



«УТВЕРЖДАЮ»

28.10.2014

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Институт  
биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина  
Российской академии наук, д.г.н. Поддубный С.А.

## ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Андреевой Александры Юрьевны «Морфофункциональные характеристики эритроцитов *Scorpaena porcus* L. в условиях гипоксии (эксперименты *in vitro*)», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Диссертационная работа Андреевой А.Ю. посвящена исследованию влияния гипоксии в условиях *in vitro* на ядерные эритроциты *Scorpaena porcus* L. при помощи методов функциональной морфологии и проточной цитометрии.

Работа выполнена на собранном автором в Черном море (бухта Казачья, г. Севастополь, Крым) материале за период 2009-2012 гг.

### **Актуальность темы выполненной работы и ее связь с соответствующими отраслями науки**

Актуальность темы не вызывает сомнения, что обусловлено ключевой ролью процессов дыхания в поддержании жизнедеятельности организмов. Помимо фундаментального интереса к этим процессам, исследования гипоксических состояний гидробионтов интересны и с точки зрения вопросов продуктивности в шельфовой зоне Мирового океана в связи с расширением в ней гипоксических акваторий, как по причине глобальных климатических изменений, так и в связи с возрастающей антропогенной нагрузкой.

Использование автором в качестве объекта исследования толерантного к экстремальным формам гипоксии морского вида *Scorpaena porcus* L., обладающего общим для представителей шельфовых экосистем набором свойств, идеально подходит для решения поставленных задач. Кроме того, выбранный диссертантом вид используется в качестве модели во многих экспериментальных работах других авторов, использующих подходы и методы не только физиологии, но и биохимии и биофизики, что в целом позволяет рассматривать результаты данного исследования в более широком – междисциплинарном – поле.

### **Значимость полученных автором диссертации результатов для науки и практики**

Рассматриваемая работа вносит существенный вклад в фундаментальные представления о процессах, связанных с функционированием клеток эритроидного ряда, в условиях гипоксии. Результаты работы представляют интерес не только для биологов, но и для медицинских исследований, так как известно, что некоторые патологии предположительно инициируются нарушениями клеточного дыхания, происходящими вследствие нарушения снабжения клеток и тканей кислородом.

О значимости полученных автором результатов свидетельствует и получение патента (патент № а201309689 от 05.08.2013 Украины: Андреева А.Ю., Муханов В.С. «Спосіб вимірювання морфометричних показників інтактних ядерних еритроцитів риб»), в котором описан разработанный Андреевой А.Ю. и соавторами метод прижизненной морфометрии ядерных эритроцитов низших позвоночных. Предложенный подход позволяет ускорить процесс проведения морфометрического анализа клеток, снизить аппаратную погрешность измерений, а также регистрировать линейные размеры не только клеток (длину, ширины, толщину), но и их ядер.

Помимо фундаментальных исследований в области биологии и медицины, теоретические положения и прикладные аспекты диссертации могут быть использованы для оценки биопродуктивности шельфовых экосистем, а также для подготовки лекционных курсов по клеточной физиологии и биохимии животных для студентов биологических специальностей высших учебных заведений.

### **Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Впервые описан феномен повышения степени поляризации внутренней мембраны митохондрий клеток вследствие ограничения процессов трансмембранного обмена при экстремально низких концентрациях кислорода. Впервые выявлены две фазы в последовательности изменений морфофункциональных характеристик ядерных эритроцитов скорпены при снижении концентрации кислорода в инкубационной среде. Первая фаза характеризуется уменьшением объема, ростом удельной поверхности клетки и снижением толщины ее диффузионного слоя. Вторая фаза имеет противоположную направленность перечисленных процессов. Впервые показано, что экстремальные формы гипоксии не оказывают влияния на жизнеспособность и целостность мембран ядерных эритроцитов скорпены и, более того, индуцируют рост функциональной активности ядер эритроцитов.

### **Структура и содержание работы**

Диссертационная работа изложена на 162 страницах. Работа состоит из введения, 6-ти разделов, заключения, выводов и списка использованных источников; содержит 6 таблиц и 53 рисунка. Список литературы включает 263 источника, из них - 248 на иностранных языках.

**Во введении** автор обосновывает актуальность выбранной темы, обусловленной интересом к механизмам толерантности к гипоксии гидробионтов, обитающих в гипоксических акваториях шельфовых экосистем Мирового океана.

Учитывая, что кислород выполняет функцию акцептора электронов в дыхательной цепи митохондрий клеток и тем самым определяет энергетический статус клеток, тканей и организма, автор выбрал в качестве предмета исследования его клеточный уровень. Для исследования были выбраны клетки, переносящие кислород - эритроциты. Опираясь на работы авторов, исследовавших у толерантных к гипоксии организмов метаболические процессы, автор диссертационной работы выделил среди них те, которые направлены на оптимизацию их энергетических трат, и использовал их для трактовки закономерностей, выявленных для эритроцитов (эксперименты *in vitro*).

Удачный выбор объекта (толерантной к гипоксии морской донной рыбы *Scorpaena porcus* L.) и системного уровня (клетки - ядерные эритроциты) исследования определили успех автора работы в решении поставленных задач.

Во введении автором сформулированы цели и задачи исследования, показаны актуальность и научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приводятся три основных положения, выносимых на защиту.

**Первая глава** посвящена обзору литературы по основным путям адаптаций гидробионтов к гипоксии и аноксии. Автором отмечены тенденции к расширению гипоксических зон в прибрежных морских акваториях и пресных водоемах вследствие увеличения на них антропогенной нагрузки и глобальных изменений климата. Рассмотрены разные уровни изучения механизмов адаптации гидробионтов в гипоксических зонах Мирового океана – от клеточного и субклеточного до организменного, от процессов внутриклеточного метаболизма до физиологических и поведенческих адаптаций. Наиболее подробно автор рассматривает адаптации к гипоксии у рыб: на уровне поведенческих приспособлений, физиологических и метаболических адаптаций, а также реакций клеточных и субклеточных систем.

**Во второй главе** описаны материалы и методы исследований. Работа выполнена в ИнБЮМ НАН Украины в течение 2009-2012 г.г. В качестве донора циркулирующей эритроцитарной массы использовали донный морской вид *Scorpaena porcus* L. Рыбу отлавливали в мае-июне ставным неводом в бухте Казачьей (р-н Севастополя, Крым). Глава включает информацию об отлове, транспортировке и содержании биологического материала, об отборе и анализе проб крови и приготовлении эритроцитарных взвесей, о моделировании гипоксических условий в экспериментах *in vitro*. Дано подробное описание цитометрического и морфометрического анализа и методов статистической обработки данных.

**В третьей главе** представлены результаты исследования по разработке метода прижизненной морфометрии клеток и его применения для ядерных эритроцитов рыб. Результаты, полученные автором, выявили существенную разницу между измерениями на фиксированных мазках и измерениями, выполненными на нативных взвешах эритроцитов. Разработанный автором подход морфометрии нативных взвесей эритроцитов имеет значительное преимущество, заключающееся в возможности обнаружения реакции клеток в виде изменения их объема и формы в ответ на те или иные экспериментальные или естественные воздействия.

**Четвертая глава** посвящена морфометрическим характеристикам эритроцитов в условиях экспериментальной гипоксии. Автором показано, что при ранжированной гипоксии изменение линейных размеров эритроцитов носило двухфазный характер: в условиях умеренного дефицита кислорода размеры клеток снижались, а при экстремально низких концентрациях кислорода возрастали. Двухфазовый характер был отмечен и для показателя формы эритроцитов и значений клеточного объема.

Выявленные двухфазовые изменения объема эритроцитов в условиях экспериментальной гипоксии – первоначальное уменьшение объема при умеренной гипоксии и увеличение объема при экстремальной гипоксии - автор объясняет следствием постепенного понижения величины рН клетки. Вначале оно активирует  $K^+/Cl^-$  – котранспорт, а затем  $Na^+/H^+$  – антипорт и последующий свеллинг. Автор отмечает, что в условиях *in vivo* активация  $K^+/Cl^-$  – канала маловероятна, так как поступление в кровь катехоламинов и активирование  $\beta$ -адренорецепторов эритроцитов практически сразу запускает  $Na^+/H^+$  – обмен на мембране клетки.

На основании полученных данных автор делает вывод о вероятной функциональной значимости морфометрических преобразований эритроцитов. При умеренной гипоксии, инициирующей уменьшение объема эритроцита, в качестве возможных функциональных изменений автор отмечает усиление диффузионных процессов и облегчение оксигенации гемоглобина. При экстремальной гипоксии, сопровождающейся увеличением объема эритроцита, автор предполагает вероятное угнетение метаболических процессов в клетке. Выявленные однонаправленные изменения геометрических параметров клетки и ядра эритроцита в условиях гипоксии позволили автору предположить, что гидратация цитоплазмы эритроцита при свеллинге сопровождается функциональной активацией ядра.



**В пятой главе** рассмотрены цитофлюориметрические показатели суспензий эритроцитов в условиях экспериментальной гипоксии. Используемые автором различные красители позволили охарактеризовать метаболическую активность клеток и состояние клеточных мембран (FDA и PI), а также мембранный потенциал митохондрий (R123) и состояние ядер (SYBR Green I).

Результаты работы показали, что экспериментальная гипоксия индуцирует рост интенсивности флуоресценции R123 и FDA в эритроцитарных взвесах. Причем, интенсивность флуоресценции не зависела от степени гипоксического воздействия. Корреляционный анализ не выявил связи между процессами, мечеными R123 и FDA. Это означает, что изменение интенсивности свечения красителей в условиях гипоксии отражают совокупности самостоятельных процессов, реализуемых в клетках красной крови в условиях дефицита кислорода.

Увеличение интенсивности свечения клеточных взвесей, меченных R123, в условиях гипоксии, полученное в настоящей работе, ранее не никем отмечалось. Наиболее вероятной причиной роста интенсивности флуоресценции R123 во взвесах эритроцитов в условиях гипоксии автор считает уменьшение проницаемости цитоплазматических мембран клеток, выражающееся в ограничении числа функционирующих ионных каналов на основе их конформационных перестроек. Данное обстоятельство по мнению автора позволяет снизить энергетические траты клеток на поддержание трансмембранных ионных градиентов и уменьшить тем самым функциональную нагрузку на митохондрии. Последнее должно приводить к увеличению степени поляризации органоида, что и отражает рост интенсивности флуоресценции R123. Автор не исключает и другие причины. Так, рост интенсивности свечения R123 может являться следствием начальных этапов развития реакции эритроцитов на гипоксию, а именно: синтеза факторов транскрипции адаптивных генов и перехода клетки на анаэробный метаболизм.

В качестве наиболее вероятной причины роста интенсивности флуоресценции FDA автор считает уменьшение проницаемости клеточной мембраны, так как полярная флуоресцирующая форма FDA, образующаяся в клетке, неспособна быстро проходить через биологическую мембрану и, в случае снижения ее проницаемости, накапливается в клетках. Уменьшение количества ионных каналов происходит, по мнению автора, путем конформационных перестроек белка-переносчика.

В изменениях интенсивности флуоресценции SYBR Green I автором выявлен двухфазовый характер: при умеренной гипоксии имело место снижение, а при экстремальной гипоксии - нарастание интенсивности флуоресценции. Сходство в направленности изменений интенсивности свечения красителя и колебаний объема клеток и ядер эритроцитов (связь объема ядра с интенсивностью флуоресценции красителя была более выражена) проявилось в высоких значениях коэффициента детерминации в системе SYBR Green I – объем ядра ( $R^2 = 0,810$ ). Полученный результат позволил сделать предположение о функциональной активации ядра в условиях экстремально низких концентраций кислорода.

**В шестой главе** автором представлены результаты прямого (FS) и бокового (SS) рассеяния неокрашенных суспензий эритроцитов, позволяющие оценить размерные параметры и внутреннюю структурированность клеток. Анализ цитограмм неокрашенных суспензий эритроцитов показал факт достоверного увеличения значений обоих индексов. При этом, связь FS с морфометрическими параметрами клеток оказалась слабовыраженной. Что касается бокового рассеяния, то несмотря на его зависимость от числа митохондрий в клетках и их объема, структурных перестроек ядер, размеров клеток и изменения плотности внутриклеточной среды (то есть параметров, меняющихся в условиях гипоксии), коэффициент корреляции между значениями SS и перечисленными характеристиками ядерных эритроцитов выявил крайне низкую степень взаимосвязи ( $R^2 < 0,150$ ). Таким образом, изменения размеров и функционального состояния ядер

эритроцитов скорпены в условиях гипоксии *in vitro* не оказывают значительного влияния на изменения бокового рассеяния неокрашенных проб.

**В заключении** автором подведены итоги проведенного исследования. Результаты работы позволили автору отдать предпочтение морфометрическим характеристикам клеток, полученным на основе светооптических методов исследования. Они признаны наиболее целесообразными в оценке размерных характеристик эритроцитарных популяций при исследовании влияния на них экспериментальной гипоксии. Автором перечислены основные эффекты, выявленные им в эритроцитах при влиянии ранжированной гипоксии: последовательные изменения размера и формы клеток; изменения размерных показателей ядер клеток и выраженные изменения метаболической активности клеток; а также предложены вероятные механизмы, лежащие в основе этих изменений. Отмечены различия в механизмах адаптации клеточных и субклеточных показателей эритроцитов к гипоксии в условиях *in vivo* и *in vitro*. В заключении также перечислены прикладные аспекты работы: это и модель оригинального стенда для проведения *in vitro* экспериментов с клеточными взвесями; метод прижизненного морфометрического анализа ядерных эритроцитов рыб (патент № а201309689 от 05.08.2013).

**Выводы** работы включают семь пунктов. Они полностью соответствующие целям и задачам данного исследования.

Таким образом, на основе комплекса современных методов функциональной морфологии и проточной цитометрии изучено влияние ранжированной гипоксии в условиях *in vitro* на ядерные эритроциты морской донной рыбы *Scorpaena porcus* L.

Основными результатами рассматриваемой работы стали: разработка метода прижизненной морфометрии клеток с применением витального флуорохрома SYBR Green I и фотографирования нативных образцов крови в световом и люминисцентном режимах, что позволило исследовать морфофункциональные характеристики ядерных эритроцитов без предварительной фиксации и окраски проб; оригинальные данные о двухфазном изменении морфометрических параметров эритроцитов и ядер при умеренной и экстремальной гипоксии; о пропорциональном изменении объема клеток и ядер и сохранении ядерно-плазматических отношений в условиях гипоксии; о росте функциональной активности ядер эритроцитов в условиях экстремальной гипоксии и о росте степени поляризации внутренней мембраны митохондрий клеток в условиях гипоксии; об отсутствии влияния гипоксии на целостность мембран эритроцитов и недостатках в использовании прямого и бокового рассеяния для оценки морфологических и функциональных реакций клеток на недостаток кислорода в условиях *in vitro*.

В целом, научные положения и выводы обоснованы и достоверны. Теоретическая значимость работы не вызывает сомнений. Практическое значение работы заключается в возможности использования ее результатов в мониторинге состояния водных экосистем и оценке их биопродуктивности, медицинской практике, а также для подготовки лекционных курсов по клеточной физиологии и биохимии животных для студентов биологических специальностей высших учебных заведений.

**Автореферат** в целом соответствует диссертации.

Основные результаты диссертации опубликованы в научной печати, из которых две в изданиях, рекомендованных ВАК.

При всех достоинствах работы она не лишена недостатков, среди которых можно отметить следующие:

1) грамматические ошибки (с. 5, 9, 16, 18, 23, 32, 34 и др.), отсутствие запятых (с. 7, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 26, 27 и др.), скобок (с. 8, 14) и неоднотипность в обозначениях единиц измерения разных величин – концентрации кислорода, красителей, плотности посадки рыб и др. Так, в большинстве случаев в величинах отсутствуют знаки умножения

( $\text{мг O}_2 \text{ л}^{-1}$ ), однако, в ряде случаев они присутствуют ( $\text{мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ ); в некоторых случаях из них «выпадает» обозначение кислорода  $\text{O}_2$ . На стр.50 одни формулы содержат знаки умножения, другие не содержат; в одних случаях эти знаки представлены точками, в других знаком умножения «х».

2) В обозначении коэффициентов детерминации также нет единства – в большинстве случаев они представлены через тире «-», которое в скобках выглядит как число со знаком минус.

3) На с.42 в разделе «Отбор проб крови» написано, что на мазках крови подсчитывали процентное содержание незрелых эритроидных форм. Хотелось отметить, что на мазках крови идентификация именно незрелых эритроидных клеток абсолютно ненадежна. На той же странице отсутствует ссылка на гемоглобинцианидный метод. На с.43 и 58 описан состав раствора, но не сказано, изотоничен ли он плазме.

4) Представляются неудачными некоторые выражения автора, например:

- «изоморфы гемоглобина» (с.23) (подразумеваются, вероятно, изоформы);
- «разрядка гемоглобина от кислорода» (с.23) (вероятно, речь идет о дезоксигенации);
- глобиновые цепочки (с.23) (принято «глобиновые цепи»);
- «цитоплазматические водородные сливы» (с.32);
- «природа генетических перестроек лежит в синтезе регулятора активности генов при гипоксии НИФ» (с.33);
- «неровный эндоплазматический ретикулум» (с.34) (вероятно, имеется в виду «шероховатый...»);
- «фосфатный обмен» (с.34) (имеется в виду, вероятно, пентозофосфатный путь, ферменты которого перечислены автором ниже на той же странице).
- «при гипоксии происходит кратковременная интенсификация процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях, которая связана с образованием ферментов анаэробного метаболизма» (с.112). Вероятно, имеется в виду не «образование», а предварительная работа.

5) Есть в работе и (вероятно) «опечатки» в виде «транскрипции белков» (с.32), и эффектов Бора и Рута не в полагающемся по контексту месте текста (с.23); на с.83 в тексте написано, что коэффициент детерминации равен 0.67, а на рисунке 0.59.

6) В обзоре литературы приведена формула эффекта Бора, но отсутствует ссылка на литературный источник. В том же разделе при описании показателя крови  $P_{50}$  желательнее указать, что это характеристическое давление полунасыщения гемоглобина кислородом. На с.32 при перечислении энергетических субстратов в условиях анаэробнозиса автор упоминает опины. Однако, эти продукты встречаются у граммотрицательных почвенных бактерий и не имеют отношения к энергетическим субстратам приведенных в качестве примеров гидробионтов.

7) Есть замечания к списку литературы. Его порядок нарушен тем, что 68 работ из 263 расположены по алфавиту не на основе фамилий авторов, а на основе первой буквы названия работы. Данное обстоятельство привело к тому, что ряд ссылок по тексту так и не был найден в списке литературы, например, ссылка на Bahar et al., 2000.

Указанные недостатки ни в коей мере не умаляют научное и практическое значение работы.

### Заключение

Диссертационная работа Андреевой А.Ю. является законченной научно-квалификационной работой, которая расширяет имеющиеся представления о влиянии гипоксии на клеточные системы. Используемый автором комплексный подход позволил

дать интегральную морфофункциональную характеристику состояния взвесей ядерных эритроцитов в условиях недостатка кислорода и выявить ряд особенностей реакции клеток на экспериментальную гипоксию в условиях *in vitro* без участия системных процессов. По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует критериям п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013г. № 842, а соискатель присуждения искомой степени по специальности 03.03.01 – физиология.

Отзыв подготовил д.б.н. Андреева А.М.

Его обсуждение состоялось на заседании лаборатории экологической биохимии ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (протокол от 23 октября 2014г.).

Заведующий лабораторией экологической биохимии  
доктор биологических наук

Андреева А.М.  
23.10.2014.

