

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Рябчиковой Елены Ивановны на диссертацию Клименкова Игоря Викторовича на тему: «Адаптивные особенности в системе периферического отдела обонятельного и слухового анализаторов у рыб», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология и 03.03.01 – физиология

Механизмы функционирования обонятельной системы животных и человека вызывают неизменный интерес исследователей, работающих в самых разных областях науки – от распознавания запахов до проникновения инфекционных агентов через обонятельный тракт в головной мозг и использования обонятельного тракта для доставки лекарственных препаратов. Важное место в изучении обонятельной системы занимают её сравнительные исследования у различных животных, которые позволяют полнее представить эволюционные и видовые аспекты функционирования этой важнейшей системы организма. Неотъемлемой частью этих исследований является изучение гистологического строения обонятельного анализатора и особенностей строения его клеток, что определяет **актуальность** диссертационного исследования И.В. Клименкова, которое существенно «наполняет» нишу знаний о морфологических особенностях обонятельной системы рыб и её адаптивных изменениях.

Комплексное исследование морфологии периферического отдела обонятельного и слухового анализаторов рыб, обитающих в озере Байкал, её изменений в зависимости от условий обитания и различных воздействий, позволило получить **новые теоретически значимые** результаты. Игорем Викторовичем впервые установлена большая структурно-функциональная устойчивость сенсорного аппарата пелагических рыб по сравнению с бентосными к гипобарической гипоксии и высказано предположение о своеобразной «тренировке» аппарата вследствие вертикальных миграций пелагических рыб в процессе жизнедеятельности. Впервые описаны ультраструктурные перестройки обонятельных рецепторных клеток в репродуктивный период и их связь с восприятием феромонов при химической коммуникации половых партнеров, а также с выключением этой функции при переходе рыб к родительскому поведению. Продемонстрирована важная роль цитоскелета в структурно-функциональных изменениях обонятельных рецепторных клеток. Впервые установлена морфологическая база компенсаторного усиления процессов нейрогенеза при длительной хемотимуляции рыб нетоксичными водорастворимыми веществами. Показано формирование пространственно разграниченных доменов «молодых» клеток в ходе нейрогенеза в обонятельном эпителии рыб и сделано предположение об их участии в рецепции одорантов в качестве отдельных морфофункциональных единиц. Впервые установлена идентичность морфотипов волосковых клеток и их поляризации в

саккулярных макулах рыб разных семейств, занимающих одинаковые экологические ниши в естественной среде озера Байкал, что обеспечивает сходство их направленной акустической чувствительности. **Достоверность полученных результатов** и выводов диссертационной работы И.В. Клименкова основана на тщательном подборе объектов исследования (видов рыб, обитающих в озере Байкал), большом объеме материала и комплексе взаимодополняющих морфологических методов. **Практическая значимость работы** заключается в возможности использовать полученные данные при разведении рыб в аквакультуре с дальнейшим их выходом в природную среду; в возможности использовать разработанный автором метод неинвазивной активизации процессов нейрогенеза в ольфакторном эпителии в медицине при лечении травматических повреждений нервной системы. Кроме того, комплекс данных, представленных в работе, будет полезен при анализе реакций организмов, в том числе – человека, при перепадах гидростатического давления и гипоксии.

Характеристика диссертации. Работа Игоря Викторовича представляет собой законченное исследование, оформление которого отвечает всем требованиям, предъявляемым к оформлению докторских диссертаций. Диссертационная работа изложена на 370 страницах, содержит 123 рисунка, включая 31 схему, 4 таблицы и состоит из разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 548 источников.

Во введении показана актуальность темы диссертационной работы и степень её разработанности, отмечена уникальность экологических условий оз. Байкал, - среды обитания рыб, использованных в исследовании. В этом разделе автор формулирует цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту и приводит характеристики диссертационной работы, сведения о публикациях и личном вкладе в работу.

Обзор литературы представляет состояние исследований в области обонятельной и акустической систем позвоночных. Приведены детальные сведения о морфофункциональных особенностях клеток обонятельного эпителия рыб, включая сведения о рецепции запаховых сигналов. Описание нейрогенеза в обонятельном эпителии приводится на основании данных исследований других позвоночных, поскольку опубликованные сведения о нейрогенезе у рыб фрагментарны. Особое внимание автор уделяет анализу адаптивных изменений клеточных элементов обонятельного эпителия животных на разных этапах их жизненного цикла и полового поведения, а также при различных запаховых воздействиях. Освещены в «Обзоре» и вопросы химической коммуникации рыб, что особо важно, учитывая их среду обитания. Раздел, посвященный структуре слухового аппарата рыб, дает исчерпывающее представление об его анатомо-

гистологических особенностях, особое внимание уделено морфологической поляризации волосковых клеток. Приводятся сведения о функциональных характеристиках слуха и его роли в жизнедеятельности рыб. «Обзор литературы» в целом обосновывает постановку задач диссертационного исследования.

Глава «**Материалы и методы**» начинается с раздела «Методологические подходы, используемые для решения поставленных задач», в котором приводятся сведения о поведении исследуемых рыб на разных стадиях жизненного цикла, особенностях их физиологии, приводится обоснование выбора вида рыб, обитающих в оз. Байкал, для решения каждой из задач диссертационного исследования. Материал этого раздела крайне полезен для понимания работы в целом. И.В. Клименковым использован комплекс взаимодополняющих методов световой, конфокальной, электронной и атомно-силовой микроскопии, а также условно-рефлекторный метод определения диапазона акустической чувствительности. Следует отметить удачное применение способов обработки изображений конфокальной микроскопии, позволяющее наглядно представить полученные результаты и провести их адекватную статистическую обработку.

Результаты и обсуждение изложены в шести главах. Глава «Ультраструктурные особенности обонятельного эпителия у желтокрылки в межнерестовый период» представляет детальное описание жгутиковых и микровиллярных рецепторных клеток, а также опорных и базальных клеток обонятельного эпителия; данные о пространственной организации актиновых микрофиламентов в обонятельном эпителии у рыб сем. Cottidae; структуре межклеточных плотных контактов и её особенностях у данного вида. В главе 4 представлены результаты выявления цитохимических особенностей обонятельного эпителия у желтокрылки в нерестовый период и в фазе активного нереста, описаны ультраструктурные изменения клеток обонятельного эпителия. Глава 5 «Стимул-зависимая дифференцировка и нейрогенез в обонятельном эпителии у рыб» представляет результаты исследований, которые автор трактует как «феномен дендритной нейросекреции в хеморецепторных клетках», а также данные об ультраструктурных перестройках рецепторных клеток вследствие продолжительного воздействия гетерогенной смесью аминокислот и пептидов. В этой же главе приведены данные о влиянии продолжительной одорантной стимуляции на цитохимические характеристики клеток обонятельного эпителия и его пролиферативную активность. Всесторонне анализируются различные аспекты нейрогенеза в обонятельном эпителии. Несомненно, важны данные о влиянии фенола на обонятельный эпителий рыб, поскольку этот токсикант входит в состав многих промышленных стоков. Большой блок исследований обонятельного эпителия завершает

глава, посвященная изучению адаптивных особенностей обонятельного аппарата глубоководных рыб озера Байкал.

Глава, посвященная изучению морфологии слухового саккулярного аппарата у рогатковидных и сиговых рыб оз. Байкал представляет исчерпывающую характеристику расположения рецепторных клеток в макуле, а также различий длины, пространственной организации стереоцилий и киноцилий рыб. Приводятся данные анализа акустической чувствительности рыб и её сопоставления с длиной стереоцилий. Интересны сведения о различиях морфологической поляризации волосковых клеток разного типа в зависимости от зоны обитания рыб. В «**Заключении**» Игорь Викторович обобщает полученные данные. **Выводы**, сделанные в диссертационной работе, адекватны полученным результатам.

Материалы автореферата диссертационной работы и 21 опубликованных в журналах из перечня ВАК РФ работ адекватно отражают содержание диссертационной работы Клименкова И.В. Работа прошла успешную апробацию на всероссийских и международных конференциях.

В целом можно заключить, что Клименковым И.В. проделана огромная экспериментальная работа, направленная на обнаружение закономерностей адаптивных и онтогенетических изменений морфологии клеток обонятельного эпителия и саккулярной макулы 16 видов рыб, обитающих в разных экологических нишах оз. Байкал. Импонирует использование автором работы в качестве экспериментальной модели рыб, эволюционно приспособленных к существованию в разных экологических условиях оз. Байкал. Игорю Викторовичу удалось обойти сложности работы с природным материалом и представить данные о различных морфофункциональных изменениях сенсорного аппарата рыб, обусловленных различиями природных условий среды обитания. В этом отношении работа И.В. Клименкова является примером «ухода» от привычных лабораторных моделей, с их обязательными требованиями стандартных параметров животных.

При прочтении диссертационной работы Клименкова И.В. появился **ряд вопросов и замечаний.**

В работе Игоря Викторовича представлен большой объем данных, полученных с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Однако автор не проводил предварительное исследование обонятельных розеток на полутонких срезах, чтобы выбрать участки для прицельной заточки пирамид, в результате на многих снимках приведены тангенциальные срезы клеток, не отражающие адекватно их цитологическую структуру. Кроме того, светооптические снимки полутонких срезов продольных срезов эпителия очень наглядны и информативны. Жаль, что таковые в работе отсутствуют.

Неудачна, на мой взгляд, формулировка цели работы (выявить цитохимические перестройки в сенсорных отделах обонятельной и акустической систем у рыб в связи с их экологией, поведением и спецификой сенсорной нагрузки). Данная формулировка отражает только часть работы.

В разделе 4.1 (Рецепторные клетки) большое внимание уделяется гладкомембранным везикулам, количество которых увеличивается в дендритах этих клеток. Автор относит эти везикулы к секреторным и, в итоге, утверждает, что в дендритах реализуется процесс нейросекреции. Однако, приводимые доказательства секреторной природы этих везикул неубедительны, особенно с учетом утверждения (стр. 134), что «... в состоянии дендритной секреции рецепторные клетки могут продуцировать одорант-связывающие белки в водорастворимой форме». На приводимых снимках (рис. 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 и 39) хорошо видны везикулы с электронно-прозрачным содержимым, однако, нет признаков, указывающих на секреторный процесс с участием этих везикул. Несомненно, выявленный феномен накопления гладкомембранных везикул интересен и требует объяснения, но убедительных оснований связывать его с секрецией не представлено. Тем более нет оснований относить выявленное явление к нейросекреции.

В соответствии с современными представлениями, нейросекреция – это свойство определенного вида нервных клеток, которые называются нейросекреторными, производить и выделять специфическое активное вещество – нейросекрет, в первую очередь – нейрогормоны. Нужно идентифицировать, или хотя бы визуализировать содержимое гладкомембранных везикул, которые, по мнению Игоря Викторовича, являются секреторными гранулами. Их содержимое электронно-прозрачно, без каких-либо следов белкового секрета. При отсутствии бесспорных доказательств, нет оснований и говорить о «феномене трансформации обонятельных нейронов в клетки секреторного типа». Столь значимые заключения должны базироваться на неоспоримых доказательствах, включая данные о характере секрета.

В своей работе Клименков И.В. активно использует конфокальную микроскопию, успешно реализуя её возможности. Несомненно, анализ распределения структур в слое более продуктивен, чем на двумерных срезах, и дает убедительные результаты. Однако при прочтении соответствующих разделов обнаруживаются неточности формулировок, а интерпретация некоторых результатов вызывает недоумение. Во-первых, использование термина «окрашивание» по отношению к выявлению актина и других структур при флуоресцентной микроскопии неверно по сути. При окрашивании происходит изменение цвета окрашиваемого объекта, что мы наблюдаем на гистологических срезах. При флуоресцентной микроскопии мы наблюдаем свечение того или иного вещества,

связавшегося с объектом, а не свечение самого объекта. Правильно использовать термин «выявление» или «визуализация». К сожалению, эта досадная ошибка присутствует на протяжении всего текста диссертации. Например, «после окраски эпителия фаллоидином–FITC актиновая сеть состоит из мелких ячеек (стр. 100).

В главе 3 сообщается, что «взаимодействуя друг с другом, актиновые пучки соседних клеток образуют непрерывный органический матрикс, формирующий в поверхностной зоне эпителия характерный, сложно организованный орнамент». Однако, из курса цитологии и научных публикаций известно, что актиновые микрофиламенты локализуются внутри клеток и не проникают в соседние клетки, равно как и промежуточные филаменты, связанные с плотными контактами клеток разного типа.

Далее, формирование так называемой «поры» в примембранном слое актиновых микрофиламентов, «через которую (по мнению автора) от одорант-связывающих рецепторов может проходить внутриклеточный сигнал, необходимый для стабилизации экспрессии гена, кодирующего обонятельные рецепторы». Да, на снимках, сделанных с помощью конфокального микроскопа, виден некий цилиндр, не содержащий актиновых филаментов. Однако, из этих снимков не следует, что это – пора (т.е., отверстие). Для такого заключения, как минимум, необходимо провести электронно-микроскопическое исследование, позволяющее визуализировать структуру поры. Идентификация наблюдаемой структуры как поры выглядит, по меньшей мере, странно, особенно, на фоне приписываемых ей функций. Автор утверждает: «на нашем материале видно, что через пору созревающая клетка способна взаимодействовать с минимальной порцией пахучих веществ внешней среды, и обеспечивать проведение сигнала внутрь клетки. Кроме того, для поддержания механизмов сигнальной трансдукции данная микропора может служить специальным сквозным каналом для транспорта к вершине клетки везикул, содержащих, комплекс рецептора и его транспортных белков (RTP1 и RTP2), G-белок, аденилатциклазу, нуклеотид-связанные каналы, фосфодиэстеразу и другие необходимые компоненты». Думаю, для таких «серьёзных» заключений все-таки следовало бы детально изучить структуру «поры» и показать её связь с внешней средой.

При очень интересном исследовании структуры незрелых обонятельных нейронов, дендриты которых еще не взаимодействуют с внешней средой, также использована конфокальная микроскопия в сочетании с электронной микроскопией ультратонких срезов. На снимках растущих дендритов хорошо виден слой актиновых микрофиламентов, формирующий своеобразный «чехол» и синее свечение, соответствующее материалу ядра. Автор полагает, что актиновый «чехол» способствует «переносу» ядра в ходе перемещения дифференцирующейся клетки в толще эпителия. Это – очень интересное наблюдение и

остается выразить сожаление, что данные конфокальной микроскопии не подтверждены исследованием ультратонких срезов.

Забавно, но неправильно использовать слово «освящены» при анализе публикаций (освящены слабо (стр. 40, 55; подробно освящены стр. 54 и др). В тексте встречаются и другие неправильные выражения, следует отметить: «программированная гибель клеток», - в русскоязычной литературе – «программируемая».

Приведенные вопросы и замечания носят в основном дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки диссертационного исследования Клименкова И.В.

Заключение: диссертация Клименкова Игоря Викторовича на тему «Адаптивные особенности в системе периферического отдела обонятельного и слухового анализаторов у рыб», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является законченной научно-исследовательской работой, в которой автором получены новые оригинальные данные о морфофункциональных особенностях клеток периферических отделов обонятельного и слухового анализаторов и установлены закономерности их изменений в различных условиях. Представленные в диссертации данные имеют важное значение для клеточной биологии, цитологии и гистологии, а также физиологии. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, методологическому и методическому уровню диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора биологических наук, согласно пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а её автор, Клименков Игорь Викторович, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология и 03.03.01 – физиология.

Рябчикова Елена Ивановна,



профессор, доктор биологических наук,

заведующая группой микроскопических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Для телеграмм: Новосибирск 90, ИХБФМ

Телефон: (383) 363-51-50 Факс: (383) 363-51-53

E-mail: lenryab@niboch.nsc.ru

Сайт группы: <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/structure/labs/microscop>

Согласна на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных.

Подпись Рябчиковой Е.И. заверяю
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН
К.х.н.

