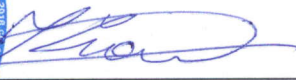


«УТВЕРЖДАЮ»

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

И.о. директора по приказу от 11.12.2019
№367-лс




В.Т. Комов

12.12.2019

Приказ №367лф от 11.12.2019

ОТЗЫВ

ведущей организации - Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской академии наук (ФГБУН ИБВВ РАН) на диссертационную работу
КУХАРЕВОЙ Татьяны Александровны «КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КРОВИ И
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ОРГАНОВ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ДОННЫХ РЫБ
(СЕВАСТОПОЛЬСКАЯ БУХТА, ЧЕРНОЕ МОРЕ)», представленную на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
«03.02.10 – гидробиология»

Проблема адаптации живых организмов к действию природных и антропогенных факторов – одна из ключевых в современной биологической науке. Морфофункциональные изменения на суборганизменном уровне лежат в основе адаптации животных к изменяющимся условиям среды их обитания. Актуальность проблеме придает наблюдающиеся в последнее время глобальные изменения климата на фоне усиливающегося антропогенного пресса на окружающую среду, в целом, и на водные экосистемы, в частности. Все эти факторы влияют на адаптивные ответы организма.

Среди физиологических систем, которые первыми реагируют на изменение внешней среды на уровне респираторных функций у водных животных, является система красной крови. И хотя к настоящему времени многое уже известно о структурно-функциональных особенностях этой системы у костистых морских рыб, остается достаточно не до конца исследованных вопросов. В частности, не изучен механизм развития асфиксии у тепловодных рыб при гипотермии на фоне усиления анаэробных процессов и снижения кислородных потребностей в их тканях, с одной стороны, и повышения концентрации растворенного в воде кислорода, с другой. Еще одним аспектом, требующим изучения, являются процессы, которые предшествуют изменениям в системе красной крови на самых ранних этапах адаптации к дефициту кислорода, хотя на более поздних сроках ее реакция на гипоксию изучена достаточно полно.

Учитывая выше сказанное, становится очевидной актуальность, научно-теоретическая и практическая значимость диссертационной работы Кухаревой Т.А., цель которой – исследовать влияние естественных состояний (нерест) и абиотических факторов морской среды (температура, гипоксия) на систему красной крови некоторых видов донных рыб и определить возможность использования показателей эритрона для экодиагностики.

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

1. Изучить клеточный состав основных очагов гемопоэза (головная почка, селезенка) в организме ряда видов донных рыб.
2. Исследовать морфофункциональные характеристики эритроидных элементов крови донных рыб в процессе клеточной дифференцировки.
3. В условиях эксперимента оценить влияние краткосрочной острой гипоксии на клеточный состав и гематологические характеристики циркулирующей крови донных рыб.
4. Исследовать влияние экспериментальной гипотермии на эритрограмму циркулирующей крови донных рыб.

5. Изучить клеточный состав крови и гемопоэтических органов донных рыб в нерестовый период.

6. Сравнить эритрограммы крови черноморских бычков, обладающих различной резистентностью к факторам водной среды.

Структура работы традиционна для подобного рода исследований. Она состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка литературы. Она изложена на 150 страницах, содержит 5 таблиц и 30 рисунков. Список литературы включает 335 источников, из которых 232 на иностранных языках.

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

В первой главе представлен литературный обзор, в котором детально анализируется текущее состояние вопроса, связанного с изучением морфофункциональных характеристик эритроидных элементов крови и гемопоэтических органов костистых рыб. Особое внимание уделяется аномальным клеткам красной крови, которые можно использовать в качестве биомаркеров в целях экодиагностики качества морской среды.

Наиболее подходящим тест-объектом для экодиагностики морских экосистем, наряду с моллюсками-фильтраторами, являются малоподвижные донные виды рыб, миграционная активность у которых практически

отсутствует. В черноморском регионе широкое применение в экодиагностических исследованиях получили виды донных рыб, принадлежащие семействам Gobiidae и Scorpaena, типичными представителями которых являются соответственно бычок-кругляк и черноморская скорпена. Поэтому использование их морфофункциональных показателей в качестве биомаркеров, и в частности, показателей циркулирующей крови, которая на уровне респираторных поверхностей (жабры) испытывает наиболее жесткое воздействие внешней среды, является наиболее перспективным и целесообразным. В этой связи диссертант делает обзор локализации очагов гемопоэза, эритроидного ряда циркулирующей крови (гематологические характеристики, морфофункциональные и ультраструктурные особенности организации эритроцитов, особенности дифференцировки и созревания клеток эритроидного ряда), аномалий форм эритроцитов (изменение размеров и формы, изменения окраски, другие виды аномалий) и ядер у костистых рыб.

Далее рассматриваются влияние факторов внешней среды на показатели красной крови костистых рыб, делая акцент на разделение ответов на естественные (температура, гипоксия) и антропогенные (токсиканты) факторы. Более детально описываются частные примеры ответов на отдельные виды токсикантов. В заключении главы формулируется основная тема диссертационной работы, связанная с дифференцированием этих состояний, что определило ее цель и основную группу задач, рассмотренных выше. Следует отметить, что обзор литературы выполнен достаточно полно и отражает основную информацию по теме диссертации.

Во второй главе детально описываются материалы и методы исследования, которые включают процедуры отлова, транспортировки и содержания исследуемого материала. Исследования выполнены на одном виде скорпены (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758) и четырех видов черноморских бычков: кругляк (*Neogobius melanostomus* Pallas, 1814), мартовик (*Mesogobius batrachocephalus* Pallas, 1814), кругляш (*Gobius cobitis*

Pallas, 1814) и травяник (*Zosterisessor ophiocephalus* Pallas, 1814), отловленных в Севастопольской бухте в период их физиологического покоя (вне периода нереста) и во время нереста. Приводятся размерно-массовые характеристики отловленных рыб. Транспортировка рыб проведена с соблюдением всех необходимых мер предосторожности для снижения их стрессированности. Перед экспериментом рыбы в течение одной недели содержались в лабораторных условиях, максимально приближенных к естественным, чтобы сгладить последствия транспортировочного стресса. Далее диссертант описывает условия проведения экспериментов по влиянию гипоксии. Для проведения сравнительного исследования устойчивости к токсической нагрузке, рыб вылавливали в одной из наиболее загрязненных бухт – Карантинной, куда поступают хозяйственные и ливневые стоки, находится база военно-морского флота. Приводятся концентрации токсикантов в воде бухты.

Экспериментальная часть работы проводилась в опытной установке (стенде), специально разработанной диссертантом для этих целей и позволяющей создавать, поддерживать и контролировать необходимые условия в аквариуме с рыбой. Приводится схема экспериментальной установки и дается ее описание, перечисляется спецификация приборов и оборудования, использованных при создании стенда.

Далее описываются методы отбора и подготовки крови и кроветворных органов, гематологических исследований, определения цитоморфометрических характеристики статистического анализа результатов.

В главах третьей - шестой описаны результаты собственных исследований. Структура глав выстроена так, что в начале идет краткая аннотация изучаемого вопроса, далее подробно излагаются результаты, а затем идет их обсуждение. Такая структура, на наш взгляд, является оптимальной и облегчает понимание материала.

В третьей главе представлены результаты светооптических исследований клеточного состава гемопоэтических органов скорпены

(головная почка, селезенка). Особое внимание уделено процессам созревания и дифференцировки эритроидных элементов (на примере бычка-кругляка) с акцентом на их морфометрические характеристики.

Полученные результаты позволили диссертанту заключить, что организация гемопоэза у черноморской скорпены (морского ерша), в целом, соответствует общим принципам формирования клеток крови у других костистых. Головная почка является основным гемопоэтическим органом, содержащим бластные клетки всех гемопоэтических рядов. Селезенка функционирует как эритропоэтический орган только в период нереста, являясь «резервным» местом формирования эритроцитов у взрослых особей морского ерша. Гемопоэтическая активность обоих органов усиливается в нерестовый период, и это усиление, преимущественно, вызвано активацией эритроидного ростка кроветворения.

Процесс созревания и дифференцировки эритроидных элементов в циркулирующей крови бычка-кругляка предполагает совершенствование респираторных характеристик клеток. Основные изменения происходят на этапе перехода полихроматофильных нормобластов в нормоциты. Они включают накопление гемоглобина в цитоплазме, подавление функциональной активности ядра и значительный рост диффузионной поверхности. При этом клетки приобретают форму эллипса.

В четвертой главе приводятся результаты экспериментального изучения влияния ранжированной гипоксии на эритрон циркулирующей крови устойчивого к гипоксии морского ерша, для которого установлены низкие значения критических и пороговых концентраций кислорода.

Установлено, что краткосрочная гипоксическая нагрузка (90 минут; 15% насыщение воды кислородом ($1,3 \text{ мг л}^{-1}$)), вызывает ряд однонаправленных изменений в системе красной крови рыб. Угнетаются эритропоэтические процессы в гемопоэтической ткани, что находит отражение в преимущественном снижении содержания в составе красной крови, прежде всего, малодифференцированных эритроидных форм

(базофильных нормобластов). Одновременно отмечается набухание циркулирующих эритроцитов и лизис осмотически низкостойких и аномальных клеток. Это приводит к снижению концентрации гемоглобина, числа эритроцитов в крови и росту осмотической резистентности циркулирующей эритроцитарной массы. При 30% насыщении воды кислородом показатели не отличаются от контрольных значений.

В пятой главе описываются результаты исследования состава эритрона циркулирующей красной крови у теплолюбивого бычка-кругляка в условиях эксперимента. Результаты исследования продемонстрировали, что в условиях экспериментальной гипотермии (1-2°C) у особей бычка-кругляка в циркулирующей красной крови повышается содержание незрелых эритроидных элементов, особенно клеток пролиферативного пула пронормобласты и, по-видимому, ранние базофильные нормобласты. Содержание аномальных эритроцитов в целом не изменяется, за исключением клеток, содержащих микроядерные включения. Отмеченные изменения происходят на фоне роста содержания в крови лактата, что допускает развитие гипоксического состояния.

В шестой главе приводятся морфологические описания эритроцитарных аномалий, встречаемых в красной крови черноморских бычков, а также исследуется роль естественных состояний и факторов среды, ответственных за их развитие.

Установлено, что активная продукция эритроцитов кроветворной тканью у бычка-кругляка приходится на нерестовый период. Об этом свидетельствует относительный рост содержания в крови рыб малодифференцированных эритроидных форм. Данный процесс влияет на содержание числа аномальных эритроидных клеток в крови. В ряде случаев, между этими показателями установлена выраженная корреляционная связь ($R^2 > 0,95$). Это означает, что подсчет числа аномальных эритроцитов в крови рыб при оценке уровня токсичности морской среды необходимо проводить с

учетом активности кроветворной ткани, которая существенно изменяется в нерестовый период.

Среди бычков, обитающих в юго-западных акваториях Крыма, наименее стойким к фоновой токсической нагрузке оказался краснокнижный бычок-травяник. В его циркулирующей крови обнаружено максимальное содержание аномальных эритроидных форм при сходных условиях среды и близком уровне незрелых эритроцитов.

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.

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

1. В разделе «Материалы и методы» (стр.47) не совсем понятен выбор автором способа приготовления мазков клеток головной почки и селезенки. Он достаточно трудоемок, к тому же приводит к повреждению части клеток при гомогенизации органа и последующем центрифугировании. Возможно, проще и быстрее было приготовить мазки-отпечатки исследуемых органов.

2. В том же разделе замечание касается формулы расчета объема клетки, так как приводимые автором ссылки относятся к расчету объема эритроцита млекопитающих, эти клетки безъядерные и имеют иную форму. Проще делать это просто по расчету формы эллипса (Петров, Степанян, 2016).

3. В главе 3 (стр.52) в качестве объекта исследования указан морской ерш, тогда как в материалах и методах этот вид заявлен как черноморская скорпена. Лучше придерживаться единого названия, чтобы не усложнять восприятие материала.

4. Колониеобразующие единицы, как клетки-предшественники, а также малые лимфоциты, имеют в ядре очень небольшое количество

гетерохроматина, поэтому приведенные на фото клетки скорее следует считать тромбоцитами. Приводимые автором следующие аргументы: “Однако, имея дело с кроветворными органами, необходимо учитывать, что схожие морфологические характеристики имеют и колониеобразующие единицы (КОЕ) – родоначальные клетки всех ростков гемопоэза [299]. По-видимому, в данном случае часть подобных форменных элементов принадлежала именно к классу КОЕ. Лимфоциты и тромбоциты, в свою очередь, могли попасть в суспензию клеток непосредственно из сосудов периферического русла.” не однозначны, так как головная почка является основным местом образования малых лимфоцитов.

5. Стр.53 и 55. Рис.3.1. Фотографии, приведенные на рисунке, невнятные. Во-первых, они подтверждают травматичность для клеток выбранный автором метод приготовления препаратов. Во-вторых, вызывает сомнение идентификация автором типов лейкоцитов. Под номером 5 и 9 – скорее разрушающийся эритроцит, 7 – скорее незрелый нейтрофил.

6. Автор идентифицировал у скорпены 3 типа гранулоцитов, тогда как в работе Barber, Westermann (1978), у скорпеновых цитохимически был обнаружен только 1 тип гранулярных клеток, который авторы отнесли к гетерофилам.

7. В тексте диссертации и автореферата имеется заметное количество опечаток, включая такие как “гемомоэтических клеток”, “эритроцитранные тени”, “нерестовый период”, “монобастического”, “эритропоэтина”, которые усложняют восприятие материала. Следовало более тщательно вычитать и отредактировать текст.

8. Стр.59. Раздел 3.2. Следует в тексте указать вид рыбы, на котором выполнен данный раздел. Это видно только по подписям к рисункам.

Тем не менее, отмеченные недостатки не снижают ценности представленных результатов, полученных автором в ходе многолетней 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 корректных натурных наблюдений и 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, особенно, практическую ценность. Её результаты прошли апробацию на отечественных и международных конференциях и полностью отражены в рецензируемых научных изданиях. По материалам диссертационной работы опубликована 21 печатная работа, из них 8 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 7 статей попадают в базу WoS (Scopus), 1 статья в сборнике и 8 тезисов докладов. Автореферат в основных положениях отражает содержание работы.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.02.10 – гидробиология, в частности пункту 1: «Исследование влияния факторов водной среды на гидробионтов в природных и лабораторных условиях с целью установления пределов толерантности и оценки устойчивости водных организмов в условиях изменяющихся физико-химических свойств природных вод (в частности, при антропогенном воздействии)», а также пункту 7 паспорта «Разработка методов экологического мониторинга водных экосистем».

Диссертационная работа отвечает всем требованиям пп. 9-11, 13, 14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 «О порядке присуждения ученых степеней», а её автор, Кухарева

Татьяна Александровна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.10 – 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 «09» декабря 2019 г. протокол № 8.

Заведующий лабораторией физиологии и токсикологии, доктор биологических наук, специальность 03.01.04 - биохимия

Чуйко Григорий Михайлович

Ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и токсикологии, кандидат биологических наук, специальность 03.02.10 - гидробиология

Заботкина Елена Анатольевна

Старший научный сотрудник лаборатории физиологии и токсикологии, кандидат биологических наук, специальность 03.02.08 - экология

Лапирова Татьяна Борисовна

12.12.2019 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

Сайт: <http://ibiw.ru/>

