

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Климовой Яны Станиславовны  
**«Влияние природных и антропогенных факторов среды на показатели оксидативного стресса двустворчатых моллюсков сем. Dreissenidae»,**  
представленную на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности 03.02.10 – гидробиология

### 1. Актуальность выбранной темы

Биоиндикация – одно из актуальных направлений биологического мониторинга состояния водных акваторий. Двустворчатые моллюски соответствуют всем критериям, предъявляемым к организмам-биомониторам: толерантность к разнообразным физико-химическим факторам среды, фильтрация и биоаккумуляция широкого спектра поллютентов, прикрепленный образ жизни, отсутствие выраженного токсического и генотоксического эффектов загрязнений на их организм. Последнее определяется присутствием в тканях высокоэффективных систем детоксикации. Важной составляющей этих систем является антиоксидантный (АО) ферментный комплекс. Его компоненты позволяют выявлять крайне незначительные токсические эффекты сравнительно широкой группы химических соединений. Поэтому данный молекулярный комплекс используется не только в качестве маркеров оксидативного стресса тканей, но и для целей экодиагностики, так как позволяет давать интегральную оценку степени токсичности водной среды.

Оценка качества морских акваторий обычно проводится с привлечением представителей рода *Mytilus*. В отношении пресных водоемов особое внимание уделяется моллюскам рода *Dreissena*, которые в перспективе могут стать модельными объектами биоиндикации токсичности континентальных водоемов и водотоков. Изучение состояния АО ферментного комплекса, уровня процессов перекисного окисления липидов и белков в тканях представителей данного рода – необходимое условие для их дальнейшего использования в качестве объектов биоиндикации. Важным моментом также является учет влияния естественных состояний моллюска на выше перечисленные процессы. Все эти аспекты проблемы нашли отражение в диссертационной работе Я.С. Климовой, что делает ее, несомненно, актуальной, прежде всего, с практической точки зрения.

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

Диссертант 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 современные спектрофотометрические методы оценки состояния антиоксидантного ферментного комплекса и процессов перекисного окисления белков и липидов, атомно-абсорбционную спектроскопию при определении содержания тяжелых металлов в тканях моллюсков. Статистические методы обработки цифровой информации адекватны поставленным задачам и в достаточной степени иллюстрируют выявленные эффекты и закономерности.

### **3. Новизна основных научных положений и выводов диссертации**

Важным достоинством представленной диссертационной работы является всесторонняя комплексная характеристика антиоксидантной ферментативной системы и процессов перекисного окисления белков и липидов у двух наиболее массовых видов дрейссен: *D. polymorpha* и *D. bugensis*. Автор учел динамику естественных состояний (сезонные аспекты работы), видовую и возрастную специфику, различия между полами, а также реакцию на гипоксические и токсические (тяжелые металлы) нагрузки указанного молекулярного комплекса. Полученная информация крайне важна, для того чтобы рекомендовать данные виды моллюсков (прежде всего *D. polymorpha*) в качестве объектов биоиндикации. Результаты диссертации нашли адекватное отражение в разделах «Научная новизна», «Защищаемые положения» и выводах работы.

Вместе с тем, как мне кажется, вывод 6 следует переформулировать, так как информационная ценность показателей оксидативного стресса в экодиагностике известна давно и на это не стоит еще раз обращать внимание. Лучше сосредоточиться на рекомендациях по использованию *D. polymorpha* в качестве объекта биоиндикации. В целом же новизна работы очевидна и не вызывает возражений.

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

Как уже отмечалось, представленная в диссертационной работе информация имеет не только научное, но, прежде всего, прикладное значение. Изучение показателей оксидативного стресса у массовых видов дрецсен: *D. polymorpha* и *D. bugensis*, условиях токсических нагрузок и с учетом естественных состояний моллюсков позволяет рекомендовать их в качестве объектов биоиндикации и использовать в практике мониторинговых исследований водных акваторий. Это основной итог выполненных исследований.

Вместе с тем, с рядом формулировок во введении работы трудно согласиться: «Заложены теоретические и практические основы применения показателей оксидативного стресса моллюсков *D. polymorpha* и *D. bugensis* в качестве биологических маркеров для экотоксикологических исследований пресноводной среды». Теоретические основы применения показателей оксидативного стресса у гидробионтов для биомониторинга водной среды заложены значительно раньше. Автор лишь адаптирует эти подходы к двум видам пресноводных двустворчатых моллюсков не более и не менее. В остальном замечаний не имею.

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

Результаты исследований нашли отражение в 8-ми печатных работах и автореферате диссертации. Список публикаций включает 3 статьи и 5 тезисов докладов. Статьи соответствуют списку ВАК РФ. Одна работа опубликована диссертантом самостоятельно. В остальных она 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 123 страницах, включает 7 таблиц и 18 рисунков. Она состоит из введения (общая характеристика работы), 5-ти глав, заключения, выводов, списка использованных источников, включающего 236 наименования (85 кириллицей, 151 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 3-5 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 (общая характеристика 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. Даны развернутая характеристика апробации полученных результатов, количества опубликованных работ, структуры диссертации.

### *Замечания, рекомендации, вопросы.*

- Целесообразно было бы указать во введении (общей характеристики работы) в рамках, каких государственных программ и проектов было выполнено настоящее исследование.
- При формулировке научной новизны, теоретической и практической значимости работы следует избегать таких фраз как «...существенный вклад...», «Заложены теоретические и практические основы...». Об этом должны судить другие специалисты, но не авторы работы. В этих разделах введения явно не хватает конкретики, хотя достойная информация в работе имеется.

В главе 1 рассмотрен значительный объем информации, касающейся непосредственно тематики диссертационной работы. Она включает семь разделов. Всесторонне охарактеризованы понятия «биомаркер» и «биомониторинг» (разделы 1.1 и 1.3). Должное внимание уделено состоянию антиоксидантного ферментного комплекса (супероксиддисмутазам, каталазе, глутатионовому ферментному комплексу) и его специфике у двустворчатых моллюсков, а также процессам перекисного окисления белков и липидов (раздел 1.2, 1.5). Особый акцент сделан на особенностях функционирования антиоксидантного ферментного комплекса в условиях внешней гипоксии, чему посвящен значительный объем исследований автора (раздел 1.4). Приводится достаточная информация об особенностях биологии и экологии объектов исследования – представителей рода *Dreissena*, а также специфики их реакции на условия водной среды и, прежде всего, антропогенную нагрузку. Рассматриваются перспективы использования представителей данного рода в качестве модельных объектов биоиндикации качества водной среды континентальных водоемов России.

### *Замечания, рекомендации, вопросы.*

- В разделе 1.2 практически не уделено внимание антиоксидантным свойствам восстановленного глутатиона. Известно, что он не только используется для регенерации НАДФ·Н<sub>2</sub>, но и обладает способностью самостоятельно нейтрализовать отдельные виды активных форм кислорода (АФК). Следовало бы также уделить внимание неспецифическим молекулярным системам, способным нейтрализовать АФК: каротиноидам (активно накапливаются в тканях моллюсков), аскорбиновой кислоте, токоферолам и т.д.
- Принято считать, что обзор литературы по объему не должен превышать 25% от содержательной части диссертационной работы. В настоящей работе он достигает почти 35%. Однако, думаю, это не критично.

**Глава 2** всесторонне раскрывает методологические аспекты выполненного исследования. Даётся развернутая характеристика материала, условий его сбора, транспортировки, содержания в лаборатории (аквариальной). Достаточно подробно описаны методические аспекты отбора проб тканей и их подготовки к лабораторному анализу, методология постановки эксперимента по влиянию гипоксии, методы определения активности ряда ферментов, содержания восстановленного глутатиона, белка, продуктов перекисного окисления липидов и белков. Методы статистического анализа адекватны поставленным задачам и позволяют с достаточно высокой степенью надежности характеризовать выявленные в работе эффекты.

*Замечания, рекомендации, вопросы.*

- В течении какого промежутка времени осуществлялся переход от нормоксических условий среды к гипоксическим? Не вызывало ли это развитие неспецифической реакции организма (стресса)?
- Почему не определялась активность супeroxиддисмутазы и глутатионпероксидазы? Это осложняет анализ причин изменения активности каталазы и состояния глутатионового комплекса.
- Чему равны объемы выборочных совокупностей? Эта информация отсутствует в разделе «Материалы и методы» и основной части работы. Это не позволяет проверить надежность статистических сравнений.

**Глава 3** является основной по объему и числу выявленных эффектов (3 вывода). Она содержит информацию о видовых, размерно-возрастных особенностях состояния антиоксидантной ферментной системы и процессах перекисного окисления белков и липидов в тканях двух видов дрейссен (*D. polymorpha* и *D. bugensis*). Учтены также половые различия и сезонная динамика указанных выше показателей. Автор рассматривает полученные результаты как фоновые, позволяющие охарактеризовать состояние антиоксидантного ферментного комплекса и процессы перекисного окисления белков и липидов в условиях относительной физиологической нормы. Выявлен ряд эффектов в функциональном состоянии моллюсков, которые необходимо учитывать в случае использования *D. polymorpha* и *D. bugensis* в качестве объектов биоиндикации: более высокая чувствительность к факторам среды *D. polymorpha*; сезонные вариации отдельных компонентов антиоксидантного ферментного комплекса, процессов перекисного окисления липидов и белков.

*Замечания, рекомендации, вопросы.*

- В главе присутствует аналитическая составляющая, однако она диффузно рассеяна по тексту работы. Целесообразно было бы ее выделить в самостоятельный раздел (напр.

«Обсуждение результатов»), что придало бы главе определенную цельность и завершенность.

- На рисунках 7-9 не обозначена ось абсцисс. Нет комментариев к ряду цифровых обозначений. При указании размерностей активности ферментов следует дополнять величины концентраций типом субстратов, которые входили в состав инкубационной среды. Например, нмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мкг белка/мин, а не нмоль/мкг белка/мин. Это замечание ко всем видам ферментов.
- Не указаны объемы выборочных совокупностей (таблицы, рисунки).
- При проведении статистических сравнений следует писать не  $p=0,05$ , а  $p\leq 0,05$ .

Глава 4 посвящена изучению в экспериментальных условиях влияния гипоксии на состояние антиоксидантного ферментного комплекса и процессы перекисного окисления липидов и белков в тканях двух видов дрейссен (*D. polymorpha* и *D. bugensis*). Автору удалось показать принципиальные отличия в реакциях на дефицит кислорода организма *D. polymorpha* и *D. bugensis*. Они касались не только характера изменения параметров, указанного выше молекулярного комплекса, но и поведения моллюсков. Полученные результаты в достаточной степени надежны и хорошо обсуждены. Автор склоняется к точке зрения о том, что *D. polymorpha* является более окси菲尔ным видом, так как предпочитает твердые субстраты и более активный гидродинамический режим, который не предполагает возникновения дефицита кислорода.

*Замечания, рекомендации, вопросы.*

- Глава начинается с литературной справки, в которой рассматриваются вопросы, связанные с влиянием гипоксии на организм моллюсков. Думаю, этот текст целесообразно перенести в обзор литературы (глава 1).
- К графической части (рисунки 10-14) замечания те же: не обозначена ось абсцисс; при указании размерностей активности ферментов следует дополнять величины концентраций типом субстратов, которые входили в состав инкубационной среды; при проведении статистических сравнений следует писать не  $p=0,05$ , а  $p\leq 0,05$ .
- Не указаны объемы выборочных совокупностей.

В главе 5 представлены результаты натурных наблюдений за моллюсками (*D. polymorpha*) из различных акваторий Рыбинского водохранилища с учетом уровня антропогенной нагрузки. Изучено содержание в мягких тканях достаточно широкого спектра тяжелых металлов (Pb, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, и Cd). Обнаружены корреляции между отдельными из них (Mn, Cu, Cd) и показателями состояния антиоксидантного ферментного комплекса и процессами перекисного окисления белков и липидов (КАТ, ГЛТ, МДА), что представляет определенный интерес.

*Замечания, рекомендации, вопросы.*

- Высокий уровень восстановленного глутатиона в тканях не всегда отражает усиление процессов оксидативного стресса. Скорее, наоборот, в этом случае функция нейтрализации АФК передается ферментам низкого сродства (КАТ), а глутатионовая система активного участия в этом не принимает. Хотелось бы услышать мнения автора относительно этой интерпретации его данных.
- Необходимо учесть, что тяжелые металлы могут вступать между собой в различные виды коэргических отношений. Это необходимо учесть при интерпретации общего токсического эффекта на организм *D. polymorpha*.
- Для целей биоиндикации выбирают эврибионтные виды, так как они имеют широкое распространение, что позволяет проводить полноценный биологический мониторинг водной среды. Высокочувствительные к токсической нагрузке виды, обычно имеют ограниченное распространение и не могут рассматриваться в качестве объектов биоиндикации. Автор предлагает, напротив, для этих целей применить *D. polymorpha*, чувствительность которой к токсической нагрузке выше, чем у *D. bugensis*. Как это объяснить?
- К рисункам и таблицам те же претензии: не обозначена ось абсцисс; при указании размерностей активности ферментов следует дополнять величины концентраций типом субстратов, которые входили в состав инкубационной среды; при проведении статистических сравнений следует писать не  $p=0,05$ , а  $p\leq 0,05$ .
- В заголовке к таблице 6 указана *D. bugensis*, хотя, по-видимому, представлены материалы только по *D. polymorpha*.

В **заключении** автор обобщает полученную информацию. Акцент делается на межвидовых особенностях организации антиоксидантной ферментной системы и процессах перекисного окисления белков и липидов у *D. bugensis* и *D. polymorpha*. Сопоставляются стратегии адаптации к гипоксии указанных видов моллюсков. В условиях натурных наблюдений анализируются токсические эффекты тяжелых металлов на организм *D. polymorpha*.

**Выводы** полностью отражают содержание диссертационной работы. Принципиальных замечаний нет.

**Список использованных источников** включает 236 наименования с относительно сбалансированным числом отечественных и зарубежных работ (85 кириллицей, 151 латиницей). Он содержит достаточное число свежих публикаций (работы после 2010 года). На них приходится более 17 % от общего числа ссылок. При этом в списке

встречаются работы 30-60-х годов прошлого столетия, что отражает всестороннее знание проблемы.

Автореферат полностью отражает содержание и структуру диссертации.

В работе имеются опечатки, на иллюстрациях нет обозначения осей, размерности указаны не точно, не расшифрованы отдельные элементы рисунка, в списке источников местами пропущены года публикаций.

Однако все указанные 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 Я.С. Климовой: «Влияние природных и антропогенных факторов среды на показатели оксидативного стресса двустворчатых моллюсков сем. Dreissenidae» является законченным научным исследованием. Она соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.10 – гидробиология (п.9 Положения ВАК РФ о порядке присуждения ученых степеней от 24 сентября 2013 г № 842), а ее автор, Климова Яна Станиславовна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук.

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник

руководитель отдела физиологии животных и биохимии

ФГБУН Института морских биологических исследований

им. А.О. Ковалевского РАН

доктор биологических наук, профессор

А.А. Солдатов

проспект Нахимова 2, Севастополь 299011, РФ

телефон: +79788277526

alekssoldatov@yandex.ru

