

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора биологических наук, профессора, зав. кафедрой биоразнообразия и биоэкологии ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» В.Л. Вершинина на диссертационную работу Шаповаловой Кристины Вадимовны "Адаптивные реакции костного мозга и развитие окислительного стресса у прудовых и озерных лягушек, обитающих в различных гидрохимических условиях среды", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки)

Индивидуальная аккомодация во многом определяется способностью организма инактивировать свободные радикалы, нормализовать про- и антиоксидантный баланс. Система гомеостаза в первую очередь реагирует на меняющиеся условия среды. По этой причине изучение иммуногематологических ответов на примере первых наземных позвоночных – амфибий весьма перспективно. Таким образом, актуальность диссертационного исследования К.В. Шаповаловой не вызывает сомнений.

Цель работы: определение эколого-физиологических показателей иммуногемопоэза природных популяций индикаторных видов амфибий в условиях воздействия комплекса гидрохимических факторов водных объектов Верхнего Поволжья (на примере Нижегородской области).

Содержание данной работы связано с изучением иммуногематологических показателей, способствующих поддержанию популяционного гомеостаза и обеспечивающих адаптацию животных к условиям антропогенной трансформации среды.

Работа К.В. Шаповаловой представляет собой рукопись общим объемом 146 страниц. Иллюстрирована 32 таблицами и 34 рисунками. Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы из 174 источников (в том числе 39 на иностранных языках).

По теме диссертации К.В. Шаповаловой опубликовано 22 работы, из которых 6 в изданиях, входящих в Перечень ВАК РФ и международные реферативные базы данных и системы цитирования; 15 - статей и тезисов в материалах международных и российских конференций и 1 учебное пособие. В работах отражены все основные положения и выводы диссертации. Результаты исследований неоднократно обсуждались на международных, всероссийских, региональных симпозиумах, конференциях и совещаниях.

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора биологических наук, профессора, зав. кафедрой биоразнообразия и биоэкологии ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» В.Л. Вершинина на диссертационную работу Шаповаловой Кристины Вадимовны "Адаптивные реакции костного мозга и развитие окислительного стресса у прудовых и озерных лягушек, обитающих в различных гидрохимических условиях среды", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки)

Индивидуальная аккомодация во многом определяется способностью организма инактивировать свободные радикалы, нормализовать про- и антиоксидантный баланс. Система гомеостаза в первую очередь реагирует на меняющиеся условия среды. По этой причине изучение иммуногематологических ответов на примере первых наземных позвоночных – амфибий весьма перспективно. Таким образом, актуальность диссертационного исследования К.В. Шаповаловой не вызывает сомнений.

Цель работы: определение эколого-физиологических показателей иммуногемопоэза природных популяций индикаторных видов амфибий в условиях воздействия комплекса гидрохимических факторов водных объектов Верхнего Поволжья (на примере Нижегородской области).

Содержание данной работы связано с изучением иммуногематологических показателей, способствующих поддержанию популяционного гомеостаза и обеспечивающих адаптацию животных к условиям антропогенной трансформации среды.

Работа К.В. Шаповаловой представляет собой рукопись общим объемом 146 страниц. Иллюстрирована 32 таблицами и 34 рисунками. Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы из 174 источников (в том числе 39 на иностранных языках).

По теме диссертации К.В. Шаповаловой опубликовано 22 работы, из которых 6 в изданиях, входящих в Перечень ВАК РФ и международные реферативные базы данных и системы цитирования; 15 - статей и тезисов в материалах международных и российских конференций и 1 учебное пособие. В работах отражены все основные положения и выводы диссертации. Результаты исследований неоднократно обсуждались на международных, всероссийских, региональных симпозиумах, конференциях и совещаниях.

Материал собран в ходе полевых и лабораторных исследований, проведенных в течение 2016–2019 гг. на территории Нижегородской области. Общий объем материала составляет 283 особи озерной лягушки и 135 прудовых лягушек. Уровень загрязненности местообитаний определялся на основе гидрохимических анализов поверхностных вод, проведенных с помощью спектрофотометра Hach DR-2800 с последующим расчетом удельного комбинаторного индекса загрязненности воды УКИЗВ. В расчетах учитывали показатели, превышающие норматив качества воды для водоемов рыбохозяйственного назначения (ПДК<sub>рыб-хоз</sub>).

Оценка состояния исследуемых популяций проведена с использованием комплекса физиологических методов: метода определения клеточного состава костного мозга (миелограмма) амфибий с расчетом интегрального индекса миелограммы (отношение суммы клеток миелоидного ряда к сумме клеток эритроидного ряда); метода определения содержания эритроцитов, количественного и качественного лейкоцитарного состава крови (лейкоцитарная формула) амфибий, с расчетом 7 интегральных лейкоцитарных индексов; метода окислительной модификации белков (по уровню карбонильных производных) и свободно радикального окисления сыворотки крови амфибий. Выполнена оценка спонтанной окислительной модификации белков (ОМБ) сыворотки крови лягушек (по уровню карбонильных производных). Показатели свободно-радикального окисления оценивали методом индуцированной перекисью водорода и сульфатом железа хемилюминесценции на биохемилюминометре БХЛ-07.

Статистический анализ результатов выполнен с помощью комплекса современных методов непараметрической, а также многомерной статистики.

Все основные положения и выводы работы обоснованно аргументированы. Автором выполнена вся математическая обработка первичного материала, сформулированы все выводы и положения работы.

Научная новизна работы состоит в том, что К.В. Шаповаловой впервые выполнены комплексные исследования системы крови бесхвостых амфибий рода *Pelophylax* в градиенте антропогенного загрязнения среды на территории Нижегородской области. Выявлены адаптивные видоспецифические реакции на уровне эритроидного и миелоидного ростков костного мозга прудовых и озерных лягушек, обитающих в различных по уровню загрязнения условиях среды. Для *P. lessonae* выявлена более выраженная активизация эритропоэтической активности кроветворения в то время как адаптивной реакцией *P. ridibundus* являлось изменение соотношения клеточного состава

костного мозга и активация клеток миелоидного ряда, обеспечивающих впоследствии механизмы врожденной естественной резистентности организма. Показана информативность интегральных лейкоцитарных индексов, как популяционных маркеров иммунного статуса амфибий. Впервые выявлена видоспецифичность окислительных реакций в сыворотке крови амфибий, более интенсивно проявляющихся у *P. lessonae*, по сравнению с *P. ridibundus*. Впервые показано, что в условиях повышенного загрязнения водной среды обитания показатели про-, антиоксидантного равновесия в организме зеленых лягушек смещаются в сторону интенсификации свободно-радикального окисления и усиления работы антиоксидантной системы.

Во введении автором аргументировано обосновывается проблематика диссертационного исследования, грамотно сформулированы цели и задачи исследования, а также основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1 представляет собой обзор отечественной и зарубежной научной литературы, в котором К.В. Шаповаловой приводятся современные сведения характеризующие вопросы исследования гемопоэза амфибий; вопросы свободно-радикального окисления и их продуктов, как медиаторов межклеточных взаимодействий, участвующих в адаптивных реакциях и работе защитных систем (иммунной системы, системы детоксикации и др.) организма животных.

Глава 2 содержит подробную информацию о местах и времени сбора материала, его объемах, подходах в оценке качества среды на основе состояния прибрежных вод, а также использованных полевых и лабораторных методах и особенностях статистического анализа данных.

В главе 3 автор приводит характеристику абиотических условий обитания зеленых лягушек г. Н. Новгорода и Нижегородской области с использованием удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ). Определен класс качества воды, также проведена логарифмическая трансформация  $\log(x+1)$  полученных индексов. На основании анализа гидрохимических особенностей с применением кластерного анализа и метода главных компонент были выделены четыре отдельных кластера водных объектов.

Следует отметить, что загрязнение всех исследованных водоемов было относительно высоким (по содержанию железа, меди и хрома) применительно к используемым ПДК<sub>рыб-хоз</sub>. Поэтому правильнее на наш взгляд, говорить о градиенте загрязнения.

Сравнительный анализ клеточного состава костного мозга исследуемых видов в зависимости от гидрохимических показателей среды приведены К.В. Шаповаловой в главе 4. Показано, в условиях более высокого загрязнения водных объектов, у *P. ridibundus* наблюдается перестройка клеточного баланса, проявляющаяся в увеличении количества миелоидных и снижении числа эритроидных клеток. В то время как, миелограммы прудовых лягушек, в условиях загрязнения демонстрировали более высокую эритропoтическую активность костного мозга.

Глава 5 содержит сведения о гематологических показателях зеленых лягушек и их изменение в различных кластерах водной среды. Отмечено, что у *P. ridibundus* в условиях загрязнения среды происходит активизация процесса эритропозза и напряжение неспецифической защитной системы крови. У *P. lessonae* в условиях загрязнения отмечена лейкемоидная реакция лимфатического типа, т.е. пониженное содержание нейтрофильных гранулоцитов и эозинофилов и повышенная доля лимфоцитов. В целом установлено, что с ухудшением качества водной среды (определенного по УКИЗВ) адаптация и функционирование организма у озерной лягушки, в большей степени, идет по пути усиления неспецифических реакций иммунной системы (повышение содержания нейтрофилов); у прудовых лягушек в иммунных реакциях преобладает специфическая составляющая (повышение содержания лимфоцитов).

В главе 6 дана оценка интенсивности окислительной модификации белков и свободно радикального окисления сыворотки крови лягушек рода *Pelophylax*.

Показано, что уровень окисления как альдегидных, так и кетонных аминокислотных остатков белков сыворотки крови лягушек, обитающих в наиболее загрязненных водных объектах, намного превышал аналогичные показатели лягушек в менее загрязненных местообитаниях. Для *P. ridibundus* установлено, что общая антиоксидантная активность исследуемых образцов сыворотки крови была относительно высокой. При этом выявлено изменение активности свободно-радикальных реакций  $I_{max}$  и скорости восстановления антиоксидантной системы. Таким образом, длительное существование озерных лягушек в грязных и экстремально грязных водных объектах приводило к развитию окислительного стресса и изменению содержания уровня карбонильных производных в сыворотке крови, и активации свободно-радикальных процессов.

Для *P. lessonae* сравнительный анализ содержания альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови прудовых лягушек выявил более

выраженный характер процесса окислительной модификации белков (ОМБ) у особей, входящих во второй кластер. Установлено, что показатели ОМБ, регистрируемые при всех пяти длинах волн, у прудовых лягушек статистически значимо превышали аналогичные показатели озерных лягушек. Сравнение степени окисления белков у двух исследуемых видов, обитающих в сходных гидрохимических условиях среды в водных объектах II кластера), выявило, что показатели ОМБ, регистрируемые при всех пяти длинах волн, у *P. lessonae* статистически значимо превышали аналогичные показатели *P. ridibundus*. Показано наличие значимой связи интенсивности окисления белков сыворотки крови в зависимости от содержания ионов меди в водной среде обитания зеленых лягушек По совокупности исследованных показателей для зеленых лягушек установлена разная степень выраженности окислительного стресса: взаимосвязь между особями прудовых лягушек более тесная, чем между озерными лягушками.

Имеется ряд замечаний по отдельным моментам, изложенным в диссертации. Так, то, что идентификация видов проводилась по внешним морфологическим признакам в случае совместного обитания *P. ridibundus* и *P. lessonae* не может исключить ошибок – в Нижегородской области доля *P. esculentus* может достигать 10% (Borkin et al., 2002).

На наш взгляд, вывод 1 содержит избыточное количество словесной и цифровой информации. Последняя фраза этого вывода вызывает недоумение.

Также, возможно, следовало бы отдельно отметить межвидовые различия *P. ridibundus* и *P. lessonae* в клеточном составе костного мозга, лейкоцитарном составе и лейкоцитарных индексах, интенсивности окислительной модификации белков в сыворотке крови.

Имеется несовпадение указанных сроков проведения исследований – в автореферате 2016-2019 гг., а в диссертации - 2016-2019 гг.

Впрочем, эти замечания носят частный характер и не снижают ценности и значения выполненной работы.

К.В Шаповаловой на примере двух видов зеленых лягушек удалось показать реакцию иммуногемопоэтической системы на загрязнение среды, а также наличие общих и видоспецифических реакций на уровне системы кроветворения. изменений гематологических показателей, интенсивности окислительной модификации белков и свободно радикального окисления сыворотки крови, антиоксидантной активности в градиенте загрязнения среды. Результаты работы имеют общетеоретическое значение для понимания адаптивного значения иммуногематологических изменений у представителей

рода *Pelophylax*, проявляющееся в экстремальных условиях антропогенной трансформации среды. Практическое значение результатов диссертационного исследования состоит в их использовании для биондикации и мониторинга качества среды. Так, на основе выполненной работы написана глава «Методы оценки иммунного статуса амфибий» в учебном пособии «Экологический мониторинг. Часть 9», 2017, для студентов, аспирантов и преподавателей, занимающихся вопросами биондикации. Рекомендуется использование материалов диссертации при чтении спецкурсов в государственных университетах Российской Федерации.

Автор в своем исследовании показал хорошее знание затронутых в диссертации вопросов и специальной литературы. Большой объем материала, обоснованная аргументация сформулированных выводов не оставляют сомнений в научной зрелости автора.

Работа соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842. Автореферат достаточно хорошо отражает структуру и содержание диссертационной работы. Автор диссертации – К.В. Шаповалова, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

Доктор биологических наук (03.00.16 – Экология),  
профессор, заведующий кафедрой биоразнообразия  
и биоэкологии  
ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента  
России Б.Н. Ельцина»

620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

Тел.: +7 (343) 3899703,

e-mail: vladimir.vershinin@mail.rfu.ru, vol\_de\_mar@list.ru

<https://urfu.ru/ru/about/personal-pages/Personal/person/vladimir.vershinin/>

27. 11. 2020 г.

Вершинин  
Владимир  
Леонидович

