

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Кухаревой Татьяны Александровны на тему «КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КРОВИ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ОРГАНОВ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ДОННЫХ РЫБ (СЕВАСТОПОЛЬСКАЯ БУХТА, ЧЕРНОЕ МОРЕ)», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.10 – гидробиология

Важность гематологических исследований в гидробиологии и экологии невозможно переоценить. Кровь, являясь внутренней средой организма, быстро и точно реагирует на изменения окружающей среды, всегда и безошибочно отражает физиологическое состояние организма, свидетельствуя о характере и тяжести отклонения от нормы. Изучение многочисленных параметров красной и белой крови рыб позволяет определить их адаптационные возможности в условиях конкретных водоемов.

Динамика эритрона рыб в изменяющихся условиях внешней среды является достаточно реактивной для качественного определения состояния здоровья животных и установления возможных причин морфологических преобразований системы красной крови. Некоторым аспектам этих изменений и посвящена представленная диссертационная работа.

Рукопись диссертации, изложенная на 150 страницах, организована по общепринятым правилам. Включает перечень сокращений и условных обозначений, введение, 6 глав, заключение, выводы и список литературы. Рисунки, в том числе макро- и микрофотографии, схемы, дендрограммы, графики и таблицы, иллюстрирующие содержательную часть, включены в текст работы. Список литературы включает 335 источников, из которых 103 на русском языке, 232 – на иностранных.

Актуальность темы диссертационной работы. Использование костистых рыб в качестве модельных объектов при изучении физиологических и биохимических основ адаптационного процесса в условиях усиливающейся антропогенной нагрузки на прибрежные морские акватории является весьма актуальным и перспективным в гидробиологических и экологических исследованиях. Многие аспекты функционирования системы красной крови у костистых рыб до конца не изучены. В рукописи представлена попытка оценить степень влияния естественных (нерест) и абиотических факторов (гипотермия и гипоксия) на состояние эритрона донных костистых рыб, что свидетельствует о своевременности и актуальности данного исследования.

Высока значимость представленной работы в вопросе изучения влияния антропогенных факторов на возникновение цитоморфологических изменений циркулирующих эритроцитов, что приводит к появлению различных клеточных аномалий. Некоторые из них проявляются под действием конкретных токсических и биологических агентов (тяжелых металлов, вирусных инвазий, анемичных состояний), и в настоящей работе предлагается использовать данные показатели для целей экодиагностики.

Диссертация посвящена изучению аспектов структурно-функциональной организации системы красной крови рыб, которые до настоящего момента оставались неясными: локализации и функционированию очагов эритропоэза (головная почка и селезенка), реакции эритроидного ростка гемопоэза на гипоксию на самых ранних этапах, способности гемопоэтической ткани сохранять чувствительность к управляющим сигналам в условиях крайне низких температур, возможности использования содержания аномальных эритроидных форм в крови рыб в качестве биомаркеров для целей экодиагностики. В связи с этим, поставленная автором **цель работы** состояла в исследовании влияния естественных состояний (нерест) и абиотических факторов морской среды (температура, гипоксия) на систему красной крови некоторых видов донных рыб и определении возможности использования показателей эритрона для экодиагностики. Для ее решения были грамотно сформулированы и разрешены **6 задач**, а вынесенные на защиту **3 положения** убедительно демонстрируют действительную важность проведенных исследований и их итогов.

Изучение автором общих закономерностей функционирования системы красной крови костистых донных рыб, определенных поставленными целью и задачами исследования, является важным для решения теоретических и прикладных задач, формируемых современной экологической наукой, что и определяет актуальность диссертационной работы.

Новизна научных результатов, выводов. Кухаревой Т.А. впервые на основе анализа клеточного состава гемопоэтических тканей показано, что в нерестовый и постнерестовый период, когда пролиферативная активность эритроидного ростка гемопоэза в головной почке достигает максимальных значений, селезенка донных Teleostei выполняет в основном функцию «резервного» очага эритропоэза.

Впервые показано, что краткосрочная гипоксия не стимулирует, а подавляет эритроидный росток кроветворения, что приводит к снижению содержания незрелых эритроидных форм в циркулирующей крови. При этом гипотермия приводит к противоположному эффекту.

Результаты исследований, представленные в настоящей работе, расширяют представления об особенностях течения процессов гемопоэза в организме костистых рыб. Они касаются мест локализации очагов кроветворения, динамики течения эритропоэтических процессов на протяжении годового цикла, характера дифференцировки клеток эритроидного ряда, а также влияния ключевых факторов водной среды (температуры, концентрации кислорода) на эритрограмму циркулирующей крови.

В работе впервые предлагается использовать показатели эритрона некоторых видов донных рыб Черного моря для целей экодиагностики. Акцент делается на содержании аномальных клеток в крови донных рыб, которые позволяют давать не только интегральную оценку качества водной среды, но и определять присутствие в ней отдельных видов поллютантов.

Разработанные в ходе выполнения работы экспериментальные стенды могут быть рекомендованы к внедрению в практику научных исследований

лабораторий, занимающихся изучением водных организмов.

Основные результаты работы прошли апробацию на различных симпозиумах, конференциях и семинарах с 2011 по 2018 гг.

Общий список работ автора включает 21 печатную работу. Из них 8 статей в изданиях, рекомендованных ВАК, 7 статей в журналах, индексируемых международными базами WoS и Scopus, 8 статей в сборниках и 5 тезисов докладов.

В **Обзоре литературы (глава 1)** автором проведен детальный анализ отечественных и зарубежных источников, посвященных роли донных рыб в экотоксикологических исследованиях, описанию очагов гемопоза у Teleostei и их значению в динамике эритрона, характеристике клеток эритроидного ряда костистых рыб, закономерностям возникновения аномальных форм эритроцитов, а также динамике системы красной крови рыб под влиянием факторов естественной и антропогенной природы. Знакомство с данным разделом показывает, что диссертант отлично владеет современной литературой по исследуемой проблематике.

Единственное замечание к данному разделу (присутствует и в последующих главах): не следует сокращать имя автора, описавшего бычка-кругляка (П.С. Паллас) до первой буквы его фамилии, это в корне не верно (у соискателя на стр. 28 в подписи к рис. 1.4 «... *Neogobius melanostomus* P.»).

Глава 2. В настоящей главе диссертации автором подробно описывается общая характеристика используемого материала, методики его отлова, транспортировки и содержания. Отрадно, что в работе соблюдены этические принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.).

Приводится описание оригинальных экспериментальных схем, разработанных непосредственно соискателем для установления влияния гипоксии и гипотермии на эритрон донных костистых рыб в условиях эксперимента. При этом представлена исчерпывающая информация по моделированию гипоксических и температурных условий на экспериментальных стендах, разработанных и сконструированных лично диссертантом.

Описывается и обосновывается корректность и адекватность применения общепринятых методов лабораторного гематологического анализа и последующей статистической обработки данных, используемых автором в работе.

По материалам главы 2 есть ряд вопросов и замечаний:

1. Лабораторные аквариумы, в которых содержалась рыба, наполнялись водой из Карантинной бухты, где отлавливались рыбы?

2. В таблице 2.2 (стр. 43) приведено содержание некоторых токсических соединений в воде Карантинной бухты, являющейся одной из наиболее загрязненных в окрестностях г. Севастополя. Было бы более информативно соотнести эти данные с предельно допустимыми концентрациями (ПДК) данных веществ, было бы понятно, какие концентрация каких поллютантов

более ощутимо «выбиваются» из понятия условной нормы.

3. Достаточное ли количество бычков трех видов (мартовик, кругляш и травяник – по 10 особей) было использовано для получения достоверных данных? Минимальная необходимая выборка, исследование которой будет считаться достоверным и репрезентативным, включает не менее 15 особей каждого вида.

4. Почему для изучения эритрограммы в условиях острой экспериментальной гипоксии был выбран один вид (скорпена), а в условиях гипотермии – другой (бычок-кругляк)? Не было бы показательнее и информативнее исследовать эритрограммы обоих видов и при гипоксии, и при гипотермии?

5. По сути, диссертационная работа построена на методах биотестирования, а не биоиндикации, поскольку особи исследовались в условиях эксперимента через неделю после изъятия из естественной среды обитания. В то же время в главе 1 речь идет в основном о биоиндикации и использовании донных рыб в целях экодиагностики.

В **Главе 3** соискателем приведен подробнейший анализ организации гемопоэза у морского ерша (скорпены), что было сделано впервые. Показано, что данный процесс в целом соответствует общим принципам формирования клеток крови у других костистых рыб, а головная почка является основным гемопоэтическим органом, содержащим бластные клетки всех гемопоэтических рядов. В то же время 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.

На примере бычка-кругляка Севастопольской бухты Черного моря впервые изучен процесс созревания и дифференцировки эритроидных элементов в ряду: базофильные нормобласты (БН) → полихроматофильные нормобласты (ПН) → нормоциты. Соискателем установлено, что основные изменения (накопление гемоглобина в цитоплазме, подавление функциональной активности ядра и значительный рост диффузионной поверхности) происходят на этапе ПН → нормоциты; направлены они не только на повышение содержания гемоглобина в цитоплазме клетки, но и на совершенствование ее формы.

Однако возникает ряд вопросов. Почему изучение клеточного состава гемопоэтических органов произведено у морского ерша, а процессы созревания и дифференцировки эритроидных элементов исследованы у бычка-кругляка? Возможно ли предоставить эти данные в сравнительном аспекте? Можно ли говорить об аналогичности процессов гемопоэза и пролиферации клеток красной крови у скорпены и кругляка? Или существует видовая специфичность в специализации органов кроветворения у *Scorpaena porcus* и *Neogobius melanostomus*?

На стр. 66 имеет место нарушение причинно-следственных связей. Соискатель утверждает, что «... нерест морского ерша был связан с

активизацией деятельности кроветворных органов». Очевидно, что интенсификация деятельности селезенки и головной почки вызвана периодом нереста рыб, который сопряжен с рядом изменений в организме, в первую очередь неспецифического стрессорного характера.

В **Главе 4** приводятся результаты экспериментального изучения влияния ранжированной гипоксии на эритроциты циркулирующей крови устойчивого к гипоксии морского ерша, для которого характерны низкие значения критических и пороговых концентраций кислорода. Соискателем убедительно доказано, что дефицит кислорода является одним из ведущих факторов водной среды, который оказывает существенное влияние на функциональное состояние эритроцитов рыб (концентрацию гемоглобина и число эритроцитов, показатели осмотической стойкости циркулирующих эритроцитов в условиях экспериментальной гипоксии, содержание незрелых и аномальных эритроидных форм при различном насыщении воды кислородом).

По данным таблицы 4.1 (стр. 72) возникает следующий вопрос. Достаточно ли для получения достоверных данных выборка особей для каждого эксперимента по насыщению воды кислородом? Насколько репрезентативные данные может дать исследование от 5 до 7 экземпляров морского ерша в каждом эксперименте?

В **Главе 5** соискатель рассматривает влияние экспериментальной гипотермии (до температуры 1–2° С) на эритрограмму циркулирующей крови теплолюбивого бычка-кругляка. Среди основных однозначно трактуемых изменений, происходящих в крови *Neogobius melanostomus* под действием низких температур, автор выделяет следующие:

1. Существенный рост содержания в крови незрелых эритроидных форм.

Диссертант обращает внимание на то, что низкие температуры полностью не подавляют метаболические процессы в организме исследованных особей. На примере кроветворной ткани можно видеть, что она сохраняет чувствительность к управляющим сигналам (гипоксия) и может существенно повысить свою пролиферативную активность в условиях внешней гипотермии, что для бычка-кругляка, являющегося теплолюбивым видом, показано впервые.

Но непонятно, чем можно объяснить снижение доли пронормобластов при понижении температуры с 19–20° С до 15–16° С, а затем резкое увеличение их доли при 1–2° С (рисунок 5.2, стр. 82), тогда как рост содержания базофильных нормобластов (БН) и полихроматофильных нормобластов (ПН) в тех же условиях происходит плавно?

2. Повышение в плазме крови содержания лактата.

3. Увеличение ряда эритроцитарных аномалий по мере понижения температуры воды (микроядерных включений и случаев ядерного полиморфизма).

Последнее утверждение достаточно спорно. Увеличение встречаемости аномальных эритроидных форм (в первую очередь, клеток с микроядрами) в кровяном русле рыб, действительно, следует рассматривать как результат активной клеточной пролиферации, одной из причин которой может выступать гипотермия. Однако данные, полученные диссертантом, свидетельствуют, что

доля таких клеток чрезвычайно низка (не превышает 0,1% при самых низких температурах воды в эксперименте), что значительно ниже величины их спонтанного образования, которая в норме составляет не более 1%.

В **Главе 6** приводится описание аномалий эритроцитов, зарегистрированных у четырех видов бычковых рыб Севастопольской бухты Черного моря (кругляка, мартовика, кругляша и травяника); всего выделено 4 типа aberrаций, отличающихся по характеру и степени проявления. Соискателем верно подмечено, что в целях экодиагностики важно знать, какие причины (функциональное состояние животного или токсическое действие среды) явились основными в развитии патологий клеток крови.

Автором убедительно доказано, что созревание гонад у бычка-кругляка сопровождается активизацией эритроидного ростка кроветворения в гемопоэтической ткани. Об этом свидетельствует рост содержания незрелых эритроидных форм (базофильных и полихроматофильных нормобластов) в циркулирующей крови. Процессы пролиферации и дифференцировки при этом сбалансированы, что подтверждается постоянством значений индекса БН/ПН на протяжении всего периода.

Соискателем впервые на примере бычка-кругляка показано, что содержание аномальных и незрелых эритроцитов в крови особей бычка-кругляка тесно коррелирует со стадией зрелости гонад исследуемых особей. Это позволяет предположить, что активизация процессов эритропоэза в кроветворной ткани сопровождается не только поступлением в кровоток эритроидных форм на ранних стадиях дифференцировки, но и приводит к росту числа аномальных клеток. Подробно исследована и объяснена динамика изменения содержания в крови разных типов эритроцитарных патологий в зависимости от стадии зрелости гонад, что сделано впервые.

В целях выделения группы показателей, которые можно использовать в целях экодиагностики, автором изучены различные гематологические характеристики, эритроцитарные индексы, особенности морфологии аномальных клеток эритроидного ряда, определение уровня эритропоэза у трех видов черноморских бычков (мартовика, кругляша и травяника).

Анализируя встречаемость эритроцитарных аномалий и незрелых эритроидных элементов в циркулирующей крови исследованных бычков, соискатель приходит к выводу, что aberrации клеток красной крови рыб вызваны именно фоновой токсической нагрузкой водоема, а не функциональным состоянием животных. Причем устойчивость к загрязнению морской среды у разных видов бычков, отловленных одновременно из одной и той же точки акватории, неодинакова. Травяник оказался наиболее восприимчивым к действию поллютантов, о чем свидетельствует наибольшее число зарегистрированных эритроцитарных аномалий в его циркулирующей крови.

Было бы интересно узнать мнение автора относительно столь различной устойчивости разных видов бычков к фоновой токсической нагрузке, которую испытывают прибрежные районы черноморского региона.

В **Заключении** соискателем обобщаются полученные результаты с

акцентом на выявленные в работе эффекты. Данный раздел диссертации представляет собой в сжатом виде выводы, уже сделанные в каждой главе, и, по сути, дублирует эту информацию.

Выводы:

Диссертантом сформулировано семь выводов, полностью соответствующих поставленной цели и задачам исследования, корректно раскрывающих основные результаты диссертационной работы.

В целом хотелось бы отметить хороший стиль изложения рукописи, умение автора корректно использовать литературные источники. Небольшое количество опечаток не снижает общее благоприятное впечатление от работы.

Заключение официального оппонента. Оценивая в целом оппонируемую работу Кухаревой Татьяны Александровны, взвесив положительные стороны диссертационного исследования и сделанные мною замечания, тщательно обдумав свое решение, я пришел к следующему заключению: работа является самостоятельным завершенным научным исследованием, в котором впервые детально изучено состояние эритрограммы крови и кроветворных органов некоторых видов донных костистых рыб Севастопольской бухты Черного моря в условиях экспериментальной гипоксии и гипотермии. Подробно проанализирована зависимость динамики нескольких типов эритроцитарных патологий от уровня гемопоза и стадий зрелости половых продуктов.

По актуальности темы, научной новизне, теоретической и практической значимости, уровню проведения исследований, новизне полученных результатов и обоснованности выводов, работа отвечает требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата биологических наук, а ее автор Кухарева Татьяна Александровна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.10 – гидробиология (биологические науки).

Минеев Александр Константинович
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник,
Институт экологии Волжского бассейна
Российской академии наук – филиал ФГБУН
Самарского федерального исследовательского центра
Российской академии наук
445003, г. Тольятти, ул. Комзина, д.10
телефон: 89277316306
mineev7676@mail.ru



«14» ноября 2019 г.

