

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Рябининой Елены Сергеевны «Экофизиологическая характеристика цитогенетического гомеостаза амфибий в условиях химического загрязнения водных объектов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.15. Экология (биологические науки)

Система гомеостаза организма одна из наиболее оперативно и чутко реагирующих на все внешние факторы среды представляет большой исследовательский интерес с позиций оценки адаптивного потенциала организма, а также с точки зрения использования ряда показателей, характеризующих функциональный ответ в целях биоиндикации. Работа посвящена вопросам популяционной экофизиологии бесхвостых амфибий. Проблемы, затронутые автором, связаны с адаптивными и негативными реакциями системы крови в природных популяциях и в условиях загрязнения. Таким образом, актуальность диссертационного исследования Е.С. Рябининой не вызывает сомнений.

Цель работы: является сравнительный аутоэкологический анализ цитогенетических характеристик *P. ridibundus* и *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae) в градиенте загрязнения среды обитания на примере водных объектов Нижегородской области в период с 2016 по 2022 гг. и обоснование возможности их применения в цитогенетическом мониторинге. Работа Е.С. Рябининой представляет собой рукопись общим объемом 174 страницы. Основная часть работы изложена на 141 странице, также имеется 31 страница приложений. Работа иллюстрирована 37 таблицами и 36 рисунками. Диссертация состоит из введения, 8 глав, заключений и выводов, списка использованной литературы из 183 источников (в том числе 83 на иностранных языках) и приложений.

По теме диссертации Е.С. Рябининой опубликовано 36 работ, из которых 9 – входят в Перечень ВАК РФ и международные реферативные базы данных и системы цитирования, 26 – статей и тезисов в материалах международных, российских и региональных конференций; 1 – учебное пособие. В работах отражены все основные положения и выводы диссертации. Результаты исследований неоднократно обсуждались на международных, всероссийских, региональных симпозиумах, конференциях и совещаниях.

Лабораторные и полевые исследования проведены Е.С. Рябининой в течение полевых сезонов 2016–2022 гг. на территории Нижегородской области в природных и антропогенно-трансформированных ландшафтах. Всего в исследовании использовано 556 особей европейских зеленых лягушек, видовая принадлежность которых была подтверждена с помощью молекулярной идентификации: 391 экз. озерной - *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) и 165 экз. прудовой *P. lessonae* (Camerano, 1882) из популяций в 12 точках исследований.

В качестве критерия оценки состояния местообитаний были использованы результаты гидрохимических анализов, проведенных в лаборатории с помощью спектрофотометра Nach DR-2800 (HACH LANGE GmbH, Германия).

При исследовании крови проведено определение количественного содержания лейкоцитов и эритроцитов в камере Горяева. Микроядерный тест выполнен на мазках крови и костного мозга (Меньшиков и др., 1987; Гематология... , 2004). Учет эритроцитов проведен на микроскопе Meiji Techno (Япония, иммерсия, ув. x1500) с помощью электронного гематологического счетчика С-5М (Жулева, Дубинин, 1994; Крюков, 2023 и др.). Для каждой особи просматривали по 2 препарата, анализируя по 1000 эритроцитов на препарат. Полученные результаты выражали в промилле (‰). Также были проанализированы стандартные морфофизиологические параметры: индексы печени, почек, сердца, селезенки, гонад, тимуса (‰). Кроме того, было определено содержание металлов в тканях и органах (Al, Mn, Sr, Cu, Cr, Fe, Zn), которое выполнено атомно-эмиссионным методом с помощью AES-ICP-спектрометра Prodigy High Dispersion ICP (Teledyne Leeman Labs, США).

Статистический анализ выполнен в среде R (R Core Team, 2020) (Якимов, 2019) с применением пакетов программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., USA) и Statistica 8 (StatSoft Inc., OK, USA).. 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 автором – Е.С. Рябининой впервые проведенная оценка цитогенетического гомеостаза амфибий, обитающих в водных объектах урбанизированной территории, выявила повышение генетической нестабильности организма (возрастание доли микроядер в клетках крови и костном мозге) при ухудшении качества среды. Предложены собственные классификационные характеристики типов микроядер в эритроцитах амфибий, основанные на измерении их

площади. Также впервые установлено перераспределение соотношения видов микроядер в клетках организма в градиенте загрязнения водной среды, за счет возрастания доли прикрепленных микроядер; выявлена взаимосвязь между цитогенетическими, морфофизиологическими показателями гомеостаза и биоаккумуляцией тяжелых металлов в тканях и органах исследуемых видов зеленых лягушек.

Теоретическое значение работы состоит в том, что результаты, полученные диссертантом, могут быть использованы при изучении микроэволюционных процессов в популяциях на антропогенно-трансформированных территориях.

Исследование Е.С. Рябиной также обладает большой практической значимостью, поскольку предлагаемые автором подходы позволяют оценить экологическую обстановку конкретной территории, выявить мутагенные факторы среды и виды нарушений ядерного материала в соматических клетках разной степени зрелости.

Материалы диссертации, выводы и результаты могут найти применение при решении природоохранных задач и совершенствовании методов регуляции численности индикаторных видов на урбанизированных территориях.

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

Глава 1 представляет собой обзор отечественной и зарубежной научной литературы, содержащей сведения о механизме формирования микроядер, как основных показателях генетической нестабильности в эукариотических клетках различных организмов. Рассмотрены причины образования микроядер и применение микроядерного теста для оценки влияния экологических факторов на живые организмы; для скрининга и мониторинга мутагенов различной природы.

В главе 2 дана характеристика районов, объектов исследования и объем материала. Приведены параметры, методы и методология анализа проб водной среды исследуемых территорий. Подробно описана методика определения видовой принадлежности объектов исследования и их молекулярно-генетической верификации. Приведена методика приготовления мазков крови и костного мозга и проведения микроядерного теста. Также указаны методические особенности определения морфофизиологических индексов животных и содержания металлов в тканях лягушек. Указаны статистические методы, примененные при анализе полученных результатов.

Глава 3 содержит сведения об уровне загрязнения исследуемых водоемов. комплексного гидрохимического загрязнения среды обитания, оцениваемого по удельному комбинаторному индексу загрязненности воды (УКИЗВ). Е.С. Рябининой выполнено группирование водных объектов по данным определенных гидрохимических показателей с помощью кластерного анализа на основе метода объединения Уорда. Методом многомерного дисперсионного анализа с использованием лямбды Уилкса установлено, что для выделенных кластеров приоритетными загрязнителями являлись: ионы меди, марганца, хрома, цинка, кобальт, железо, никель, соединения серы, значительно различающиеся в отдельных кластерах. На основе метода главных координат была построена ординационная диаграмма распределения водных объектов в пространстве двух первых главных координат. Анализ распределения исследуемых видов по кластерам показал, что озерные лягушки присутствовали на всем диапазоне УКИЗВ. Прудовые лягушки встречались в водных объектах с УКИЗВ более 5.0.

В главе 4 приводятся результаты молекулярно-генетической идентификации видов. Установлено, что озерная лягушка представлена двумя генетическими дифференцированными криптическими формами «западной» (*P. ridibundus*) и «восточной» (анатолийской лягушкой *P. cf. bedriagae*), в то время как прудовая лягушка представлена видоспецифическими для *P. lessonae* маркерами.

В главе 5 диссертантом проведен анализ адаптивных реакций крови в зависимости от гидрохимических параметров среды. Установлено снижение числа лейкоцитов в условиях экстремального загрязнения среды у обоих исследуемых видов, при этом содержание клеток в крови прудовых было значимо выше, по сравнению с озерными лягушками. Количество эритроцитов в крови двух видов менялось разнонаправленно: у озерных – показатель снижался; у прудовых - повышался.

Глава 6 посвящена оценке встречаемости микроядер в периферической крови (нормохроматофильных эритроцитах, НХЭ) и костном мозге (полихроматофильных эритроцитах, ПХЭ) *P. ridibundus* и *P. lessonae*, обитающих в водных объектах Нижегородской области, группирующихся по гидрохимическому составу. Удалось установить, что в условиях ухудшения качества среды у озерных и прудовых лягушек наблюдается возрастание суммы клеток с микроядрами, за счет вклада прикрепленных микроядер; по этим показателям прудовые лягушки оказались более реактивным видом, по сравнению с озерными. Установленное для обоих видов лягушек возрастание доли ПХЭ с микроядрами в условиях ухудшения качества среды, определялось разным

вкладом: у озерных лягушек - за счет оформленных и разрыхленных микроядер; у прудовых – за счет прикрепленных. Межвидовые различия в условиях синтопии выражались в повышенной доле ПХЭ у прудовых лягушек за счет вклада микроядер прикрепленного вида. Интересные, на наш взгляд, результаты дал сравнительный анализ видов микроядер в нормохроматофильных (НХЭ) и полихроматофильных (ПХЭ) эритроцитах. Оказалось, что соотношение микроядер в клетках разной степени зрелости у обоих исследуемых видов в экстремальных условиях среды изменялось за счет вклада разрыхленных микроядер, доля которых была выше у озерных лягушек в ПХЭ, а у прудовых в НХЭ. Возрастание доли микроядер в клетках системы крови лягушек по градиенту химического загрязнения водной среды обуславливалось, как суммарным комплексным загрязнением среды, так и спецификой воздействия конкретных загрязнителей.

Е.С. Рябининой выявлена взаимосвязь увеличения частоты ядерных аномалий в эритроцитах разной степени зрелости озерных и прудовых лягушек с содержанием в поверхностных водах сульфатных и нитратных ионов и тяжелых металлов.

В целом, в условиях комплексного гидрохимического загрязнения среды обитания отмечен рост генетической нестабильности зеленых лягушек, проявляющийся в значительном увеличении доли микроядер оформленного, прикрепленного, разрыхленного и палочковидных видов в эритроцитах разной степени зрелости (ПХЭ и НХЭ).

В главе 7 проанализированы закономерности изменения морфофизиологических показателей зеленых лягушек в градиенте загрязнения среды. Установлено, что с ростом загрязнения среды у обоих видов лягушек выявлено однонаправленное возрастание индекса селезенки и снижение индекса почек; индексы печени и сердца не изменялись. Индексы гонад и тимуса менялись разнонаправленно: индекс гонад – снижался, индекс тимуса – не изменялся (озерные лягушки); индекс тимуса – снижался, индекс гонад не изменялся (прудовые лягушки). При высоком уровне загрязнения межвидовые различия в морфофизиологических параметрах выражены высокими значениями индексов печени, сердца, селезенки и пониженным значением индекса почек прудовых лягушек, по сравнению с озерными.

Глава 8 содержит сведения о биоаккумуляции металлов (Mn, Cu, Cr, Al, Fe, Zn, Sr) тканями и органами зеленых лягушек. Полученные Е.С. Рябининой данные свидетельствуют о высокой степени аккумуляции металлов в организме бесхвостых

амфибий обоих видов, определяемой условиями водной среды и биодоступностью металлов. При этом, для прудовых лягушек установлена более выраженная связь аккумуляции в организме металлов с изменением цитогенетических (индукция микроядер в клетках крови), а для озерных – морфофизиологических (индексы сердца, печени, почек) показателей гомеостаза.

В ряде разделов диссертации, к сожалению, встречаются опечатки: на стр. 69 - «Установлено снижении..»; на стр. 113 текст содержит неудачное выражение - «...экстремально загрязненных условиях среды...».

По отдельным моментам, изложенным в диссертации, возникли вопросы:

- Является ли более выраженная интенсификация кроветворения у прудовой лягушки в условиях значительного уровня загрязнения свидетельством её более существенного адаптивного потенциала?

- Соответствуют ли цитогенетические изменения, отмеченные у исследуемых видов, определенному поллютанту, или же выявленные реакции, в большей степени, носят неспецифический характер?

Отмеченные недочеты носят редакционный характер и не снижают ценности и значения выполненной Е.С. Рябининой работы.

Результаты исследования содержат новые сведения о направленности функциональных физиологических преобразований, у исследованных видов зеленых лягушек, в условиях антропогенных геохимических аномалий. Автору удалось показать, наличие реакций, лежащих в основе микроэволюционных изменений, носящих как общий, так и видоспецифический характер, в особенности на уровне цитогенетического гомеостаза и нестабильности генома.

Ряд результатов диссертационного исследования может быть использован при разработке новых методов экологического мониторинга и включен в содержание учебного пособия (Романова, Рябнина, 2023).

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

Содержание диссертации соответствует шифру специальности 1.5.15. Экология. Диссертация является законченным научно-квалификационным исследованием, 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 – Елена Сергеевна Рябина, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.15. Экология (биологические науки).

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

Вершинин
Владимир
Леонидович

620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

Тел.: +7 (343) 3899703,

e-mail: vladimir.vershinin@mail.urfu.ru, vol_de_mar@list.ru

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



03. 05. 2024 г.

