

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора

ФИЦ ИнБЮМ РАН

Горбунов Р.В.

ОТЗЫВ

ведущей организации – ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН» на диссертационную работу Мурзиной Светланы Александровны «Роль липидов и их жирнокислотных компонентов в эколого-биохимических адаптациях рыб северных морей», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.06 – ихтиология, 03.01.04 – биохимия

1. Актуальность выбранной темы

Ихтиофауна арктических морей России представлена уникальным комплексом видов, общим свойством которых является способность к существованию в условиях низких температур. Особо актуальными являются исследования, связанные с изучением биоэнергетических аспектов адаптации морских и пресноводных рыб к условиям гипотермии. Известно, что у низших позвоночных, включая рыб, энергетические затраты явно превалируют над конструктивными процессами. Диссертационную работу С.А. Мурзиной можно отнести именно к этой проблематике, что делает ее несомненно актуальной. В ней рассматривается содержание и качественный состав липидов и жирных кислот, изменение которых может коренным образом повлиять на судьбу популяции и вида в экосистеме.

Работа выполнена на шести видах морских и пресноводных рыб, часть из которых является объектами промысла (беломорская сельдь), разведения (кумжа, атлантический лосось), а остальные являются важными компонентами трофической цепи арктических морей (трехиглая колюшка, пятнистый лептоклин, люмпен Фабриция). Знание качественного состава липидов и жирных кислот позволяет оценить их пищевую ценность, что делает работу интересной с практической точки зрения. Эту информацию дополняют сезонные аспекты исследования, изучение процессов репродукции, тканевой специфики, раннего онтогенеза, локальных группировок отдельных видов. Это позволяет автору делать крупные обобщения интересные с фундаментальной и прикладной точки зрения, что соответствует формату докторской диссертации.

2. Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Диссидент показывает весьма хорошую теоретическую подготовку и владение, имеющейся в современной научной периодике информацией. Это видно из характера

анализа полученных материалов, качества аргументации, логических схем. Выводы и заключения, представленные в работе, достаточно хорошо обоснованы.

О надежности заключений и выводов свидетельствует также весьма широкий методический арсенал, применяемый в диссертационной работе, который включает жидкостную и газожидкостную хроматографию, спектрофотометрические методы исследования, гистологический анализ биологического материала. Автором выполнены развернутые ихтиологические и паразитологические исследования представителей 4-х семейств костистых морских и пресноводных рыб. Применяемые методы статистической обработки цифровой информации адекватны поставленным задачам и в достаточной степени иллюстрируют выявленные в работе эффекты и закономерности.

3. Новизна основных научных положений диссертации

Новизна, представленной в диссертационной работе С.А. Мурзиной информации, не вызывает сомнений. Используя современные методы исследования, автор впервые привел развернутую характеристику качественного состава липидов и жирных кислот в тканях шести видов арктических рыб. Достаточно подробно изучены жизненные циклы, сезонная динамика липидного и ЖК состава, участие липидов в процессах репродукции, раннего онтогенеза. Положения, выносимые на защиту, логически вытекают из содержания диссертационной работы и в достаточной степени обоснованы.

4. Научно-практическая ценность работы и конкретные пути применения результатов исследований

Представленная в диссертационной работе информация имеет преимущественно теоретическое значение. В ней рассматриваются вопросы, касающиеся взаимодействия организма и среды обитания. Она интересна, прежде всего, с позиций физиологии и биохимии адаптационных процессов. Практическая ценность работы определяется в основном перечнем видов, которые были задействованы в ней в качестве материала исследования, часть из которых являются кормовыми объектами, объектами промысла и разведения. Знание качественного состава липидов и жирных кислот позволяет оценить их пищевую ценность. Информация об особенностях течения репродуктивных циклов, раннего эмбриогенеза, состава паразитофауны может представлять интерес для практического рыбоводства, частности разведения представителей семейства лососевых.

Содержание, качественный состав липидов и жирных кислот костистых рыб, в последнее время, часто используются и для целей биоиндикации качества морской среды. *Lumpenus fabricii* и *Leptoclinus maculatus*, как придонные виды, отвечают всем требованиям, предъявляемым к объектам биомониторам, и, в перспективе, могут рассматриваться в этом качестве.

5. Полнота изложения основных научных положений и выводов в опубликованных научных работах

Результаты исследований нашли отражение в 52-ми печатных работах и автореферате диссертации. Список публикаций включает 50 статей и 2 главы в монографиях. Статьи соответствуют списку ВАК РФ, ряд из них попадают в базу WoS Scopus. Во многих работах диссертант является первым автором, что наглядно отражает степень ее участия в проводимых исследованиях. Опубликованные работы всесторонне отражают представленные для рассмотрения результаты исследований, основные положения и выводы диссертации.

6. Структура диссертации

Рукопись диссертации изложена на 376 страницах, включает 52 таблицы и 48 рисунков. Она состоит из введения, 6-ти глав, заключения, выводов, списка использованных источников, включающего 662 наименования (249 кириллицей, 413 латиницей). Глава 1 – это обзор имеющейся информации по тематике диссертации. В главе 2 описаны районы исследования, методы сбора материала и лабораторной обработки проб, статистического анализа цифровой информации. В главах 4-6 приводятся результаты натурных и экспериментальных исследований, полученные автором. В заключении подводятся некоторые итоги, акцентируется внимание на ряде выявленных эффектов, которые позволяют сделать определенные выводы.

Во **введении** работы в развернутой и аргументированной форме раскрывается актуальность выбранной темы и вытекающие отсюда цель и перечень исследовательских задач. Здесь также определена связь с выбранной специальностью. Раскрыта научная новизна, практическая значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту и личный вклад автора. Дано развернутая характеристика апробации полученных результатов, количества опубликованных работ и структуры диссертации.

Замечания, рекомендации, вопросы.

- Думаем, что перечень задач мог бы быть более развернутым и акцентированным с учетом специфики работ, представленных в диссертации.

В **главе 1** представлен значительный объем информации, касающейся непосредственно тематики диссертационной работы. Она включает шесть разделов. В разделе 1 всесторонне охарактеризовано функциональное назначение структурных (фосфолипидов) и резервных групп липидов (триацилглицерины, воска и эфиры холестерина), с акцентом на физико-химические свойства биомембран. В разделе 2 рассмотрены особенности структуры жирных кислот, их функциональное назначение и экологические следствия изменения качественного состава данных соединений. Должное

внимание уделено роли липидов в адаптации морских организмов к условиям высоких широт (гипотермии), прежде всего, в регуляции текучести клеточных мембран, которая определяется степенью насыщенности жирных кислот. Разделы 3-6 посвящены особенностям биологии, таксономии и жизненным циклам объектов исследования: пятнистому лептоклину, люмпену Фабрициуса, беломорской сельди, трехиглой колюшке и ряду лососевых (кумжа, атлантический лосось). Следует отметить, что каждый из этих видов вносит существенный вклад в экосистему арктических морей России, являясь объектом промысла, разведения, важным элементом трофической цепи.

Представленная информация полностью соответствует тематике диссертационной работы. Принципиальных замечаний нет.

Глава 2 всесторонне раскрывает методологические аспекты выполненного исследования. Даётся развернутая характеристика районов проведения работ, условий сбора материала, его содержания и транспортировки. Особое внимание уделено методам лабораторной обработки проб: их фиксации, экстракции общих липидов. Достаточно подробно описаны методы количественного определения содержания липидов, тонкослойной, высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии, а также методы гистологического и паразитологического анализа. Статистический анализ полученных цифровых массивов адекватен поставленным задачам и позволяет с достаточно высокой степенью надежности характеризовать выявленные в работе эффекты.

Замечания, рекомендации, вопросы.

- Как предварительная спиртовая фиксация и хранение рыб в этиловом спирте (разная по длительности) могли повлиять на содержание липидов и их жирнокислотный состав до начала обработки проб стандартными методами (перефиксация в хлороформ-метанольной смеси)?
- Содержание ОЛ определяли весовым методом или суммированием содержания фракций?
- Непонятно как соотносится число проб, указанное в большинстве таблиц, с числом обследованных особей?
- Чем вызвано одновременное применение двух методов оценки статистических различий: One-way ANOVA и непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни?
- Как оценивали нормальность распределения выборочной совокупности?
- В настоящей работе анализируются в основном относительные единицы: процентное соотношение отдельных классов липидов и жирных кислот. Изменение процентного

соотношения указанных соединений не всегда отражает изменение их количественного содержания в тканях. Здесь требуется комментарий автора.

- Содержание липидов и фракций выражали в % сухой массы тела/ткани, что ограничивает возможность сравнения с литературными данными, где содержание чаще всего выражают на сырую массу.

Глава 3 посвящена изучению жизненного цикла пятнистого лептоклина и участию липидов в этом процессе. Она хорошо структурирована. Значительное внимание уделено сезонной динамике содержания липидов и ЖК в тканях взрослых половозрелых особей и молоди пятнистого лептоклина (разделы 3.1-2, 3.5), сравнительному анализу липидного статуса данного вида и люмпена Фабрициуса (раздел 3.3), паразитофауне (раздел 3.4) и суточной динамике содержания липидов и ЖК в тканях молоди (раздел 3.6). Материалы, представленные здесь, позволили автору составить схему жизненного цикла данного вида, которая является одним из наиболее интересных результатов в представленной диссертационной работе.

Автору удалось показать то, что распределение, накопление общих липидов и их различных классов в тканях и органах половозрелых самок лептоклина тесно связано с процессом развития их гонад. Установлена общая тенденция доминирования МНЖК в липидах в большинстве тканей особей пятнистого лептоклина. Эта закономерность проявляется как на уровне структурных (фосфолипиды), так и резервных энергетических соединений, прежде всего, ТАГ. Отмечено, что переход личинок пятнистого лептоклина с эндогенного типа питания на экзогенный сопровождается формированием суточных ритмов в обмене веществ данного вида, что косвенно отражает динамика содержания отдельных видов липидов и ЖК в тканях.

Замечания, рекомендации, вопросы.

- Материал, представленный в настоящей и последующих главах, излагается в определенной степени сумбурно. Собственные результаты приводятся одновременно с данными полученными другими авторами. Думаем, что элементы обсуждения следовало бы вынести в самостоятельный раздел, при этом четко обозначить выявленные в работе эффекты, которые требуют специального анализа.
- В таблице 11 приведены данные по содержанию и составу липидов мышц, печени и гонад. Обращает внимание крайне высокое содержание холестерина в мышцах и печени в летние месяцы. Трудно представить клетку, в которой холестерина в несколько раз больше, чем ФЛ.
- При анализе ЖК состава тканей лептоклина в разные сезоны упоминаются также жабры, данные по которым в таблицах отсутствуют.

- Фраза: «Содержание ОЛ у исследуемых видов рыб семейства Стихеевых, обитающих в акватории залива Ис-фьорд и Белом море, было практически равным (в пределах 11,4 – 11,8 % сухой массы), что с высокой степенью вероятности указывает на их (липидов) генетическую детерминированность». О какой детерминированности идет речь? Это скорее экологическая детерминированность – сходные условия существования.
- При сравнении люмпена и лептоклина – не указано какие органы/ткани сравнивали.
- Если суточная динамика ТАГ у личинок L4 пятнистого лептоклина хорошо объяснима (вертикальные кормовые миграции), то как объяснить наличие суточной динамики в содержании структурных липидов (ФЛ) отмеченное в работе?
- В чем состояла целесообразность изучения паразитофауны половозрелых особей пятнистого лептоклина? Это абсолютно не укладывается в перечень задач настоящего исследования, те более рассматривается вне связи динамикой содержания липидов и ЖК в тканях данного вида.

Глава 4 посвящена анализу липидного и жирнокислотного состава тканей (печень, гонады) трехиглой колюшки в течение жизненного цикла с акцентом на репродуктивный период. Автору удалось обнаружить следующие закономерности: отмечено наличие в гонадах колюшки двух генераций ооцитов, что указывает на наличие порционного нереста; установлена гетерогенность по липидному составу у трех исследованных группировок рыб из естественных нерестилищ; обнаружено, что содержание фосфолипидов в тканях более консервативно относительно триацилглицеридов; Отмечена связь между высоким содержанием МНЖК 16:1(n-7) и 18:1(n-9) и фракцией триацилглицеридов.

Замечания, рекомендации, вопросы.

- Чтобы судить о характере изменений липидного и жирнокислотного состава печени и гонад у трехиглой колюшки в период нереста целесообразно было бы иметь информацию об аналогичных показателях у данного вида в период относительного функционального покоя (стадия зрелости гонад II-III). Тогда бы направленность процессов была более выраженной.
- Не очень удачное выражение «липидный статус», лучше состав. Насколько видно из результатов, колюшка, как другие скрепеновые, рыба тощая. Высоким (как написано на стр. 180) содержание липидов в 14-20% сухой массы (или 3-5% сырой массы) в печени и гонадах считать нельзя, тем более что содержание ТАГ в ОЛ очень низкое: 10-20% ОЛ в гонадах и 5-10% ОЛ в печени. Тут картина не совсем обычная для тощих рыб.

- Размерные характеристики колюшки из разных биотопов даны только для молоди. Размеры и масса взрослых рыб не приведены.
- Анализируя различия липидного и жирнокислотного состава тканей трех нерестовых группировок колюшки, автор пытается привязать это к условиям среды обитания. Думаем, что за этими различиями может также стоять и сам нерестовый процесс, то есть каждая группировка может находиться на разных его этапах, что и определяет специфику липидного и жирнокислотного состава печени и гонад.
- Две взаимно исключающие фразы: «Высокое содержание ПНЖК характерно для морских рыб северных морей и в значительной степени определяется их рационом питания (Arts et al., 2009).» (стр. 185); «Высокое содержание МНЖК является специфической особенностью ЖК-состава арктических морских рыб.» (стр. 188). Требуется комментарий автора.

Глава 5 посвящена изучению особенностей популяционной структуры беломорской сельди на основе анализа качественного и количественного состава липидов и жирных кислот ее тканей. Показано, что сельдь, выловленная из различных акваторий (Кандалакшский, Онежский, Двинский заливы и Терский берег моря) отличалась по уровню резервных (ТАГ) и структурных липидов (ФЛ). Наиболее высокий уровень ТАГ был выявлен у скоплений в районе Кандалакшского и Онежского заливов, что отражает наиболее благоприятные условия для нагула у данных группировок сельди.

Отмечено, что качественный состав фосфолипидов у 4-х групп сельди принципиально не отличался. Явно доминировала фракция ФХ. Определенные различия обнаруживались относительно минорных фракций: ЛФХ, СФМ, что, вероятно, отражает процесс адаптации особей сельди к специфике ф/х условий, в которых они находятся. Дискриминантный анализ показал, что основная факторная нагрузка приходится на ФЛ, ТАГ, ХС и ЭХС, определяя тем самым межгрупповые и внутригрупповые различия. У всех группировок сельди Белого моря выявлено преобладание МНЖК в основном за счет 18:1(n-9) и 16:1(n-7).

Замечания, рекомендации, вопросы.

- Следует признать громоздким и в целом неудачным название данной главы: «Биохимическая разнокачественность с участием липидов и жирных кислот у беломорской сельди *Clupea pallasii marisalbi* Berg, 1923 в различные периоды жизненного цикла и при действии факторов среды». В главе приводится информация только по содержанию и качественному составу липидов и ЖК. Другие показатели, которые могли бы повлиять на биохимическую разнокачественность не рассматриваются.

- Первый раз за все время в таблице 31 видим размеры сельди (вес не указан, хотя при такой вариабельности размеров различия в весе могут быть большими – до 5 раз, что может сказываться на содержании липидов).
- В таблице 38 приведен ЖК состав личинок сельди. Здесь очень много редких кислот с очень низкими концентрациями. Каким образом были они были идентифицированы?
- В ЖК личинок найдено 2-3% общего количества 20:1 и 22:1 ЖК. Соискатель пишет, что это свидетельствует о наличии в пище науплиев воскодержащих копепод. Это неверно, так как воска у раков появляются на 2-3-й копеподитной (не науплиальной) стадии.
- Относительно группировок А и В. Нахождение особей на глубине 50 м, при температуре воды 6,5°C и солености 26,5‰ (группировка А) позволяет им снизить энергетические затраты при низких значениях ОЛ, ФЛ и ТАГ. Думаем, что это своеобразная стратегия пережидания неблагоприятного периода годового цикла (зимовки). Этому аспекту исследования следовало бы уделить больше внимания.
- Следует отметить, что не на всех графиках расшифрованы условные обозначения (см. рисунки 45,46).

Глава 6 является важной составляющей диссертационной работы. В ней рассматривается динамика содержания липидов и ЖК на ранних этапах онтогенеза молоди кумжи и атлантического лосося. Крайне интересная информация получена относительно роли биотопов в формировании размерно-весовых характеристик рыб. Все достаточно обосновано. Данные по липидам и описание результатов не вызывает возражений. Результаты свидетельствуют о том, что липидный статус лососей зависит в первую очередь от особенностей среды обитания (гидрологии водоема и кормовой базы).

Замечания, рекомендации, вопросы.

- Стр.258 «низкий липидный профиль» - следует пояснить.
- Стр. 268. Фраза: «Однако, известно, что мышечные клетки не способны к синтезу ТАГ и ЖК и в отличие от печени, они запасают эти липиды (Сидоров, 1983).» Насколько это так, особенно относительно красных мышц?
- Стр.271. Несколько раз упоминается положительная корреляция между возрастом (весом) и липидными характеристиками кумжи. Однако это не подтверждается статистически (коэффициентами корреляции, детерминации). Тоже на стр. 272, где речь идет об «активизации питания молоди кумжи (2+, 3+), которое положительно коррелирует с ростом их размерно-весовых характеристик».

Общее заключение. В этом разделе работы автор подводит итоги выполненному комплексу работ. Фактически это общее обсуждение со ссылками на работы других авторов, занимающее достаточно большой объем – более 16 страниц. При некоторой хаотичности и аморфности изложения автору удалось акцентировать внимание на выявленных в работе закономерностях (общего и частного порядка), что существенно облегчает восприятие выводов. Заслуживает серьезного внимания схема жизненного цикла пятнистого лептоклина, предложенная автором работы, описание группировок беломорской сельди, факт ранней дифференциации молоди атлантического лосося на стадии сеголеток и ряд других аспектов работы.

Замечания, рекомендации, вопросы.

- Относительно схемы жизненного цикла лептоклина (рис. 48) хотелось бы уточнить: что это за температура – воздуха или воды; на глубине 100-200 м и ниже температура воды скорее всего относительно постоянна; какова продолжительность жизни рыб на каждой стадии?

Выводы полностью отражают содержание диссертационной работы.
Принципиальных замечаний нет.

Список использованных источников включает 662 наименования с относительно сбалансированным числом отечественных и зарубежных работ (249 кириллицей, 413 латиницей). Он содержит достаточное число свежих публикаций (работы после 2010 года). На них приходится более 25 % от общего числа ссылок. При этом в списке встречаются работы 27-60-х годов прошлого столетия, что отражает всестороннее знание проблемы. В списке цитируемых источников имеются неточности: местами не указан год публикации (см. позиции 226, 477 и т.д.).

При всей добротности, диссертация несвободна от опечаток, грамматических, стилистических ошибок.

Автореферат адекватен содержанию и структуре диссертации.

Указанные выше замечания не умаляют достоинств диссертации. Они скорее носят технический и рекомендательный характер и не могут повлиять на общее положительное впечатление от проделанной работы.

7. Заключение

Анализ представленного для рассмотрения материала (рукописи диссертации, автореферата, публикаций), основных положений и выводов диссертации, с учетом новизны, практической значимости и статистической надежности полученной информации позволяет заключить, что диссертационная работа С.А. Мурзиной: «Роль липидов и их жирнокислотных компонентов в эколого-биохимических адаптациях рыб

северных морей» является законченным научным исследованием. Она соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.06 – ихтиология, 03.01.04 – биохимия (п.9 Положения ВАК РФ о порядке присуждения ученых степеней от 24 сентября 2013 г № 842 в редакции от 01.10.2018), а ее автор, Мурзина Светлана Александровна, заслуживает присуждения степени доктора биологических наук.

Главный научный сотрудник
руководитель отдела физиологии животных и биохимии
ФГБУН ФИЦ «Института биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского РАН»
доктор биологических наук, профессор

Александр Александрович Солдатов

Ведущий научный сотрудник
отдела физиологии животных и биохимии
ФГБУН ФИЦ «Института биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского РАН
кандидат биологических наук

Татьяна Владленовна Юнева

проспект Нахимова 2, Севастополь 299011, РФ
телефон: +79788277526
alekssoldatov@yandex.ru

Отзыв рассмотрен на заседании отдела физиологии животных и биохимии ФИЦ ИнБЮМ

Протокол № 7 от «09 » Сентябрь 2019 г.

Подписи А.А. Солдатова и Т.В. Юневой удостоверяю  Р.В. Горбунов

