

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской академии наук (ИБВВ РАН),
д.б.н., профессор



А.В. Крылов

05.2022

ОТЗЫВ

ведущей организации - Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской академии наук (ФГБУН ИБВВ РАН) на диссертационную
работу

КАПРАНОВОЙ Ларисы Леонидовны «ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MYTILUS
GALLOPROVINCIALIS* LAMARCK, 1819 В ПЕРИОД РАЗМНОЖЕНИЯ»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности «1.5.16. Гидробиология»

Изучение реакции гидробионтов на действие природных и антропогенных факторов – одна из ключевых и актуальных проблем современной гидробиологии, экологии и экотоксикологии. Физиолого-биохимические реакции организма лежат в основе адаптации животных к изменяющимся условиям среды их обитания. Актуальность проблеме придает наблюдающиеся в последнее время глобальные изменения климата на фоне усиливающегося антропогенного пресса на окружающую среду, в целом, и на водные экосистемы, в частности.

Наряду с этим в настоящее время все большее значение приобретает выращивание для практических целей в условиях аквакультуры различных видов гидробионтов, включая морских двустворчатых моллюсков, в

частности мидий. Поэтому изучение физиолого-биохимических процессов их адаптации к условиям аквакультуры являются актуальной задачей гидробиологии, морской биохимии и биотехнологии. Для успешного выращивания моллюсков в этих условиях наиболее критическими являются репродуктивные процессы и все, что связано с ними. Так для оценки подготовленности моллюсков к нересту и его эффективности необходимы знания о динамике биохимического состава и содержания отдельных компонентов в их гонадах, в частности концентрации половых гормонов, жирных кислот, макро- и микроэлементов, биоаккумуляции загрязняющих веществ, таких как стойкие хлорорганические соединения (ХОС): полихлорированные бифенилы, хлорорганические пестициды и т.д. Несмотря на важность этих эколого-биохимических аспектов размножения мидий, их изученность остается недостаточной.

Учитывая выше сказанное, становится очевидной актуальность, новизна, научно-теоретическая и практическая значимость диссертационной работы Капрановой Л.Л., цель которой – изучение эколого-биохимических характеристик двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis* из Чёрного моря в период размножения в природных условиях и при загрязненности ХОС.

Для реализации поставленной цели диссертантом был сформулирован ряд логически вытекающих из неё задач:

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить концентрации общего тестостерона и эстрадиола в гонадах, яйцеклетках и сперматозоидах мидий на разных стадиях репродуктивного цикла;
2. Исследовать состав жирных кислот и динамику их концентраций в зависимости от стадии репродуктивного цикла в гонадах, половых продуктах (ПП) и личинках (трохофорах) мидий;
3. Оценить степень аккумуляции ХОС в гонадах и ПП мидий, а также установить влияние ХОС на жирнокислотный (ЖК) состав трохофор;

4. Определить концентрации макро- и микроэлементов в гонадах, и личинках мидий с черной и коричневой окраской раковин;
5. Рассчитать экскрецию тестостерона, эстрадиола, Se и Zn культивируемыми мидиями;
6. Разработать новые технологии получения биологически активных веществ из мидии и продуктов на их основе.

Структура работы традиционна для подобного рода исследований. Она состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, перечня сокращений и условных обозначений, а также списка литературы, состоящего из 258 источников, в т. ч. 189 — иностранных. Общий объем рукописи — 185 страниц. Работа включает 20 таблицы и иллюстрирована 20 рисунками.

Во *Введении* автор обозначает исследуемую проблему, лаконично, но убедительно обосновывает актуальность избранной темы и степень её разработанности, формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, связь работы с научными программами, планами и темами, обосновывает методологию и перечисляет методы исследования, формулирует выносимые на защиту положения, подтверждает степень достоверности результатов, указывает личный вклад соискателя в подготовку диссертационной работы, где и когда проводилась апробация материалов, описывает объём и структуру работы, приводит количество публикаций по теме диссертации, выражает благодарности руководителю и коллегам, помогавшим в выполнении работы.

В первой главе **Стероидные гормоны, жирные кислоты и элементный состав двустворчатых моллюсков (литературный обзор)** рассмотрены вопросы происхождения тестостерона и эстрадиола в организме беспозвоночных, этерификация стероидов с ЖК, проблемы количественного определения стероидов у мидий. Описана роль ЖК в организме моллюсков и связь с содержанием тестостерона, а также влияние ХОС на рост и развитие гидробионтов. Затронуты проблемы исследований элементного состава мидий с черной и коричневой окраской раковин, накопление элементов и их

роль в организме мидий. Перечислены возможные способы расчета экскреции тестостерона, эстрадиола, ЖК и микроэлементов. Рассмотрено, в какой степени изученности находится каждое из избранных направлений, что уже сделано другими авторами, что в этих вопросах еще неясно, и поэтому требует дальнейших исследований. В заключении главы формулируется основная тема диссертационной работы, связанная с дифференцированием этих состояний, что определило ее цель и основную группу задач, рассмотренных выше. Следует отметить в качестве положительного момента, что обзор литературы выполнен достаточно полно и отражает основную информацию по теме диссертации.

Во второй главе **Материалы и методы исследований** подробно описываются объект исследований – мидия *Mytilus galloprovincialis*, процедуры определения содержания общего тестостерона, эстрадиола, и жирнокислотного состава в гонадах и половых продуктах моллюсков, элементного состава гонад, половых продуктов и личинок, содержания хлорорганических соединений во взрослых мидиях и их личинках, приводятся методы статистической обработки результатов. Следует особо отметить, как положительный момент, что в работе использованы разнообразные физико-химические методы анализа с применением современных подходов и оборудования: газожидкостная хроматография, иммуно-сорбентный анализ ELISA, сканирующая электронная микроскопия, ИСП-МС спектрометрия. Для достоверности результатов использованы сертифицированные стандарты химических элементов и ХОС. Статистическую значимость различий оценивали с помощью адекватных статистических методов анализа.

В главах третьей - шестой описаны результаты собственных исследований. Структура глав выстроена так, что в начале каждой главы идет краткое описание изучаемого вопроса, далее подробно излагаются результаты и их обсуждение, а в конце каждой главы раздела дается краткое Заключение, что облегчает восприятие информации. Такая структура, на наш

взгляд, является оптимальной и облегчает понимание материала, что следует отметить в качестве положительного момента.

В третьей главе **Содержание стероидных гормонов в мидии *Mytilus galloprovincialis*** представлены результаты изучения содержания общего тестостерона и эстрадиола, а также определения жирнокислотного состава, включая насыщенные (НЖК), мононенасыщенные (МНЖК), полиненасыщенные (ПНЖК), омега-3 (ω 3ЖК) и омега-6 (ω 6) жирных кислот в гонадах и половых продуктах моллюсков на разных стадиях репродуктивного цикла и их экскреция в окружающую среду вместе с половыми продуктами во время нереста.

Полученные результаты позволили диссертанту заключить, что концентрации тестостерона и эстрадиола в гонадах и половых продуктах мидии зависят от половой принадлежности, стадии репродуктивного цикла и соответствуют сезонному циклу размножения животных. В их гонадах к концу репродуктивного цикла отмечено уменьшение концентрации тестостерона и эстрадиола, играющих ключевую роль в размножении, и увеличение концентрации этих веществ на начальных стадиях репродуктивного цикла и перед нерестом. Рассматривая современные концепции происхождения половых гормонов в гонадах моллюсков и анализируя полученные собственные результаты и литературные данные, автор в большей степени склоняется к гипотезе экзогенного происхождения тестостерона и эстрадиола у мидий.

Автором установлено, что тестостерон этерефицируется жирными кислотами, а затем экскретируется в водную среду, в частности с половыми продуктами. В сперматозоидах содержание общего тестостерона выше, чем в гонадах. Такое явление согласуется с характером конъюгации жирных кислот со стероидными гормонами, когда перед нерестом повышается доля «свободного» тестостерона или эстрадиола, а в середине цикла, находясь в «связанном» состоянии с жирными кислотами, концентрации стероидов практически не меняются. Этот факт свидетельствует о важной роли

стероидных гормонов в регуляции гаметогенеза вне зависимости от их происхождения в организме моллюсков.

Тестостерон и эстрадиол из гонад экскретируется вместе с половыми продуктами в водную среду, что связано с поддержанием равновесия между свободными и связанными с жирными кислотами формами стероидов. Вместе с половыми продуктами стероиды передаются личинкам, которые первые трое суток после вылупления находятся на эндогенном питании. Автором приводятся результаты расчетов выделения в окружающую среду количества тестостерона и эстрадиола вместе с половыми продуктами одной тонной мидий во время нереста. Делается заключение, что тестостерон и эстрадиол, потребляемые моллюсками вместе с пищей и водой, прежде всего, необходимы им для роста и развития, а также для осуществления нереста. Часть потребляемых мидиями физиологически активных веществ вовлекается в процесс метаболизма. Избыточные формы стероидных гормонов экскретируются в водную среду вместе с половыми продуктами.

*В четвертой главе Состав жирных кислот гонад, половых продуктов и личинок мидии *Mytilus galloprovincialis** приводятся результаты по идентификации, определению содержания и относительного состава жирных кислот и содержания ХОС в гонадах и половых продуктах мидий на разных стадиях репродуктивного цикла.

Установлено, что в гонадах и половых продуктах мидии *M. galloprovincialis* идентифицированы 22 ЖК, а их состав зависит от стадии репродуктивного цикла моллюсков. Максимальная концентрация суммарных ЖК зафиксирована на первой стадии репродуктивного цикла. Снижение концентрации отмечено на второй стадии и повышение на третьей, что согласуется с изменением концентраций стероидов в гонадах. С первой по четвертую стадию репродуктивного цикла в гонадах самок преобладают насыщенные ЖК. В гонадах самцов, начиная со второй стадии, мононенасыщенные (МНЖК) и полиненасыщенные (ПНЖК) преобладают

над другими жирными кислотами. В гонадах самок МНЖК и ПНЖК обнаружены на 4 и 5 стадиях репродуктивного цикла.

Особую ценность для биотехнологических целей представляют половые продукты мидии, в которых относительное содержание МНЖК и ПНЖК достигает максимальных значений по сравнению с гонадами. В яйцеклетках содержание НЖК выше, чем в сперматозоидах. ПНЖК в сперматозоидах доминируют над НЖК и МНЖК. Делается заключение, что жирные кислоты, содержащиеся в половых продуктах мидии *M. galloprovincialis*, с высокой вероятностью, могут использоваться другими гидробионтами, так как со спермой и яйцеклетками в водную среду выделяться до 50% ПНЖК, тогда как в личинках этот показатель не превышает 10%.

Впервые определено влияние нереста на изменение уровня загрязненности гонад и половых продуктов ХОС. До и после нереста в гонадах, яйцеклетках и сперматозоидах культивируемых мидий обнаружены пять конгенов ПХБ, а также ДДТ и его метаболиты: ДДЭ и ДДД. Концентрация ПХБ в пробах более чем в 70 раз превышает содержание ДДТ и его метаболитов и составляет от 97% до 100% суммы ХОС, что указывает на загрязнение среды обитания мидий этими соединениями. Наибольшие концентрации зафиксированы для высокохлорированных ПХБ 101, 138 и 153, что сопоставимо с соотношением этих конгенов в коммерческой смеси Ароклор 1254 или Совол. Этот факт указывает на то, что загрязнение данной акватории Черного моря свежей коммерческой смесью ПХБ происходит и в настоящее время. Показано, что уровень биоаккумуляции ХОС в гонадах зависит как от их концентрации в воде, так и физиологического состояния организма, а именно от содержания жирных кислот, которое определяется репродуктивным статусом моллюсков. Вымет половых продуктов уменьшает содержание ХОС в гонадах мидий вследствие передачи ХОС в яйцеклетки и сперматозоиды, и с ними — в морскую среду.

Выявлено, что, в целом, сумма концентраций ХОС в гонадах и половых продуктах мидии не превышает санитарно-эпидемиологические нормы РФ для морепродуктов.

ЖК-состав личинок мидий в значительной мере зависит от степени загрязненности среды их обитания ПХБ. На примере трохофор рассмотрено влияние ПХБ на ЖК-состав, а значит на стероидный состав мидий, так как стероиды этерифицируются преимущественно НЖК. Увеличение концентрации ненасыщенных жирных кислот и снижение доли насыщенных под воздействием минимальных концентраций $0,1 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ ПХБ указывает на формирование защитной адаптивной реакции организма личинок. Снижение уровня ненасыщенных ЖК и увеличение МНЖК связано с окислением их молекул, входящих в структуру клеточных мембран личинок. При этом, повышение доли некоторых ПНЖК, например, арахидоновой, под действием низких концентраций ПХБ, может быть связано с их способностью выступать в качестве гормона в иммунном ответе.

При максимальной концентрации ПХБ порядка $10 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ ЖК-ответ минимален, что свидетельствует о неспособности организма моллюска приспособиться к такому жёсткому воздействию.

Закономерности, полученные при изучении влияния концентрации ХОС на ЖК-состав трохофор мидий, автор предлагает использовать при подборе оптимальных биотехнологических условий получения биологически активных веществ (БАВ). Используя в экспериментах личинки мидий и зная концентрацию БАВ в среде выращивания, можно подобрать условия, при которых доля ценных ПНЖК будет максимальной. Именно этот показатель определяет отклик организма на воздействие БАВ.

В пятой главе **Содержание макро- и микроэлементов в мидии *Mytilus galloprovincialis*** описываются результаты исследования элементного состава в гонадах половозрелых особей, половых продуктах и личинках двух морф мидий – черной и коричневой. Показано, что содержание металлов (Cu, Fe, Al, Mg, Zn) в тканях мидий зависит от пола, возраста моллюсков и стадии

репродуктивного цикла, что в большой степени обусловлено сезонными изменениями массы ткани.

В гонадах черных и коричневых цветовых морф мидий статистически значимых половых отличий в макроэлементном составе (С, N, O, P, S) не обнаружено, тогда как между морфами отличия были существенные. Так, не зависимо от пола, в гонадах и половых продуктах коричневых мидий содержание углерода, а следовательно, органического вещества, выше, чем у черных. В яйцеклетках коричневой морфы по сравнению с черной кислорода в два раза меньше, а в трохофорах на порядок больше, что свидетельствует о различиях в содержании полисахаридов. Десятикратное превышение азота в сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий, по сравнению с черными, указывает на различия в аминокислотном составе, что может быть обусловлено как с условиями их обитания, так и генетически. В сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий фосфора, больше, чем в черных моллюсках, что связано с более высоким содержанием АТФ и других энергетически ёмких молекул. В яйцеклетках картина была противоположная.

У черных мидий по сравнению с коричневыми было в несколько раз больше серы и серосодержащих аминокислот в сперматозоидах, а также Se и Zn. В гонадах самцов и самок коричневых мидий концентрация марганца, кальция, калия и фосфора выше, чем у черных. В гонадах самок мидий преобладает медь, железо и мышьяк, но в гонадах коричневых мидий содержание этих элементов ниже, чем в черных. Больше всего статистически значимых отличий отмечено в трохофорах и яйцеклетках черных и коричневых цветовых морф мидий.

Все эти выявленные различия в макро- и микроэлементном составе показывает, что процессы развития мидии двух морф идут с разной интенсивностью, что приводит к выраженным отличиям биохимического состава моллюсков. Автор справедливо связывает это разнообразие состава с адаптивными процессами в ходе биохимической эволюции.

На примере селена и цинка автору впервые удалось доказать взаимосвязь элементного состава гонад на разных стадиях репродуктивного цикла с тестостероном. Этот факт еще раз подтверждает гипотезу об экзогенном происхождении стероидов, жирных кислот и микроэлементов в организме мидий, что особенно наглядно видно в процессе репродуктивного цикла.

На основании полученных результатов автор делает расчеты количества элементов и стероидных гормонов, экскретируемых мидиями во время нереста. Следует отметить, и на это указывает автор, что данные расчеты носят приблизительный характер, поскольку элементный и гормональный состав у моллюсков значительно варьируется в зависимости от ряда факторов: питания, сезонности, температуры, состояния гонад, условий роста мидий и др. Расчетные величины демонстрируют лишь значительные масштабы этих процессов и их существенную роль в экологическом метаболизме моря.

В шестой главе **Разработка технологий получения функциональных продуктов на основе гонад и половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis*** описываются способы получения из гонад и половых продуктов мидий: биологически активных веществ и эмбриональных тотипотентных клеток, функционального продукта, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами масляной композиции, и обладающего противоопухолевой активностью вещества.

Перечисленные способы получения функциональных продуктов были разработаны после детального изучения накопления и экскреции физиологически активных веществ липидной природы в гонадах и половых продуктах мидии *Mytilus galloprovincialis*, представленных в предыдущих главах диссертации. Технологии их выделения, очистки и применения подтверждены патентами: «Способ получения биологически активного вещества из черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam»; «Способ получения функционального продукта из мидии *Mytilus galloprovincialis*»;

«Способ получения масляной композиции, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами из мидии *M. galloprovincialis*»; «Способ получения вещества из гонад мидии *M. galloprovincialis*, обладающего противоопухолевой активностью». Кроме того, разработан метод выделения из оплодотворенных яйцеклеток *M. galloprovincialis* и фиксации в спирте эмбриональных тотипотентных клеток. Эмбриональные тотипотентные клетки моллюсков могут быть не только сырьем для лечебно-профилактических и косметических препаратов, но и объектом изучения процессов, регулирующих морфогенетические функции ядер, что недоступно для изучения на клетках человеческих эмбрионов.

В заключении автор коротко обобщает результаты и их обсуждение, представленные в предыдущих главах.

По результатам работы автор делает шесть выводов, которые полностью раскрывают поставленные задачи и соответствуют цели диссертации.

Вместе с тем, при прочтении и анализе диссертации возникает ряд замечаний и вопросов, на которые при защите хотелось бы получить ответы диссертанта:

1. Было бы более информативно, если бы в разделе Содержание глава, посвященная литературному обзору, была разбита на подразделы, которые даны в самой главе.
2. Работа изобилует сокращениями терминов. В диссертации они расшифровываются, а в автореферате нет. Поэтому следовало при первом упоминании термина в автореферате писать его полностью и давать аббревиатуру, а в дальнейшем использовать только её. Без этого восприятие текста несколько затруднено.
3. В автореферате указано 6 статей из списка WOS (SCOPUS), а в диссертации 7. Видимо, в автореферате ошибка, т.к. одна статья под №6 из списка публикаций автора (Морской биологический журнал, 2020) не учтена.

4. Хотелось бы получить объяснение автора что обозначают цифры стадий репродуктивного цикла? Какой стадии физиологического состояния они соответствуют? Как стадии распределяются по периодам года? Было бы более информативно, если в таблицах, где приводятся стадии репродуктивного цикла, указать в отдельной колонке месяцы года или даты.
5. Следует пояснить как рассчитывается коэффициент накопления K_N , коэффициента пищевого накопления ($K_{П}$) и среднегодовые значения степени усвоения пищи на рост у гидробионтов $q_{П}$ (K_2). Почему последний имеет два значения: 0.14 и 0.42?
6. Не во всех таблицах отмечена статистическая значимость различий между средними значениями. Это затрудняет анализ данных.
7. Хотелось бы пожелать автору чаще представлять свои исследования перед научной аудиторией на конференциях.

Тем не менее, отмеченные недостатки не снижают ценности представленных результатов, полученных автором в ходе многолетней работы.

В целом диссертационная работа выполнена на современном научном уровне, хорошо технически оформлена, отличается достаточным и доступным научным содержанием, четкостью и простотой литературного стиля изложения, ясностью мыслей, логичностью обоснования развиваемых положений. Цели и задачи, поставленные автором, успешно решены, результаты получены на основе корректных натуральных наблюдений и лабораторных исследований, обработаны статистически, удачно и полностью проиллюстрированы в таблицах и рисунках и их достоверность не вызывает сомнений. Выводы сформулированы четко и полностью соответствуют поставленной цели и задачам. Работа представляет целостное, законченное исследование и имеет несомненную теоретическую и особенно практическую ценность. Её результаты прошли апробацию на отечественных и международных конференциях и полностью отражены в рецензируемых

научных изданиях. По материалам диссертационной работы опубликована 17 печатных работ, из них 13 публикаций в изданиях, рекомендованных ВАК РФ (9 статей и 4 патента), 7 из которых входят в базу WoS (Scopus), 4 в сборниках материалов международных конференций. Автореферат в основных положениях отражает содержание работы.

По актуальности, новизне, методическому уровню и научно-практической значимости представленная диссертационная работа полностью соответствует критериям, установленным в пп. 9-14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 «О Порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ (ред. от 11.09.2021 г.), а её автор, Капранова Лариса Леонидовна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.16. Гидробиология»

Отзыв составлен заведующим лабораторией физиологии и токсикологии водных животных ИБВВ РАН, доктором биологических наук, Г.М. Чуйко.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании лаборатории физиологии и токсикологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук «24» мая 2022 г. протокол № 2.

Заведующий лабораторией физиологии
и токсикологии, доктор биологических наук,
специальность 1.5.4. Биохимия
(03.00.04 – биологическая химия)

Чуйко Григорий Михайлович

26.05.2022 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук (ИБВВ РАН) Почтовый адрес: 152742, Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, ИБВВ РАН.

Телефон: 8 4854 72 48 16

e-mail: adm@ibiw.ru

Сайт: <http://ibiw.ru/>

