

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Гуркова Антона Николаевича «Исследование вариабельности рН внутренних сред гидробионтов в стрессовых условиях: *in vivo*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.10 – гидробиология

1. Актуальность выбранной темы

Температура, рН и ионная сила жидких сред являются ключевыми факторами микроокружения, которые существенным образом влияют на процессы ферментативной кинетики и метаболизма в целом. Известно, что большинство ферментных систем полноценно функционируют в относительно узком диапазоне указанных выше условий, что требует решения проблем гомеостаза этих характеристик, прежде всего, на клеточном уровне. рН и ионная сила жидких сред были стабилизированы на внутриклеточном и организменном уровнях на ранних этапах эволюционного процесса, что сделало организмы менее зависимыми от естественной динамики физико-химических факторов внешней среды. Контроль за величиной рН внутренних и внутриклеточных сред является важнейшей характеристикой, позволяющей судить о путях трансформации метаболических процессов при адаптации организмов к условиям окружающей среды и смене естественных состояний. Этот показатель может быть использован и в качестве индикатора при решении вопросов экодиагностики.

Представленная диссертационная работа посвящена прижизненному контролю величины рН внутренней среды представителя байкальской фауны амфипод (*Eulimnogammarus verrucosus*) и ряда видов костистых рыб (*Danio rerio*, *Cyprinus carpio*). Работа ценна, прежде всего, уникальной методической разработкой, которую предлагает автор – использование имплантированных флуоресцентных сенсоров (полиэлектролитных микрокапсул) для контроля рН циркулирующих сред гидробионтов, которая не имеет аналогов. Важной составляющей работы является реализация данной методической разработки в ходе серии экспериментов, выполненных в режиме *in vivo* и *in vitro*. Все рассмотренные выше аспекты, относящиеся в работе А.Н. Гуркова, делают ее несомненно актуальной и интересной как с практической, так и теоретической точек зрения.

2. Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Диссертант показывает весьма хорошую теоретическую подготовку и владение, имеющейся в современной научной периодике информацией. Это видно из характера анализа полученных материалов, качества аргументации, логических схем. Выводы и заключения, представленные в работе, достаточно хорошо обоснованы.

О надежности заключений и выводов свидетельствует также весьма широкий методический арсенал, применяемый в диссертационной работе. Он включает современные светооптические (стереомикроскопия), спектрофотометрические методы (при определении активности ферментов, ряда субстратов и метаболитов), а также электрофорез в ПААГе с элементами вестерн-блоттинг анализа (БТШ). Статистические методы обработки цифровой информации адекватны поставленным задачам и в достаточной степени иллюстрируют выявленные эффекты и закономерности.

3. Новизна основных научных положений и выводов диссертации

Важным достоинством представленной диссертационной работы является разработка метода прижизненного контроля величины рН во внутренних средах водных организмов. Метод действительно сделан добротным, особенности лабораторного регламента его применения на практике хорошо обоснованы. Поэтому первые два положения, выносимые на защиту, а также выводы 1-4 не вызывают возражений.

Вместе с тем, 3-е положение, выносимое на защиту, и вывод 5 мне кажутся не обоснованными. Не следует ставить знак равенства между действием гипоксии и гиперкапнии. Это разные факторы и разные состояния организма. Гиперкапния затрагивает, прежде всего, буферные системы и только затем тканевой метаболизм, который постепенно реорганизуется в направлении усиления анаэробных процессов. Поэтому рост содержания лактата будет отмечаться на уровне систем циркуляции с опозданием. Гипоксия же вначале вызывает перестройку метаболизма, что сопровождается постепенным ростом содержания молочной кислоты вначале на уровне тканевых структур, а затем плазмы крови, вызывая развитие ацидоза (снижение рН), то есть картина будет обратной.

4. Научно-практическая ценность работы и конкретные пути применения результатов исследований

Как уже отмечалось, автор предложил уникальную методическую разработку, основанную на применении микроинкапсулированных флуоресцентных сенсоров (МФС), которая не имеет аналогов на сегодняшний день. Она позволяет осуществлять прижизненный контроль величины рН внутренних сред гидробионтов (амфипод, рыб), что интересно, прежде всего, с позиций получения новой информации об особенностях течения метаболических процессов в их организме. Следует отметить тщательность, с которой автор подошел к разработке данного метода, учитывая многие переменные, которые могут повлиять на качество получаемой информации (анализ распределения МФС, вопросы калибровки SNARF-1, оценка поведения биообъекта, процессов заживления инъекционной раны и т.д.).

Применение данного метода в условиях натуральных наблюдений и в серии экспериментов (внешняя гиперкапния), с одной стороны, позволило автору зарегистрировать величины рН в условиях естественных состояний организма, а, с другой стороны, реакцию гидробионтов на действие стрессорных факторов. При этом были выявлены общие закономерности: снижение величины рН на повышение концентрации CO₂ в воде, у систематически удаленных организмов, что, безусловно, имеет теоретическое значение. Автор справедливо отмечает, что данная методическая разработка может быть использована и для целей экодиагностики.

5. Полнота изложения основных научных положений и выводов в опубликованных научных работах

Результаты исследований нашли отражение в 14-ти печатных работах и автореферате диссертации. Список публикаций включает 8 статей и 6 тезисов докладов. Большинство статей опубликовано в рейтинговых изданиях (базы WoS, Scopus), которые соответствуют списку ВАК РФ. В 4-х из 8-ми статей соискатель является первым автором, что наглядно отражает степень его участия в проводимых исследованиях. Опубликованные работы всесторонне отражают представленные для рассмотрения результаты исследований, основные положения и выводы диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены на 6-ти конференциях, большинство из которых имеет статус международных.

6. Структура диссертации

Рукопись диссертации изложена на 119 страницах, включает 1 таблицу и 37 рисунков. Она состоит из введения (общая характеристика работы), 3-х глав, выводов, списка использованных источников, включающего 165 наименований (15 кириллицей, 150 латиницей). Глава 1 – это обзор имеющейся информации по тематике диссертации. В главе 2 дана характеристика используемого в работе материала, описаны экспериментальные схемы, методы лабораторной обработки проб, статистического анализа цифровой информации. В главе 3 приводятся результаты экспериментальных исследований, полученные автором, подводятся некоторые итоги, акцентируется внимание на ряде выявленных эффектов, которые позволяют сделать определенные выводы.

Во **введении** работы (общая характеристика работы) в развернутой и аргументированной форме раскрывается актуальность выбранной темы и вытекающие отсюда цель и перечень исследовательских задач. Здесь также определена связь с выбранной специальностью. Раскрыта научная новизна, практическая значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту и личный вклад автора. Дана

развернутая характеристика апробации полученных результатов, количества опубликованных работ, структуры диссертации.

Замечания, рекомендации, вопросы.

- Считаю, что формулировка цели работы не совсем удачна. Она не отражает весь объем работы, который выполнил соискатель.
- Есть претензии к 3-му положению, выносимому на защиту. Аргументация изложена в пункте 3 настоящего отзыва.
- Формулировки положений, выносимых на защиту, должны быть более корректными. Не стоит их начинать с фразы «Несмотря на ...».

В главе 1 (21 страница) рассмотрен значительный объем информации, касающейся непосредственно тематики диссертационной работы. Она включает 8 разделов. В рамках настоящей главы охарактеризован стресс, как функциональное состояние, а также факторы, которые могут быть причиной его развития (гипоксия и гиперкапния) (разделы 1.1, 1.2). Определенное внимание уделено маркерам стрессорных состояний, по которым можно судить о степени их развития (лактат, БТШ, глутатион-S-трансфераза) (раздел 1.6). Особый акцент сделан на применении полиэлектролитных микрокапсул для контроля функциональных состояний организма, которые являются одним из объектов исследования в настоящей диссертационной работе (разделы 1.4, 1.5, 1.8). Автор осознанно затронул также вопросы, связанные с иммунитетом ракообразных и костистых рыб (раздел 1.7). Это закономерно, так как полиэлектролитные микрокапсулы можно рассматривать в качестве антигена, что допускает активную реакцию со стороны гуморального и, прежде всего, клеточного иммунитета.

Замечания, рекомендации, вопросы.

- Гипоксия и гиперкапния вызывают развитие различной последовательности процессов в организме, хотя в конечном итоге и тот и другой фактор усиливают интенсивность анаэробных процессов в тканях (более детально пункт 3). Мне кажется, что понимание этих аспектов у автора несколько размыто, о чем свидетельствуют его рассуждения в рамках раздела 1.2.
- Думаю, что при описании системы иммунитета костистых рыб следовало бы больше внимания уделить таким разновидностям лейкоцитов, как нейтрофилы и моноциты, для которых характерна выраженная способность к реакции фагоцитоза.
- Не лишним было бы также соотнести размеры полиэлектролитных микрокапсул и их агрегатов с вопросами микроциркуляции на тканевом уровне.

Глава 2 (22 страницы) всесторонне раскрывает методологические аспекты выполненного исследования. Включает 15 разделов. Дается развернутая характеристика материала, условий его сбора, транспортировки, содержания в лаборатории (аквариальной), методам фиксации, анестезии и эвтаназии (разделы 2.1, 2.2, 2.6). Достаточно подробно описаны методические аспекты отбора проб тканей и их подготовки к лабораторному анализу, методология постановки эксперимента по влиянию гиперкапнии (раздел 2.3), методы определения активности глутатион-S-трансферазы, содержания ряда соединений (общий белок, БТШ) и метаболитов (лактат) (разделы 2.11-2.14). Особое внимание уделено подготовке микрокапсул, методологии их инъекции, визуализации и измерения pH, оценке предельного воздействия эффекта Доннана (разделы 2.4-2.9). Методы статистического анализа, используемые в работе, адекватны поставленным задачам и позволяют с достаточно высокой степенью надежности характеризовать выявленные в работе эффекты (раздел 2.15).

Замечания, рекомендации, вопросы.

- В качестве анестезирующего агента автор применял гвоздичное масло. Этот же препарат был использован и для целей эвтаназии. Показано, что гвоздичное масло обычно оказывает стрессорное воздействие на водные организмы (рыбы), повышая уровень кортизола и трийодтиронина в плазме крови. При этом многие особи сохраняют болевую чувствительность. Хотелось бы услышать комментарий автора по этому поводу.
- Автор при подготовке обзора литературы много внимания уделил системе иммунитета ракообразных и рыб. Вместе с тем, в работе он ограничился лишь описанием характера раневых поверхностей в момент и после инъекций микрокапсул. Почему?
- С чем связан выбор глутатион-S-трансферазы, а не глутатионпероксидазы?

Глава 3 является основной (43 страницы). Она включает 8 разделов. Здесь представлены результаты исследований, выполненных автором, и аналитическая составляющая работы. Ее условно можно разделить на 3 основные части: результаты методических разработок (разделы 3.1-3.5), применение методических разработок (разделы 3.6, 3.7), анализ полученных результатов (раздел 3.8).

В разделах 3.1-3.5 представлены данные по оптическим характеристикам покровов амфипод, характеру распределения микросфер в циркуляционных системах амфипод и рыб, реакции организма биообъектов на введение микросфер в систему циркуляции, влиянию эффекта Доннана на состояние микроинкапсулированных флуоресцентных сенсоров и их калибровки.

В разделах 3.6 и 3.7 сосредоточена информация о величинах рН внутренних сред амфипод и рыб, полученных на основе применения автором полиэлектролитных микрокапсул. Это результаты получены как в ходе фоновых наблюдений (аквариальная), так и в условиях экспериментальных нагрузок (гиперкапния).

Раздел 8 сочетает в себе два аспекта: обсуждение полученных результатов и заключение.

Замечания, рекомендации, вопросы.

- Думаю, что главу 3 можно было бы разделить на 3 самостоятельные главы. Одна из них была бы посвящена методическим разработкам автора, вторая применению этих разработок на практике, третья – анализу полученной информации. Это бы упростило восприятие материала, представленного в диссертации.
- С чем автор связывает неравномерность распределения микрокапсул в системе циркуляции *E. verrucosus* в условиях длительной экспозиции? Аналогично по *D. rerio*. Думаю, что инъекцию микросфер было бы проще осуществлять пункцией жаберной или хвостовой артерии. Это довольно простая процедура.
- Насколько жабры могут отражать реальные величины рН крови у рыб? Их состояние в значительной степени зависит от условий среды.
- Если говорить о фагоцитозе микрокапсул, о чем рассуждает автор, то логично было бы изготовить мазок крови (гемолимфы) и подвергнуть его спектральному анализу. Это было бы доказательно, а методически процедура достаточно простая.
- Автор наблюдал значительное понижение величины рН в крови и гемолимфе на 2-ой и 9-ый день экспозиции у *D. rerio* и *E. verrucosus* соответственно. Объяснить это только фагоцитозом микросфер сложно. Скорее есть нарушение микроциркуляции и локальное накопление кислых метаболитов. Хотелось бы услышать мнение автора по данному поводу.
- В разделе 3.7 автор опять совмещает гиперкапнию и гипоксию, что неправильно (подробно пункт 3 настоящего отзыва).
- Рубрику «Обсуждение и заключение» можно объединить под вывеской «Заключение», так как обсуждение фактически не получилось. Данный раздел занимает всего 3 страницы. Элементы обсуждения присутствуют в разделах 3.1-3.5, связанные с методическими разработками автора, тогда как полученная с помощью новой разработки информация (разделы 3.6, 3.7) проанализирована крайне слабо.

Выводы полностью отражают содержание диссертационной работы. Вывод 5 не считаю достаточно обоснованным (детали изложены в пункте 3 отзыва). Думаю, что

формулировку выводов не следует начинать со слов «Показано...», «Установлено...». Это следует из содержания самой работы.

Список использованных источников включает 165 наименований с явным преобладанием публикаций на английском языке (15 кириллицей, 150 латиницей). Он содержит достаточное число свежих публикаций (работы после 2010 года). На них приходится более 56 % от общего числа ссылок. При этом в списке встречаются работы 24-45-х годов прошлого столетия, что отражает всестороннее знание проблемы.

Автореферат полностью отражает содержание и структуру диссертации.

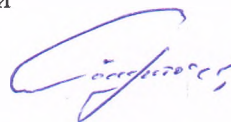
В работе имеется незначительное число опечаток.

Однако все указанные замечания не умаляют достоинств диссертации. Они скорее носят технический и рекомендательный характер и не могут повлиять на общее положительное впечатление от проделанной работы. Диссертация сделана добротнo с высокой степенью научной и методической новизны.

7. Заключение

Анализ представленного для рассмотрения материала (рукописи диссертации, автореферата, публикаций), основных положений и выводов диссертации, с учетом новизны, практической значимости и статистической надежности полученной информации позволяет заключить, что диссертационная работа А.Н. Гуркова: «Исследование вариабельности рН внутренних сред гидробионтов в стрессовых условиях: *in vivo*» является законченным научным исследованием. Она соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.10 – гидробиология (п.9 Положения ВАК РФ о порядке присуждения ученых степеней от 24 сентября 2013 г № 842), а ее автор, Гурков Антон Николаевич, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук.

Официальный оппонент:
главный научный сотрудник
руководитель отдела физиологии животных и биохимии
ФГБУН ФИЦ «Института биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского РАН»
доктор биологических наук, профессор



А.А. Солдатов

проспект Нахимова 2, Севастополь 299011, РФ
телефон: +79788277526
alekssoldatov@yandex.ru



Подпись А.А. Солдатов удостоверяю

ул. сеп. Пушкина
к.б.к. Астаф. Пестерев В.В.

В диссертационный совет Д 002.036.02
При Институте биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН

Я, Солдатов Александр Александрович, даю согласие выступить официальным оппонентом диссертации Гуркова Антона Николаевича на тему «Исследование variability рН внутренних сред гидробионтов в стрессовых условиях *in vivo*», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук.

СВЕДЕНИЯ ОБ ОППОНЕНТЕ

1. Учёная степень, учёное звание, отрасль науки и научная специальность, по которой защищена диссертация: доктор биологических наук, профессор, 03.00.10 – Ихтиология.
2. Место работы (полное наименование организации): Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН». Сокращённое наименование организации: ФИЦ ИнБИОМ.
3. Почтовый адрес организации с указанием индекса: 299011, г. Севастополь, проспект Нахимова, д. 2.
4. Адрес официального сайта в сети Интернет: <http://imbr-ras.ru/>
5. Название структурного подразделения: отдел физиологии животных и биохимии.
6. Должность: главный научный сотрудник, заведующий отделом.
7. Телефон с указанием кода города: +7(8692)54-41-10.
8. Адрес электронной почты: alekssoldatov@yandex.ru
9. Список основных публикаций по профилю оппонируемой диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15):
 - 1) Andreyeva A.Y., Soldatov A.A., Krivchenko A.I., Mindukshev I.V., Gambaryan S. Hemoglobin deoxygenation and methemoglobinemia prevent regulatory volume decrease in crucian carp (*Carassius carassius*) red blood cells // Fish Physiology and Biochemistry. 2019. Vol. 45. Iss. 6. P. 1933-1940.
 - 2) Andreyeva A.Y., Kukhareva T.A., Soldatov A.A. Cellular composition and proliferation levels in the hematopoietic tissue of black scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) head kidney and spleen during the spawning and wintering periods // Anatomical Record. 2019. Vol. 302. Iss. 7. P. 1136-1143.
 - 3) Puzakova L.V., Puzakov M.V., Soldatov A.A. Gene encoding a novel enzyme of LDH2/MDH2 family is lost in plant and animal genomes during transition to land // Journal of Molecular Evolution. 2019. Vol. 87. Iss. 1. P. 52-59.

- 4) Soldatov A.A., Kukhareva T.A., Andreeva A.Y., Efremova E.S. Erythroid elements of hemolymph in *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) under conditions of the combined action of hypoxia and hydrogen sulfide contamination // Russian Journal of Marine Biology. 2018. Vol. 44. Iss. 6. P. 452-457.
- 5) Slynko Y.V., Kulikova A.D., Slynko E.E., Soldatov A.A. Genetic changeability by loci COI mtDNA for different coloring of shell phenotypes of black sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) // Russian Journal of Genetics. 2018. Vol. 54. Iss. 8. P. 944-949.
- 6) Andreyeva A.Y., Skverchinskaya E.A., Gambaryan S., Soldatov A.A., Mindukshev I.V. Hypoxia inhibits the regulatory volume decrease in red blood cells of common frog (*Rana temporaria*) // Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology. 2018. Vol. 219-220. P. 44-47.
- 7) Andreyeva A.Y., Soldatov A.A., Kukhareva T.A. Black scorpionfish (*Scorpaena porcus*) hemopoiesis: analysis by flow cytometry and light microscopy // Anatomical Record. 2017. Vol. 300. Iss. 11. P. 1993-1999.
- 8) Soldatov A.A., Kukhareva T.A., Andreyeva A.Y., Parfenova I.A., Rychkova V.N., Zin'kova D.S. The functional morphology of erythrocytes of the black scorpion fish *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) during hypoxia // Russian Journal of Marine Biology. 2017. Vol. 43. Iss. 5. P. 368-373.
- 9) Vodyasova E.A., Soldatov A.A. Identification of subspecies of European anchovy *Engraulis encrasicolus* (Engraulidae) in the wintering aggregations based on morphological parameters of otoliths // Journal of Ichthyology. 2017. Vol. 57. Iss. 4. P. 553-559.
- 10) Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Borodina A.V., Golovina I.V. Glutathione antioxidant complex and carotenoid composition in tissues of the bivalve mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2017. Vol. 53. Iss. 4. P. 289-297.
- 11) Andreyeva, A.Y., Soldatov A.A., Mukhanov V.S. The influence of acute hypoxia on the functional and morphological state of the black scorpionfish red blood cells // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal. 2017. Vol. 53. Iss. 4. P. 312-319.
- 12) Kukhareva T.A., Soldatov A.A. Functional morphology of blood erythroid cells in *Neogobius melanostomus* P. during cell differentiation // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2016. Vol. 52. Iss. 3. P. 261-266.
- 13) Borodina A.V., Soldatov A.A. The qualitative composition of carotenoids and their seasonal dynamics in tissues of the bivalve *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // Russian Journal of Marine Biology. 2016. Vol. 42. Iss. 2. P. 166-177.
- 14) Soldatov A.A., Kukhareva T.A. Comparative estimation of circulating blood erythrograms of the family Gobiidae representatives from the water areas of southwestern Crimea // Journal of Ichthyology. 2015. Vol. 55. Iss. 3. P. 442-445.
- 15) Soldatov A.A., Kukhareva T.A. Erythropoiesis and the contents of abnormal erythroid forms in the blood of the round goby, *Neogobius melanostomus* Pallas, 1811 (Osteichthyes: Gobiidae) // Russian Journal of Marine Biology. 2015. Vol. 41. Iss. 2. P. 155-160.

Д.б.н., профессор, руководитель отделом
физиологии животных и биохимии ФИЦ ИнБЮМ

Солдатов Александр Александрович

27.01.2020



Подпись А.А. Солдатов удостоверяю

ул. сепр., к. 8. н. Юсиф Мамедбеков