

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Тимофеева Максима Анатольевича, на диссертационную работу Кладченко Екатерины Сергеевны на тему «Акклимация моллюска-вселенца *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) к условиям осмотического стресса», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 — гидробиология (биологические науки)

### Актуальность

Диссертационная работа Кладченко Екатерины Сергеевны посвящена исследованию влияния осмотического стресса на морфофункциональные особенности гемоцитов моллюска *Anadara kagoshimensis*. Двустворчатые моллюски являются основными объектами марикультуры. Известно, что у двустворчатых моллюсков, как организмов-осмоконформеров, осмолярность внутренних жидкостей меняется вследствие изменения внешней осмолярности, что существенно ограничивает их адаптивный потенциал. С другой стороны, краткосрочные изменения солености могут приводить к подавлению реакций неспецифического иммунного ответа. Кроме этого, с точки зрения фундаментальных знаний интересны механизмы, позволяющие эвригалинным видам двустворчатых моллюсков длительно адаптироваться к гипо- и гиперосмотическим условиям. Все это определяет не только актуальность, но и практическую значимость исследований биологии моллюсков в целом и особенностей функционирования иммунной системы в условиях осмотического стресса в частности.

**Научная новизна исследований и результатов, сформулированных в диссертационной работе.** В диссертационной работе Кладченко Е.С. впервые выполнена идентификация типов клеток гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis*, основанная как на морфологических критериях, так и на комплексе морфофункциональных признаков. Автором работы описаны два типа гемоцитов: агранулярные клетки – амебоциты и гранулярные – эритроциты. Показано, что эритроциты *A. kagoshimensis* в равной степени с амебоцитами способны к генерации активных форм кислорода, что может свидетельствовать об участии в реакции иммунного ответа как эритроцитов, так и амебоцитов. Дана оценка влияния акклимации к условиям осмотического стресса на динамику морфофункциональных параметров клеточных факторов гемолимфы анадары. Соискателем использованы оригинальные подходы к оценке осмотической стойкости гемоцитов после гипо- и гиперосмотического стресса. Показана достоверная зависимость сдвига кривой лизиса от осмотических условий среды, в которой содержались моллюски. Впервые показано, что гемоциты гемоглобин-содержащего моллюска *A. kagoshimensis* способны как к регуляторному снижению объема, так и к регуляторному увеличению объема в условиях осмотического стресса.

**Значимость результатов диссертационной работы для науки и практики.** Результаты проведенных исследований расширяют фундаментальные знания о врожденном иммунитете двустворчатых моллюсков. Полученные результаты представляют несомненный интерес для исследователей, работающих в различных областях биологии (зоология беспозвоночных, иммунология, клеточная биология, гистология, гидробиология и т.д.) и

позволяют оценить диапазоны толерантности анадары в контексте перспективности массового культивирования в марикультурных хозяйствах Российской Федерации с учетом колебаний солености и глобальных изменений климата.

**Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.** Диссертант показывает глубокие знания по рассматриваемой проблеме на мировом уровне, о чем свидетельствует анализ 257 источников литературы, из которых 255 – публикации иностранных коллег. Анализ полученных результатов проведен с использованием самых современных данных. Методы подобраны адекватно поставленным задачам. Статистическая обработка данных в достаточной степени отражает выявленные эффекты и закономерности. Выводы, представленные в работе, хорошо обоснованы, вытекают из полученных данных, задачи исследования решены. Положения, выносимые на защиту, и выводы соответствуют пунктам 1, 2 паспорта специальности 1.5.16 – гидробиология.

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ, из них 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 6 в журналах, индексируемых в базах WoS (Scopus) и 6 тезисов докладов.

**Структура и содержание работы.** Представленная диссертация хорошо структурирована, логически обоснована, автор продемонстрировал способность решать поставленные научные задачи, анализировать полученные данные. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 разделов, выводов и списка литературы, включающего 257 источников (в том числе иностранных - 255). Работа иллюстрирована 6 таблицами и 41 рисунком.

В разделе «**Введение**» приведен краткий обзор по проблеме изучения защитно-адаптационной системы моллюсков, обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи работы. Положения, выносимые на защиту, соответствуют полученным результатам.

В **Главе 1 «Обзор литературы»** подробно изложен анализ современных знаний об изменении солености, влиянии колебания солености на функциональное состояние гидробионтов (рыб и моллюсков), стратегиях их адаптации к изменению солености, детально описаны принципы классификации клеток гемолимфы.

В **Главе 2 «Материалы и методы»** представлена информация об объекте исследования и детально охарактеризованы используемые методические подходы. Подробно описана процедура сбора и содержания моллюсков. В работе использованы современные методы исследования – световая микроскопия, проточная цитометрия, центрифугирование в градиенте плотности Percoll и метод лазерной дифракции. В разделе «Материалы и методы» автор приводит детальное описание и схемы постановки *in vitro* экспериментов по определению осмотической стойкости гемоцитов и объемных изменений в гипо- и гиперосмотических условиях, что существенно упрощает читателю понимание и оценку полученных результатов.

### **Глава 3 «Клеточный состав гемолимфы *A. kagoshimensis*»**

В настоящей главе, посвященной клеточному составу гемолимфы анадары, даны описания морфотипов клеток, показаны их функциональные различия. Показано, что исследуемые типы клеток проявляли одинаковую способность к формированию окислительного взрыва, но статистически значимо отличались по показателю мембранного

потенциала митохондрий. Следует отметить, что полученные данные по классификации клеточных типов гемоцитов могут быть использованы учеными для последующей интерпретации исследований по оценке изменений функционального состояния анадарты на уровне клеток гемолимфы.

В Главе 4 «Влияние кратковременной гипо- и гиперосмотической нагрузки на морфофункциональные особенности гемоцитов *A. kagoshimensis*» приведены результаты исследования влияния краткосрочного гипер- и гипоосмотического стресса на клетки гемолимфы двустворчатого моллюска, распространенного в водах с соленостью от 12‰ до 35‰. Проанализированы изменения морфофункциональных особенностей гемоцитов после акклимации к условиям осмотического стресса.

#### Глава 5 «Клеточные реакции на изменение солености моллюска *A. kagoshimensis*»

В этой главе оценена осмотическая стойкость гемоцитов у моллюсков после инкубации в гипо- и гиперосмотических условиях. Результаты, представленные в главе, доказывают способность гемоцитов регулировать объем в осмотически нарушенных условиях. Данные, полученные диссертантом, отличаются новизной и достоверностью.

В разделе «Обсуждение» проведен детальный анализ результатов в контексте современного состояния исследуемой проблемы.

В разделе «Заключение» автором обобщены полученные научные результаты. Обсуждается теоретическая и практическая значимость исследования.

**Выводы** отражают результаты работы, четко сформулированы и согласуются с поставленными задачами.

Результаты исследований содержат новые научные сведения и свидетельствуют о безусловном личном вкладе автора диссертации в изучаемый раздел гидробиологии. Диссертационная работа написана хорошим научным языком, доступна для понимания и не вызывает существенных замечаний по форме, содержанию и способу изложения. Опечатки и неудачные выражения единичны и не снижают общего положительного впечатления о работе.

Принципиальных замечаний по диссертации Кладченко Е.С. нет. В процессе рецензирования возникли следующие вопросы и замечания:

- 1) Могли ли изменения функционального состояния моллюсков объясняться не действием осмотического стресса, а длительностью содержания в лабораторных условиях?
- 2) Каким образом подбирали осмолярность для инициации реакции регуляторного снижения и регуляторного увеличения объема?
- 3) По какому принципу подбирали экспериментальные уровни солености? Как исследуемый диапазон солености соотносится с ареалом анадарты?
- 4) Почему был выбран вариант мягкой акклиматизации моллюсков к солености, а не резкая смена, когда это является полноценным стрессом?
- 5) Почему колебания солености в сторону опреснения были связаны с ростом АФК, а в сторону засоления – наоборот?
- 6) Почему не исследовали границы выживаемости?

7) В литературном обзоре и обсуждении результатов автор приводит транслитерацию фамилий зарубежных авторов, что несколько затрудняет поиск соответствующих источников в списке использованной литературы.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертационная работа 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

Доктор биологических наук,  
директор Научно-исследовательского института  
биологии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный  
университет», заведующий лабораторией  
«Стресс-физиологии и перспективных биотехнологий»,  
профессор кафедры гидробиологии и зоологии  
беспозвоночных биолого-почвенного факультета  
Иркутского государственного университета

  
Тимофеев Максим Анатольевич

« 15 » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Россия, 664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3.

<http://www.bioinstitute.ru>

Тел. (3952) 24-30-77

Email: m.a.timofeyev@gmail.com

