

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Сикорской Татьяны Васильевны

**«ЛИПИДОМ СИМБИОТ - СОДЕРЖАЩИХ КОРАЛЛОВ И ЕГО ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОБЕСЦВЕЧИВАНИИ»**, представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия

Актуальность выбранной темы. Класс Anthozoa включают большую и разнообразную группу морских организмов из типа Cnidaria, представленную порядка 6000 видов. Объектами исследования Т.В. Сикорской были коралловые полипы, принадлежащие трем отрядам обоих подклассов Anthozoa: Scleractinia и Zoantharia из подкласса Hexacorallia, и Alcyonacea из подкласса Octocorallia. Большинство исследованных видов содержит в качестве симбионтов микроводоросли (зооксантеллы), которые снабжают организм-хозяина питательными веществами. Повышение температуры воды приводит к потере зооксантелл (процесс обесцвечивания кораллов) и во многих случаях гибели хозяина. В связи с глобальными изменениями климата и повышением температуры мирового океана многие виды симбионт-содержащих кораллов оказываются под угрозой исчезновения. Особенно это касается рифообразующих кораллов, составляющих основу таких богатых по биоразнообразию морских экосистем, какими являются коралловые рифы. Неудивителен возрастающий интерес к проблеме в научной литературе: согласно базе данных Web of Science за последние 10 лет число публикаций, посвященных обесцвечиванию кораллов, выросло почти в 2 раза. Липиды являются структурными, запасными, защитными и сигнальными компонентами как коралловых полипов, так и их симбионтов - зооксантелл. У последних гликолипиды вовлечены в процесс фотосинтеза. Липиды определяют чувствительность мембран к температурным изменениям окружающей среды, определяя их фазовые переходы. Использование липидного подхода позволяет более полно охарактеризовать строение и состав липидов, проводить сравнительные исследования организмов, устанавливать пути биосинтеза и превращения липидов, а также определять их участие в различных физиологических и стрессовых процессах. Таким образом, тема диссертации Татьяны Васильевны **является актуальной**, а поставленная цель, включающая характеристику липидов коралловых полипов, закономерности изменений липидома и их связь с морфологией и физиологией коралла при температурном стрессе, **имеет важное научное значение** для понимания роли липидов у кораллов.

Общая характеристика работы. Диссертация построена по общепринятому плану и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы и четырех приложений. Работа изложена на 154 страницах, содержит 14 таблиц, 34 рисунка, 208 литературных источников, 4 приложения. Во введении (7 стр.) даны общие сведения о кораллах, их экологическом значении и липидах, обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, его научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сообщается о методологии и используемых методах, приведены положения, выносимые на защиту, определена степень достоверности полученных результатов, дана информация об апробации, публикациях, обсуждении работы, личном вкладе соискателя и структуре диссертации. Этот раздел почти полностью повторен в автореферате.

В литературном обзоре (35 стр.) автор сообщает об особенностях кораллов как симбиотических организмах с основным акцентом на симбиозе с микроводорослями-динофлагеллятами, хотя другие возможные симбионты-микроорганизмы также упомянуты. Отдельный раздел посвящен процессу обесцвечивания кораллов, молекулярным и клеточным механизмам потери кораллами зооксантелл, что дает дополнительный довод в пользу актуальности темы исследования. Наиболее обширный раздел литературного обзора сообщает известные данные о липидах кораллов по группам: рифообразующие кораллы, мягкие кораллы, зоантарии, а также симбионтов кораллов - зооксантеллам. При этом зоантарии оказались наименее исследованной группой. Заключительный раздел обзора рассматривает влияние неблагоприятных факторов окружающей среды на состав липидов кораллов. В качестве неблагоприятных факторов автор рассматривает только повышение температуры воды и связанное с этим обесцвечивание кораллов. Изменения состава липидов даны как для кораллов, так и для их симбионтов. В целом, литературный обзор дает хорошее представление об имеющихся литературных данных по теме диссертации, однако автор не сделала итогового заключения, которое бы связывало литературный обзор с последующим изложением результатов и их обсуждением.

Основной раздел диссертации - «Обсуждение результатов» (58 стр.) - разделен на две части: в первой части приведены результаты липидомных исследований кораллов, представляющих три отряда, а также сравнительный анализ липидомов зооксантелл, выделенных из двух видов кораллов разных подклассов; во второй части - изменения липидов у одного из видов кораллов в ответ на тепловой стресс (повышение температуры воды) в условиях эксперимента. В первой части подробно охарактеризованы неполярные

(воски, триацилглицерины, моноалкилдиацилглицерины) и полярные (классы фосфо- и гликолипидов, фосфолипид, а также бетаиновый липид) липидомы трех видов кораллов и зооксантелл, выделенных из двух видов кораллов. В начале соответствующих подразделов описаны подходы липидомного анализа, которые были использованы для установления структуры липидов, указаны методы разделения и основные условия фрагментации, приведены масс-спектры и характеристичные ионы классов липидов (кроме гликолипидов и бетаинового липида), что является весомым аргументом в пользу достоверности полученных результатов. На основании липидомного анализа установлены сходства и различия кораллов из трех отрядов по классам липидов и их молекулярным видам, показаны маркерные липиды организма-хозяина и их симбионтов. Для девяти видов тропических кораллов, представляющих симбиотические мягкие кораллы, симбиотические рифообразующие кораллы и асимбиотические мягкие кораллы, представлен состав восков. Показано, что несмотря на очевидное сходство в составе восков разных групп кораллов, имеющиеся различия обусловлены таксономическим положением и наличием симбиотических зооксантелл. При этом асимбиотические кораллы могут использовать спирты и/или жирные кислоты бактерий для синтеза собственных восков.

Наиболее интересной частью диссертационной работы, на мой взгляд, является исследование липидов коралла при обесцвечивании в результате теплового стресса. Эксперимент повторяли дважды с одним и тем же видом - *Sinularia heterospiculata* - при разных условиях: 40-литровом аквариуме в течение 36 ч и 500-литровом аквариуме в течение 72 ч. Температурный режим в обоих случаях был одинаковый: 27°C для контрольных животных и 33°C для животных в условиях теплового стресса. В первом эксперименте внимание уделяли изменениям в содержании липидов и общего хлорофилла. Во втором кроме липидов исследовали уровень хлорофиллов, содержание зооксантелл, в том числе зооксантелл, подверженных окислительному стрессу, микроанатомию зооксантелл, физиологическое состояние клеток хозяина на основании микроскопических наблюдений и оценки содержания апоптозных, некротических и подверженных окислительному стрессу клеток в тканях организма-хозяина. Такой комплексный подход позволил выявить связь биохимических и физиологических процессов при обесцвечивании кораллов. Повышение температуры воды вызывало снижение доли некоторых структурных липидов (ФХ, ФЭ, исчезновение ФИ), появление лизо-ФЭ и окисленных форм ФЭ, снижение уровня хлорофиллов и липидов, характерных для зооксантелл (МГДГ, ДГДГ, СХДГ, жирной кислоты 18:4n-3), нарушение нормального

суточного ритма молекулярных видов гликолипидов. Во втором эксперименте тепловое воздействие сопровождалось снижением хлорофилл-положительных клеток зооксантелл и увеличению доли клеток, подверженных окислительному стрессу, нарушением ультраструктуры их клеток. Одновременно наблюдали частичную деградацию клеток в тканях хозяина. В итоге автор пришла к заключению, что повышение температуры окружающей среды приводит к фотоокислительному стрессу у микроводорослей-симбионтов, обитающих в ткани коралла. Накопление активных форм кислорода вызывает деструкцию клеток зооксантелл, что в свою очередь запускает воспалительную реакцию у самого хозяина, влекущую за собой развитие некротических явлений в ткани коралла, что может быть губительным для всего организма. Хотя подобные процессы описаны в литературе для симбиотической актинии, Татьяна Васильевна показала изменения в липидах, которыми они сопровождаются. При этом автор впервые обнаружила, что фосфатидилэтаноламин является главной мишенью теплового стресса (появление лизо- и окисленных форм этого фосфолипида).

Раздел «Экспериментальная часть» (8 стр.) описывает объекты и методы исследования в соответствии с требованиями, предъявляемыми к научным публикациям. Выводы основаны на результатах, полученных в ходе исследования, хотя есть замечание к п. 4 (см. ниже). Список литературы включает 208 ссылок. Завершают диссертацию 4 приложения (28 стр.), в которых приведены все исходные результаты, изложенные в работе. Информация, представленная в этих приложениях, во-первых, подтверждает достоверность исследования, а во-вторых, представляет ценный справочный материал по липидому кораллов и зооксантелл для специалистов в этой области.

Диссертационная работа Т.В. Сикорской написана в хорошем научном стиле, хотя не лишена опечаток, неточных выражений, пропусков и ошибок. Среди наиболее существенных необходимо указать следующие:

- 1) Во введении и выводах диссертации неправильно написано видовое название *Simularia siaesensis*, эта же ошибка попала в автореферат. В литературном обзоре (стр. 10) неверно дано название семейства Symbiodiniaceae.
- 2) Заголовок таблицы 8 или подпись к рисунку 5 находятся на отдельных страницах с самими таблицей и рисунком, хотя могли быть размещены на одной странице.
- 3) В литературном обзоре для жирных кислот полярных липидов дана ссылка на табл. 13 (стр. 36), хотя в табл. 13 даны жирные кислоты только для триглицеридов.

- 4) Рис. 8 Б: для МАДАГ не для всех пиков правильно указаны состав ионов (как и на рис. 1 в автореферате).
- 5) Отсутствует ссылка о генетическом различии зооксантелл из альционии и зоантарии (стр. 59).
- 6) Нет единообразия в написании компонентов: стерины/стеролы (стр. 60), глицерин-содержащих липидов (обычно написаны как глицеролы, но также есть как глицерины - стр. 38, 48), фосфолипидов. Например, в выводах есть триацилглицеролы (п. 2) и триацилглицериды (пп. 5, 6), в тексте встречаются и «триглицериды» (стр. 36-37). В перечне используемых сокращений (стр. 113) и по тексту в полном названии ДГДГ, МГДГ и СХДГ оканчиваются на «глицерол», а в выводах - на «глицериды» (пп. 4, 6). Вместо привычных фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и т.д., от которых и происходят использованные в работе сокращения ФХ, ФЭ и т.д., применяются названия «холинглицерофосфолипиды» и «этаноламинглицерофосфолипиды». Хотя иногда применяются и «фосфатидилэтаноламин» (Выводы, пп. 2 и 7). Для сырого веса использованы определения «мокрый», «влажный» и «сырой».
- 7) Стр. 72: Едва ли можно говорить о **резких** различиях в составе неполярных частей ФХ и ФЭ, на что указывает автор, т.к. у них есть общие молекулярные виды, в том числе содержащие тетракозаполиеновые жирные кислоты (Приложение 1, табл. 1).
- 8) Рис. 31: не всегда удастся разглядеть отмеченные структуры на микрофотографиях. Стр. 97: в некоторых случаях неверно даны ссылки на рисунок (указан рис. 31 вместо рис. 30).
- 10) Стр. 101: «Для людей организмы типа Cnidaria (морские анемоны, кораллы, медузы) являются...» - если имеется в виду вид, то правильнее «Для человека...».
- 11) Выводы: формулировка п. 4 представляется неудачной, поскольку содержит, на мой взгляд, излишнее упоминание профиля бетаиновых липидов. Если судить по рис. 13, профили молекулярных видов бетаинового липида ДГКХ отличаются между зооксантеллами ZP и ZS, выделенные из двух разных подклассов кораллов, в меньшей степени, чем профили их гликолипидов МГДГ и ДГДГ.
- 12) В списке литературы в большинстве случаев названия журналов сокращены, однако иногда написаны полностью (например, ссылки 169, 171, 208). Статьи из журнала «Биология моря» даны как в русском написании (ссылка 151), так и в английском (ссылка 101). •
- 13) Приложение 1, табл. 1: Для зооксантеллы ZP даны молекулярные виды для ЦАЭФ, хотя сам фосфолипид в зооксантеллах отсутствует.

14) Приложение 3, табл. 3: сумма восков на 36 ч воздействия отличается от величины, показанной на рис. 17 (стр. 76). При этом необходимо заметить, что тенденция изменений сохраняется. Однако тенденция суммы ТГ и МАДАГ в этой же таблице отличается от изменений этих липидов, показанных на рис. 17.

Учитывая, что такой обширный материал невозможно детально рассмотреть в рамках ограниченного объема кандидатской диссертации, при знакомстве с работой возникли некоторые вопросы:

- 1) Как указывает автор (стр. 60), в литературе (Rosset et al., 2019) описан фосфатидилглицерин для симбиотических динофлагеллят, принадлежащих тем же кладам, что и зооксантеллы, выделенные в этой работе. По какой причине этот фосфолипид, характерный для хлоропластов растений, может отсутствовать в зооксантеллах из кораллов, исследованных в этой работе?
- 2) По мнению автора, какой вклад в состав липидов исследованных симбионт-содержащих кораллов вносят питательные вещества, захватываемые кораллами из окружающей среды? Может ли различия в питании кораллов быть причиной наблюдаемых различий в их липидах?
- 3) Как идентифицировали неметиленразделенные жирные кислоты в составе фосфатидилэтаноламинов?
- 4) С чем можно связать более медленное изменение в содержании липидов (окисленные формы ФЭ, исчезновение ФИ) во втором эксперименте по сравнению с первым?

Главными достоинствами диссертационной работы Татьяны Васильевны являются выполнение исследований на высоком методическом уровне с использованием современных аналитических методов, большой объем полученной информации и комплексный подход при исследовании процесса обесцвечивания. Это свидетельствует о высокой профессиональной квалификации исследователя и гарантирует научную значимость результатов. Полученные автором полные липидомы кораллов и их симбионтов-зооксантелл, совместные липидомные, морфологические и физиологические исследования коралла, подвергшегося тепловому стрессу, составляют новизну, теоретическую и практическую значимость работы Т.В. Сикорской. Могу предположить, что исходные результаты по липидому кораллов, данные в приложениях, будут полезными в сравнительных исследованиях и для дополнительной аналитической обработки. Поэтому рекомендовал бы автору опубликовать эти результаты на специализированных интернет-ресурсах для доступа специалистам в этой области.

Достоверность полученных результатов основывается на использовании современных методов анализа (различные виды хроматографии, масс-спектрометрические методы, электронная микроскопия, флюороцитометрия), нескольких измерений для одного объекта и повторение опытов, статистической обработкой результатов и сравнение с литературными данными. Результаты работы (за исключением повторного эксперимента с обесцвечиванием кораллов) опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Science Citation Index или Science Citation Index Expanded, а также Scopus, апробированы на международных, российских и внутриинститутской конференциях. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и включает все результаты, на основе которых автор формулирует выводы.

Считаю, что по степени актуальности темы, уровню полученных научных результатов, степени их новизны, теоретической и практической значимости, а также по объему и содержанию диссертационная работа «Липидом симбионт-содержащих кораллов и его изменения при экспериментальном обесцвечивании» отвечает требованиям, предъявляемых к кандидатским диссертациям в соответствии с пунктами 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства №842 от 24.09.2013 г., а её автор, Татьяна Васильевна Сикорская, заслуживает присвоения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия.

Официальный оппонент:



Э.В. Некрасов

Некрасов Эдуард Витальевич

кандидат биологических наук (специальность 03.01.04 – Биохимия),

старший научный сотрудник лаборатории интродукции

Амурского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Ботанического сада-института Дальневосточного отделения Российской академии наук
(АФ БСИ ДВО РАН)

675000 Амурская область, г. Благовещенск, Игнатьевское шоссе, 2-й км,

телефон: +7(4162)209509, e-mail: ed_nekrasov@mail.ru

Подпись Э.В. Некрасова заверяю:

Ученый секретарь АФ БСИ ДВО РАН, к.б.н.



И.М. Котельникова