

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию 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)

В настоящее время практически отсутствуют водоемы, не затронутые деятельностью человека и обитающие в них животные вынуждены адаптироваться к новому достаточно широкому диапазону гидрохимических условий среды. Диссертационная работа Е.С. Рябининой, посвященная сравнительному аутоэкологическому анализу двух видов амфибий водных объектов Нижегородской области в период длительных наблюдений (с 2016 по 2022 гг.), как раз и ставит своей целью – выяснение особенностей адаптации (на основе цитогенетического гомеостаза) организма к антропогенно измененным условиям водных объектов, что бесспорно является актуальной и своевременной задачей экологической физиологии. Для оценки цитогенетических нарушений автор выбрал современный универсальный инструмент анализа – микроядерный тест, основанный на особенностях эритроцитов разной степени созревания, образующих особые ядерные структуры – микроядра, формирующиеся в процессе нарушений генетического материала под воздействием комплекса неспецифических факторов среды обитания. Дополнительно к микроядерному тесту в работе использован гематологический и морфофизиологический подходы, показавшие свою информативность для целей биомониторинга.

*Научная новизна* диссертации несомненна, поскольку в ней впервые проведена сравнительная оценка цитогенетического гомеостаза двух видов зеленых лягушек, обитающих в водных объектах урбанизированной территории, и выявлено возрастание доли микроядер в клетках крови и костном мозге при ухудшении качества водной среды обитания. Впервые установлено перераспределение соотношения видов микроядер в клетках организма в градиенте загрязнения водной среды за счет возрастания доли прикрепленных микроядер. Впервые выявлена

взаимосвязь между цитогенетическими, морфофизиологическими показателями гомеостаза и биоаккумуляцией тяжелых металлов в тканях и органах в амфибий.

Диссертационная работа имеет как *теоретическое* (определение способов адаптации двух видов лягушек к загрязнению среды; изучение микроэволюционных процессов видов на антропогенно-трансформированных территориях) так и *практическое* (изучение цитогенетических показателей конкретных видов амфибий; получение характеристик цитогенетического популяционного гомеостаза; оценка экологической обстановки конкретной территории), *экологическое значение*. Положения, выносимые на защиту, результаты проведенного исследования, выводы полностью соответствуют специальности 1.5.15. Экология, конкретно области исследования – экофизиология (факториальная экология).

Диссертация Е. С. Рябининой написана по классической схеме с соблюдением требований ВАК РФ и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы.

Вводная часть диссертации характеризуется четким и конкретным изложением материала, отражающим существо работы. Автор обоснованно формулирует актуальность работы, ее цель и ставит конкретные задачи, описывает новизну, теоретическую и практическую значимость и приводит положения, выносимые на защиту.

В подробном обзоре литературы (**глава 1**) приведены современные данные по вопросам, имеющим непосредственное отношение к теме диссертации. Рассмотрены причины образования микроядер и применение микроядерного теста для оценки влияния экологических факторов на живые организмы; для скрининга и мониторинга мутагенов различной природы и оценки интегрирующего эффекта антропогенных факторов. Замечаний по главе 1 нет.

В **главе 2** «Материалы и методы исследования» четко описан и представлен в виде таблицы объем собранного материала и краткая характеристика мест обитания амфибий. Описаны методические приемы проведенных исследований. Большинство методов, используемые для изучения состояния экспериментальных животных, являются общепринятыми. Отметим, что при оценке гидрохимических условий среды обитания амфибий автор не ограничился оцениванием концентраций

отдельных показателей загрязнения, которые важны при проведении научных исследований, но провел расчет комплексного показателя (УКИЗВ) с целью сравнительной оценки качества воды на различных водных объектах, статистически безусловно сгруппированных в отдельные кластеры. Вторым положительным вкладом в исследование является абсолютно необходимая для современного уровня научных исследований точная молекулярно-генетическая идентификация видов, выполненная в лаборатории молекулярной экологии и систематики животных при кафедре зоологии и экологии Пензенского государственного университета под руководством доцента кандидата биологических наук О. А. Ермакова, что не вызывает никаких сомнений в достоверности полученных результатов. Обращает на себя внимание широта арсенала статистических методов и подходов к анализу полученных данных, что свидетельствует об эрудиции и высоком уровне базовой университетской подготовки диссертанта.

Замечание по главе 2: отметим отсутствует масштабная линейка на фотографиях с видами микроядер (рисунки 2.3 и 2.4 с. 38 диссертации, рисунки 2 и 3 с.8 автореферата) в эритроцитах крови и костного мозга.

Третья, четвертая, пятая, шестая, седьмая и восьмая главы посвящены результатам проведенного исследования. В **главе 3** на основе гидрохимического анализа дана характеристика абиотических условий обитания зеленых лягушек двенадцати водных объектов Нижегородской области. Для стандартизации вклада различных загрязнителей в результаты дальнейшего анализа в качестве исходных данных диссертант использует частные оценочные коэффициенты, которые рассчитываются в ходе оценки УКИЗВ и учитывают кратность превышения ПДКрыб-хоз  $i$ -го ингредиента на водном объекте. С целью группирования водных объектов по гидрохимическим показателям автор использован кластерный анализ на основе метода объединения Уорда. Для выявления закономерностей группирования изученных водных объектов был применен метод главных координат с построением ординационной диаграммы в пространстве двух первых главных координат, куда были спроецированы векторы, соответствующие исходным переменным. В результате выделены пять кластеров, объединяющие водные объекты сходного гидрохимического состава. На основе распределения водных объектов по кластерам и в соответствии с поставленными задачами диссертант проводит сравнительный

анализ встречаемости зеленых лягушек и показывает, что в условиях комплексного гидрохимического загрязнения среды обитания, диапазон экологической толерантности озерной лягушкой шире по сравнению с прудовой лягушкой; условной границей, разделяющей виды, является значение УКИЗВ, больше 5.

Замечания по главе 3: 1. Чем объясняется разница между группами водных объектов? И предпочтение их разными видами лягушек?

2. На с. 47 диссертации указано: «Для выделенных кластеров приоритетными загрязнителями являлись: ионы меди, марганца, хрома, цинка, кобальт, железо, никель, соединения серы в концентрациях, превышающих ПДКрыб-хоз и значительно различающиеся в отдельных кластерах ...». Из текста диссертации неясно – эти вещества антропогенного происхождения или их присутствие обусловлено действием региональных геохимических факторов, определяемых составом пород на водосборе, т. е. фоновым содержанием?

**Глава 4** посвящена молекулярно-генетической идентификации вида зеленых лягушек. В последние годы сформировалось четкое представление о зеленых лягушках, как сложном комплексе криптических видов и эволюционных видов с присутствием диплоидных и полиплоидных форм. Результаты проведенного мультиплексного типирования маркера мтДНК показали равное соотношение гаплотипов «восточной» и «западной» формы в выборке озерной лягушки. Исследование маркера яДНК озерных лягушек выявило наличие только аллелей «западной» формы. Секвенирование митохондриального маркера показало, что все гаплотипы «западной» формы были идентичны и соответствовали варианту R17 – наиболее распространенному у озерных лягушек Центральной Европы, Болгарии, Латвии, Польше, Румынии, Сербии, Словакии, Украине, Франции, России (Калининградская, Московская, Свердловская, Саратовская, Тульская, Воронежская, Рязанская, Нижегородская, Ульяновская области, Ставропольский край, Калмыкия, Марий Эл). Гаплотипы «восточной» формы также были идентичными и относились к гаплотипу ранее выявленному у озерных лягушек во многих регионах европейской части России: Куйбышевская, Астраханская, Волгоградская, Ульяновская, Нижегородская, Рязанская области, Башкирия, Мордовия, Марий Эл, Татарстан, а также отмеченному в западном Казахстане и на северо-востоке Турции. Секвенирование ядерного маркера (SAI-1) озерных лягушек

показало его специфичность для «западной» формы, тождественной гаплотипу, обнаруженному у озерных лягушек Черноморского побережья Кавказа, Крыма, Астраханской, Волгоградской, Калужской, Куйбышевской, Саратовской, Челябинской области, Марий Эл, Татарстана, а также Украины и Западного Казахстана.

В выборках прудовых лягушек все изученные особи имели только видоспецифические маркеры *P. lessonae*, как митохондриальной, так и ядерной ДНК. Обнаружено два гаплотипа, один из которых, соответствовал широко распространенному митохондриальному гаплотипу прудовых лягушек, встречающемуся от юго-восточной Европы до Центральной Европы и Скандинавии (Plötner et al., 2008). На территории России такие же гаплотипы отмечены в Марий Эл, Мордовии, Ульяновской, Московской, Калужской и Рязанской областях. Другой гаплотип, отличающийся на одну замену от L2 и обнаруженный у прудовых лягушек являлся уникальным.

Замечание по главе 4 – из текста неясно изучались ли особи съедобной лягушки *P. esculentus*, произошедших в результате гибридизации прудовой (*P. lessonae*) и озерной (*P. ridibundus*), доля которых в Нижегородской области достигает 10%?

**Глава 5** диссертации посвящена анализу гематологических показателей озерных и прудовых лягушек, обитающих в водных объектах Нижегородской области, группирующихся по гидрохимическому составу. По градиенту ухудшения качества водной среды обитания, в крови озерных лягушек выявлено снижение числа лейкоцитов и эритроцитов, коррелирующее с повышенным содержанием в поверхностных водах ряда загрязнителей; в крови прудовых лягушек лейкоцитов и эритроцитов изменялось волнообразно. Установлено снижение числа лейкоцитов в условиях экстремального загрязнения среды у обоих видов лягушек, при этом содержание клеток в крови прудовых было значимо выше, что свидетельствует о более выраженной интенсификации кроветворения по сравнению с озерными лягушками в специфических условиях среды.

Замечание по главе 5 – на основании количественных гематологических показателей трудно выявить специфику адаптивных реакций системы крови двух видов к условиям загрязнения среды обитания. Есть ли данные по сравнительному

анализу качественных характеристик крови этих видов в условиях химического загрязнения?

**Глава 6** – центральная и наиболее объемная часть диссертации, посвящена сравнительной цитогенетической характеристике двух видов лягушек рода *Pelophylax* с оценкой встречаемости микроядер в клетках костного мозга (полихроматофильных эритроцитах) и периферической крови (нормохроматофильных эритроцитах). Диссертант предлагает собственные классификационные характеристики типов микроядер в эритроцитах амфибий, основанные не только на их положении в клетке относительно ядра, но и на измерении их площади, что безусловно повышает точность эксперимента. В костном мозге и периферической крови двух видов зеленых лягушек водных объектах урбанизированной территории наблюдалось возрастание доли клеток с микроядрами, что свидетельствовало о мутагенном влиянии гидрохимических загрязнителей. Установлено, 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 полихроматофильных эритроцитов 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 (совместном обитании в водном объекте) выражались в повышенной доле полихроматофильных эритроцитов с микроядрами у прудовых лягушек за счет вклада микроядер прикрепленного вида. Соотношение микроядер в клетках разной степени зрелости у обоих видов в экстремальных условиях среды изменялось за счет вклада наиболее крупных разрыхленных микроядер, площадь которых почти в 3–5 раз превышала площадь прикрепленных микроядер, а их доля была выше у озерных лягушек – в костном мозге, у прудовых лягушек – крови. Выполнив детальный статистический анализ взаимосвязи количества нормохроматофильных (НХЭ) и полихроматофильных (ПХЭ) клеток с микроядрами от гидрохимических условий среды, диссертант доказывает связь показателей цитогенетического гомеостаза лягушек от концентрации ряда загрязнителей водной среды обитания, делая

заключение о возможных механизмах цитогенетических нарушений и вывод о межвидовых различиях по частоте ядерных аномалий, заключающихся в повышенном содержании в костном мозге и периферической крови прудовых лягушек клеток с микроядрами прикрепленного вида.

Замечание по главе 6 – на странице 87 диссертации отмечено, что «Прудовые лягушки характеризовались более выраженной генетической нестабильностью, по сравнению с озерными, что проявлялось в зависимости широкого спектра ядерных нарушений ... от большинства химических загрязнителей...». Можно ли считать зависимостью выявленные изменения в показателях цитогенетического гомеостаза от конкретных химических веществ или это проявление функциональных изменений организма в условиях повышенного загрязнения водного объекта в целом?

**Глава 7** посвящена оценке относительной массы внутренних органов позволяющей косвенно судить о физиологическом состоянии организма лягушек в условиях особенного гидрохимического состава водной среды. При ухудшении гидрохимических условий 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). В экстремальных условиях водной среды межвидовые различия в морфофизиологических параметрах проявлялись повышенными значениями индексов печени, сердца, селезенки и пониженным значением индекса почек прудовых лягушек, по сравнению с озерными. Выявлена взаимосвязь изменения морфофизиологических параметров зеленых лягушек с содержанием отдельных загрязнителей в водной среде обитания.

Замечание по главе 7 – можно ли из набора морфофизиологических индикаторов выбрать наиболее адекватный показатель, отражающий специфичность химического загрязнения водного объекта, например тяжелыми металлами?

**Глава 8** – посвящена комплексному исследованию и сравнительной оценке содержания и распределения металлов (Mn, Cu, Cr, Al, Fe, Zn, Sr) в органах и тканях (мышцы, кожа, кости, гонады, печень, сердце, селезенка, кровь) озерных и прудовых

лягушек. Несомненным достоинством этого раздела является обсуждение полученных данных с анализом имеющихся сведений литературы. С учетом возможности разных путей поступления металлов в организм лягушек диссертант устанавливает взаимосвязь между накоплением тяжелых металлов в органах от их содержания в других тканях; набором показателей цитогенетического гомеостаза и морфофизиологическими индексами. Видовые закономерности накопления металлов из воды представлены по убыванию в виде следующих рядов активности: прудовые лягушки: Zn > Cr > Al > Cu > Fe > Sr > Mn; озерные лягушки: Fe > Zn > Mn > Cu > Cr > Al > Sr. Диссертант приходит к заключению о преимущественном влиянии биоаккумуляции тяжелых металлов на морфофизиологические параметры озерных лягушек, при этом индукция микроядер в клетках крови и костного мозга наблюдается у обоих видов амфибий.

Из заключения диссертации следует, что более существенные различия в эколого-физиологических механизмах цитогенетического гомеостаза двух видов зеленых лягушек проявляются в экстремально загрязненных условиях среды; для целей биомониторинга могут быть рекомендованы оба вида зеленых лягушек и оба набора цитогенетических и морфофизиологических показателей.

Замечания, сделанные по ходу разбора содержательной части диссертации, не носят принципиального характера и могут быть квалифицированы как пожелания, способные улучшить работу.

Подводя итог критическому анализу диссертационной работы Е. С. Рябининой «Экофизиологическая характеристика цитогенетического гомеостаза амфибий в условиях химического загрязнения водных объектов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук, можно заключить, что работа является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором представлены новые данные, имеющие значение для теоретической и прикладной экологии. Специфика объекта исследования и выбранная диссертантом тактика решения поставленных научных задач соответствуют заявленной специальности. Автореферат и опубликованные автором работы отражают полученные результаты, и раскрывают основные положения, выносимые на защиту. Автореферат по содержанию адекватен диссертации, полностью отражает



все основные положения диссертации и дает полное представление о вкладе автора, новизне и значимости результатов.

Значительная часть результатов диссертационной работы отражена в публикациях. Основные результаты диссертации апробированы на 23 международных и российских научных конференциях в период с 2017 по 2023 год. Полученные в ходе исследования результаты опубликованы Е.С. Рябининой в 36 научных работах, 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. Имеется одно учебное пособие. Опубликованные научные работы в полной мере отражают содержание диссертации.

Все изложенное позволяет сделать заключение, что по актуальности темы, научной и практической значимости, уровню проведения исследований, новизне полученных результатов и обоснованности выводов, работа отвечает требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата биологических наук, а ее автор Рябина Елена Сергеевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.15. Экология (биологические науки).

Доктор биологических наук (03.00.16),  
доцент, директор Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения «Объединенная дирекция  
Мордовского государственного  
природного заповедника имени П.Г.  
Смидовича и национального парка  
«Смольный» (ФГБУ «Заповедная  
Мордовия»)

Подпись Александра Борисовича  
Ручина ЗАВЕРЯЮ  
специалист по кадрам  
430005, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Красная, д. 30  
Тел/факс (8342)27-20-01  
Сайт: <http://zapoved-mordovia.ru>  
e-mail: [sasha\\_ruchin@rambler.ru](mailto:sasha_ruchin@rambler.ru)



Ручин Александр Борисович

О. В. Денисова

17 апреля 2024 г.