

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Гуркова Антона Николаевича

«Исследование variability рН внутренних сред гидробионтов в стрессовых условиях *in vivo*», представленную на соискание учёной степени кандидата

биологических наук по специальности

03.02.10 — Гидробиология

Актуальность и новизна исследования. Одной из актуальных проблем гидробиологии является поиск удобных и информативных критериев оценки состояния водных организмов в условиях изменяющихся факторов среды обитания, в том числе антропогенных. Особенно это касается вопросов, связанных с изучением индивидуальной variability того или иного параметра физиологического статуса организмов в динамике. В рассматриваемой работе впервые для решения этих задач применен метод прижизненного внедрения в ткани или кровеносную систему гидробионтов микроскопических датчиков, позволяющих оценивать физиологические параметры непосредственно во внутренних средах, что значительно повышает точность измерений. Впервые на примере ракообразных и рыб автором отработана методика применения имплантируемых микросенсоров, чувствительных к рН, что позволило *in vivo* оценить уровни рН внутренних сред объектов исследования, а также изучить экологически значимые диапазоны его снижения в гипоксических условиях, что является важным для формирования теоретических представлений о реакциях гидробионтов на данные условия.

Общая характеристика диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, постановка цели и задач исследования и общая характеристика работы; обзор литературы; описание объектов исследования и использованных методов; результаты экспериментов и их обсуждение; заключение с обсуждением значимости результатов для гидробиологии,

выводы и список цитируемой литературы. Диссертация изложена на 119 страницах, содержит 37 рисунков, 1 таблицу и 165 ссылок на цитируемые литературные источники.

Во «**Введении**» отражена актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследований, согласующиеся с поставленной целью. Автор обозначил и некоторые вспомогательные задачи работы, связанные с преодолением технических проблем при применении имплантируемых оптических сенсоров, что также является одним из критериев новизны работы.

Глава «**Обзор литературы**» представляет собой анализ современных представлений по обсуждаемой проблеме. Диссертант обосновывает перспективность выбранного направления исследований, рассматривает различные аспекты применения использованного типа имплантируемых сенсоров *in vivo*. Значительная часть обзора включает сведения, касающиеся иммунного ответа рыб и ракообразных на воздействие различных факторов.

Раздел «**Материалы и методы**» включает описание объектов исследования: широко распространённого байкальского вида амфипод - *Eulimnogammarus verrucosus*, известного модельного вида рыб - *Danio rerio* и родственного ему вида - *Cyprinus carpio*, который был использован для ряда вспомогательных анализов. Достаточно подробно описаны процедуры содержания животных и проведения экспериментальных экспозиций, а также методики подготовки и применения имплантируемых сенсоров и ряд других методик. Описание материала и методов исследований хорошо проиллюстрировано рисунками и фотографиями.

Глава «**Результаты и обсуждение**» включает 8 разделов с подразделами. В разделе 1 автор в доступной форме излагает результаты анализа автофлуоресценции покровов исследуемых организмов, чрезвычайно важной при получении сигнала от флуоресцентных микросенсоров. В разделе 2 охарактеризованы схемы распространения полиэлектролитных микрокапсул, служащих структурной основой используемых микросенсоров, при введении в организмы амфипод *E. verrucosus* и рыб *D. rerio*. На основании результатов

первых двух разделов автор обосновывает значение изучения центрального сосуда амфипод и жабр рыб в качестве т.н. «оптического окна» для получения сигнала от флуоресцентных микросенсоров. Несмотря на покрытие полиэлектролитных микрокапсул специальным полимером, который, казалось бы, должен снижать скорость распознавания микрокапсул иммунными клетками, автор, основываясь на результатах исследований, приведенных во втором разделе главы, высказал предположение о возможности последующего (в долговременной перспективе) иммунного ответа у исследуемых гидробионтов на вышеназванный чужеродный агент. Результаты анализа реакции амфипод и рыб на введение микрокапсул, приведенные в разделе 3, позволяют заключить, что используемые концентрации микросенсоров не обладают выраженными токсическими эффектами. Разделы 4 и 5 содержат материалы проведенных технических проверок показаний микросенсоров, чувствительных к рН, при их применении *in vivo*. В разделе 6 описана наиболее значимая часть работы — использование микросенсоров для отслеживания уровня рН во внутренних средах амфипод и рыб в норме и в различных гипоксических условиях. Наиболее впечатляющим результатом данного раздела, на мой взгляд, является экспериментальное подтверждение возможности одновременного измерения рН в крови и тканевой жидкости рыб. В 7-м разделе приводятся результаты анализа содержания лактата у амфипод в гиперкапнических условиях для сравнения с результатами оценки изменения рН гемолимфы амфипод в рамках ранее представленного аналогичного эксперимента. Завершает данную главу 8-й раздел «Обсуждение и заключение», в котором автор резюмирует значение полученных экспериментальных данных.

Выводы диссертационной работы хорошо обоснованы, соответствуют поставленным задачам и вытекают из представленных результатов. Достоверность сформулированных выводов и научных положений обоснована используемыми экспериментальными и статистическими методами и не вызывает сомнений.

Замечания к работе

1. С. 23 (обзор литературы). Следует напомнить автору, что в фазе II биотрансформации в конъюгации с гидрофильным субстратом участвует не только глутатион. УДФ-глюкуронидазы катализируют образование конъюгатов с глюкуроновой кислотой, сульфотрансферазы – конъюгатов с сульфонильной группой 3'-фосфоденозин-5'-фосфосульфата.

2. На стр. 36 указано, что карпы были весом 1,5- 2 кг, на стр. 42 написано, что обездвиженную рыбу помещали на предметное стекло на столике микроскопа. Наверное, автору следовало бы разъяснить поподробнее, каким образом рыба весом 2 кг. размещалась на предметном стекле микроскопа? Каких размеров предметное стекло?

3. В диссертации приводится 37 рисунков и 1 таблица. На мой взгляд, некоторые рисунки можно было представить в виде таблиц.

4. В формуле 4 не проставлены знаки математического действия, поэтому формула представляется как набор цифр. То же относится и к формуле

5. С 90. Рис 34 - досадная опечатка – "гиркапния" вместо "гиперкапния". Этот рисунок без изменений "перекочевал" в автореферат. В работе написано, что «Данный анализ проводили в пакете Scilab с использованием дополнения Stixbox в диапазоне длин волн 600-650 нм». На мой взгляд, анализ проводят, используя пакет прикладных математических программ....., а не в пакете...

6. На Стр. 90 автор пишет: «закисление рН внутренней среды амфипод и рыб на стадии истощения ответа организма на стресс», однако доказательств, что это " истощение" в работе не приводится.

7. Поскольку обсуждение результатов приводится в разделах 1-7 гавы "Результаты и обсуждение", вызывает недоумение название следующего раздела - "Обсуждение и Заключение". На мой взгляд, "Заключение" должно представлять краткий обзор того, что поставленная

цель и задачи работы выполнены и получены ответы на поставленные вопросы.

Указанные замечания не снижают общего положительного впечатления о диссертационной работе.

Теоретическая и практическая значимость работы

С теоретической точки зрения полученные результаты представляют несомненный интерес в контексте изучения variability рН внутренних сред гидробионтов небольшого размера в норме и в гипоксических условиях. Особого внимания заслуживает практическая значимость данной диссертационной работы, в ходе которой продемонстрировано применение имплантируемых микросенсоров на основе полиэлектролитных микрокапсул в качестве нового инструмента в изучении физиологии гидробионтов. Несмотря на то, что в данной работе были использованы только сенсоры, чувствительные к рН, полученные результаты формируют основу для последующего применения и других типов микросенсоров на основе полиэлектролитных микрокапсул.

Содержание автореферата согласуется с содержанием диссертации, а материалы исследований, изложенные в работе, соответствуют специальности, по которой она представлена к защите.

Результаты работы обсуждались на нескольких международных конференциях и школах-конференциях, опубликованы в 8 статьях в научных журналах, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России, 7 из них опубликованы в рецензируемых изданиях, индексируемых международными базами Web of Science и Scopus. В 4 статьях диссертант выступает первым автором.

Таким образом, диссертационная работа «Исследование variability рН внутренних сред гидробионтов в стрессовых условиях *in vivo*» по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов, используемым методам, соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности 03.02.10 –

"Гидробиология" (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а её автор Гурков Антон Николаевич заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук.

Доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН,
главный научный сотрудник лаборатории экологической биохимии
Института биологии — обособленного подразделения Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Федерального
исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии
наук» (ИБ КарНЦ РАН)

16.03.2020



Немова Нина Николаевна

185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11.

Тел. +79217268842.

Email: nemova@krc.karelia.ru



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

Я, Немова Нина Николаевна, 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, член-корреспондент РАН, 03.01.04 – Биохимия.
2. Место работы (полное наименование организации): Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук». Сокращённое наименование организации: ИБ КарНЦ РАН.
3. Почтовый адрес организации с указанием индекса: 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11.
4. Адрес официального сайта в сети Интернет: <http://ib.krc.karelia.ru>
5. Название структурного подразделения: лаборатория экологической биохимии.
6. Должность: главный научный сотрудник.
7. Телефон с указанием кода города: +7(8142)76-98-10, +7(921)7268842.
8. Адрес электронной почты: nemova@krc.karelia.ru
9. Список основных публикаций по профилю оппонируемой диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15):
 - 1) Churova M. V., Shulgina N., Kuritsyn A., Krupnova M. Y., Nemova N. N. (2020). Muscle-specific gene expression and metabolic enzyme activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry reared under different photoperiod regimes // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2020. Vol. 239, P. 110330.
 - 2) Nefedova Z.A., Murzina S.A., Pekkoeva S.N., Ruokolainen T.R., Veselov A.E., Efremov D.A., Nemova N.N. Lipid profile of the young Atlantic salmon *Salmo salar* L. in the Letnyaya Zolotitsa River (Arkhangelsk Oblast, White Sea Basin) // *Journal of Ichthyology*. 2019. Vol. 59. Iss. 3. P. 407-413.
 - 3) Murzina S.A., Sokolov S.G., Pekkoeva S.N., Ieshko E.P., Nemova N.N., Kristoffersen R., Falk-Petersen S. First data on the parasite fauna of daubed shanny *Leptoclinus maculatus*

- (Fries 1838) (Actinopterygii, Perciformes: Stichaeidae) in Svalbard waters // Polar Biology. 2019. Vol. 42. Iss. 4. P. 831-834.
- 4) Murzina S.A., Nefedova Z.A., Pekkoeva S.N., Lajus D.L., Nemova N.N. Fatty Acids of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from the White Sea // Applied Biochemistry and Microbiology. 2019. Vol. 55. Iss. 1. P. 73-77.
 - 5) Murzina S.A., Nefedova Z.A., Pekkoeva S.N., Veselov, A.E. Baryshev I.A., Ripatti P.O., Nemova N.N. Content of fatty acids in forage objects of juveniles of salmonids from rivers of the Lake Onega basin // Inland Water Biology. 2019. Vol. 12. Iss 1. P. 96-103.
 - 6) Churova M.V., Shulgina N.S., Nemova N.N. Activity of the enzymes of the energy and carbohydrate metabolism in the organs of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* from different biotopes of the White Sea // Doklady Biological Sciences. 2018. Vol. 482. Iss. 1. P. 185-187.
 - 7) Nemova N.N., Rendakov N.L., Pekkoeva S.N., Nikerova K.M., Murzina S.A. Dynamics of estradiol level during metamorphosis in the daubed shanny (*Leptoclinius maculatus*, Fries, 1838) from Spitsbergen Island // Doklady Biological Sciences. 2018. Vol. 482. Iss. 1. P. 188-190.
 - 8) Nefedova Z.A., Murzina S.A., Pekkoeva S.N., Ruokolainen T.R., Nemova N.N. Biochemical heterogeneity of the lipid status of the prespawm eggs of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum 1792) (Varzuga River, White Sea basin) // Contemporary Problems of Ecology. 2018. Vol. 11. Iss. 3. P. 325-330.
 - 9) Murzina S.A., Nefedova Z.A., Pekkoeva S.N., Veselov A.E., Ruch'ev M.A., Nemova N.N. Fatty acid status of freshwater resident and anadromous forms of young brown trout (*Salmo trutta* L.) // Contemporary Problems of Ecology. 2018. Vol. 11. Iss. 3. P. 320-324.
 - 10) Kantserova N.P., Krylov V.V., Lysenko L.A., Nemova N.N. Geomagnetic storm effects on the calpain family calcium-dependent proteases of some invertebrate and fish species // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2018. Vol. 44. Iss. 1. P. 73-79.
 - 11) Nemova N.N., Kaivarainen E.I., Fokina N.N. Activity of Na⁺/K⁺-ATPase and the content of phospholipids in the blue mussel *Mytilus edulis* L. during environmental temperature changes // Applied Biochemistry and Microbiology. 2017. Vol. 53. Iss. 6. P. 699-702.
 - 12) Churova M.V., Meshcheryakova O.V., Ruchev M., Nemova N.N. Age- and stage-dependent variations of muscle-specific gene expression in brown trout *Salmo trutta* L. // Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology. 2017. Vol. 211. P. 16-21.
 - 13) Lysenko L.A., Kantserova N.P., Kaivarainen E.I., Krupnova M.Y., Nemova N.N. Skeletal muscle protease activities in the early growth and development of wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology. 2017. Vol. 211. P. 22-28.
 - 14) Churova M.V., Meshcheryakova O.V., Veselov A.E., Efremov D.A., Nemova N.N. Activity of metabolic enzymes and muscle-specific gene expression in parr and smolts Atlantic salmon *Salmo salar* L. of different age groups // Fish Physiology and Biochemistry. 2017. Vol. 43. Iss. 4. P. 1117-1130.
 - 15) Nemova N.N., Kyaivyaryainen E.I., Krupnova M.Y. Dynamics of activity of intracellular cysteine-dependent proteases and some peptidases in embryogenesis of Atlantic salmon *Salmo salar* L. // Russian Journal of Developmental Biology. 2017. Vol. 48. Iss. 4. P. 263-268.

д.б.н., проф., член-корр. РАН, главный научный сотрудник
лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН

Немова Нина Николаевна

15.01.2020

