярностью незначительна, поскольку жидкости организма обычно представляют собой разбавленные водные растворы. Но следовало бы придерживаться единой принятой терминологии и соответствующих единиц ее выражения.

5. В работе очень коротко говорится о способности гемоцитов к окислительному взрыву и методе его измерения. Хотелось бы, чтобы автор более детально пояснил, что он понимает под окислительным взрывом и что лежит в основе этого феномена.
6. Аббревиатура **RVD** расшифровывается как «regulatory volume decrease» и переводится как «регуляторное **уменьшение** объема», а **RVI** – «regulatory volume increase» переводится как «регуляторное **увеличение** объема». Автор использует аббревиатуру **RVD** при описании моделирования реакции регуляторного **увеличения** объема в условиях гипоосмотической нагрузки, а **RVI** – при описании моделирования реакции регуляторного **снижения** объема в условиях гиперосмотической нагрузки. Исходя из расшифровки перевода аббревиатур их следует поменять местами. Если это не так, то необходимо дать пояснение.
7. Неудачный термин «оценка ширины распределения графика осмотической хрупкости (рис.39). Не ясно, о чем идет речь. Имеется в виду график ширины распределения эритроцитов (red cells distribution width, RDW) по размеру? Возможно, неудачный перевод англоязычного термина? Следует пояснить.
8. Неудачный термин «засоление» по отношению к водной среде. Он более подходит к почвам. Для водных объектов лучше говорить «повышение или понижение солености»
9. Изменение солености не может быть стрессом. Это стресс-фактор или стрессор, а стрессом является морфофункциональный адаптивный ответ



организма. Стресс – это совокупность неспецифических адаптационных (нормальных) реакций организма на воздействие различных неблагоприятных факторов - стрессоров (физических или психологических), нарушающее его гомеостаз, а также соответствующее состояние нервной системы организма (или организма в целом).

10. При описании экспериментов *in vivo*, в частности, исследования осмотической хрупкости гемоцитов, использование термина «инкубация» применительно к моллюскам при их содержании в гипо- или гиперосмотических условиях не корректно. Обычно этот термин применяется для клеточных или субклеточных структур в экспериментах *in vitro*. Для целого организма более подходят термины «содержание, экспонирование, нахождение».
11. В тексте есть немногочисленные стилистически неудачные выражения, опечатки и грамматические ошибки.

Тем не менее, указанные замечания не снижают ценности представленной автором работы.

В целом диссертационная работа выполнена на современном научном уровне, хорошо технически оформлена, отличается достаточным и доступным научным содержанием, четкостью и простотой литературного стиля изложения, ясностью мыслей, логичностью обоснования развиваемых положений. Цели и задачи, поставленные автором, успешно решены, результаты получены на основе правильно и логично спланированных лабораторных исследований, обработаны статистически, удачно и полностью проиллюстрированы в таблицах и рисунках и их достоверность не вызывает сомнений. Выводы сформулированы четко и полностью соответствуют поставленной цели и задачам.

Работа представляет целостное, законченное исследование и имеет несомненную теоретическую и практическую ценность. Её результаты прошли апробацию на отечественных и международных конференциях и полностью отражены в рецензируемых научных изданиях. По материалам

диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 6 индексируются в базах WoS (Scopus) и 6 тезисов докладов. Автореферат, в основных положениях, отражает содержание работы.

По актуальности, новизне, методическому уровню и научно-практической значимости представленная диссертационная работа полностью соответствует критериям, установленным в пп. 9-14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 «О Порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ (ред. от 11.09.2021 г.), а её автор, Кладченко Екатерина Сергеевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.16. Гидробиология»

Отзыв составлен заведующим лабораторией физиологии и токсикологии водных животных ИБВВ РАН, доктором биологических наук, Г.М. Чуйко.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании лаборатории физиологии и токсикологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук «14» ноября 2022 г. протокол № 4.

Заведующий лабораторией физиологии  
и токсикологии, доктор биологических наук,  
специальность 1.5.4. Биохимия  
(03.00.04 – биологическая химия)

Чуйко Григорий Михайлович

15.11.2022 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук (ИБВВ РАН) Почтовый адрес: 152742, Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, ИБВВ РАН.

Телефон: 8 4854 72 48 16

e-mail: [adm@ibiw.ru](mailto:adm@ibiw.ru)

Сайт: <http://ibiw.ru>

