

ОТЗЫВ

официального оппонента

профессора, доктора биологических наук, профессора кафедры морфологии и экологии животных Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского» Аникина Василия Викторовича на диссертационную работу Кучеренко Елены Евгеньевны «Энантиомеры *втор*-бутилдодецен-2-оата – новые половые аттрактанты *Zygaenidae*», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия в диссертационный совет 24.2.318.08 (Д 900.006.14) при ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» по адресу: 295007, Республика Крым, г. Симферополь, проспект академика Вернадского, 4

Диссертация Кучеренко Елены Евгеньевны представляет целенаправленное исследование синтеза энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата, их биологической активности (в отдельности и в рацемической смеси) как половых аттрактантов *Zygaenidae* (Lepidoptera), разработку рекомендаций по их практическому применению.

Тема диссертации очень **актуальна** в силу недостаточности и фрагментарности современных исследований феромонных систем абсолютного большинства групп насекомых, включая и структуры половых феромонов в семействе *Zygaenidae*.

Поставленная диссертантом **цель работы** – синтезировать энантиомеры *втор*-бутилдодецен-2-оата, изучить их биологическую активность (в отдельности и в рацемической смеси) как половых аттрактантов *Zygaenidae* (Lepidoptera) и разработать рекомендации по их практическому применению – была в полной мере достигнута автором благодаря решению хорошо скоординированных и **четко поставленных задач** работы.

Так, был осуществлен синтез половых аттрактантов *Zygaenidae* на основе полученных авторских данных об особенностях хемокоммуникации биологических видов данного семейства; дана оценка аттрактивности и видоспецифичности полученных половых аттрактантов в условиях естественных и антропогенных (агробиоценозов) биотопов; проведено сравнение биологической активности синтезированных веществ и подобран эффективный состав хеоаттрактантов для представителей разных видов *Zygaenidae*; разработаны рекомендации по использованию энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата для практических применений в сельском хозяйстве.

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что впервые Кучеренко Е. Е. синтезированы новые половые аттрактанты *Zygaenidae*, представляющие собой сложные эфиры, *R*- и *S*-энантиомеры *втор*-бутилдодецен-2-оата. Это эффективный и малостадийный синтез новых половых аттрактантов *Zygaenidae* на основе доступного сырья: бутанола-2 и его *R*- и *S*-энантиомеров, лауриновой кислоты, жирных кислот рыбьего жира. Впервые

диссертантом установлены аттрактивные свойства видовой и половой специфичности полученных соединений для самцов 17 видов Zygaenidae подсемейства Procridinae, относящихся к шести родам. Впервые были открыты половые аттрактанты для самцов семи видов Procridinae, включая эндемичный вид Иберийского полуострова – *Rhagades (Wiegelia) predotae* и нового для науки вида *Goazrea lao*. При изучении полового поведения самцов в присутствии запаха синтезированных аналогов половых феромонов Еленой Евгеньевной было показано существование нескольких типов влияния аттрактивных компонентов, таких как взаимный синергизм, ингибирование.

Теоретическая и практическая ценность работы заключается в развитии представления о биосинтезе компонентов феромонов в организмах и взаимодействии феромонов/аттрактантов с рецепторами, что позволяет в свою очередь оценить поведенческий контекст коммуникаций и взаимодействие разных типов стимулов по привлечению и распознаванию видов. Кроме того, это позволяет оценить с новых позиций филогенетические связи между таксонами Lepidoptera и эволюцию сигнальных молекул у представителей семейства Zygaenidae.

Разработанные методы применения адгезивных ловушек или переносных приманок с новыми половыми аттрактантами в полевых исследованиях позволяют не только обнаруживать конкретные виды Procridinae в биотопах и выявлять их популяции с низкой плотностью, но и изучить сезонную динамику численности видов, уточнить границы ареалов видов. Особо следует отметить вклад автора по разработке практических рекомендаций и получение патента РФ на способ привлечения и отлова самцов вредителя виноградарства в Средиземноморском регионе *Theresimima ampellophaga*, что позволяет совершенствовать систему защиты сельскохозяйственных и декоративных культур от данного вредителя на территории Республики Крым.

Диссертационная работа Кучеренко Е. Е. выполнялась в рамках научно-исследовательских работ кафедры биохимии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» по темам: «Применение комплекса биохимических, иммунологических, молекулярно-генетических и спектральных методов для изучения иммуноглобулинов человека при патологии, а также решения вопросов эволюционной биологии и хемокоммуникации биологических видов» (№ государственного учёта НИОКТР РФ АААА-А19-119011790032-0), «Использование молекулярных методов для решения эволюционно-биологических проблем и изучения иммуноглобулинов человека» (№ государственной регистрации МОЗ Украины 0113U002992). Определенные блоки исследований проведены диссертантом совместно с иностранными коллегами во время реализации международного научного проекта «Synthesis and study of pheromone molecules» (Tiroler Landesmuseen, Ferdinandeum (Австрия)). Всё это доказывает связь представленной работы с научно-исследовательскими программами и темами.

Методическое обеспечение проведенного исследования вполне достаточно для **достоверности** полученных результатов. Так, диссертантом были ис-

пользованы традиционные и современные молекулярные методы в энтомологии для решения эволюционно-биологических задач (получения новых фундаментальных знаний в области хемокоммуникации Lepidoptera, анализа филогенетических связей Zygaenidae). Биохимические методы включали в себя: аналитические (моделирование пространственных структур молекул на основе анализа строения уже известных аттрактантов и феромонов Zygaenidae); физико-химические (синтез энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата, идентификация структуры целевых продуктов с помощью поляриметрии, газо-жидкостной хроматографии и ЯМР-спектроскопии); сравнительные (сравнение степени привлекательности стереоизомеров половых аттрактантов во время скрининг-тестов в природных биотопах и агробιοценозах); вероятностно-статистические (анализ достоверности полученных результатов).

Результаты полевых испытаний аттрактантов анализировались автором с помощью непараметрических критериев: Краскела–Уоллиса для оценки групповых различий и *U*-критерия Уилкоксона (Манна–Уитни) для попарного сравнения (Лакин, 1990). Для статистической обработки полученных данных и визуализации результатов использовались диссертантом программы PAST v3.23 и программная среда R (R Core Team, 2020).

Сведения о составе половых феромонов и химической структуре половых аттрактантов привлечённых видов, а также их научная новизна проверялись Еленой Евгеньевной по электронной глобальной базе данных «The Pherobase» (www.pherobase.com).

По результатам исследований диссертантом сделаны доклады в 2015–2021 гг. на 15 конференциях регионального, всероссийского и международного уровней. Участие в конференциях и выступления с результатами диссертационной работы подтверждают, что основные результаты исследований Кучеренко Е. Е. были **в полной мере апробированы**.

Кроме того, научные результаты диссертации опубликованы автором в рецензируемых научных изданиях: 12 статей (из которых 11 статей – в журналах, рекомендованных ВАК Минобразования России, из них 8 – в журналах, индексируемых в SCOPUS и Web of Science). Получен 1 патент РФ на изобретение.

В целом, это свидетельствует о высоких показателях **личного вклада Елены Евгеньевны** в заявленное диссертационное исследование. Научные положения, выводы, практические рекомендации обоснованы и подкреплены обширным экспериментальным материалом.

Диссертация **написана по традиционному плану** и изложена на 155 страницах машинописного текста, состоит из введения, трёх глав, заключения с выводами, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, приложений. Библиография включает 264 литературных источника, из них 195 – на иностранных языках. Иллюстративный материал представлен 28 рисунками и 8 таблицами.

Кратко остановимся на содержании глав диссертационной работы.

Во **Введении** (на 8 стр.) обосновываются актуальность исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, апробация работы, объем и структура диссертации.

Цель сформулирована четко и ясно. Задачи соответствуют поставленным целям. Заявлены положения (2), выносимые на защиту работы.

В целом – эта вводная часть диссертации представляет собой повторение одноименных блоков автореферата.

Глава 1 (на 26 стр.) посвящена обзору научных источников по тематике авторских исследований – половые феромоны как средства химической коммуникации насекомых, химическая структура половых аттрактантов чешуекрылых из семейства Пестрянок, перспективы использования половых аттрактантов для нужд человека. Содержание данной главы диссертационной работы свидетельствует о хорошем знании автором современного состояния изученности решаемой научной проблемы, что позволило в свою очередь ему четко обосновать цели и задачи своего диссертационного исследования.

Глава 2 (на 13 стр.) представляет собой описание методов, материала и районов исследования. Автор аргументирует необходимость предварительного прогнозирования молекулярной структуры веществ с потенциально аттрактивными свойствами. В тексте главы подробно освещены разработанные методики синтеза сложных эфиров бутанола-2 и ненасыщенных жирных кислот. Сформулирована основная научная гипотеза исследования, то что указанные эфиры – возможные половые аттрактанты представителей семейства *Zygaenidae*; описаны методы ее верификации. Были выделены четыре основных параметра, гипотетически ответственных за проявление аттрактивной активности.

С целью проверки гипотезы и действия синтезированных аттрактантов автором было проведено 200 полевых экспериментов в Крыму (11 различных биотопов) и использован полевой материал коллег из зарубежных стран (9) Евразии. Полевые эксперименты имели два направления: 1) тестирование синтетических половых аттрактантов для подтверждения их активности в отношении конкретных биологических видов; 2) проведение работ по оптимизации количественного и качественного состава привлекающих приманок.

Все используемые Кучеренко Е. Е. в исследованиях методы апробированы и не вызывают сомнения. Все вышеизложенное позволяет считать **методическое обеспечение** данного исследования **вполне достаточным**, чтобы **достоверно** оценить полученные результаты, обосновать научные положения и выводы диссертации, которые в полном объеме были представлены уже в следующей главе работы.

Глава 3 (на 59 стр.) является результирующей частью диссертационной работы. Основой этой работы служит полученный «богатый» фактический полевой материал как в качественном, так и в количественном отношении. Научный текст главы изложен четко и последовательно, хорошо иллюстрирован. Важно отметить, что все полученные в ходе исследования научные факты изложены в сравнительном аспекте, а рассматриваемые подглавы имеют свое логическое завершение в виде собственных выводов. При обсуждении полученных данных их анализ трактуется автором в рамках собственной идеи о причинах и механизмах, обуславливающих различия или сходства в привлечении самцов отдельных видов *Procridinae* на аттрактивные приманки. Однако при этом не забываются и представленные ранее коллегами точки зрения по вопро-

су исследований. Такой авторский подход к обоснованной трактовке результатов исследований свидетельствует о **становлении Кучеренко Е. Е. как ученого и специалиста** в своей области знаний.

Заслуживает также внимания разнообразие целей поставленных диссертантом экспериментов: доказательство аттрактивных свойств синтезированных веществ, оценка их видоспецифичности, определение активного радиуса действия приманок, сравнение биологической активности новых половых аттрактантов и природных половых феромонов, подбор оптимального состава и объема аттрактантов в приманках и др. Все это подчеркивает комплексный подход к решению поставленной научной задачи. Представленные результаты полевых испытаний EFETOV-S-2 и EFETOV-S-S-2 за пределами Крыма показали их аттрактивные свойства в отношении ещё нескольких видов Procridae, не встречающихся в Крыму! Таким образом, заложенная авторская **теоретическая гипотеза была с успехом подтверждена этими исследованиями**. В пятой подглаве приведена информация об апробации и внедрении результатов исследования в отношении вида-вредителя *Theresimima ampellophaga*. Это еще раз демонстрирует **значимость данной работы в её практической составляющей**.

Очень интересно (с точки зрения оппонента) представлен текст в 6 подглаве о возможном пути эволюции половых феромонов у представителей семейства Zygaenidae. Сделанный анализ данных о строении половых феромонов и аттрактантов как у Zygaenoidea, так и у систематически близких надсемейств Sesioidea и Cossioidea и взятого в качестве сестринской группы надсемейства Tortricoidea показал их схожесть! Это объективно говорит в пользу того, что указанная группа соединений (сложные эфиры уксусной кислоты и жирных спиртов) – эволюционно более древняя, чем сложные эфиры втор-бутилового спирта и жирных кислот.

Завершает текстовую Основную часть диссертационной работы **Заключение с 6 Выводами** (на 3 стр.). Отдельным разделом представлены **Практические рекомендации** (на 1 стр.).

В целом, диссертационная работа Кучеренко Е. Е. представляет собой важное, интересное и профессионально выполненное исследование, соответствующее статусу научно-квалификационного труда с явными отправными точками для дальнейшего планирования научной работы, и её (диссертацию) следует охарактеризовать положительно, а диссертанта – как современного ученого биохимика и энтомолога, вдумчивого, внимательного и широко эрудированного исследователя (теоретика и практика) в области биохимии феромонов насекомых.

Вопросы и замечания по содержанию диссертации: в целом по структуре и содержанию диссертационной работы принципиальных замечаний нет, вместе с тем у оппонента имеется ряд замечаний и вопросов:

1. В Главе 2 Материал и методы в подглаве 2.2. (стр. 38) следовало указать, на базе какой лаборатории осуществлялся синтез аттрактантов Procridae.

2. Здесь же в подглаве 2.4. (стр. 43) следовало указать общее число привлеченных самцов на ловушки с синтезированными аттрактантами. Отдельные

сведения о количестве собранного материала можно почерпнуть только для отдельных годов полевых исследований и видов из табл. 3.1 (стр. 51), табл. 3.2 (стр. 57), табл. 3.3 (стр. 66), табл. 3.4 (стр. 79); из рис. 3.2 (стр. 54), рис. 3.4 и рис. 3.5 (стр. 60), рис. 38 (стр. 67); из текста на стр. 62 и 69. Общее количество «привлеченных» аттрактантами самцов Procridinae в 2960 экз. указано в Заключение (стр. 107).

3. В Главе 3 в подглаве 3.5 на стр. 87 (рис. 3.17) приведены результаты эксперимента по привлечению самцов *Theresimima ampellophaga* к аттрактанту EFETOV-2, тестируемому в различных дозах в 2015 году в Крыму, а именно: 1 мкл, 10 мкл, 100 мкл, 200 мкл. При этом показано, что оптимальной для существенного повышения привлекающей способности аттрактанта EFETOV-2 является доза в 100 мкл. Однако в этом же параграфе далее говорится, что «наиболее эффективными для привлечения самцов *Th. ampellophaga* являются синтетические половые аттрактанты EFETOV-2 и EFETOV-S-2 в объёмах 50 и 100 мкл». Возникает вопрос, на чем основано это утверждение, если при расфасовке аттрактанта EFETOV-2 не была представлена доза в 50 мкл?

4. Здесь же в подглаве 3.5 (на стр. 89) для полевого эксперимента в Турции указывается, что самцы *Th. ampellophaga* прилетали только в ловушки с EFETOV-S-2, а ловушки с EFETOV-2 оставались пустыми. Автор трактует эту вариабельность привлекательности как эколого-географическую изменчивость видоспецифичности полового аттрактанта (при соотношении компонентов 1:1). Если бы автор применил двухкомпонентные композиции с другим процентным содержанием *R*- и *S*-энантиомеров, например 30:100 или 100:50 – изменился бы результат привлечения самцов в ловушки и правомочно тогда было бы говорить об эколого-географической изменчивости полового аттрактанта?

5. В ЗаклЮчении в выводе №1 (стр. 108) читаем: «Разработана относительно простая, малостадийная схема получения ранее неизвестных половых аттрактантов Zygaenidae, которые представляют собой сложные эфиры бутанола-2, его *R*- и *S*-энантиомеров и додецен-2-овой кислоты». Автор неоднократно подчеркивает сходство в строении указанных веществ и компонентов известных половых феромонов Zygaenidae, но при этом не акцентирует внимание на явных преимуществах предлагаемой в работе схемы получения новых аттрактивных веществ по сравнению с «многостадийным стереоселективным синтезом» половых феромонов, описанным в литературе.

6. Здесь же в Выводах №5 (стр. 109) утверждается что «Благодаря ... открыты один новый род и вид ... - *Goazrea lao*; уточнены границы ареалов *Th. ampellophaga*, *Rh. (Rh.) pruni* и *J. (J.) globulariae*». Следовало резюмировать, что - «синтезированные аттрактанты способствовали нахождению и описанию новых таксонов из подсемейства Procridinae. Уточнены границы распространения *Th. ampellophaga* в Крыму, Турции, Албании, *Rh. (Rh.) pruni* и *J. (J.) globulariae* на территории Крыма». Представленные территории лишь небольшая часть ареала каждого вида.

7. На взгляд оппонента Практические рекомендации (стр. 100) следовало включить в Заключение.

Других замечаний у оппонента нет и он уверен, что на все сделанные замечания по тексту диссертации сможет получить от автора правомерные и разъясняющие ответы. Поставленные вопросы и сделанные замечания не снижают научной ценности проведенной диссертантом работы.

Таким образом, диссертационная работа Кучеренко Е. Е. представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком профессиональном уровне. Она хорошо оформлена, иллюстрирована достаточным объемом рисунков и таблиц и оставляет очень хорошее впечатление. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационной работы, публикации в полной мере отражают основное содержание диссертации.

Заключение. Автореферат и 35 публикаций, 11 из которых – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, включая 8 – в журналах, индексируемых в SCOPUS и Web of Science, посвященные разработке новых половых аттрактантов Zygaenidae, полностью отражают содержание диссертации. Диссертационная работа Кучеренко Елены Евгеньевны «Энантиомеры вторбутилдодецен-2-оата – новые половые аттрактанты Zygaenidae» является самостоятельным завершенным научным трудом, выполненным на высоком научно-методическом уровне, в котором решена задача синтеза биологически активных веществ – половых аттрактантов Zygaenidae, имеющая важное значение для развития биохимии и отвечает паспорту специальности 1.5.4 – Биохимия. По актуальности, объему проведенных исследований, новизне, теоретической и практической значимости представленная диссертация полностью отвечает критериям пунктов 9-11, 13-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями, внесенными постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, от 01.10.2018 г. №1168, от 20.03.2021 г. №426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор Кучеренко Елена Евгеньевна успешно представила законченное научное исследование и заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Аникин Василий Викторович
доктор биологических наук,
профессор, профессор кафедры морфологии
и экологии животных ФГБОУ ВО «Саратовский
национальный исследовательский государственный
университет имени Н.Г. Чернышевского»,
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 5
Биологический факультет, тел:+7 (8452) 51-16-30
AnikinVasiliiV@mail.ru

8 февраля 2022 г.

Подпись	<i>В.В. Аникин</i>
Ученый секретарь доцент	<i>И.В. Федосеев</i>
" 8 "	<i>02</i>
	2022