

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
Шульгиной Натальи Сергеевны

«Активность ферментов энергетического обмена и уровень экспрессии генов, регулирующих мышечный рост, у молоди атлантического лосося (*Salmosalar*) в условиях искусственного воспроизводства при влиянии разных режимов освещения»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия

Диссертация Н.С. Шульгиной затрагивает фундаментальные проблемы энергетического обмена, миогенеза и роста рыб под влиянием внешнего фактора – освещения, и имеет перспективу практического использования выявленных закономерностей в условиях искусственного воспроизводства.

Вопросы энергетического обмена, роста и миогенеза рыб были и остаются объектами пристального внимания и изучения, ввиду того, что базовые механизмы, лежащие в основе этих процессов, закладывались в эволюции позвоночных именно у рыб и примитивных бесчелюстных. В то же время, наряду с общими для всех позвоночных закономерностями, энергетика, рост и миогенез (как составляющая роста) у рыб имеют таксонспецифичные черты. Так, на разных стадиях онтогенеза рыб доля участия тех или иных энергетических субстратов последовательно меняется: в обеспечении морфогенеза ведущую роль играет гликолиз; к завершению гастрюляции возрастают масштабы использования белка и липидов; у взрослых рыб основным энергетическим субстратом являются липиды и, в отличие от млекопитающих, в большей степени используются белки. Рост рыб характеризуется разнообразием реализаций так называемой «асимптотической тенденции роста» - «тенденции к бесконечному», а также периодичностью, связанной со стадией онтогенеза, физиологическим состоянием именой условий среды обитания. Рост неразрывно связан с развитием и приростом мышечной ткани, на которую приходится большая весовая доля тканей организма. Миогенез рыб имеет ряд особенностей, связанных с ранней двигательной активностью зародышей, наличием адаксиальных клеток, разными пропорциями медленных и быстрых волокон, ростом мышц на протяжении большей части онтогенеза и другими чертами.

Проблемы регуляции энергетического обмена и миогенеза рыб находятся в центре внимания исследователей, о чем свидетельствует наметившийся с 2005 г. рост числа публикаций по этим разделам в DBP и bMed и PubMed Central NCBI (~ 60,000\60,000). Принадлежность рыб к пойкилотермным определяет зависимость их жизненно важных функций от факторов внешней среды, среди них ключевым, наряду с температурой, является свет. В литературе имеются сведения о влиянии светового режима на рост, пищевое поведение и ритмы размножения рыб. В меньшей степени изучено его влияние на энергетику и миогенез; по этим разделам имеется значительно меньшее число публикаций (NCBI) за последние 20 лет.

Основной проблемой выращивания коммерческих видов рыб в аквакультуре остается вопрос о предотвращении наступления половой зрелости до того, как рыба достигнет товарных размеров. Манипулирование фотопериодом в виде применения постоянного освещения успешно используется в рыборазведении для некоторой задержки полового созревания у атлантической трески, атлантического лосося и европейского морского окуня. Тем не менее, вопросы регуляции миогенеза рыб в условиях разного светового режима относятся к числу малоизученных, это касается, прежде всего, влияния освещения на транскрипционные факторы, контролирующие миогенез.

Преимуществом диссертационной работы Н.С. Шульгиной является выбор объекта, комплексный подход в решении поставленных задачи, преемственность в развитии начатых ранее исследований обменных процессов в онтогенезе данного вида. Выбор атлантического

лосося в качестве модельного объекта представляется идеальным, так как этот вид имеет сложный жизненный цикл, включающий несколько этапов с разной чувствительностью к световому режиму. А его коммерческая востребованность во всем мире дает перспективу использования полученных автором фундаментальных закономерностей в практике искусственного воспроизводства. Комплексный подход заключается также в использовании методов экологической физиологии, биохимии и функциональной геномики. С их помощью автором впервые для лососевых рыб проведен анализ активности ферментов энергетического обмена; дана оценка уровня экспрессии транскрипционных факторов, контролирующих миогенез, негативного регулятора роста и дифференцировки мышечной ткани (миостатина) и гена тяжелой цепи миозина как основного структурного компонента мышечных волокон; и, в конечном счете, дана оценка согласованности этих показателей с весовым приростом молоди лосося в условиях естественного освещения и разного фотопериода – фиксированного режима (16С:8Т) и круглосуточного (24С:0Т). Необходимо отметить, что диссертационная работа Н.С. Шульгиной является логическим продолжением систематических исследований различных вопросов эколого-биохимических адаптаций рыб (в т.ч. лососевых) на протяжении многих лет в рамках научной школы, основанной профессором В.С. Сидоровым.

Выполненное исследование, несомненно, вносит вклад в развитие фундаментальных представлений о механизмах регуляции миогенеза и теории роста рыб, а также имеет практическое значение, в частности, для развития аквакультуры лососевых на рыбноводных хозяйствах Республики Карелия.

Учитывая все вышеизложенное актуальность и новизна рассматриваемой работы не вызывает сомнений.

Основной целью рассматриваемой работы было изучение влияния разных режимов освещения на активность ферментов энергетического обмена и уровень экспрессии генов, регулирующих мышечный рост, у атлантического лосося в условиях искусственного воспроизводства. Для достижения цели Наталья Сергеевна поставила перед собой четыре задачи, с решением которых вполне успешно справилась. Цель и задачи работы сформулированы автором четко и ясно.

Для оценки роста молоди лосося автор использовал весовые характеристики сеголеток и двухлеток в условиях разного светового режима, а также экспрессию гена тяжелой цепи миозина. Для анализа энергетического обмена автор оценивал активность трех ферментов из метаболических путей, поставляющих энергию для организма, - гликолиза и окислительного фосфорилирования. Для оценки регуляции миогенеза были использованы гены транскрипционных факторов и гены-паралоги негативного регуляторного фактора роста и дифференцировки мышечной ткани миостатина. Динамику биохимических показателей автор оценивал путем их сравнительного анализа на протяжении весенне-осеннего и летне-осеннего периодов разных лет. Для оценки взаимосвязи энергообмена и миогенеза автор учитывал связь первого с мышечной активностью, чем и обусловлен выбор ферментов. Для оценки взаимосвязи размеров молоди и мышечного роста автор использовал весовые показатели молоди и экспрессию тяжелой цепи миозина – основного структурного компонента скелетных мышц. Таким образом, выбор всех параметров является обоснованным.

Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов), заключения, выводов, списка используемых сокращений и списка литературы. Работа изложена на 172 страницах, содержит 19 рисунков, 25 таблиц. Список литературы содержит 346 источников, из них 47 отечественных.

Глава 1 «Обзор литературы» изложена на 42 страницах. Глава содержит логически выстроенный ряд основных сведений о роли энергетического обмена в развитии и росте рыб; сведения о ферментах, участвующих в энергетическом обмене, миогенезе и его регуляции, миозине и транскрипционных факторах – регуляторах формирования скелетной

мышечной ткани, а также влиянии фотопериода на развитие и рост лососевых рыб северных широт. Обзор написан четко и ясно; включает всю необходимую информацию. В нем отмечены работы отечественных и зарубежных «классиков» в области энергетики, физиологии и биохимии рыб и практически все современные профильные источники из баз данных PubMed и PubMed Central NCBI.

Глава 2 «Методическая часть» изложена на 18 страницах. Она содержит подробнейшие сведения об объектах исследования, об объеме, отборе и условиях хранения материала, методах определения активности ферментов, выделения нуклеиновых кислот, количественного определения белка и НК, праймерах, условиях проведения ПЦР, а также детальную информацию об экспериментах с использованием разных режимов освещения, данные о температуре воды и перечень методов статистического анализа. Раздел снабжен подробными схемами экспериментов и температурными кривыми (4 рисунка) и пятью таблицами. Использованные автором методы адекватны поставленным задачам, они обеспечили получение достоверных результатов, что подтверждают сведения статистической обработки данных.

Глава 3 «Результаты исследования» изложена на 36 страницах. В ней автор последовательно приводит результаты первого и второго экспериментов. Для каждого эксперимента и каждой возрастной группы результаты представлены по схеме: оценка влияния режимов освещения 1. на рост, 2. на активность ферментов энергетического обмена, 3. на экспрессию тестируемых генов и 4. оценка взаимосвязи исследуемых показателей с массой рыб.

Глава 4 «Обсуждение результатов» изложена на 27 страницах. В ней перечислены все выявленные автором закономерности взаимосвязи активности ферментов энергетического обмена, экспрессии МРФ, МуНС и миостатина, и их согласованность с показателями прироста массы рыб из контрольных и экспериментальных групп с разными режимами освещения. Для их анализа автор привлекает обширный материал из литературных источников. Отчасти это приводит к повторам из раздела "Обзор литературы", но они обусловлены необходимостью сопоставления и подкрепления полученных результатов имеющимися сведениями в разрабатываемой области. Выявленные различия в приросте массы в разных группах молоди, находящихся в различных условиях светового режима автор объясняет разной степенью изменений в уровнях аэробного и анаэробного обмена, и комплексным влиянием регуляторов миогенеза на состояние мышечных волокон, зависящих от сезонных факторов, включая температуру, момента запуска режима круглосуточного освещения и возраста рыб, что в совокупности и определяет эффект круглосуточного освещения на прирост массы рыб. **По разделу влияния режимов освещения на рост** молоди 0+ и 1+ автором установлен ряд закономерностей. И у сеголеток и у двухлеток отмечено влияние режима освещения 24С:0Т на прирост массы тела, но у первых он превосходил данный показатель в других группах, а у вторых уступал контрольной группе. Прирост веса у рыб 0+ автор связал с увеличением светового периода и активного питания, с нейроэндокринными изменениями, стимулирующими аппетит и пищевое поведение, и с перераспределением энергетических ресурсов в сторону прироста массы тела. Пониженный прирост у рыб 1+ автор объяснил стрессом рыб на введение дополнительного освещения, вследствие чего у них снижался аппетит, а замедлились темпы роста. Автор предположил, что для рыб 1+ нужен период акклиматизации к новому световому режиму и для проявления его стимулирующего эффекта требуется продление режима 24С:0Т. **По разделу влияния режимов освещения на активность ЦО, ЛДГ и альдолазы белых мышц** у сеголеток и двухлеток автор приводит данные по межгрупповым различиям в активности мышечных ферментов. Изменение активности ферментов у рыб 0+ автор объясняет повышением уровней аэробного и анаэробного обмена в мышцах при режиме 24С:0Т, для обеспечения энергией как основного обмена и двигательной активности, так и биосинтеза в мышцах, требующего АТФ. Интенсификация энергетического обмена может быть связана с ростом пищевой активности рыб и

эффективности преобразования питательных веществ при длительном освещении. Изменение активности ферментов у 1+ (эксп.1) через месяц режима 24С:0Т происходило на фоне пониженного прироста массы в сравнении с контролем. Автор объяснил его возобновлением пищевой активности рыб и усилением аэробного обмена в мышцах, и с компенсаторным ростом после акклиматизации к режиму 24С:0Т, который (в отличие от режима 16С:8Т), может эффективно влиять на процессы регуляции роста и связанный с ними аэробный обмен в летний период при естественной длине светового дня >16 часов. Рыбы 1+ (эксп.2), находящиеся при круглосуточном освещении включая зимний период, - имели на протяжении эксперимента более низкую активность всех ферментов по сравнению с контролем и рыбами из группы с 24С:0Т, которые в предыдущий год росли без дополнительного освещения. Снижение активности ферментов в группе с наибольшим приростом массы тела автор связывает с тем, что дополнительное освещение привело к адаптивным перестройкам метаболических путей и перераспределению доступных ресурсов и энергии, поступающих за счет энергетического и углеводного обмена в мышцах и необходимых в период активного роста рыб. В этом же разделе автор отмечает зависимость изменений активности ферментов от температуры воды, объясняя ее более высоким уровнем обменных процессов в летний период и их снижением в осенний период. В разделах по **влиянию освещения на уровни экспрессии генов тяжелой цепи миозина, МРФ и миостатина в белых мышцах молоди** приведены данные, согласно которым в исследуемых группах 0+ и 1+ в контроле и при разных режимах освещения имела место дифференциация по уровню экспрессии генов тяжелой цепи миозина и 5-ти транскрипционных факторов - Myf5, MyoG, MyoD1a, MyoD1b, MyoD1c. По мнению автора, данное обстоятельство может отражать как различия в регуляции интенсивности процессов миогенеза, связанные с условиями освещения, так и возрастные особенности рыб. Различия в уровнях экспрессии паралога гена миостатина (MSTN1a и MSTN1b) и их положительную корреляцию с экспрессией генов MyHC и миогенных регуляторных факторов (МРФ), свидетельствуют, по мнению автора, об их участии в механизме регуляции интенсивности процессов миогенеза и контроле роста мышц. Межгрупповые различия в уровнях экспрессии генов трех генов - MyoD1a, MyoD1b и MyoD1c (эксп.1, 2), отражают, по мнению автора, различия в функциональной роли паралога MyoD1 в регуляции миогенеза, и могут быть связаны изменением их активности под влиянием разной продолжительности светового дня. На основе анализа экспрессии паралога гена MyoD1, автор предположил идущий (после события полногеномной дупликации) процесс их субфункционализации и связанные с ней особенности регуляции миогенеза у лососевых.

В Заключение автор подводит итог исследования, представляет все выявленные и рассмотренные в предыдущих главах закономерности. Глава воспринимается в виде отчета о проделанной работе, что является оправданным шагом, так как систематизирует и делает более доступным для восприятия достаточно сложный и большой по объему материал. Все основные результаты работы перечислены в разделе **Выводы**. Они целиком соответствуют поставленным задачам и положениям, вынесенным для защиты.

В целом, научные положения диссертации, защищаемой автором, выводы, полученные на основе большого экспериментального материала, достоверность которого подтверждена используемыми статистическими методами анализа, рекомендации по использованию результатов работы хорошо обоснованы.

Результаты диссертационной работы и сделанные на их основе заключения и выводы имеют эффект новизны, расширяют имеющиеся к настоящему времени в фундаментальной литературе знания о влиянии светового режима на показатели жизнедеятельности рыб и вносят вклад в понимание влияния света на механизмы миогенеза и, в целом, роста рыб. Они могут быть использованы при составлении лекционных курсов, учебников и учебных пособий для общебиологических специальностей вузов. В практическом отношении результаты работы могут быть востребованы для усовершенствования технологий выращивания молоди лосося на рыбноводных хозяйствах Республики Карелия.

Как и всякая работа, диссертация Н.С. Шульгиной не лишена недостатков.

1. В Обзоре литературы в плеяде отечественных корифеев по разрабатываем в диссертации проблемам уместно наряду с Г.Е. Шульманом, М.И. Шатуновским и Н.Д. Озернюком процитировать М.В. Мину и Г.А. Клевезаль в связи с их известным фундаментальным трудом «Рост животных».
2. Краткие наименования генов рыб пишут с маленькой буквы согласно UniprotKB и NCBI (для человека используют прописные буквы, для млекопитающих название гена начинается с прописной буквы). Во многих журналах этих правил не придерживаются. Однако, при сравнительных исследованиях генов разных групп животных разные способы наименований облегчают систематизацию и восприятие материала.
3. Хотелось бы иметь представление о состоянии рыб в условиях круглосуточного освещения. Сведений по выживанию рыб и приросту их массы для этого все же недостаточно. Более информативными были бы показатели уровней маркеров стресса в крови экспериментальных рыб – кортизола и глюкозы. Планируются ли такие работы?
4. По поводу названия режима освещения 16С:8Т – общепринято ли называть этот режим переменным? Может лучше было бы назвать его фиксированным?
5. Список используемых сокращений в такой насыщенной терминами работе должен быть более широким.

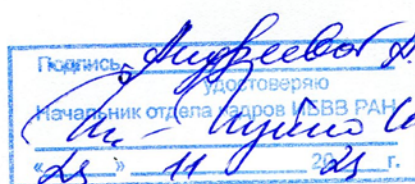
Хочется отметить, что в тексте диссертации практически нет грамматических ошибок. На стр.86 две таблицы пронумерованы одним номером.

Все перечисленные замечания не затрагивают существа и выводов этой фундаментальной работы. Результаты экспериментальных исследований обсуждены в материалах 11 международных, российских и региональных конференций и школ и опубликованы в 5 статьях из «Белого списка», в том числе в рецензируемых журналах, утвержденных ВАК, и 13 тезисов и материалов докладов. Содержание автореферата соответствует материалу, представленному в диссертации. Диссертация соответствует специальности, по которой она представлена к защите.

В целом, рассматриваемая диссертационная работа по актуальности, новизне, объему, достоверности полученных материалов, степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» № 842, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Шульгина Наталья Сергеевна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

доктор биологических наук
по специальностям 03.00.04 – биохимия и 03.00.10 - ихтиология
заведующий лаборатории экологической биохимии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии внутренних вод РАН
152742, Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, 109
Тел. 8-962-211-38-22; e-mail: aam@ibiw.ru

Андреева Алла Михайловна



23.11.2023г.