

## ОТЗЫВ

### официального оппонента на диссертацию

**Рыбак Анны Викторовны на тему «Анализ сочетанного действия радиационного и химического факторов на популяцию дождевых червей семейства Lumbricidae», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1 – радиобиология**

#### **Актуальность избранной темы.**

В современной радиобиологии, использующей высокотехнологичные методы и подходы, становится все более значимым анализ молекулярных и клеточных механизмов адаптации разных представителей биоты к низкодозовому действию радиации и других токсикантов. Эти механизмы позволяют организмам устойчиво существовать в условиях загрязнения. В исследованиях хронического радиационного и химического воздействия на наземные экосистемы почвенные животные представляют большой научный и практический интерес для анализа отдаленных последствий загрязнения. Земляные (или дождевые) черви, относящиеся к семейству Lumbricidae, хорошо изучены в плане биологии и экологии. Они имеют статус тест-организмов, которые в высокой мере контактируют с загрязняющими веществами почвы, заглатывая ее при перемещении и, тем самым, аккумулируя генотоксиканты в органах и тканях. В этой связи диссертационная работа Рыбак А.В., посвященная анализу структурно-функциональной организации природной популяции дождевых червей сем. Lumbricidae в условиях загрязнения почвы радионуклидами и тяжёлыми металлами, является актуальной.

Автор изучила уровни одноклеточных и двуклеточных повреждений ДНК у дождевых червей из природных популяций, населяющих участки с фоновым и повышенным содержанием токсикантов, провела анализ репродуктивной способности животных в условиях сочетанного загрязнения. Диссертантка обнаружила повышенную скорость репарации ДНК у червей, обитающих в условиях хронического низкодозового воздействия радионуклидов и тяжелых металлов. Впервые обнаружила снижение выживаемости животных из загрязненных экотопов к повторному воздействию Cd в более высокой дозе. Все эти изменения обнаружены на фоне сложной внутривидовой генетической структуры исследуемой популяции дождевых червей, что может служить обоснованием наблюдаемых механизмов адаптации к сочетанному загрязнению радионуклидами и металлами.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Широкие знания диссертантки в области радиобиологии, зоологии беспозвоночных, молекулярной биологии, генетики, радиэкологии и междисциплинарных отраслей позволили сформулировать новые выводы, положения и понятия относительно сочетанного влияния радиации и тяжелых металлов на природную популяцию дождевых червей на разных уровнях структурно-функциональной организации; осуществить всесторонний анализ биологических эффектов и, тем самым, внести определённый вклад в разработку концепции использования техногенно загрязненных территорий.

Правильно выбранный теоретический и эмпирический материал, верные методологические подходы, комплексный и системный анализ исследуемой проблемы, корректные, репрезентативные данные исследований, фактического и статистического материала, всесторонний анализ широкого круга российских и зарубежных научных источников литературы способствовали получению обоснованных научных результатов. Список литературы содержит 328 наименований, в том числе 197 на иностранном языке, среди которых в достаточном количестве представлена литература последних лет.

#### **Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

В работе впервые изучен широкий спектр биологических эффектов, отражающих структурно-функциональные особенности популяции дождевых червей, длительно



обитающих на загрязнённых радионуклидами и тяжелыми металлами территориях. Многие из представленных в работе результатов получены впервые, отмечу некоторые. Впервые обнаружена высокая эффективность репарации ДНК у дождевых червей сем. Lumbricidae, обитающих в условиях хронического низкодозового загрязнения радионуклидами и тяжелых металлов по сравнению с таковой у червей из незагрязненных районах. По всей видимости, это обеспечивает стабильную выживаемость видов и адаптацию к загрязнению. Важным является вывод по диссертации, что генетическое разнообразие популяции не зависит от степени загрязнения территории обитания, что подчеркивает значимость адаптационных генетических механизмов, заложенных в природных популяциях.

Диссертационная работа Рыбак Анны Викторовны является целостным, самостоятельным научным исследованием, отличающимся своей новизной. Достоверность полученных результатов и выводов обеспечена достаточными для статистической обработки объёмами выборок, а также используемыми методами анализа в современных математических (статистических) программах.

#### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов.**

Результаты и выводы, сделанные в диссертации, расширяют знание и понимание механизмов адаптации почвенной биоты к радиоактивному и химическому загрязнению почвы как основного местообитания многих видов беспозвоночных животных. Полученные результаты могут быть использованы при разработке экологических норм радиационной безопасности и концепции использования техногенно загрязнённых территорий.

Работа поддержана грантом РФФИ 13-04-90351 «Оценка генетической стабильности у животных разных таксономических групп в условиях радиоактивного загрязнения среды обитания» в 2013–2014 гг.

#### **Оценить содержание диссертации, ее завершенность.**

Диссертационная работа имеет стандартную структуру, состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы.

Во введении лаконично и четко дано обоснование актуальности исследуемой проблемы, показана степень ее проработанности, сформулированы цель и задачи, а также положения, выносимые на защиту.

В главе «Обзор литературы» автором проведен тщательный анализ литературы по известным механизмам биологического действия ионизирующего излучения и тяжелых металлов. Подчёркнуты особенности накопления и детоксикации тяжелых металлов у дождевых червей. Особое внимание уделено известным механизмам повреждения ДНК и их репарации в облученных клетках, а также методам анализа. Тщательно проработана литература, касающаяся биологических эффектов на уровне репродуктивных систем организма и выживаемости в условиях комплексного загрязнения среды. Все это будет положено в основу обсуждения полученных автором результатов на субклеточном, клеточном и организменном уровнях.

Большое значение в диссертационной работе уделено анализу популяционных показателей, поэтому в обзоре литературы хорошо раскрыта и проанализирована эта проблема по классическим источникам литературы конца 20 века в сопоставлении с современными исследованиями последних лет. Особое внимание уделено генетическому полиморфизму природных популяций дождевых червей. Из источников литературы следует, что при загрязнении одним из видов тяжелых металлов, свинцом, не происходит изменения генетического разнообразия и структуры популяции *L. rubellus* – одного из анализируемых в диссертационной работе видов червей. Автор также ссылается на источники литературы, в которых показано отсутствие генетической дифференциации в зависимости от степени загрязнения участков и взаимосвязи между уровнем ионизирующей радиации и долей метилированных локусов в популяциях *Octolasion lacteum* и *Aporrectodea caliginosa*, обитающих в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС. Из литературы следует подчеркнуть, что генетическая структура популяции организмов в условиях техногенного загрязнения



может изменяться в результате селекции конкретных аллелей генотипов, локусов у животных, более устойчивых к существованию в неблагоприятных условиях. Например, автор ссылается на работу, в которой у исследуемых ею дождевых червей *L. rubellus*, обитающих на загрязнённой тяжелыми металлами (Cd, Cu, Pb, Zn) территории, было выявлено повышение гетерозиготных генотипов по сравнению с особями с контрольной территории, что в литературе объясняется большей устойчивостью гетерозигот относительно гомозигот. Из литературы следует, что это явление характерно и для популяций растений.

Обзор литературы выполнен грамотно с объективной научной оценкой имеющихся данных по проблематике исследования.

В главе «Материалы и методы» даны подробные описания района исследования, характеризующегося хроническим радиоактивным и химическим загрязнением. Детально описаны объекты исследования – два вида дождевых червей сем. Lumbricidae и дано обоснование их выбора для анализа биологических эффектов в соответствии с целью и задачами диссертации. Объемы выборок достаточны для статистического анализа полученных данных.

В качестве замечания по оформлению главы «Материалы и методы» хочу отметить то, что автор диссертации все время отсылает читателя к главам, которые будут далеко впереди. Так, в гл. 2.2.3 идут ссылки на гл. 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3 и 2.5.4. В гл. 2.2.4 идет ссылка на гл. 2.6 и т.д. Обычно, ссылки делают на уже опубликованные главы, чтобы читателю было легче ориентироваться в материале.

Анализ эффектов на организменном уровне проведен у животных, отобранных с загрязненных и фоновых участков, и в дальнейшем культивируемых в условиях лаборатории на искусственном субстрате, пригодном для анализа биоэффектов у выбранных тест-объектов. Кислотность субстрата, влажность и доступность пищи в ходе проведения экспериментов были удовлетворительными. Анализ физико-химических характеристик почвенных образцов производили в аккредитованных лабораториях. Содержание тяжелым металлов в природных образцах проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии и атомной абсорбции. Содержание анионов и катионов определяли современными методами аналитической химии. Автором рассчитаны суммарные показатели загрязнения почв тяжелыми металлами. Стандартными радиохимическими и спектрометрическими методами определена удельная активность большого спектра радионуклидов.

Дозовые нагрузки на дождевых червей оценивали с использованием программного комплекса ERICA Tool на базе референтного организма, относящегося к типу аннелид (главным представителем являются дождевые черви), и методике Thomas & Liber (2001). Хотя изначально последняя дозиметрическая модель была предложена для оценки дозы облучения для бентосных беспозвоночных, она считается вполне пригодной для расчёта дозовой нагрузки на наземные виды. Диссертантка провела оценку доз внутреннего облучения от альфа-излучателей в желудочно-кишечном тракте червей, рассчитала поглощенную тканями тела червей дозу от альфа-, бета- и гамма-излучателей. Считаю в данном случае, использование двух почти равнозначных моделей несколько «утяжелило» работу, было избыточным для достижения поставленной цели, хотя, несомненно, наглядно продемонстрировало прекрасное владение диссертанткой всеми доступными методами дозиметрического анализа.

Диссертанткой применены современные методы молекулярной биологии и генетики для молекулярно- и популяционно-генетического анализа – метод ДНК-комет, ПЦР-анализ и секвенирование фрагментов ДНК дождевых червей. Проведен анализ полиморфизма фрагментов ДНК. На организменном уровне проведена оценка репродуктивной способности червей из разных экотопов, Учет выживаемости проведен с целью анализа адаптивного потенциала червей, обитающих на территориях с разным уровнем загрязнения. Рассчитана суммарная полулетальная для дождевых червей концентрация ТМ. На популяционном уровне проведен анализ плотности популяции червей.



Глава «Результаты исследования» дает полное представление о полученных в диссертационной работе экспериментальных данных. Вполне естественно, что для дождевых червей, заглядывающих почву с генотоксикантами при перемещении и питании, «значения мощностей поглощенных доз от инкорпорированных источников вносили на всех участках намного больший вклад в суммарные дозовые нагрузки, чем мощности доз от внешних источников облучения» (с.63). Применение Thomas & Liber дозиметрической модели для расчета дозовой нагрузки помогло диссертантке выявить, что «доминирующими радионуклидами оказались, главным образом,  $^{210}\text{Po}$  и только потом  $^{226}\text{Ra}$ . При этом основными дозообразующими радионуклидами по модели ERICA Tool являлись, главным образом,  $^{226}\text{Ra}$ , а потом  $^{210}\text{Po}$ » (с. 64). При этом, «согласно расчетам значений мощностей доз облучения по двум методикам, наибольшему воздействию ионизирующего излучения подвергаются дождевые черви, обитающие на импактном участке 1, наименьшему – на фоновом участке 4» (с.64).

Для уточнения видовой принадлежности отобранных для анализа дождевых червей диссертанткой проведено секвенирование высоковариабельного фрагмента последовательности гена цитохромоксидазы I.

Важным в объяснении механизмов адаптации являются полученные данные о повышенном уровне репарации ДНК у животных, дополнительно облученных гамма-квантами в дозе 4 Гр, и относительно высокая продолжительность жизни при дополнительной острой дозе 2270 Гр. По отношению к тяжелому металлу адаптационные механизмы оказались менее значимыми. Репродуктивная способность дождевых червей из загрязненных экотопов была понижена.

Популяционные показатели были изучены в зависимости от множества факторов. Диссертантка не ограничилась только действием радиации и тяжелых металлов на тест-организм. Ею изучена зависимость численности дождевых червей от основных физико-химических свойств почвы, концентраций тяжелых металлов и As, нефтепродуктов, мощности поглощенной дозы, что делает результаты работы достаточно весомыми, всесторонними и пригодными для включения в полноценные базы данных. Диссертанткой сделан вывод, что «возможно, снижение численности на сильно загрязненном участке 1 обусловлено воздействием комплекса факторов, включающих антропогенные (радиоактивное и химическое загрязнение среды обитания) и природно-климатические (температура, влажность, рН почвы, состав почвы и др.)» (с. 79).

Особое внимание заслуживает гл. 3.8, в которой проанализированы данные о генетическом полиморфизме популяции дождевых червей, обитающих в условиях сочетанного радиационно-химического загрязнения. Нулевая гипотеза, что дождевые черви с участков с радиоактивным и химическим загрязнением почвы, «генетически дифференцированы в зависимости от степени загрязнения почвы» была оценена с помощью расчетов гетерозиготности популяции, индекса разнообразия Шеннона, доли полиморфных локусов, числа эффективных и редких аллелей. На основании проанализированных показателей диссертанткой сделан вывод, что «генетический полиморфизм дождевых червей *A. caliginosa* с загрязненных и контрольных участков статистически значимо не отличается и указывает на существование генетически однородной популяции *A. caliginosa*».

В своей диссертации А.В. Рыбак тщательно изучила генетическую структуру исследуемых выборок дождевых червей в условиях радиоактивного и химического загрязнения почвы, провела их сравнение между собой с помощью разных математических (статистических) моделей, показала, что «уровень техногенного загрязнения почвы не вызывает дифференциацию генетической структуры исследуемых выборок» (с.83). По данным диссертационного исследования 97% всей молекулярной изменчивости приходится на внутривидовую изменчивость, и лишь 3% на межвидовую. Здесь хочется задать диссертантке вопрос. Достаточно ли полученных данных для того, чтобы опровергнуть утверждение, сделанное ею же во введении со ссылкой на сведения из



литературы о неизбежных «необратимых изменениях структуры естественных популяций» в условиях загрязнения среды обитания тяжелыми металлами и радионуклидами? (с.5).

Результаты диссертации полноценно обсуждаются в соответствующей главе на основе сведений из источников литературы последних лет.

Завершая анализ содержания работы могу еще раз подчеркнуть, что структура и логика изложения материала в диссертационном исследовании выглядят достаточно обоснованными в контексте раскрытия поставленной цели и задач, которые, считаю, вполне достигнутыми. В работе применены современные методы исследования и анализа полученных экспериментальных данных. Все вышесказанное не дает основания сомневаться в полученных результатах и сделанных выводах.

Среди выводов диссертантки наиболее значимым представляется вывод о повышении скорости репарации ДНК у дождевых червей из загрязнённых участков в ответ на дополнительное облучение, что, несомненно, «является важной защитной реакцией на повреждение ДНК после радиационного и химического воздействия» (вывод 4, с.109). Важно, что дополнительное загрязнение одним из тяжелых металлов – кадмием, приводит к снижению выживаемости червей, т.е. к усилению эффекта от действия химического поллютанта.

Результаты диссертационной работы Рыбак А.В. широко представлены на конференциях и в научных статьях. Опубликовано 19 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК. Материал, полученный в диссертационной работе, соответствует паспорту научной специальности 1.5.1. – радиобиология. Публикации и автореферат полно и всесторонне отражают авторскую концепцию и основные результаты работы.

**Отметить достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, высказать мнение о научной работе соискателя в целом.**

Диссертация Рыбак Анны Викторовны на тему «Анализ сочетанного действия радиационного и химического факторов на популяцию дождевых червей семейства Lumbricidae» представляет теоретическую и практическую ценность, а автор показала себя профессионально состоявшимся научным исследователем. Диссертационная работа носит теоретический и прикладной характер, является оригинальным, самостоятельным исследованием, вносящим вклад в решение фундаментальных задач радиобиологии и радиоэкологии – анализа действия излучений на ДНК и репарации лучевых повреждений, принципов и методов радиационного мониторинга, а также анализа отдалённых последствий хронического действия радиации в сочетании с другими антропогенными факторами среды на биоту.

К замечаниям и вопросам по диссертационной работе можно отнести следующее.

1. Считает ли автор, что структура популяции животных или растений на загрязнённых радионуклидами и тяжелыми металлами территориях будет неизбежно претерпевать необратимые изменения, как это написано во введении (с. 5 диссертации)? В чем это будет выражаться? Или внутривидовой полиморфизм природных популяций и механизмы репарации ДНК, обнаруженные диссертанткой в популяции дождевых червей, позволяют сохранять структуру, адаптироваться и длительно выживать видам на загрязнённых территориях?

2. Связаны ли локусы, изученные диссертанткой, с радиационной детоксикацией организма (отвечают ли изученные аллельные гены за антиоксидантную защиту)?

3. Считает ли автор, что положение 1 (с. 9) действительно следует выносить на защиту, как чрезвычайно значимое в достижении поставленной цели и значимое для науки в целом? Или это один из выводов, сделанный в соответствии с посланной задачей?

4. Повторюсь, что в данной диссертации использование двух почти равнозначных моделей ERICA Tool и Thomas & Liber для расчета дозовых нагрузок на исследуемых червей несколько «утяжеляет» работу, является избыточным для достижения поставленной цели,



хотя, несомненно, наглядно демонстрирует прекрасное владение диссертанткой всеми доступными методами дозиметрического анализа.

5. Положение 4 (с.9) очень сложно подчиненное и, в этой связи, трудно для восприятия.

6. В автореферате не везде указано количество особей (с.9 автореферата), используемых в каждом конкретном опыте, что затрудняет у читателей анализ статистической надёжности полученных результатов.

7. На рис. 3.20 (рис. 15 в автореферате) отсутствуют указанные в подписях условные обозначения А и В, что затрудняет их анализ.


8. Некоторые источники литературы (например, № 304) приведены без года публикации.

В целом работа очень достойная. Диссертация написана грамотным научным языком. Принципиальных замечаний у меня нет. Недостатки интерпретации полученных данных, которые могли бы снизить научную ценность работы, не выявлены.

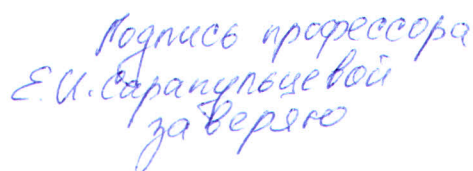
### **Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.**

Диссертационная работа «Анализ сочетанного действия радиационного и химического факторов на популяцию дождевых червей семейства Lumbricidae» является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором на основании полученных автором результатов разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, имеющее существенное значения для дальнейшего развития фундаментальных и прикладных исследований в области радиобиологии, что соответствует требованиям п.п. 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года N 842 (с изменениями на 20 марта 2021 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Рыбак Анны Викторовны заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1 – радиобиология.

Официальный оппонент,  
Доктор биологических наук, профессор,  
профессор отделения биотехнологий,  
Обнинский институт атомной энергетики –  
филиал федерального государственного  
автономного образовательного учреждения  
высшего образования «Национальный  
исследовательский ядерный университет» МИФИ

 Е.И. Сарапульцева  
30.08.2021

Сарапульцева Елена Игоревна  
Шифр специальности: 1.5.1 – радиобиология  
Тел.: +7 (910) 912-20-94  
e-mail: helen-bio@yandex.ru  
Россия, 249040, г. Обнинск Калужской области,  
ул. Студгородок, д.1, Обнинский институт атомной энергетики – филиал  
Национального исследовательского ядерного  
университета «МИФИ»  
Телефон/факс: +7(484) 397-08-22

  
Подпись профессора  
Е.И. Сарапульцевой  
заверяю

  
Зам. декана (Цурин Е.Г.)