

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Кладченко Екатерины Сергеевны

«Акклимация моллюска-вселенца *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) к условиям осмотического стресса», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 – гидробиология

Актуальность темы исследования

На фоне глобальных климатических изменений помимо повышения температуры Мирового океана, значительно меняется еще один из ключевых факторов водной среды – концентрация солей. Солевой режим оказывает огромное влияние на жизнь водных организмов, поскольку большинство обитателей пойкилосмотичны и соленость окружающей среды контролирует их внутреннее давление. Изменение концентрации солей в воде может приводить как к незначительным физиологическим перестройкам (адаптациям) у организма, так и его гибели. При аномальных изменениях солености, организмы с неконтролируемой клеточной осморегуляцией погибают, что в дальнейшем при стабильных длительных климатических изменениях может привести не только к исчезновению вида, но и необратимым трансформациям всей экосистемы.

Основным компонентом морских бентосных сообществ являются двустворчатые моллюски. Но несмотря на их широкое распространение и разнообразие местообитаний, адаптивные механизмы, обеспечивающие им длительное и успешное выживание в морской среде с изменчивой соленостью, остаются до сих пор неясными. Вероятно, процветанию данной группы животных способствовал высокий уровень развития уникальных адаптационно-защитных механизмов, отсутствующих, в том числе у представителей более высших таксонов. Одной из центральных систем моллюсков, отвечающей за формирование физиологических адаптаций к изменениям, происходящим в окружающей среде, поддержание гомеостаза и обеспечение иммунной защиты является гемолимфа, в которой ключевую роль в обеспечении адекватных реакций на различные факторы отводят гемоцитам. В этом свете диссертационная работа Кладченко Екатерины Сергеевны, посвященная исследованию реакции клеток гемолимфы двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara kagoshimensis* на осмотический стресс в процессе их акклимации, представляет несомненную актуальность.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность результатов, полученных Кладченко Е.С. не вызывает сомнений. Экспериментальный материал достаточен по объему, примененные методы адекватны цели и задачам исследования, что позволило диссертанту получить научно обоснованные и достоверные результаты. Научные положения и выводы полностью основаны на результатах собственных исследований и в полной мере отвечают поставленным задачам.

Оценка новизны, достоверности и значимости научных результатов

Автором впервые выполнена идентификация гемоцитов *A. kagoshimensis*, основанная на морфологических и функциональных критериях, в результате чего описаны два типа клеток гемолимфы: агранулярные (амебоциты) и гранулярные (эритроциты). Показано, что предварительная акклимация двустворчатых моллюсков в гипо- и гиперосмотических условиях приводит к сдвигу кривой осмотической стойкости, что свидетельствует о наличии у *A. kagoshimensis* механизмов изменения стратегии соленостной адаптации. Впервые показано, что гемоглобин-содержащие гемоциты *A. kagoshimensis* способны восстанавливать свой объем в условиях гипо- и гиперосмотического стресса.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационная работа Кладченко Е.С. делает весомый вклад не только в понимание механизмов поддержания внутреннего постоянства организма в условиях

изменчивых факторов морской среды, но и предоставляет уникальные сведения для марикультурных хозяйств, касающихся методических аспектов адаптации моллюсков при культивировании их в гипо- и гиперосмотическим условиях.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Кладченко Е.С. изложена на 137 страницах, содержит 41 рисунок и 4 таблицы. Работа состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 257 источников, из них 255 на иностранном языке.

Во введении автор описывает актуальность, степень разработанности и новизны темы диссертационного исследования, формулирует цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту, раскрывает научную новизну и значимость работы, анонсирует структуру и методические особенности выполнения работы. Однако в разделе, касающегося актуальности исследования, автор затрагивает только сведения о реакции моллюсков на осмотический стресс, а обоснования проведенных автором работ по анализу клеточного состава гемолимфы *A. kagoshimensis* отсутствует. Также некоторое замешательство вызвало не знание автором структуры собственной диссертационной работы. Так, на стр. 10 автор утверждает, что «Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста... иллюстрирована 6 таблицами...».

Глава «Обзор литературы» состоит из логично структурированных разделов. Вначале этой главы автор анонсирует ее содержание, заявляя об анализе математических моделей глобального изменения климата, однако этих сведений в данной главе не обнаружено. В целом глава разъясняет понятие «соленость», как этот фактор влияет на различные группы организмов и какие механизмы регуляции внутренней среды у этих организмов существуют.

В главе «Материалы и методы» описаны использованные в ходе работы над диссертацией методы. Автором был применен широкий спектр современных и классических методов, последовательно изложенных согласно логике исследования. Использованные в работе методы позволили решить все поставленные задачи и являются адекватными цели работы. Несмотря на некоторую небрежность в изложении данной главы, стоит отметить подробность описания методик, что в свою очередь позволит любому исследователю без труда воспроизвести описанные автором эксперименты.

В главе «Клеточный состав гемолимфы *A. kagoshimensis*» представлена классификация гемоцитов анадары с морфологической и функциональной характеристикой соответствующих морфотипов клеток. Глава начинается с подробной морфометрической характеристики трех морфотипов гемоцитов, идентифицируемых с помощью методов микроскопии. В последующих разделах автор, применяя градиентное центрифугирование и проточную цитометрию, подтверждает присутствие в гемолимфе анадар клеточных популяций, достоверно отличающихся между собой по размеру и степени гранулированности, а также способности к генерации активных форм кислорода и мембранному потенциалу митохондрий. В результате детального анализа автором было выделено два основных типа клеток в гемолимфе *A. kagoshimensis*: небольшие агранулярные (амебоциты) и крупные гранулярные гемоглобин-содержащие (эритроциты) гемоциты, среди которых преобладающим типом были последние.

В главе «Влияние кратковременной гипо- и гиперосмотической нагрузки на морфофункциональные особенности гемоцитов *A. kagoshimensis*» приведены результаты анализа осмолярности цельной гемолимфы и морфофункциональных параметров гемоцитов анадар при воздействии гипо- и гиперосмотического стресса в экспериментально моделируемых условиях. Установлено, что на *A. kagoshimensis* соленостный стресс не оказывает существенного влияния и достоверных изменений в исследуемых параметрах не наблюдается.

В главе «Клеточные реакции на изменение солености моллюска *A. kagoshimensis*» приведены результаты оценки осмотической стойкости и объема гемоглобин-содержащих гемоцитов после гипо- и гиперосмотического стресса. В результате проведенного исследования автором установлено, что данный тип клеток реагируют на гипосмотические условия регуляторным снижением объема клетки, тогда как на гиперосмотические – регуляторным увеличением объема.

В каждой из трех последних упомянутых глав достаточно подробно проанализированы полученные результаты, что не оставляет сомнений в оригинальности полученных данных и их практической значимости.

Заключение и выводы логично сформулированы, соответствуют положениям, отражают ключевые результаты и полностью отвечают поставленным задачам и цели, не вызывают возражений или сомнений в их обоснованности и достоверности. Однако наличие главы «Заключение» немного вводит в недоумение, поскольку информация в этой части работы повторяет «Выводы».

Завершается диссертационная работа списком цитируемой литературы, включающей внушительный перечень литературных источников. Значительное количество использованной литературы датируется последним десятилетием.

Автореферат диссертации Е.С. Кладченко «Акклимация моллюска-вселенца *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) к условиям осмотического стресса» полностью соответствует содержанию диссертационной работы и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями.

Вопросы и замечания

Принципиальных недостатков ни в содержании работы, ни в форме ее изложения нет. Однако, что касается общего оформления работы, то несмотря на то, что автор очевидно ознакомлен с некоторыми правилами оформления и в целом старался им следовать, работа написано небрежно, и содержит помимо множества опечаток, много орфографических, грамматических и стилистических ошибок, что отвлекло от сути работы, и вынуждало многократно перечитывать текст.

Замечания, которые можно высказать к диссертационной работе, касаются следующего:

1. Прежде всего это несоблюдение автором правил, описанных в ГОСТ, касающихся как оформления диссертационных материалов, так и общих моментов, затрагивающих написание сокращений, приведения аббревиатур, указания размерных единиц, цитирования авторов и прочего.
2. Часто диссертант приводит аргументы, не подтверждая их литературными ссылками (как, например, на стр. 4 строка 5, стр. 5 строка 29, стр. 23 строка 7, 10 и т.д.)
3. На стр. 5 строка 8-13 не совсем ясно рассуждение автора.
4. На стр. 14 строка 12 автор в контексте написанного предложения некорректно называет «соленость» – одним из основных стрессовых факторов...
5. В главе «Обзор литературы» не хватает расшифровки терминов «соленостный стресс», «осмотический стресс», «акклиматизация», «акклимация» не только для читателя, но и самого диссертанта, поскольку часто эти термины применялись автором равнозначно.
6. Стр. 17 строка 19, 20 – англоязычным аббревиатурам RVD и RVI приведена русскоязычная «расшифровка»
7. Стр. 18 строка 1-2 «Морские миксины...представляют небольшое число видов рыб». Миксины – не рыбы.
8. В разделе 1.2 «Влияние солености на функциональное состояние морских организмов» главы «Обзор литературы» не хватает системного представления имеющихся сведений о влиянии солености на различные функции организмов, как заявлено в самом названии этого раздела. В целом этот раздел представляет из себя отрывки имеющейся информации про всевозможные организмы. Не говоря уже о

- том, что в названии заявлены морские организмы, а речь в разделе идет и про пресноводные (например, стр. 17 абзац 2 или стр. 19 абзац 1).
9. В Таблице 1 для практически каждого из видов моллюсков приведен разный набор критериев при описании тех или иных типов клеток гемолимфы, а также сокращения, аббревиатуры без пояснений.
 10. На стр. 30 автор внезапно описывает гемоциты вида моллюска *M. californianus*, который отсутствует в Таблице 1 (далее по тексту это касается *A. kagoshimensis* и *A. trapezia*).
 11. На стр. 31 в последнем абзаце автор приходит к умозаключению, которое, к сожалению, было сделано еще в 1977 г., и касается классификации гемоцитов двустворчатых моллюсков, без приведения каких-либо литературных ссылок.
 12. Часто автор не указывает либо самого производителя, либо страну производителя при упоминании реактива или прибора.
 13. Описанная на стр. 37 методика окраски клеток является стандартной и не требует подробного описания. Если у автора не было каких-либо модификаций, то достаточно указать, что окраску проводили стандартно по методу Паппенгейма.
 14. Автор часто равнозначно применяет термины «диаграмма», «гистограмма» и «график».
 15. Для лучшего восприятия при описании различных методик окраски клеток не хватает подпунктов (стр. 39)
 16. Стр. 43 строка 8: если указываются обороты центрифуги, то необходимо указать и радиус ротора.
 17. Рисунок 9 – в подписях указаны буквы (обозначения), которые отсутствуют на рисунке. Но отсутствует расшифровка обозначений М1, М2 и М3
 18. На стр. 50 строка 1 автор указывает, что М3...«были преимущественно эллиптической формы, хотя обнаруживались и амeboподобные округлые элементы (рисунок 8)», но на фото рисунка 8 клетки такой формы отсутствуют. Тоже касается при описании ядра М3 на рисунке 10: автор указывает об ацентричном расположении ядра у данного типа клеток, но среди представленных на фотографии клеток лишь у одной ядро ацентрично. В будущем автору нужно более скрупулёзно подходить к выбору иллюстраций, чтобы не вводить в заблуждение читающего.
 19. На стр. 64 автор не корректно указывает, что «Состояние клеточных мембран оценивали при помощи красителя PI.», тогда как данный краситель является исключительно ядерным и связывается только с нуклеиновыми кислотами.
 20. Стр. 67 строка 5-8 не ясны предложения. Амебоциты – округлой формы, а эритроциты способны к образованию псевдоподий...возможно у автора опечатки.
 21. На рисунке 25 отсутствует обозначение «3», указанное в описании к этому рисунку.
 22. На рисунке 32 отсутствует обозначение «в», указанное в описании к этому рисунку.
 23. На стр. 79 автор указывают, что у некоторых видов моллюсков гиперосмотический стресс индуцировал апоптоз. Но схожих результатов диссертант не получил в своей работе: доля мертвых клеток, окрашенных пропидий йодидом, соответствовала норме. Может автору следовало также использовать, например, для оценки типа клеточной гибели помимо пропидий йодида, нацеленного на выявление некротических клеток, еще и аннексин, предназначенный как раз для оценки апоптоза.

Вопросы, возникшие при прочтении диссертации:

1. Стр. 17 строка 10, что автор имел ввиду под «осмотической последовательностью» в контексте написанного предложения?
2. Что означает термин «осмолиты»? Корректно ли словосочетание «органические осмолиты», приведенное диссертантом на стр. 18 и почему?
3. Из главы «Обзор литературы» так и не ясно какие существуют основные способы оценки осмотического стресса и его влияния на клетки.

4. Почему при изменении солености основным оцениваемым у организмов параметром является скорость/уровень потребления кислорода?
5. Каким принципом руководствовался автор, включая различные виды моллюсков в Таблицу 1? Почему автор не ограничился какими-то ключевыми моментами, которые, например бы, либо перекликались с инструментами, применяемыми в работе самого диссертанта, либо с близкородственными видами.
6. Уверен ли автор, что при фильтрации клеток через фильтр 20 мкм они не потеряют значительную часть амебоцитов, как раз предрасположенных к образованию конгломератов, что в свою очередь искажает исходное процентное соотношение клеточных типов в гемолимфе?
7. Не ясно последнее предложение на стр. 38. Не мог бы автор пояснить, что он имел в виду?
8. Из описания схемы эксперимента на стр. 40-41 не ясно брал ли автор гемолимфу у моллюсков до воздействия (контроль относительно «самих себя» у моллюсков)? Может же быть, что некоторые из особей изначально имели какие-либо отклонения в гематологических (и не только) параметрах.
9. Термин «осмотическая хрупкость» – это устойчивое выражение? И что оно означает? (Если можно со ссылкой на литературный источник)
10. Автор не приводит результатов подсчета различных клеточных типов на мазках гемолимфы (хотя в разделе 2.3.1 это было заявлено). Соотносил ли диссертант данные подсчета клеточных типов, полученных с помощью микроскопии и цитометрии? Есть ли достоверная разница?
11. Почему автор проводил оценку митохондриального потенциала гемоцитов при осмотическом стрессе?
12. В каждой из фракций гемоцитов, полученных автором при градиентном центрифугировании, содержалось достаточно много клеток С2, может тогда применяемый метод был не подходящим, ведь градиентное центрифугирование как раз предназначено на «выделение» отдельных клеточных типов?
13. Почему автор нигде в своей работе не обсуждает результаты работы Ким и коллег, опубликованных в 2020 году, которые также посвящены исследованию популяций гемоцитов у того же вида моллюсков *A. kagoshimensis*? При этом не ясно почему автор хотя бы не соотносит полученные результаты с представителями семейства Arcidae, а делает это с мидиями и устрицами?
14. Что такое «эритроцитарные тени»? На стр. 68 автор вводит термин «эритроцитарные тени» без пояснения и указания в «Материалах и методах», что эту некую форму тоже оценивали.
15. На стр. 68 автор также описывает, что при гиперосмотическом стрессе гранулы смещаются к центру, но не указывает как было при норме.
16. Как вы думаете почему с повышением гипоосмотической нагрузки у гемоцитов увеличивался мембранный потенциал митохондрий, а при гиперосмотической – нет, но при этом способность к генерации АФК значительно снизилась?

Несмотря на все вышеперечисленные замечания они не умаляют достоинств работы, но должны быть учтены автором при дальнейшей работе.

Заключение

Тематика исследования, формулировка цели, постановка задач, набор использованных методов и область применения полученных результатов полностью соответствуют специальности, по которой представлена работа к защите.

Результаты диссертационной работы, выносимые на защиту, прошли достаточную апробацию на 6 научных конференциях, в том числе международных, и опубликованы в виде 5 статей в высокорейтинговых рецензируемых научных изданиях, реферируемых базами РИНЦ, Web of Science и Scopus.

Заключение

Тематика исследования, формулировка цели, постановка задач, набор использованных методов и область применения полученных результатов полностью соответствуют специальности, по которой представлена работа к защите.

Результаты диссертационной работы, выносимые на защиту, прошли достаточную апробацию на 6 научных конференциях, в том числе международных, и опубликованы в виде 5 статей в высокорейтинговых рецензируемых научных изданиях, реферируемых базами РИНЦ, Web of Science и Scopus.

Диссертационная работа «Акклимация моллюска-вселенца *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) к условиям осмотического стресса» является завершённой научно-квалификационной работой, и 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.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Кладченко Екатерина Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16. – гидробиология.

Официальный оппонент:

Сокольникова Юлия Николаевна

Кандидат биологических наук

(03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»)

Младший научный сотрудник

лаборатории физиологии

ФГБУН Национальный научный центр морской биологии

им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

690041, Россия, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

Тел. +7(902)4847481

yulia.sn@mail.ru

«01» ноября 2022 г.

/Ю.Н. Сокольникова/

