

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Татьяны Александровны Пигалевой

«Морфофункциональные особенности и осморегуляторные

реакции клеточных элементов системы циркуляции

представителей класса CLITELLATA»,

представленную на соискание степени кандидата

биологических наук по специальности 03.03.01 - физиология

*Актуальность темы диссертации.* Диссертационная работа Е. А. Пигалевой, представленная на соискание степени кандидата биологических наук, посвящена изучению морфофункциональных особенностей реакций клеточных элементов циркуляторных систем поясковых червей, относящихся к классу Clitellata. Защитные свойства клеток систем циркуляции известны со времен открытия фагоцитоза И.И. Мечниковым, однако до настоящего времени единая общепринятая система классификации элементов циркуляторных систем беспозвоночных животных, в том числе кольчатых червей, отсутствует. В связи с этим актуальность разрабатываемой автором проблемы является своевременной и очень важной. Многочисленные исследования отечественных и зарубежных авторов содержат отдельные фрагменты классификации клеточных элементов систем циркуляции, однако общая система, основанная на морфофункциональных признаках клеток, отсутствует. Практически не изучена прижизненная динамика морфофункциональных показателей гемоцитов и целоцитов аннелид в норме и при стрессорных воздействиях. Поведение клеток в условиях осмотического стресса поможет оценить адаптационные возможности разных типов клеток. Таким образом, как замечает соискатель, проблема систематизации и исследование свойств нативных элементов циркулирующих жидкостей аннелид актуальна как для общей, так и для сравнительной физиологии. На основании вышесказанного цель и основные задачи, сформулированные автором, обоснованы и содержат новизну. Выбор объектов для решения вопросов, поставленных соискателем, представляется удачным в связи с возможностью проведения сравнительно-физиологического анализа ряда показателей с использованием приборов нового поколения. Указанная многофакторность подхода в изучаемой проблеме подтверждает актуальность темы диссертационной работы Е.А. Пигалевой и ее своевременность.

*Структура и содержание диссертации.* Структура диссертации общепринята, содержит разделы: введение (с. 4-9), обзор литературы (с. 10-54), методология и методы исследования (с.55-69), результаты собственных исследований (с.70- 158), обсуждение результатов исследования (с.159-182), выводы (с.183), практические рекомендации (с.184), библиографический список (с.185-207). Диссертация изложена на 207 страницах машинописного текста, достаточно хорошо иллюстрирована (53 рисунка, 54 таблицы), в списке литературы даны ссылки на 46 отечественных и 194 зарубежных источника. Текст изложен хорошим литературным языком.

Введение написано кратко и четко, знакомит читателя с общим состоянием проблемы и с работами отечественных и зарубежных авторов по морфологии и (в меньшей степени морфофизиологии и иммунологии) гемоцитов и целомоцитов. Автор подчеркивает, что большинство современных исследований, проведенных на различных объектах, все еще недостаточно полно характеризуют «систему знаний», касающуюся эволюции развития органов, обеспечивающих гомеостатические функции. Сделан акцент на возможность использования полученных экспериментальных данных для оценки антропогенных вмешательств в различные биоценозы, что имеет несомненно практическое значение. Благодаря такому подходу сформулированные диссертантом цель исследования и конкретные задачи логичны и обоснованны.

В главе 1 («Обзор литературы») приведены работы отечественных и зарубежных авторов. Т.А. Пигалева выделяет несколько подразделов (7), в которых цитируются работы относительно исследованию как морфологии, так и функции клеток целомической жидкости у аннелид. В этой части диссертационной работы описаны как классические исследования по поставленной проблеме, проведенные разными авторами, так и результаты, полученные в последние годы. Хотелось бы подчеркнуть, что обзор литературы написан таким образом, что каждая его глава фактически подводит читателя к необходимости постановки конкретной задачи. Логичность, 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» изложена на 14 страницах и снабжена несколькими иллюстрациями (рис. 1 – 11). В исследовании автор впервые исследовал гемоциты и целомоциты на 14 видах аннелид, причем, видовая принадлежность животных определялась, с одной стороны, с использованием различных источников, с другой - использовались данные лаборатории, где проводилось исследование (на базе учлесхоза «Лес на Ворскле»). Такое разнообразие животных требовало организации особых

условий их содержания для обеспечения стабильного удовлетворительного функционального состояния. Это все говорит о достаточно высокой квалификации автора при работе с такими объектами. Количество использованных животных (12 особей каждого вида, 100 клеток от каждой особи) вполне достаточно для проведения всех серий экспериментов. Методы исследования морфофункциональных характеристик основаны на использовании оптической, сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии, что позволило получить сканограммы с высоким разрешением (от нанометра до ангстрема от 10-9 до 10-10 м), а также проводить исследования непроводящих объектов в невакуумной и жидкой средах, при этом прижизненные красители и напылители не используются. Сканирующий зондовый микроскоп позволяет изучать прижизненную морфологию поверхности клетки. Соединение этих приборов и полуконтактный режим (tapping mode) позволил измерить морфометрические параметры клеток. Осмотическая стойкость клеток и мембранный резерв оценивалась с помощью модифицированного метода с использованием кантилевера. Анализ и обработка данных проводилась с помощью современных компьютерных программ Excel 7.0. Для оценки достоверности данных использовали непарный t-критерий Стьюдента. Методы статистического анализа современны и адекватны, результаты не вызывают сомнений. ....

Глава 3 «Результаты собственных исследований» занимает большой объем диссертационного текста (с. 70 – 158) и содержит 2 подраздела (3.1 – 3.1.4 и 3.2 – 3.2.4), в которых приведены экспериментальные данные, полученные лично автором.

Результаты описаны подробно, снабжены достаточным количеством иллюстраций (51 рисунок, 51 таблица) и содержат экспериментальные материалы по всем вопросам, сформулированным в задачах исследования. Представленные данные оригинальны и позволили автору идентифицировать и предложить для классификации 4 типа клеток: большие, средние, малые амебоциты, элеоциты. В пределах элеоцитов автор для разных животных, подчеркивая наличие хлорогогенных клеток и гранул, дает классификацию НА (не амебоцит) и ХЛ (хлорогогенные клетки). Автор провел 3 серии экспериментов, в которых исследовались различные показатели: 1) осмотическая стойкость; 2) осморегуляторные реакции форменных элементов гемолимфы и целомической жидкости; 3) степень использования клетками мембранного резерва при помещении их в гипо- или гипертонические растворы. Оценка проводилась с применением современных методов и по предложенным расчетным формулам. Основное внимание для классификации было уделено функциональным признакам, т.к. морфологические параметры клеток оказались достаточно переменными у представителей внутри типа. Тщательный анализ экспериментальных

данных показал наличие двух основных типов клеток в циркулирующих жидкостях амeboциты (основная функция иммунная) и элеоциты (накопление и хранение питательных веществ). Амeboциты исследованных представителей класса CLITELLATA представлены несколькими типами амeboцитов, отличающимися уровнем активности, поглотительной способностью и степенью адгезии. Среди клеток элеоцитов автор выявил 2 типа, которые отличаются по количеству отличаются по качеству и количеству внутриклеточных структур – гранул и вакуолей. На этом основании Т.А. Пигалева описывает два типа элеоцитов – хлорогогенные клетки и хлорогогенные гранулы. Интересной оказалась реакция клеток – распластывание, что происходит при снижении двигательной активности клеток. Далее клетка прикрепляется к субстрату, рельеф сглаживается, объем становится максимальным, движение прекращается. При действии осмотической нагрузки свойства клеточных мембран также изменялись, клетки по-разному использовали мембранный резерв. Выявлено несколько несколько типов клеток с разной осмотической устойчивостью, что является доказательством наличия адаптивной реакции на изменение условий среды обитания. Хлорогогенные клетки не проявили таких свойств.

Клеточные мембраны животных обладают эластичностью, поэтому могут менять форму и объем в различных средах. Это происходит за счет использования мембранного резерва. Автор впервые проверил это положение на представителях класса Clitellata. Оказалось, что степень использования этого показателя различна у представителей разных таксономических групп, например у представителей семейства Lumbricida он колеблется в пределах от 10% (*O. Complanatum*) до 56% (*E. Fetida*). Упругость мембран также является характеристикой, обеспечивающей адаптационные свойства клеток, например, при перестройке в изо- или гипертонических средах. Исследования показали, что разные животные также в разной степени реагируют на такие изменения, но в основном в гипертонических условиях эластичность увеличивалась, в гипотонических увеличивалась жесткость мембраны у таких видов, как *Lumbricus*, *E. Tetraedra*, *E. Rosea*.

По морфофункциональным адаптациям гемоцитов и целоцитов в разных осмотических средах класс Clitellata представлен (на основании собственных исследований автора) 5-ю группами, имеющими тесные филогенетические связи (1-*Eisenia rosea*, *Eusenia fetida*, *Eusenia nordenskioldi*, *Eisenia gordejffii*; 2- *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus castaneus*; 3- *Eiseniella tetraedra*; 4- *Lumbricus rubellus*; 5 *Hirudo medicinalis*, *Hirudo sansguisuga*, *E. Octoculata*), что отражает личный вклад автора в разработку типологической классификации клеточных элементов аннелид.

Глава 4 «Обсуждение результатов исследования» отражает уровень сложности проблемы и подчеркивает понимание автором полученных им впервые экспериментальных данных и их вклад в тот раздел исследований систем циркуляции жидкостей у беспозвоночных животных, которым занимается соискатель.

Выводы, сформулированные автором, конкретны и соответствуют представленным результатам.

Работа написана хорошим литературным языком, доступна в понимании, иллюстративный материал хорошего качества, список литературы соответствует требованиям ВАК. Описки, незаполненные страницы (9?) единичны и не снижают общего положительного впечатления о работе.

В ходе прочтения возникли вопросы:

- 1) Как Вы считаете, изменение рельефа мембраны за счет большей или меньшей складчатости влияет на адаптационные свойства? Для нервных клеток складчатость мембраны определяет емкостные свойства, отсюда возможные изменения возбудимости, а для гемоцитов это имеет значение?
- 2) Механизмы регуляции объема и осморегуляции сложны и предполагают комплексную многоэтапную реакцию, затрагивающую многие органы. Особая функция отводится нейрогормональным взаимодействиям. Насколько этот механизм можно привлечь для объяснения Ваших результатов?
- 3) Можно ли распространить полученные Вами данные на другие объекты, принимая во внимание гетерогенность изучаемой Вами системы циркуляции, структурную и функциональную?

Таким образом, обоснованность поставленных задач, новизна научных положений и выводов, сформулированных Т.А. Пигалевой 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 Пигалевой Татьяны Александровны «Морфофункциональные особенности и осморегуляторные реакции клеточных элементов системы циркуляции представителей класса CLITELLATA», 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 Пигалева Татьяна Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – физиология.

28.08.2015

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](mailto:TASafonova@mail.ru)

