

ОТЗЫВ

официального оппонента 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

Моллюски являются разнообразной группой животных, они важны с точки зрения экологии и считаются отличными индикаторами здоровья экосистем. Некоторые виды широко используются в программах биомониторинга среды. Увеличение числа проблем, вызванных загрязнением окружающей среды, в том числе нарушение репродуктивной физиологии беспозвоночных, требует лучшего понимания роли стероидов в этих процессах. Представленная работа посвящена комплексному изучению содержания тестостерона, эстрадиола, жирных кислот, макро- и микроэлементов в мидии *Mytilus galloprovincialis* из Чёрного моря в период размножения как в природных условиях так и при загрязненности хлорорганическими соединениями (ХОС). Изучение процессов роста и репродукции в условиях воспроизводства, выращивания и рационального использования морских моллюсков – одна из главных задач гидробиологии.

Актуальность темы диссертации определяется важностью исследований в области эндокринологии моллюсков. Молекулы стероидов присутствуют у всех беспозвоночных, и некоторые из них имеют установленную гормональную роль. Стероиды — это не только гормоны, они могут также выполнять множество других функций – участвовать в химической защите или в физиологии пищеварения. Вопрос о том, действуют ли стероиды позвоночных как гормоны у моллюсков, остается важным. Другое направление – исследование химических веществ, разрушающих гормоны и эндокринную систему, и их влияние на окружающую среду. Известно, что моллюски чувствительны к загрязнениям среды обитания, нарушающим работу их эндокринной системы, поэтому поллютанты могут представлять серьезную угрозу для популяций моллюсков. Однако, что удивительно, по сравнению с другими группами животных остается много пробелов в знаниях о гормонах, которые контролируют развитие, рост и размножение моллюсков. Без этого понимания химические вещества из окружающей среды могут продолжать наносить вред популяциям моллюсков. Именно в русле развития этой продуктивной проблемы была выполнена представленная работа.

Цель данного исследования состояла в комплексном изучении экологических и биохимических характеристик мидии *Mytilus galloprovincialis* из Чёрного моря в период размножения в природных условиях и при загрязненности хлорорганическими соединениями (ХОС). Для достижения поставленной цели автор сформулировал 4 задачи.

Наиболее существенные научные результаты, отвечающие критериям новизны.

Соискателем определено содержание тестостерона, эстрадиола, жирных кислот, макро- и микроэлементов в гонадах на разных стадиях репродуктивного цикла, в половых продуктах и личинках мидии *M. galloprovincialis*. Показано, что содержание стероидных гормонов в моллюсках зависит от их половой принадлежности и варьирует в течение репродуктивного цикла. Показано, что состав жирных кислот гонад зависит от половой принадлежности, стадий репродуктивного цикла мидий и степени загрязненности среды полихлорированными бифенилами (ПХБ). Вымет половых продуктов уменьшает содержание хлорорганических соединений (ХОС) в гонадах вследствие передачи их в яйцеклетки и сперматозоиды, и с ними в морскую среду. Установлены различия в элементном составе гонад, половых продуктов и личинок коричневой и черной цветковых морф мидий.

Результаты, полученные Л.Л. Капрановой, имеют не только теоретическую значимость, но и интересны с **практической** точки зрения, поскольку, полученные данные способствовали разработке новых технологий получения лечебно-профилактических продуктов из мидии, эффективных для поддержания здоровья человека и обладающих противоопухолевой активностью.

Общая характеристика работы.

Диссертация написана по традиционному плану, состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов, четырёх глав, включающих обсуждение результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 188 страницах, содержит 18 рисунков и 20 таблиц. Список литературы включает 258 источников.

Во введении обосновывается актуальность темы исследования, сформулирована цель и задачи работы, научная новизна и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, а также дана информация о публикациях и личном вкладе исследователя.

В обзоре литературы отражено состояние проблемы, решаемой автором диссертации. Обзор дает достаточно полную информацию об открытии и находках тестостерона и эстрадиола в разных видах моллюсков, описание их регуляторных функций в организме. Поднимает ключевой вопрос о путях происхождения стероидов в моллюсках: эндогенном через биосинтез стероидов *de novo* или экзогенном, когда моллюски получают гормоны с пищей. Соискатель четко обозначает свою позицию, как приверженца теории о способности моллюсков поглощать стероиды позвоночных из окружающей среды и хранить их в организме, конъюгируя с жирными кислотами. Приводится информация о разнообразии и составе жирных кислот моллюсков, связь его с репродуктивным циклом и сезонными колебаниями. Значительное внимание уделяется хлорорганическим поллютантам и их влиянию на физиологические и биохимические показатели моллюсков.

Экспериментальная часть кроме описания деталей сбора биологических объектов исследования включает информацию о методических приемах и условия проведения анализов. В работе успешно были использованы разнообразные методы анализа, включая иммуноферментный анализ, газовую хроматографию, энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию и масс-спектрометрию.

Объем и результаты экспериментальной работы, выполненной соискателем и представленные в разделе «Обсуждение результатов», соответствуют требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. В первом подразделе приведено описание результатов определения стероидных гормонов в гонадах на разных стадиях репродуктивного цикла и в половых продуктах мидии. Центральную часть работы составляет описание состава жирных кислот в половых продуктах и гонадах мидии, закономерностей распределения жирных кислот в зависимости от половой принадлежности, стадии репродуктивного цикла и степени загрязненности среды обитания ПХБ. Пристальное внимание уделено оценке биоаккумуляции хлорорганических соединений в гонадах мидий. Установлены различия в элементном составе гонад, половых продуктов различных полов черных и коричневых мидий, а также личинок. Автору удалось показать, что во время нереста тестостерон, эстрадиол, жирные кислоты и элементы экскретируются из гонад вместе с половыми продуктами в окружающую среду.

Соискатель демонстрирует владение широким спектром современных методов и подходов в области тестирования стероидов, жирных кислот, макро- и микроэлементного состава. Разработки новых технологий получения лечебно-профилактических продуктов из мидии *M. galloprovincialis* прекрасно дополняют большую работу, выполненную автором.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам и подтверждаются проведенными исследованиями.

Содержание диссертации достаточно полно отражено в 9 печатных работах, среди которых 7 статей в ведущих рецензируемых журналах, входящих в базы данных WOS и Scopus. Результаты работы апробированы на 4-х международных и российских научных конференциях. Четыре патента являются весомым доказательством высокой практической значимости выполненной работы. Автореферат соответствует содержанию диссертации. Вместе с тем по представленной работе имеются следующие замечания и вопросы:

- Соискатель твердо стоит на позиции сторонника экзогенного происхождения стероидных гормонов в моллюсках, и, к сожалению, в литобзоре отсутствует информация, подтверждающая эндогенное происхождение стероидов.

- По существу, наличие стероидов позвоночных у моллюсков, обнаруженное в мидии, также как изменение их уровня в течение репродуктивного цикла нельзя считать надежным доказательством ни их экзогенного происхождения, ни эндокринной роли.
- Ошибочно мнение, что изменение профиля жирных кислот в гонадах мидии происходит за счет того, что часть жирных кислот расходуется на этерификацию тестостерона, поскольку величины содержания стероидов (около $1000 \cdot 10^{-12}$ г) и жирных кислот (около 10^{-1} г на 1г сухой ткани) различаются на много порядков.
- Не обосновано объяснять доминирование насыщенных жирных кислот в яйцеклетках и снижение их концентрации в гонадах самцов в течение репродуктивного цикла разницей в уровне тестостерона у самок и самцов. На самом деле, гонады самок содержат большое количество запасных липидов – триацилглицеридов, которые богаты насыщенными кислотами. Триглицериды служат запасным веществом в яйцеклетках для дальнейшего развития личинок. Именно этим объясняется разница в составе жирных кислот самок и самцов.
- Вызывает сомнение правомерность рассуждения о путях и механизмах адаптации состава жирных кислот личинок (трохофор) к разным концентрациям полихлорфенилов (Глава 4.3). Наибольшие изменения наблюдались при концентрации 0.1 ПДК, тогда как при стократном увеличении поллютанта (10 ПДК) распределение жирных кислот в личинках практически не отличалось от контроля. Особенно парадоксально увеличение концентрации арахидоновой кислоты в трохофорах более чем в 15 раз по сравнению с контролем при воздействии минимальной дозы полихлорфенилов в дозе 0.1 ПДК, а при 10 ПДК её уровень не отличался от контроля. Достаточно хаотичные изменения в пропорциях жирных кислот соискатель пытается объяснить самыми разнообразными причинами: дополнительным синтезом олеиновой кислоты под действием загрязнения с целью детоксикации, снижением проницаемости клеточных мембран, усиленным метаболизмом, перекисным окислением, биосинтезом ненасыщенных жирных кислот (который, кстати, моллюски не способны осуществлять), защитной функцией трохофор, усилением иммунного ответа, а также ролью жирных кислот в связывании стероидных гормонов и органических поллютантов. Вероятнее всего, это можно объяснить методическими погрешностями.
- Необходимы разъяснения заявлений, касающихся биохимии жирных кислот.
- «ЖК поступают в организм мидий вместе с пищей и водой» Каким образом гидрофобные жирные кислоты поступают в мидий с водой? с. 22
- «ПНЖК семейства омега-6 и омега-3 взаимозаменяемы благодаря альтернативному действию ферментов десатураз и элонгаз». с. 23 Какие биосинтетические пути известны соискателю? Поскольку до этого заявления не возникало сомнений, что существуют два

независимых пути биосинтеза жирных кислот $\omega 3$ серии из γ -линоленовой кислоты и $\omega 6$ серии из линолевой кислоты.

- О каких кислотах идёт речь во фразе «Мидия *M. galloprovincialis* может синтезировать длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты, выступающие в роли ингибиторов процессов перекисного окисления липидов»? с. 18
- «Морские моллюски способны эндогенно удлинять и десатурировать ЖК-предшественники с образованием омега-3 жирных кислот под действием десатуразы и элонгазы». с. 23 Эта мысль в корне ошибочна (не говоря уже о стиле), поскольку полиеновые жирные кислоты $\omega 3$ и $\omega 6$ серий являются незаменимыми, и животные, в том числе и моллюски, не способны их синтезировать, они поступают в организм с пищей.
- Для анализа отбирали «моллюсков с длиной раковины 5–6 см и в возрасте 1,5–2 года». с. 42 Как можно совместить эти два разных параметра?
- Утверждение, что к концу репродуктивного цикла происходит уменьшение концентрации тестостерона и эстрадиола не соответствует полученным данным. с. 62, 142.
- Отсутствие моноеновых и полиеновых жирных кислот на начальных стадиях репродуктивного цикла, несомненно, являются результатом методической ошибки. с. 76.
- Предположение автора о том, что олеиновая кислота может происходить из диатомовых, безосновательно, поскольку она присутствует в диатомовых в минорных количествах. с. 92
- Недоумение вызывает мнение, что арахидоновая кислота способна «выступать в качестве гормона». с. 93.
- Ошибочно относить олеиновую кислоту к незаменимым с. 90, а также утверждать, что насыщенные жирные кислоты «имеют одну или более двойных связей» с. 76.
- «При более высоких концентрациях полихлорбифенилов: 1 ПДК и 10 ПДК, содержание арахидоновой кислоты снижается, что свидетельствует о её интенсивном использовании в ферментативных процессах». О каких процессах идет речь? с. 93
- Имеются неудачные или не совсем понятные выражения и фразы: «уровень тестостерона повышался у самцов по сравнению с началом яйцекладки» с. 59. «пожилой организм» с. 17, «мясо мидий» с. 136, «жиры мидий» с. 138. «Результаты представлены как среднее $\pm$ доверительный интервал с вероятностью 95%» с. 53 Вероятно, речь идет об уровне достоверности 95%.
- Иногда невпопад приводятся ссылки: с. 24 [129] явно не о жирных кислотах бактерий. На с. 76 [109] о моллюске из реки в Турции, она явно не связана с «морскими беспозвоночными, обитающими в Японском море».
- Используются разные типы ссылок в диссертации.

- Работа содержит стилистические и орфографические погрешности, которые иногда затрудняют понимание сути излагаемого материала, не редко возникают сложности с логической связью между предложениями.

Тем не менее, все эти неточности и погрешности не имеют принципиального для данной работы характера и не влияют, в целом, на общее положительное восприятие диссертации. Соискателем получен огромный объем экспериментальных данных, на основе которого сделан ряд значимых выводов и обобщений общебиологического характера.

Заключение. Диссертационная работа Л.Л. Капановой «Эколого-биохимические исследования двусторчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 в период размножения», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16. – гидробиология, представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, в которой отражены результаты собственных исследований, имеющих важное научное и практическое значение. Основные результаты опубликованы в реферируемых отечественных и международных журналах и представлены на российских и международных конференциях. Диссертация 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.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Л.Л. Капановой, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16. – гидробиология.

20 мая 2022г.

Наталья Владимировна Жукова
Ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения
Российской академии наук,
доктор биологических наук

690041, г. Владивосток
ул. Пальчевского, д. 17
Тел.: (423)2310937
e-mail: nzhukova35@list.ru

подпись Н.В. Жукова
Заверяю: В.В. Спирин
О.В. Шенникова



Н.В. Жукова