

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Сокольниковой Юлии Николаевны
на тему: “Анализ клеточных защитных реакций в диагностике здоровья
двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis*”
по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертационное исследование Сокольниковой Юлии Николаевны посвящено исследованию механизмов клеточного иммунитета двустворчатого моллюска *Modiolus kurilensis* и роли этих реакций в модуляции функционального состояния организма в условиях антропогенного загрязнения местообитания, паразитарной инвазии и травмах организма. В настоящее время оценка параметров неспецифического клеточного иммунитета у гемоцитов считается одним из наиболее эффективных, быстрых и надежных способов оценки условного здоровья двустворок. Автор диссертационной работы успешно сочетает исследование клеточных параметров клеток гемолимфы с гистопатологическим анализом тканей модиолусов, а также на основании измеренных показателей предлагает расчетный индекс, позволяющий дать универсальную количественную оценку состояния организма в условиях различных воздействий. Юлия Николаевна в своем исследовании представляет детальное описание клеточного состава гемолимфы модиолусов, являющихся удобным объектом региональной биоиндикации, приводит границы нормальных колебаний параметров клеточного иммунитета гемоцитов в условно фоновых акваториях, выделяет и описывает паразитарную водоросль *Coccomyxa parasitica*, а также приводит детальное исследование стадий развития паразитарной инвазии и поражения модиолусов. Это, несомненно,

делает проведенное исследование не только **новым**, но и крайне **актуальным**.

Диссертационная работа Сокольниковой Юлии Николаевны построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты, обсуждение и выводы. Работа изложена на 194 страницах, содержит 458 ссылок на литературные источники, только 33 из которых – на русском языке. Более 80 источников литературы имеют год выпуска от 2015.

Во **введении** подробно освещены актуальность и научная новизна работы, сформулированы цели и задачи исследования, перечислены положения, выносимые на защиту, приведен список публикаций автора в рецензируемых научных журналах и сборниках материалов конференций. **Положения, выносимые на защиту**, соответствуют полученным результатам.

В **обзоре литературы** подробно изложен анализ современных знаний о механизмах реализации клеточного иммунного ответа у двустворчатых моллюсков, общепринятых параметрах оценки функционального состояния их организма, принципах классификации клеток гемолимфы моллюсков. В целом, автор демонстрирует глубокое знание современной литературы, относящейся к вопросу исследования. Вместе с тем, автор зачастую смело использует англицизмы («клиренс», «киллинг», «дебрис», «элиситор» и пр.), что наряду со сложными конструкциями предложений в ряде случаев затрудняют восприятие текста.

В работе использован широкий спектр современных **методов** исследования, а именно: флуоресцентная, электронная и фазово-контрастная микроскопия, проточная цитометрия, градиентное центрифугирование, спектрофотометрия,

молекулярно-генетические методы. Основная часть работы выполнена с применением методов микроскопии. В разделе «Материал и методы» авторы приводят также подробное описание принципов количественной оценки гистопатологических состояний органов моллюсков, что существенно упрощает читателю понимание и оценку полученных результатов.

Раздел «**результаты**» проиллюстрирован большим количеством четких и наглядных рисунков. Всего в этом разделе представлено 29 рисунков и 15 таблиц. В данном разделе исследован клеточный состав гемолимфы модиолусов, даны описания морфотипов гемоцитов, показана их функциональная роль. Несомненным плюсом работы является использование целого комплекса различных флуоресцентных и нефлуоресцентных специфических красителей, демонстрирующих различные аспекты структуры гемоцитов. На основании комплексной оценки данных по всем видам окрашивания автор предоставляет четкое и наиболее детальное описание каждого типа гемоцитов данного вида двустворчатых моллюсков. Важно, что автор также демонстрирует границы естественных колебаний функциональных и иммунных показателей гемоцитов модиолусов в сезонной динамике, приводятся сравнительные данные об изменениях этих параметров при хронической антропогенной нагрузке, экспериментальном травмировании животных и инфицировании паразитарной микроводорослью. Большой интерес представляет оценка гистопатологических изменений в тканях моллюсков под действием указанных факторов. Данные, полученные диссертантом, отличаются новизной и достоверностью.

В разделе «**обсуждение**» приводится анализ полученных данных в контексте современного состояния исследуемой проблемы. Раздел написан ярко и интересно, логика рассуждения легко прослеживается.

Завершают диссертацию **10 выводов**, в которых отражены результаты работы. Выводы основаны на результатах достаточного количества экспериментов, четко сформулированы и согласуются с задачами, поставленными в работе.

В целом, диссертация Сокольниковой Юлии Николаевны является самостоятельным, законченным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне и вносящим существенный вклад в понимание механизмов клеточного иммунного ответа двустворчатых моллюсков и влияния неспецифических факторов среды на границы их изменений. **Автореферат** полностью отражает содержание диссертации. Основные научные результаты, включенные в работу, опубликованы в рецензируемых научных журналах и доложены на научных конференциях.

Несмотря на общее положительное впечатление от работы, возникли некоторые **вопросы и замечания**, не умаляющие достоинств диссертационного исследования:

1. В обзоре литературы авторы указывают на то, что исследованию влияния дефицита кислорода на показатели клеточного иммунитета двустворчатых моллюсков посвящено относительно немного работ, что не соответствует действительности. Существует большое число публикаций, посвященных влиянию гипоксии на параметры иммунного ответа двустворчатых моллюсков, как классических модельных видов, так и специфических объектов региональных исследований. В литературном обзоре можно было бы привести гораздо больше данных, нежели это сделал диссертант, поскольку

кислород – один из ключевых факторов среды, определяющих выживание моллюсков.

2. В пункте обзора литературы «1.5. Факторы, влияющие на морфофункциональные свойства гемоцитов» подпункт «1.5.1 Абиотические факторы» для удобства восприятия текста каждый фактор можно было бы выделить в отдельную рубрику.
3. На с. 38-41 обзора литературы приводятся данные о влиянии поллютантов на иммунную систему моллюсков, однако, данные входят в раздел «1.5.1 Абиотические факторы». Поллютанты все же в меньшей степени абиотические факторы и логичнее было бы вынести их в отдельный пункт «Антропогенные факторы».
4. В разделе «Материалы и методы», помимо описания районов отбора проб нагляднее было бы указать их на карте, приведенной в качестве рисунка.
5. Целый ряд вопросов вызывают инкубационные среды, использованные для отмывки и ресуспензирования гемоцитов в ходе выполнения экспериментов. Из каких соображений автор остановил выбор на средах такого состава, какой был рН и осмолярность среды ФБСС? Общепринятым подходом в работе с гемоцитами является использование стерильной фильтрованной морской воды. Использование сред другого состава требует соблюдения всех параметров, в особенности осмолярности и рН, поскольку они напрямую влияют на морфологию и функциональный статус клеток. Далее, в работе приводятся 2 среды для работы с гемоцитами. При этом в разных экспериментах автор использует разные среды для одного и того же этапа работ, к примеру для отмывки и финального ресуспензирования гемоцитов в п. 2.2.1., 2.2.2.1., 2.2.2.5. отмывка

гемоцитов проводилась в среде ИСС, а в 2.2.2.6. – в ФБСС. Чем объясняется выбор сред в каждом конкретном случае? Почему в п. 2.2.2.2. отмывка клеток осуществлялась в ФБСС, а финальное ресуспензирование в ИСС?

6. В п. 2.2.2.2 (Фракционирование клеток гемолимфы) сначала приводится методика отбора клеток гемолимфы, однако, ранее в п. 2.2.1 (взятие и подготовка препаратов гемолимфы) этот протокол уже описан. Речь идет о повторном взятии гемолимфы?
7. В описании экспериментов отсутствует информация об объемах выборки, весе моллюсков. Кроме того, неясно, отбирали ли пробы гемолимфы индивидуально, либо сливали образцы от нескольких особей.
8. В работе в разных экспериментах проводили подсчет клеток гемолимфы, а также анализ клеточного состава двумя методами – проточной цитометрией и путем микроскопического анализа. Эти два метода отличаются в своем подходе к идентификации клеток. Насколько совпадали результаты?
9. В разделе 2.2.4 (моделирование инфицирования) проводили отбор гемолимфы моллюсков по 500 мкл в течение 10 временных точек. В ходе эксперимента проводили регулярный отбор по точкам у одних и тех же особей? Если это так, то к моменту финального отбора гемолимфы при оценке влияния инвазии патогенов на иммунитет у моллюсков отбирали уже в общей сложности 5 мл гемолимфы, при этом моллюски подвергались многократному травмированию. Эти факторы уже сами по себе могли оказывать эффект на финальных стадиях эксперимента, поскольку согласно п. 2.2.5 (Моделирование

острой кровопотери) отбор 5 мл гемолимфы соответствует «массивной кровопотери».

10. На рисунке 6 в разделе «результаты» следует пояснить, что означают звездочки над всеми столбиками правой части рисунка. По отношению к чему рассчитана достоверность?
11. В экспериментах по исследованию фагоцитарной активности и расчетах фагоцитарного индекса, оценки продукции активных форм кислорода и других параметров клеточного иммунного ответа проводился ли анализ по популяциям гемоцитов, или оценивалась общая способность клеток гемолимфы?
12. Рисунок 11. При сравнении размеров и уровня гранулярности клеток методом проточной цитометрии говорить о различиях в параметрах можно только с применением калибровочных микросфер. В остальных случаях сдвиги субпопуляций могут объясняться целым комплексом факторов, среди которых большая часть относится к аппаратным погрешностям.
13. Интересным представляется факт частоты встречаемости гистопатологических изменений органов модиолусов в условно фоновом водоеме. Чем может объясняться эти патологические процессы?
14. Понятно, что сопоставление параметров клеточного иммунного ответа гемоцитов с частотой встречаемости гистопатологических изменений в органах моллюсков позволяет получить комплексную картину состояния особей. Однако, множественный корреляционный анализ по принципу «сравнения всего со всем» вызывает сомнения (Таблица 8-11, Таблица 13). В первую очередь при проведении корреляций в параметрах следует определить вероятный механизм взаимосвязи, а

затем искать математическое подтверждение этой связи. В обсуждении результатов авторы не приводят механизмов, лежащих в основе выявленных корреляционных связей между параметрами. Кроме того, сами взаимосвязи не имеют достаточной силы, судя по величине коэффициентов.

15. Среди общих комментариев к тексту диссертационной работы следует указать некоторое количество стилистических ошибок и несколько вольное употребление латыни, а именно указание родового названия без видового, сочетание в одном предложении в перечислении видов русского названия одного вида и латинского для другого.

16. Для более наглядного отображения достоверности результатов в таблицах и рисунках возможно приведение не только уровня достоверности, но и объема выборки.

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

18. В списке литературы в случае наличия нескольких работ одного автора, цитирования даны в произвольном порядке, хотя общепринятым считается выстраивать их в хронологическом порядке.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертационная работа “Анализ клеточных защитных реакций в диагностике здоровья двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis*” соответствует основным квалификационным критериям (пункты 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября

2013 г. № 842), а ее автор, Сокольникова Юлия Николаевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук

старший научный сотрудник отдела Физиологии животных

и биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

Андреева Александра Юрьевна

26.05.2021

[Redacted]

Контактные данные:

Тел.: 89111756614, e-mail: andreevaal@gmail.com

Адрес места работы: 299011, г. Севастополь, просп. Нахимова 2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

Тел.: +7-8692-544110; e-mail: ibss@ibss-ras.ru

Подпись Андреевой А.Ю. заверено
Начальник управления кадрами и
трудовыми отношениями ФИЦ ИвБЮМ
[Redacted]

26.05.2021



И.П. [Redacted]

[Redacted]