

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Кулько Светланы Владимировны

«Морфофункциональная характеристика гемоцитов моллюсков (Gastropoda, Bivalvia) в норме и при осмотической нагрузке», представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - физиология

Диссертационная работа С. В. Кулько, представленная на соискание степени кандидата биологических наук, посвящена изучению морфофункциональных характеристик гемоцитов моллюсков, что является своевременным и актуальным исследованием. Хотя система циркуляции жидкостей у моллюсков изучается довольно давно, ее значимость не потеряла своей актуальности: недостаточно подробно исследованы особенности функций различных клеточных элементов крови, нет современной классификации гемоцитов, основанной на морфологических и функциональных признаках, выявленных с помощью современных методов. В связи с этим разрабатываемая автором проблема является своевременной и очень важной. Многочисленные исследования отечественных и зарубежных авторов предлагают однотипные классификации, учитывающие в основном только морфологию клеток. Однако, как замечает соискатель, проблема функциональной классификации остается «отдельным пластом знаний», весьма существенным для сравнительно-физиологического анализа разных типов клеток крови у разных животных. Выбор объекта для решения вопросов, поставленных соискателем, представляется удачным по ряду причин, в числе которых стоит возможность пользоваться животными, содержащимися в лабораторных контролируемых, т. е. стандартных условиях, что исключает целый ряд вопросов об однородности объекта и позволяет использовать полученные данные при рекомендациях выводов проведенного исследования для их практического применения, в том числе для фармакологического анализа различных препаратов. Кроме того, моллюски относительно хорошо выживают в аквариумах, являются широко используемыми животными в разных лабораториях в качестве тест-объектов, что дает возможность сравнения полученных данных с исследованиями других авторов.

Структура и содержание диссертации. Диссертация написана по общепринятому образцу, содержит разделы: Введение, Обзор литературы, Методология и методы исследования, Результаты собственных исследований, Обсуждение результатов

исследования, Выводы, Практические рекомендации, Библиографический список. Диссертация изложена на 186 страницах машинописного текста, достаточно хорошо иллюстрирована (84 рисунка, 47 таблиц), в списке литературы даны ссылки на 34 отечественных и 178 зарубежных источников. Текст изложен хорошим литературным языком.

Введение написано кратко, знакомит читателя с общим состоянием проблемы и с работами последних лет по исследованию систем циркуляции жидкостей у беспозвоночных животных, подчеркивая, тем не менее, отсутствие единообразной классификации именно с позиций морфофункционального подхода, учитывающего «уникальные клеточные» особенности гемоцитов. Автор совершенно справедливо подчеркивает, что отсутствие общепринятых критериев для такой классификации является серьезным затруднением при анализе и сравнении результатов, полученных в разных научных коллективах. Важным для понимания общих механизмов адаптаций является исследование динамики морфофизиологических изменений гемоцитов в условиях стресс-воздействий, что может служить общим показателем пластичности систем циркуляции для объекта в целом, позволяет говорить о функциональном подходе в интерпретации фактов данного исследования.

Цель исследования сформулирована логично и обоснованно. В связи с этой целью поставлены конкретные задачи данной диссертационной работы.

В главе 1 («Обзор литературы») приведены работы отечественных (12) и зарубежных (121) авторов. С.В. Кулько выделяет несколько подразделов (7, из них подраздел 1.4 содержит 2 дополнительных подраздела, что связано с объектом исследования и вполне обосновано), посвященных описанию иммуннобиологических систем моллюсков, особенностей иммунных ответов (клеточные и гуморальные составляющие), явлениям фагоцитоза, исследованиям энергетического статуса гемоцитов моллюсков, пока еще не очень многочисленным. Приведены работы, выполненные как на водных, так и на наземных объектах в разных методических условиях. Обзор литературы включает классические исследования по поставленной проблеме, проведенные разными авторами, а также результаты, полученные в последние годы, в том числе в лаборатории, где выполнялась данное исследование. Особо подробно цитируется литература по организации и функционированию АПО (амебоцит-продуцирующего органа у моллюсков), подчеркивается разнообразие этой системы у разных представителей Mollusca. Таким образом, автор в процессе цитирования литературных источников логично обосновывает необходимость и актуальность собственного исследования. Обстоятельность, глубина и, в том числе,

конкретность обзора литературных источников по данной теме, позволяет рекомендовать данную главу диссертационного исследования в качестве отдельной публикации.

Глава 2 «Методология и методы исследования» разбита также на несколько подразделов. Подробно описаны условия содержания экспериментальных животных с учетом их обитания в естественных условиях. Автор максимально адаптировал улиток к нормальному «проживанию», даже грунт для *Helix sp.* и *Achatina f.* использовался разный, что снимает возможные вопросы по условиям содержания. Также тщательно соблюдались условия отбора лимфы, использовался метод, предложенный в данной лаборатории, малотравматичный.

Количество использованных животных составляло 12 особей каждого вида. Хотелось бы задать вопрос: как часто брались пробы из каждого конкретного животного, общая продолжительность эксперимента (возраст животного менялся значительно или нет). Общего количества использованных животных достаточно для проведения всех серий экспериментов, методы статистической обработки современны и адекватны, результаты не вызывают сомнений.

Глава 3 «Основные результаты исследований» занимает значительный объем диссертационного текста и содержит 2 раздела, в одном приведены результаты, полученные лично автором на представителях класса *Gastropoda* (3.1 -3.1.4.4), в другом - на представителях класса *Bivalvia* (3.2 – 3.2.4.4) соответственно.

Результаты описаны подробно, снабжены достаточным количеством иллюстраций (69 рисунков, 47 таблиц) и содержат экспериментальные материалы по всем вопросам, сформулированным в задачах исследования. Представленные данные оригинальны и позволили автору обосновать доказательство роли морфофункциональных динамических изменений гемоцитов в норме и при различных воздействиях. Автору впервые удалось изучить вклад разных гемоцитов в общем иммунном ответе клетки, оценить степень участия различных гемоцитов и предложить на этом основании свою типологию. Кулько Т.А. впервые показала, что у изученных ею представителей моллюсков наибольшую фагоцитарную активность достоверно обнаружили большие амебоциты (табл.1). Эти же клетки показали и наибольшую степень флуоресценции при окрашивании потенциалозависимым красителем родамином Б, что говорит о более высоком энергетическом статусе больших амебоцитов по сравнению с другими типами клеток (наименьший оказался у круглых клеток). Сравнивая уровень митохондриальной активности гемоцитов в ряду «большие амебоциты- малые амебоциты-гранулярные клетки-круглые клетки» автор полагает, что наибольшие энергетические траты должны быть у клеток, способных к

активному передвижению, что и удалось подтвердить экспериментально. Круглые клетки способны лишь к пассивному передвижению, у них нет способности к образованию псевдоподий, практически не выражена способность поглощать чужеродные вещества, этим и можно объяснить низкую митохондриальную активность.

В условиях стресса, т.е. при изменении осмолярности растворов исследуемые клетки моллюсков разных видов обнаружили разную реакцию. Большие амёбоциты виноградной улитки оказались энергетически более активны в гипертонической среде, а те же клетки гигантской африканской улитки - в гипотонической (обе наземные!). У представителей *Stenomphalia ravergieri* F. активность больших амёбоцитов не зависела от уровня осмотичности раствора.

Морфофункциональные особенности клеток у разных особей при оценке их упруго-эластических свойств оказались неоднородными. Здесь максимальные значения силы адгезии оказались у мембран малых амёбоцитов, что обусловлено их свойствами (инкапсуляция) (*Helix*), больших и малых амёбоцитов (*Achatina fulica*, *Lymnaea stagnalis*), круглых клетки (*Planorbis corneus*). У большинства изученных представителей моллюсков максимальная упругость мембраны характерна для круглых клеток, очевидно, это обусловлено их функциональной нагрузкой. Круглые клетки *Dreissena polymorpha* и *Stenomphalia ravergieri* устойчивы по уровню упругости и адгезии плазмалеммы к изменениям осмотического давления инкубационной среды. Напротив, большие амёбоциты оказались устойчивыми к изменениям осмолярности инкубационного раствора, такую устойчивость показали пять из девяти изученных видов – не получено достоверных изменений упругости и силы адгезии мембран к нанозонду. Однако у *Ampullaria australis* мембраны малых амёбоцитов реагировали на любое изменение осмолярности раствора.

Хотелось бы особо подчеркнуть использование диссертантом в качестве морфофункционального показателя изменчивость такой характеристики мембраны как складчатость мембраны. Эта особенность клеточной мембраны может служить для оценки мембранного резерва гемоцитов при образовании псевдоподий, фагосом и организации перемещений клеток.

Глава 4 «Обсуждение результатов исследования» посвящена анализу полученных автором данных и их сопоставление с известными литературными источниками. На основе собственного экспериментального материала С.В. Кулько предлагает авторскую классификацию форменных элементов гемолимфы моллюсков, выделяя 4 типа клеток. Автор подчеркивает, что наиболее очевидными следует считать параметры, наблюдаемые у нативных клеток. Это представляется новым подходом и особенностью данного

исследования. С.В. Кулько приводит данные, полученные на беспозвоночных животных разных таксономических групп, сравнивая структурно-функциональную роль клеток крови. Автор полагает, что выявленные в процессе экспериментов на двух представителях Molluscae особенности структуры и поведения гемоцитов можно экстраполировать на большинство представителей данного таксона и предлагает описание особенностей каждого типа клеток.

Все эти факты получены автором впервые и отражают несомненную новизну исследования. Представленные данные дополняют наши знания о возможности пластических перестроек клеточных мембран гемоцитов за счет собственных резервов и о возможной роли таких перестроек как фактора адаптационных возможностей сосудистой системы в целом. Это важно в перспективе для поиска фармакологических веществ, избирательно влияющих на конкретные структурные элементы крови.

Глава 4 отражает уровень сложности проблемы и подчеркивает понимание автором полученных им впервые экспериментальных данных и их вклад в тот раздел исследований систем циркуляции и клеточных элементов крови, которым занимается соискатель.

Выводы, сформулированные автором, конкретны и соответствуют представленным результатам.

Работа написана хорошим литературным языком, доступна в понимании, список литературы соответствует требованиям ВАК. Описки и неудачные выражения (напр., с. 17, 19; 22; вывод 4) единичны и не снижают общего положительного впечатления о работе.

В ходе прочтения возникли вопросы и пожелания:

- 1) Почему в пробах использовался именно супернатант культуры *Saccharomyces*?
- 2) Могла ли как-то контролироваться в Ваших экспериментах «жесткость кантилевера», при работе с нативной структурой, т.е. достаточно «мягкой клеткой», это существенно?
- 3) Вывод 4 – что означает последнее предложение данного вывода?
- 4) В качестве пожелания – для обозначения символов следовало бы использовать рекомендуемые системы, напр. СИ, тогда «микроны» и «ангстремы» можно было бы обозначить единообразно, в виде 1×10 в соответствующей степени.
- 5) Все аббревиатуры следовало бы дать в одном списке, например, на последней странице автореферата, это облегчило бы прочтение текста.

Таким образом, обоснованность поставленных задач, новизна научных положений и выводов, сформулированных С.В. Кулько в диссертации, достоверны, результаты хорошо и убедительно описаны и иллюстрированы, используемые методы современны, достаточно информативны и адекватны задачам исследования. Обсуждение результатов показывает знание современной литературы, выводы соответствуют представленным результатам. Автореферат диссертационной работы полностью отражает основное содержание исследования и соответствует требованиям ВАК РФ. Результаты работы опубликованы в журналах, входящих в список ВАК РФ.

В целом диссертационная работа Кулько Светланы Владимировны «Морфофункциональная характеристика гемоцитов моллюсков (Gastropoda), Bivalvia) в норме и при осмотической нагрузке», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология по объему, степени достоверности результатов исследования, научной новизне, изложению представленного материала и оформлению представляет собой законченную научно-исследовательскую работу на актуальную тему, полностью соответствует критериям, указанным в параграфе II Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а соискатель Кулько Светлана Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – физиология.

18.08.2015

Т.А. Сафонова,

Доктор биологических наук, доцент,

Профессор кафедры Общей физиологии

Биологического факультета

Санкт-Петербургского государственного Университета,

Адрес: 190344, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

TASafonova@mail.ru

