

ШАПОВАЛОВА Кристина Вадимовна

**АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ КОСТНОГО МОЗГА И РАЗВИТИЕ
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ПРУДОВЫХ И ОЗЕРНЫХ ЛЯГУШЕК,
ОБИТАЮЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ ГИДРОХИМИЧЕСКИХ
УСЛОВИЯХ СРЕДЫ**

03.02.08 – Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2020

Работа выполнена на кафедре экологии Института биологии и биомедицины (ИББМ) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ).

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры экологии ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского»

Романова Елена Борисовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биоразнообразия и биоэкологии ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» (г. Екатеринбург)

Вершинин Владимир Леонидович

доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры зоологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» (г. Краснодар)

Пескова Татьяна Юрьевна

Ведущая организация: Институт экологии Волжского бассейна Российской академии наук-филиал ФГБУН «Самарский федеральный исследовательский центр» РАН (г. Тольятти)

Защита диссертации состоится “_____” _____ 2020 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 12.166.12 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина 23, ИББМ.

E-mail: dis212.166.12@gmail.com

факс: (831) 462-30-85

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: <https://diss.unn.ru/files/2020/1051/diss-Shapovalova-1051.pdf>, с авторефератом – в сети Интернет на сайте ВАК России по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.И. Зазнобина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Сутью аутоэкологических исследований является выявление факторов и механизмов функционирования и адаптации организмов в постоянно изменяющихся условиях среды на уровне видов. Такой подход необходим как для изучения разных популяций одного вида, так и экосистем, элементами которых являются виды. В адаптации организмов к условиям среды, возникающих при воздействии экстремальных факторов, в частности, загрязняющих химических веществ, непосредственно участвует система крови, обеспечивающая важнейшие гомеостатические функции организма. Амфибии представляют собой класс, который делает определенный прорыв в совершенствовании системы адаптивного иммунитета. Озерные и прудовые лягушки обладают хорошо развитой нервной, иммунной, гематологической системами и считаются хорошими биоиндикаторами загрязнения окружающей среды (Чернышова, Старостин, 1994; Вершинин, 1995, 2004, 2013, 2014, 2015, 2017, 2018; Леонтьева, Семенов, 1997; Вершинин, Старовойтенко, 2001; Пескова, 2001, 2003, 2004, 2019; Силс, 2008; Романова, 2014; Вершинин и др., 2017, 2018; Файзулин и др., 2015, 2016, 2017 и др.) и существует значительный объем исследований по изучению системы крови амфибий при различных воздействиях (Вершинин, 2004; Пескова, 2004, 2019; Силс, 2008; Минеева, Минеев, 2010, 2014; Романова, 2011; Романова и др., 2013; Николаев, 2016; Coico et al., 2003; Peskova, 2003, 2005 и др.). Несмотря на обилие литературных данных по изучению гематологических показателей практически отсутствуют исследования по сравнительному анализу адаптивных реакций системы крови и различий со стороны иммунной системы у разных видов амфибий, обитающих в близких и качественно различных условиях среды.

Костный мозг у бесхвостых амфибий является центральным органом, продуцирующим из родоначальной гемопоэтической клетки, клетки крови и иммунной системы (Скрипченко, 2009; Грушко, 2010; Cooper, 1976; Turpen, 1989). Он обеспечивает процессы метаболизма и пролиферацию форменных элементов крови в период метаморфоза (Хамидов и др., 1978; Галактионов, 2005), определяет разветвление неспецифических и специфических реакций иммунитета, обуславливая резистентность и реактивность организма (Хаитов, Пинегин, 1999). При этом в литературе крайне мало данных о клеточном составе костного мозга (миелограммах) индикаторных видов амфибий, полностью отсутствуют сравнительные популяционные характеристики клеточного состава костного мозга амфибий, обитающих на урбанизированных территориях в условиях антропогенного средового стресса.

Общеизвестно, что адаптации организмов к химическому загрязнению среды обитания протекают на фоне образования активных форм кислорода и разветвления свободно-радикального окисления белков и липидов (Владимиров, 1987; Дубинина, 2006). От способности организма инактивировать свободные радикалы, нормализовать про- и антиоксидантный баланс зависит его приспособление к изменённым условиям среды. Между тем, вопросам развития окислительного стресса и свободно-радикальных процессов у амфибий природных популяций посвящены лишь единичные работы (Никольская и др., 2015; Falgushinska et al., 2008), что определило наш интерес в этом направлении научного поиска.

Актуальность исследования определяется и необходимостью изучения эколого-физиологических особенностей индикаторных видов природных популяций амфибий на уровне системы крови, позволяющих им выжить и расширить ареал в изменяющихся условиях среды, важных для решения фундаментальных и прикладных проблем факториальной экологии.

Цель работы: определение эколого-физиологических показателей иммуногемопоэза индикаторных видов природных популяций амфибий в условиях воздействия комплекса

гидрохимических факторов водных объектов Верхнего Поволжья (на примере Нижегородской области).

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи.

1. Дать характеристику абиотических условий водной среды обитания изученных выборок из популяций амфибий с использованием результатов гидрохимического анализа водных объектов и расчетом удельного комбинаторного индекса загрязненности воды УКИЗВ.

2. Изучить видоспецифичность клеточного состава костного мозга зеленых лягушек (*Pelophylax ridibundus* – озерной и *P. lessonae* – прудовой) в качественно различных условиях водной среды, определенных по УКИЗВ.

3. Охарактеризовать лейкоцитарный состав и лейкоцитарные индексы периферической крови амфибий, обитающих в качественно различных условиях водной среды, определенных по УКИЗВ.

4. Оценить интенсивность окислительной модификации белков в сыворотке крови амфибий, обитающих в качественно различных условиях водной среды.

5. Провести анализ связи изученных показателей интенсивности иммуногемопозеза с гидрохимическими особенностями среды обитания амфибий.

Научная новизна исследования. Впервые в условиях химического загрязнения среды на урбанизированной территории проведены комплексные исследования системы крови индикаторных видов зеленых лягушек рода *Pelophylax*. Впервые изучен клеточный состав костного мозга амфибий Нижегородской области и получены популяционные характеристики миелограмм для озерных и прудовых лягушек. Выявлены адаптивные видоспецифические реакции на уровне эритроидного и миелоидного ростков костного мозга прудовых и озерных лягушек, обитающих в качественно разных условиях среды, заключающиеся в более выраженной активизации эритропоэтической активности кроветворения у прудовых лягушек. Адаптивной реакцией озерных лягушек к существованию в измененных условиях водной среды являлось изменение соотношения клеточного состава костного мозга и активация клеток миелоидного ряда, обеспечивающих впоследствии механизмы врожденной естественной резистентности организма. Доказана информативность интегральных лейкоцитарных индексов, что позволяет рассматривать их в качестве популяционных маркеров иммунного статуса амфибий.

Впервые изучено развитие окислительного стресса и выявлена видоспецифичность окислительных реакций в сыворотке крови амфибий, более интенсивно проявляющихся у прудовых лягушек, по сравнению с озерными. 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.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационной работы носят фундаментальный характер, расширяют и углубляют существующие представления об адаптации индикаторных видов природных популяций амфибий к химическому загрязнению водной среды и могут быть использованы при изучении микроэволюционных процессов на антропогенно-трансформированных и урбанизированных территориях.

На базе проведенных экспериментов написана глава «Методы оценки иммунного статуса амфибий» в учебном пособии «Экологический мониторинг. Часть 9», 2017, предназначенном для студентов, аспирантов и преподавателей, занимающихся вопросами биоиндикации. Материалы диссертации, сформулированные научные положения, выводы и результаты могут

найти применение при решении природоохранных задач и совершенствовании методов регуляции численности индикаторных видов на урбанизированных территориях.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы основывается на исследовании иммуногематологических характеристик отдельных видов и популяций (Исаева, Вязов, 1994), полевых исследованиях (Шляхтин, 1986), сравнении и анализе, позволяющим в совокупности с имеющимися данными о степени загрязнения мест обитания изучаемых популяций оценивать состояние иммуногематологических составляющих организма с аутоэкологической точки зрения. Основные лабораторные методы: количественное определение содержания в крови лейкоцитов и эритроцитов; качественный и количественный анализ лейкоцитарного состава крови (лейкоцитарная формула и лейкоцитарные индексы) (Меньшиков и др., 1987 и др.); определение клеточного состава эритроидного и миелоидного ростков костного мозга (миелограмма) (Экологический мониторинг, 2006, 2017); оценка свободно-радикального окисления в плазме крови методом индуцированной хемилюминесценции (Кузьмина, 1983) на биохемилюминетре БХЛ-07; определение степени окислительной модификации белков по уровню карбонильных производных (Дубинина, 1995). Полученные результаты подтверждаются обширным экспериментальным материалом, применением современных методов исследования и корректной статистической обработкой данных.

Соответствие паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют шифру специальности 03.02.08 – экология, конкретно пункту – факториальная экология.

Положения, выносимые на защиту:

1. С ухудшение качества водной среды, определенного по удельному комбинаторному индексу загрязненности воды (УКИЗВ), наблюдается перестройка соотношения клеточного состава костного мозга индикаторных видов амфибий, проявляющаяся в увеличении количества клеток миелоидного ряда и снижении числа клеток эритроидного ряда.

2. 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).

3. Приоритетными химическими загрязнителями водной среды и таксономической принадлежностью животных (даже в пределах одного рода) определялась интенсивность окислительной модификации белков в сыворотке крови индикаторных видов амфибий.

Апробация результатов. Все результаты получены автором самостоятельно, автор принимал личное участие в постановке задач исследования, сборе материала на водных объектах Нижегородской области, проведении лабораторной и статистической обработки, а также обсуждении и теоретическом осмыслении полученных результатов. Доля личного участия автора в совместных публикациях составляет 80 – 90%.

Основные результаты работы были доложены и представлены на: 69-ой и 70-ой Всероссийской школе-конференции молодых ученых, «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2016, 2017; XII молодежной международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Санкт-Петербург, 1-2 ноября 2016; XX Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 2016; 1-ой международной (XIV региональной) научной конференции «Техногенные системы и экологический риск», Обнинск, 20-21 апреля 2017; VI

Молодежной научной школе-конференции с международным участием «Актуальные проблемы экологии Волжского бассейна», Тольятти, 15-16 марта 2017; III Международной конференции к 130-летию со дня рождения Н.И. Вавилова и 110-летию со дня основания Государственного Дарвинского музея «Современные проблемы биологической эволюции», Москва, 16-20 окт. 2017; V Межд. научно-практической конференции «Индикация состояния окружающей среды: теория, практика, образование», Москва, 30 ноября–3 дек. 2017; XXIII Нижегородской сессии молодых ученых (технические, естественные, математические науки), Нижний Новгород, 22-23 мая 2018; IV Международной заочной научно-практической конференции «Зоологические исследования регионов России и сопредельных территорий», Нижний Новгород, 2018; 9-ой Международной научно-практической конференции «Экология речных бассейнов», Суздаль, 5-8 сент. 2018; VII Всероссийской (с международным участием) молодежной научной конференции «Актуальные проблемы экологии Волжского бассейна» Тольятти, 17-21 апр. 2019.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 22 научные работы, из которых – 6, входящих в Перечень ВАК РФ и международные реферативные базы данных и системы цитирования; 15 – статей и тезисов в материалах международных и российских конференций; 1 – учебное пособие.

Структура и объём работы. Решение поставленных задач определило структуру диссертационной работы, состоящую из введения, 6 глав, заключения, выводов, приложения. Диссертация изложена на 146 страницах. Работа иллюстрирована 32 таблицами и 34 рисунками. Список использованной литературы включает 174 источников, в том числе – 39 иностранных авторов.

Благодарности. Автор выражает слова благодарности соавторам, коллегам, коллективу ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского за помощь и участие в выполнении работы. Автор признателен д.б.н., профессору Д.Б. Гелашвили за рассмотрение работы и ценные советы, д.б.н., заведующему кафедрой экологии В.Н. Якимову за консультации и помощь при математической обработке данных. Автор выражает сердечную благодарность д.б.н., профессору Конторщиковой К.Н. за предоставление возможности выполнить биохемилюминисцентный анализ на базе лаборатории Клинического диагностического центра. Особую благодарность автор выражает заведующему Отделом мониторинга за состоянием окружающей среды МКУ «Горкомэкологии» г. Нижнего Новгорода к.х.н. Д.Л. Губанову и ведущему специалисту Л.П. Бабковой за помощь в выполнении количественного химического анализа проб воды. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.б.н., профессору Е.Б. Романовой за помощь, оказанную при выполнении и завершении диссертационной работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. Обзор литературы. Современные представления о кроветворении, составе и свойствах крови представителей класса амфибии (Amphibia)

В главе представлена сводка современных литературных сведений отечественных и зарубежных исследователей, посвященных характеристике и исследованиям гемопоэза амфибий; рассмотрены 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.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика объектов исследования

Лабораторные и полевые исследования проводили в течение 2016–2019 гг. на территории Нижегородской области. В работе были использованы выборки из природных популяций амфибий: лягушки озерные – *Pelophylax ridibundus*, Pallas 1771 и лягушки прудовые – *P. lessonae*, Camerano 1882, обитающие в водных объектах Нижегородской области (рис. 1; табл. 2.1). Видовая идентификация лягушек проводилась по внешним морфологическим признакам: сочленение голеностопного сустава, форма внутреннего пяточного бугра и цвет резонаторов у самцов. Эти признаки являются общепринятыми при определении зеленых лягушек (Банников и др., 1977; Кузьмин, 1999).

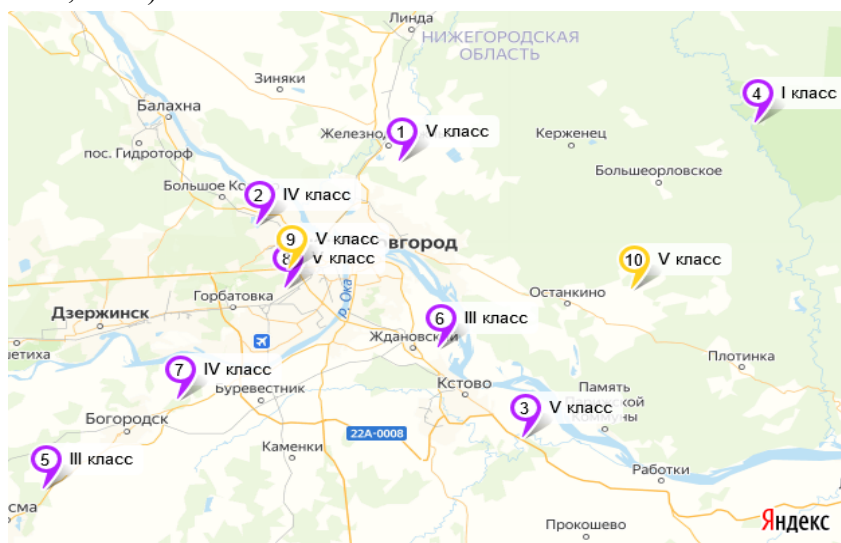


Рисунок 1. Ситуационный план. Места сбора амфибий в Нижегородской области

1 – торфокарьер Ситниковского орнитологического заказника; 2 – оз. Силикатное; 3 – уч. р. Кудьма; 4 – оз. Рустай; 5 – бол. Круглое Дальнее; 6 – оз. Жилново; 7 – оз. Березовское; 8 – оз.

Сортировочное; 9 – оз. Вторчермет; 10 – бол. п. Белкино

фиолетовым цветом обозначены места сбора *P. ridibundus*, желтым цветом – *P. lessonae*

Сравниваемые выборки подбирали из животных сходного размера. Объем каждой выборки составлял 15-20 особей. Все работы с животными проводились в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (Международные рекомендации..., 1985).

В исследованных водоемах в прибрежной зоне были отобраны пробы воды, в которых с помощью спектрофотометра Nach DR-2800 определены химические загрязнители: железо общее, марганец, медь, хром, нитрат-ионы (NO_3^-), нитрит-ионы (NO_2^{2-}), свинец, никель, цинк, хлориды, сульфаты, сульфиды, нефтепродукты и водородный показатель (pH). Расчет удельного комбинаторного индекса загрязненности воды УКИЗВ проводили согласно нормативной документации (РД 52.24.643-2002 Метод комплексной оценки степени загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям (<https://meganorm.ru/Data2/1/4293831/4293831806.htm>)). В расчетах учитывали показатели, превышающие норматив качества воды для водоемов рыбохозяйственного назначения ($\text{ПДК}_{\text{рыб-хоз}}$) (Нормативы качества..., 2010), выбранный нами, как наиболее жесткий из существующей нормативно-технической документации.

Правильность определения химических загрязнителей контролировалась периодическим анализом стандартных образцов, а возможное загрязнение проб в ходе анализа – регулярным определением холостых проб.

2.3. Метод определения клеточного состава костного мозга (миелограмма) амфибий

Костный мозг получали из бедренной кости амфибий (Тодоров, 1968). Приготовление мазков и их окраску осуществляли по стандартной методике (Гематология, 2004). Учет клеток проводили микрофотографированием с иммерсионной системой (ув. $\times 1500$). По окрашенным препаратам дифференцировали (в %) клетки миелоидного (миелобласты, промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты) и эритроидного (эритробласты, пронормоциты, нормоциты базофильные и полихроматофильные) рядов костного мозга. По результатам рассчитывали интегральный индекс миелограммы (отношение суммы клеток миелоидного ряда к сумме клеток эритроидного ряда).

2.4. Методы определения содержания эритроцитов, количественного и качественного лейкоцитарного состава крови (лейкоцитарная формула) амфибий

Число эритроцитов, лейкоцитов (тыс/мм³) и дифференцированный подсчет видов лейкоцитов (в %): нейтрофилов разной степени зрелости, базофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов, проводили общепринятым способом (Меньшиков и др., 1987). На основании лейкоцитарной формулы крови рассчитывали интегральные лейкоцитарные индексы (отн. ед): кровно-клеточный показатель (ККП); реактивный ответ нейтрофилов (РОН); лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ); индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ); индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов (ИСЛЭ); индекс соотношения нейтрофилов и эозинофилов (ИСНЭ); индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ); индекс ядерного сдвига нейтрофилов (ИЯСН) (Мустафина и др., 1999; Ткаченко, Дерхо, 2014; Cabagna et al., 2005).

2.5. Метод окислительной модификации белков и свободно радикального окисления сыворотки крови амфибий

Оценку спонтанной окислительной модификации белков (ОМБ) сыворотки крови лягушек проводили по уровню карбонильных производных спектрофотометрическим методом с использованием 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДНФГ) и образованием 2,4-динитрофенилгидразонов (Дубинина, 1995). Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 при пяти длинах волн. Расчет содержания– ДНФГ в сыворотке крови выражали в единицах оптической плотности на мл сыворотки (ОЕ/мл). Для альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) спектр поглощения регистрировали с длиной волны 230 и 270 нм. Для алифатических кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) нейтрального характера спектр поглощения составлял 370 нм, основного характера – 430 и 530 нм (Дубинина, Шугалей, 1993).

Показатели свободно-радикального окисления оценивали методом индуцированной перекисью водорода и сульфатом железа хемилюминесценции на биохемилуминометре БХЛ-07 (Кузьмина, 1983). Анализировали: индекс $I_{\max}$, мВ – максимальную интенсивность хемилюминесценции проб сывороток крови, показывающую потенциальную способность объекта к свободно радикальному окислению; индекс S , мВ – светосумму хемилюминесценции за 30 секунд, для расчета показателя $1/S$ (отн.ед.) – общей антиоксидантной активности

сыворотки крови; $\text{tg}(-2a')$ – показатель характеризующий скорость восстановления антиоксидантной защиты.

2.6. Статистический анализ экспериментальных данных

Полученные первичные данные проверяли на нормальность распределения по критериям Шапиро–Уилка, Лиллиефорса, Колмогорова – Смирнова. Критериями согласия оценивали нулевую гипотезу о соответствии анализируемых показателей нормальному распределению. Поскольку полученное значение p для данных критериев оказалось меньше принятого критического уровня ($\alpha < 0.05$), то нулевая гипотеза была отклонена и принята альтернативная гипотеза – распределение показателей считать отличающимся от нормального. Следовательно, дальнейший анализ данных проводили методами непараметрической статистики с расчетом критериев: Краскела – Уоллиса (H) (при сравнении нескольких независимых групп по одному признаку); Данна (D) (множественный критерий при попарном сравнении групп), Уилкоксона (W) (при анализе межгодовых различий), коэффициента ранговой корреляции Спирмена, методами классификационного анализа (метод главных компонент, кластерный анализ). За величину уровня статистической значимости принимали $\alpha = 0,05$. При проведении множественных сравнений производилась коррекция критического уровня значимости. С учетом вида распределения центральные тенденции и рассеяние изученных показателей описывали медианой (Me) и интерквартильным размахом (IQR) (значения 25-го и 75-го перцентилей).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА АБИОТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ОБИТАНИЯ ЛЯГУШЕК РОДА *PELOPHYLAX*

По результатам гидрохимического анализа для каждого водоема был рассчитан удельный комбинаторный индекс загрязненности воды (УКИЗВ) и определен класс качества воды (табл. 3.1).

Таблица 3.1.

Значения комбинаторного индекса загрязнения (УКИЗВ) водных объектов в период полевых сезонов 2016-2019 гг.

Водоем	Год	УКИЗВ, отн.ед.	Класс качества воды
Торфокарьер	2016	2,06	II, слабо загрязненная
	2017	9,5	IV, очень грязная, разряд «в»
	2018	6,4	IV, грязная, разряд «б»
	2019	17,53	V, экстремально грязная
уч. р. Кудьмы	2017	55,98	V, экстремально грязная
	2018	66,1	V, экстремально грязная
	2019	28,63	V, экстремально грязная
Оз. Силикатное	2016	4,87	III, загрязненная
	2017	7,2	IV, грязная, разряд «б»
	2018	7,2	IV, грязная, разряд «б»
	2019	5,99	IV, грязная, разряд «а»
Оз. Березовское	2017	8,8	IV, очень грязная, разряд «в»
Оз. Рустай	2016	1,13	I, условно чистая

Оз. Жилново	2016	4,45	III, загрязненная
Бол. Круглое Дальнее	2016	4,87	III, загрязненная
Оз. Сортировочное	2019	8,46	V класс, очень грязная, разряд «г»
Оз. Вторчермет	2016	4,51	III, загрязненная
	2017	9,1	IV, очень грязная, разряд «в»
	2018	6,6	IV, грязная, разряд «б»
	2019	19,34	V, экстремально грязная
Бол. Белкино	2017	12,1	V, экстремально грязная
	2018	12,5	V, экстремально грязная
	2019	11,73	V, экстремально грязная

Для стандартизации вклада различных загрязнителей в результаты дальнейшего анализа в качестве исходных данных использованы частные оценочные коэффициенты, которые рассчитываются в ходе оценки УКИЗВ и учитывают кратность превышения ПДК_{рыб-хоз} i-го ингредиента в водном объекте. Поскольку исходные значения частных оценочных коэффициентов имели сильно скошенное «вправо» распределение, перед проведением анализа была проведена их логарифмическая трансформация $\log(x+1)$. Единица добавлена для того, чтобы избежать появления бесконечных значений при логарифмировании нулевых частных коэффициентов. Уравнение регрессии, аппроксимирующее зависимость УКИЗВ от логарифма частного оценочного коэффициента содержания меди, имело вид: $y = 4.9028 - 3.2228 \cdot x + 4.2136 \cdot x^2$ ($R^2=0.75$; $r = 0.87$; $p < 0.001$) и показывало, что примерно на 75% (показатель детерминации $R^2=0.75$) дисперсия общего уровня загрязнения определялась дисперсией концентрации ионов меди в водных объектах (рис. 2)

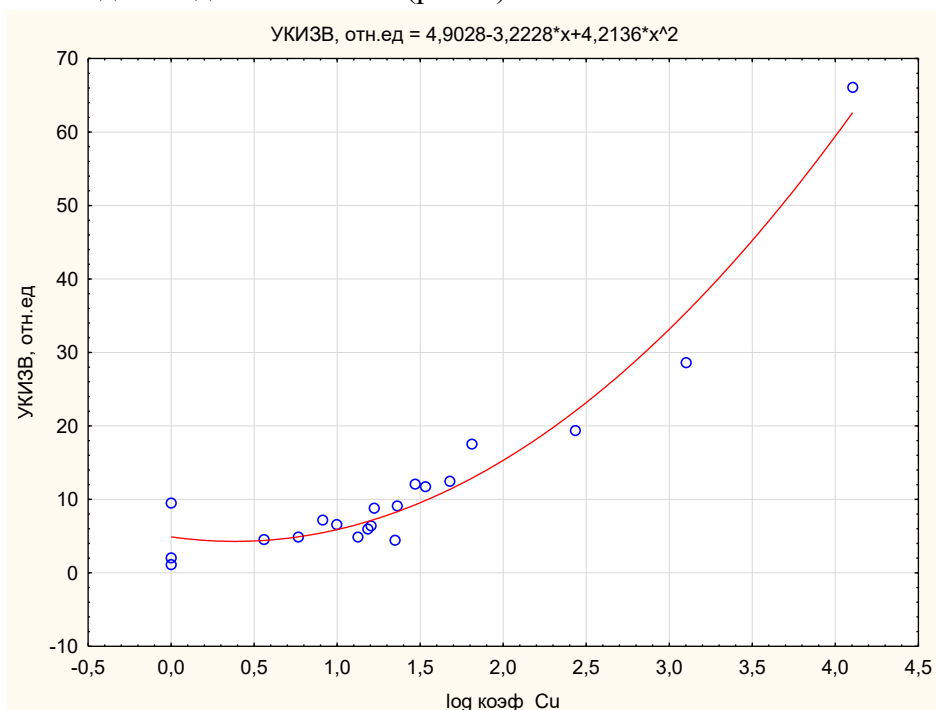


Рисунок 2. Зависимость между интегральным показателем загрязненности воды и содержанием меди в пробах воды

По оси абсцисс логарифм частного оценочного коэффициента содержания меди;
По оси ординат – удельный комбинаторный индекс загрязненности воды (УКИЗВ), отн. ед.

Для уточнения и анализа гидрохимических особенностей водной среды обитания амфибий и сокращения исходных характеристик водных объектов мы воспользовались кластерным анализом и методом главных компонент. Первая главная компонента (факторная ось), соответствующая собственному значению 1.88, описывала приблизительно 80.06 % общей дисперсии и ее роль выше, чем других по информационной насыщенности. Вторая компонента (факторная ось), соответствующая собственному значению 0.30, описывала 12.79 % оставшейся дисперсии, ее роль меньше, чем первой компоненты, а третья – описывала 3.44 % оставшейся дисперсии. Первая факторная ось наиболее сильно коррелировала с логарифмом частного оценочного коэффициента содержания в водоемах меди (0.99) (сильная положительная корреляция). Вторая факторная ось имела сильную отрицательную корреляцию с логарифмом частного оценочного коэффициента содержания марганца (-0.93).

По результатам анализа были выделены четыре отдельных кластера водных объектов, группировавшихся по гидрохимическому составу (рис. 3). Все выделенные кластеры характеризовались наличием комплекса химических загрязнителей, среди которых концентрации отдельных показателей существенно преобладали в конкретных кластерах.

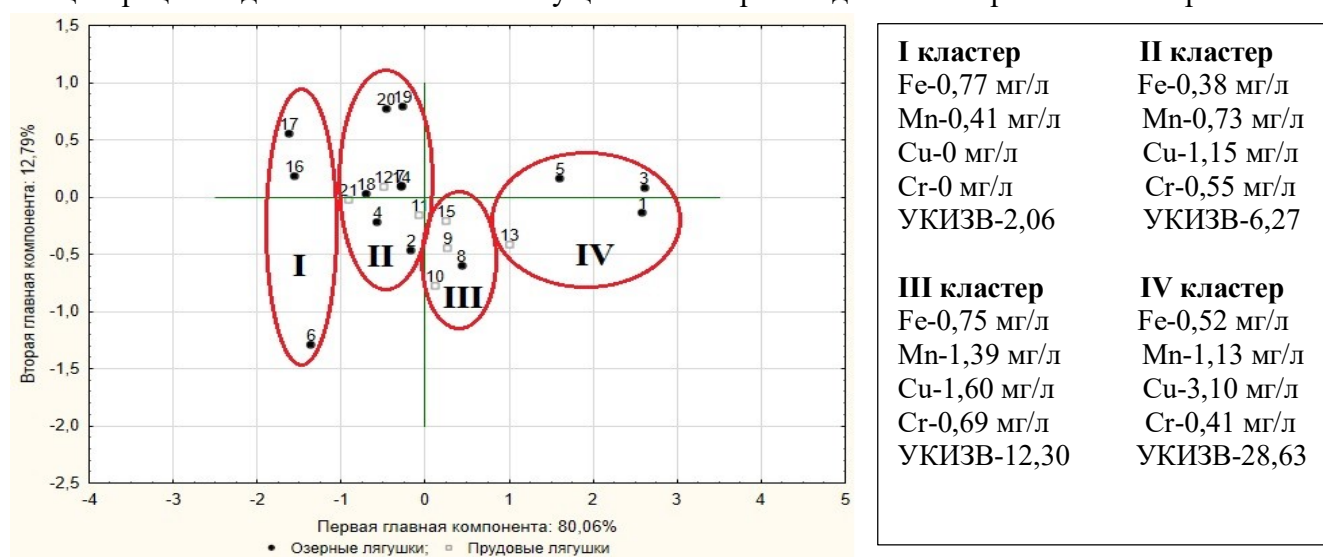


Рисунок 3. График рассеивания водных объектов в пространстве главных компонент

1 – участок р. Кудьмы_2017; 2 – оз. Березовское_2017; 3 – участок р. Кудьмы_2018; 4 – оз. Силикатное_2017; 5 – участок р. Кудьмы_2019; 6 – торфокарьер_2017; 7 – торфокарьер_2018; 8 – торфокарьер_2019; 9 – бол. Белкино_2018; 10 – бол. Белкино_2017; 11 – оз. Вторчермет_2017; 12 – оз. Вторчермет_2018; 13 – оз. Вторчермет_2019; 14 – оз. Силикатное_2019; 15 – бол. Белкино_2019; 16 – оз. Рустай_2016; 17 – торфокарьер_2016; 18 – бол. Круглое Дальнее_2016; 19 – оз. Жилново_2016; 20 – оз. Силикатное_2016; 21 – оз. Вторчермет_2016

По медианным показателям логарифмов оценочных коэффициентов кратности превышения ПДК_{рыб-хоз} по нитратам (NO_3^-) ($H=3.32$, $p=0.34$) нитритам (NO_2^-) ($H=2.39$, $p=0.49$) и сульфатам (SO_4^{2-}) ($H=2.22$, $p=0.52$) выделенные кластеры между собой статистически значимо не различались. Содержание этих загрязняющих веществ в выделенных кластерах было высоким и сопоставимым. I кластер, объединил наименее загрязненные водные объекты. Содержание железа и марганца в них не превышало 2 ПДК_{рыб-хоз}. Медиана УКИЗВ – 2.06; интерквартильный размах 8.37. II кластер характеризовался меньшим, по сравнению с третьим кластером содержанием железа, значение УКИЗВ: медиана 6.27, интерквартильный размах 2.33. В III кластер вошли объекты с высоким содержанием марганца, железа, меди и хрома. Значение УКИЗВ: медиана 12.30, интерквартильный размах 3.10. IV кластер объединил водные объекты с наиболее высоким содержанием меди (медиана – 3.10; интерквартильный размах 1.67) и

показателем УКИЗВ УКИЗВ (медиана – 28.63 отн. ед. интерквартильный размах – от 19.34 до 66.10 отн. ед.). Водные объекты с доминированием прудовых лягушек имели более высокое содержание хрома (медиана – 0.60, IQR– 0.11), по сравнению с водными объектами, в которых обитали озерные лягушки (медиана – 0.43, IQR– 0.28).

Проведенный анализ абиотических условий и качества среды обитания зеленых лягушек Нижегородской области, позволил нам, в соответствии с поставленными задачами, перейти к сравнительному анализу выборок из природных популяций амфибий и выяснить имеются ли количественные и/или качественные различия в иммунных и окислительных реакциях разных видов амфибий при адаптации к близким (входящих в один кластер) и качественно различным (относящихся к разным кластерам) условиям среды.

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КОСТНОГО МОЗГА ЛЯГУШЕК РОДА *PELOPHYLAX*

Озерные лягушки. В составе клеток костного мозга озерных лягушек преобладали клетки миелобластного ряда. Процентное содержание миелобластов в миелограммах лягушек I и IV кластеров было статистически значимо ниже по сравнению с содержанием миелобластов в составе костного мозга озерных лягушек II кластера ($D_{2-4}=4.81$, $p=0.00004$; $D_{1-2}=8.44$, $p < 0.001$). Эритропоэтическая активность костного мозга озерных лягушек, обитающих в наименее загрязненных водных объектах (I кластер) была выше, по сравнению с выборками озерных лягушек урбанизированных водоемов II и IV кластеров, у которых зарегистрировано пониженное содержание эритробластов (особи II кластера), пронормоцитов (особи II кластера) и нормоцитов базофильных (особи II и IV кластеров) (рис. 4).

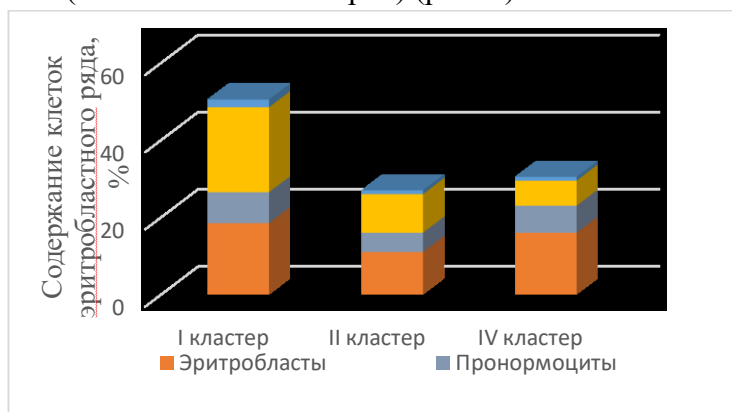


Рисунок 4. Содержание клеток эритробластного ряда костного мозга озерных лягушек

Сравнительный анализ количественного содержания клеток миелобластного ряда костного мозга выявил более высокое содержание миелобластов, промиелоцитов, метамиелоцитов у озерных лягушек II и IV кластеров, по сравнению с озерными лягушками I кластера (рис. 5).

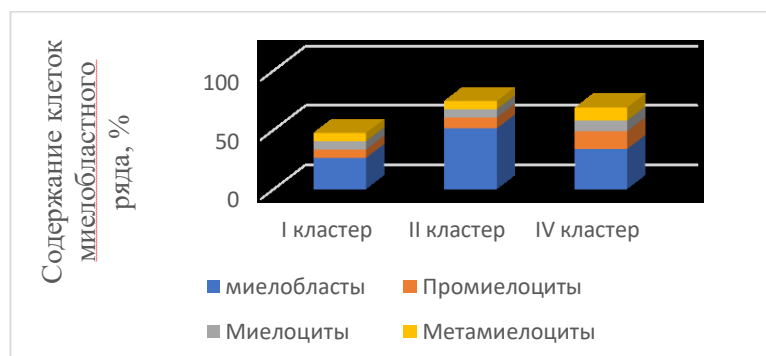


Рисунок 5. Содержание клеток миелобластного ряда в костном мозге озерных лягушек

Таким образом, в условиях более высокого загрязнения водных объектов, у озерных лягушек, наблюдалась перестройка клеточного баланса, проявляющаяся в увеличении количества миелоидных и снижении числа эритроидных клеток.

Прудовые лягушки. Доля промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов у особей III кластера значительно превышала аналогичные показатели прудовых лягушек II кластера. В миелограммах лягушек II кластера установлено повышение количества пронормоцитов ($U=1.98$, $p=0.04$) иллюстрирующее небольшую активацию эритропоэза у особей, обитающих в специфических гидрохимических условиях среды этих водных объектов.

Сравнительный анализ миелограмм озерных и прудовых лягушек, обитающих в близких гидрохимических условиях (II кластер), выявил различия в соотношении клеток как миелобластного, так и эритробластного рядов костного мозга. У озерных лягушек содержание миелобластов было выше, а промиелоцитов и метамиелоцитов значительно ниже, по сравнению с прудовыми лягушками (рис. 6).

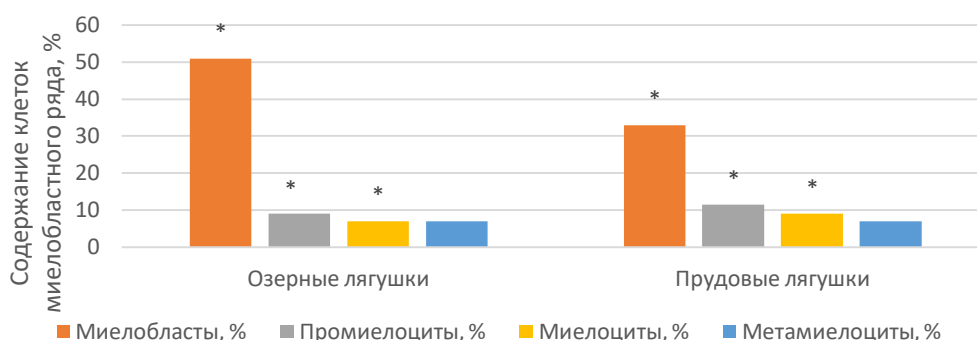


Рисунок 6. Содержание клеток миелобластного ряда в костном мозге лягушек
* – статистически значимые межвидовые различия

Количественное сравнение клеток эритробластного ряда показало более высокое содержание эритробластов (в 1.68 раза) и пронормоцитов (2,0 раза) в составе костного мозга прудовых лягушек. Базофильные нормоциты, напротив, преобладали в миелограммах озерных лягушек (рис. 7).

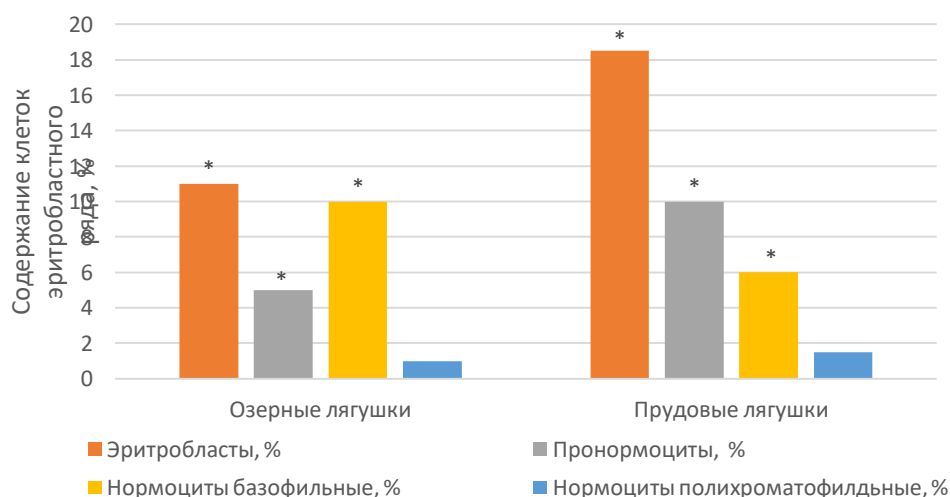


Рисунок 7. Содержание клеток эритробластного ряда в костном мозге лягушек
* – статистически значимые межвидовые различия

Таким образом, озерные и прудовые лягушки, обитающие в сходных условиях гидрохимического стресса (УКИЗВ: медиана 6.27, интерквартильный размах 2.33; IV класс качества воды, грязная) различались по содержанию в костном мозге более зрелых клеток

миелоидного и эритроидного рядов дифференцировки. У озерных лягушек установлен сдвиг миелограммы в сторону увеличения количества клеток миелоидного ряда, миелограммы прудовых лягушек, в свою очередь, иллюстрировали более высокую эритропоэтическую активность костного мозга.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛЯГУШЕК РОДА *PELOPHYLAX*

Озерные лягушки. Анализ лейкоцитарного состава крови выявил количественно-качественные изменения в иммунологических показателях, которые были выражены при небольших отклонениях гидрохимических условий среды (I кластер) и более ярко проявлялись в условиях сильного комплексного загрязнения водных объектов (IV кластер) (рис. 8).

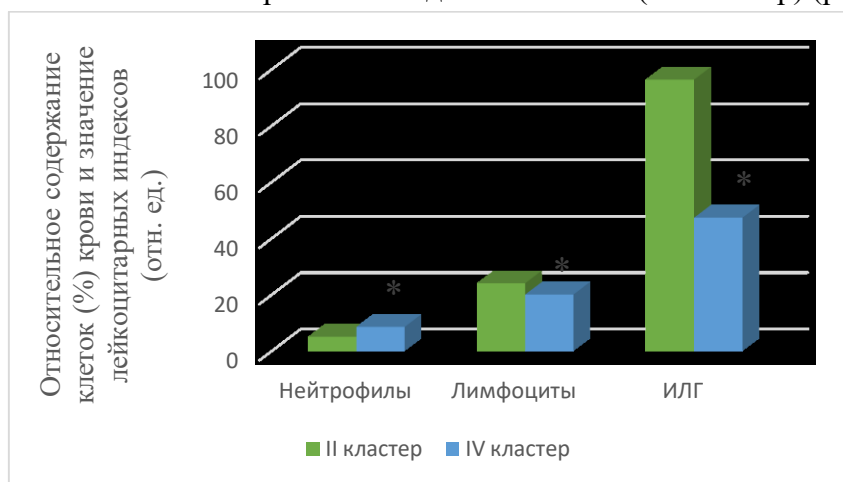


Рисунок 8. Относительное содержание клеток гранулоцитарного и агранулоцитарного рядов в крови озерных лягушек, обитающих в качественно разных условиях среды
* – статистически значимые различия

При этом снижалась специфическая иммунная реакция (содержание лимфоцитов), что компенсировалось повышением неспецифической защитной системы (содержание нейтрофильных гранулоцитов). Поддержание иммунологической реактивности организма амфибий в условиях повышенного загрязнения среды определялось функциональной активностью нейтрофилов, что подтверждалось низким показателем лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса (ИЛГ) ($D=3.23$, $p=0.003$) и более высоким значением индексов ИСНЭ ($D=3.58$, $p=0.001$) и ККП ($D=3.17$, $p=0.004$) для озерных лягушек IV кластера.

Прудовые лягушки. В лейкоцитарных формулах прудовых лягушек (III кластер) сохранялся лимфоцитарный профиль, что свидетельствовало о преобладании в иммунном ответе специфической составляющей. Периферическая кровь прудовых лягушек II кластера, по сравнению с особями III кластера характеризовалась пониженным содержанием лимфоцитов. Отклонения в лейкоцитарных формулах крови прудовых лягушек III кластера, по сравнению с особями II кластера иллюстрировали и лейкоцитарные индексы: низкое значение ККП более высокие и значения ИЛГ и ИСЛЭ (рис. 9).

Межвидовые различия в периферической крови прудовых и озерных лягушек, были выражены и в близких гидрохимических условиях среды (II кластер). Изменения в соотношении гранулоцитов к агранулоцитам в составе лейкоцитарных формул, подтверждалось более высокими показателя индексами ККП ($u=4.50$, $p < 0.001$) и ИСЛ ($u=4.57$, $p < 0.001$) у прудовых лягушек по сравнению с озерными (рис. 10).

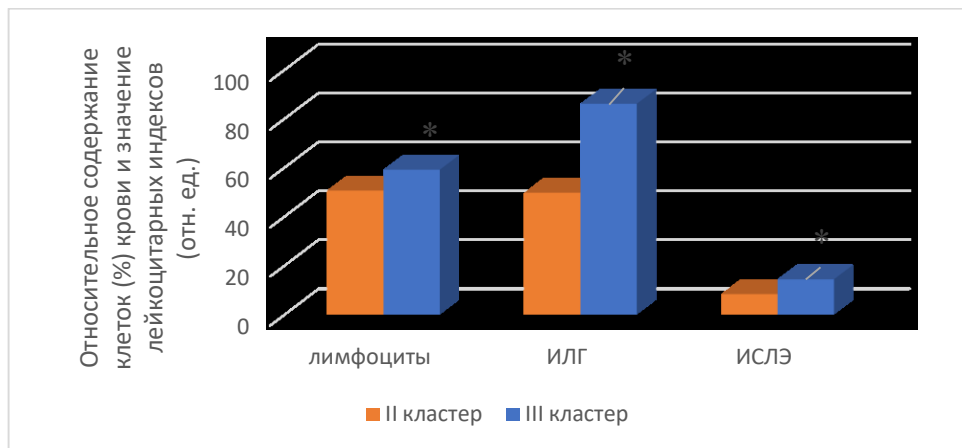


Рисунок 9. Относительное содержание лимфоцитов и соотношение клеток гранулоцитарного и агранулоцитарного рядов в крови прудовых лягушек, обитающих в качественно разных гидрохимических условиях среды
* – статистически значимые различия

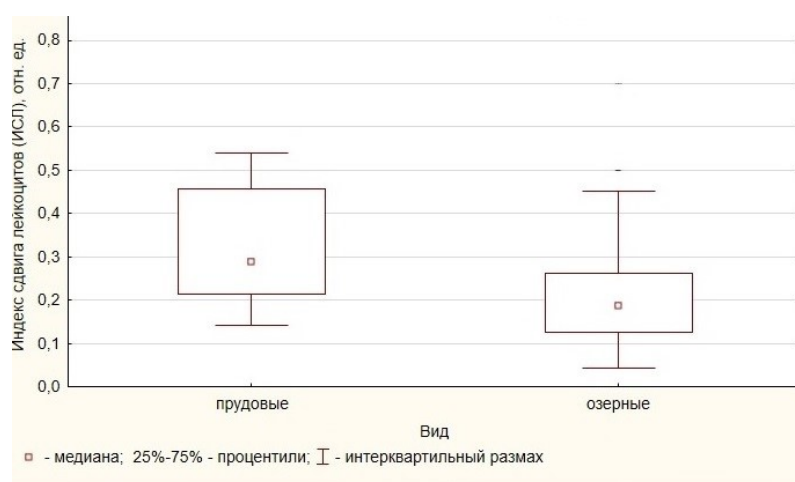


Рисунок 10. Значение индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ) для прудовых и озерных лягушек (II кластер)

С помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена выявлена статистически значимая взаимосвязь между гематологическими показателями амфибий и гидрохимическими условиями среды их обитания (табл. 5.3).

Таблица 5.3

Анализ взаимосвязи иммуногематологических показателей зеленых лягушек с гидрохимическими показателями среды обитания

Сравниваемые пары	Коэффициент корреляции, ρ ($p < 0.05$)
Число базофилов – концентрация Mn, мг/л	0.53
Реактивный ответ нейтрофилов (РОН) – УКИЗВ, отн.ед.	0.53
Число базофилов – концентрация Cu, мг/л	0.54
Число базофилов – УКИЗВ, отн.ед.	0.70
Число эозинофилов – концентрация Fe, мг/л	-0.50
Общее число эритроцитов – концентрация Cu, мг/л	-0.51
Число миелоцитов – концентрация Cu, мг/л	-0.53

Общее число лейкоцитов – УКИЗВ, отн.ед.	-0.55
Число миелоцитов – концентрация Сг, мг/л	-0.55
Общее число эритроцитов – УКИЗВ, отн.ед.	-0.69

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И СВОБОДНО РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЛЯГУШЕК РОДА *PELOPHYLAX*

Озерные лягушки. Показано, что уровень окисления как альдегидных, так и кетонных аминокислотных остатков белков сыворотки крови лягушек, обитающих в наиболее загрязненных водных объектах IV кластера, намного превышал аналогичные показатели лягушек I, II и III кластеров (рис. 11).

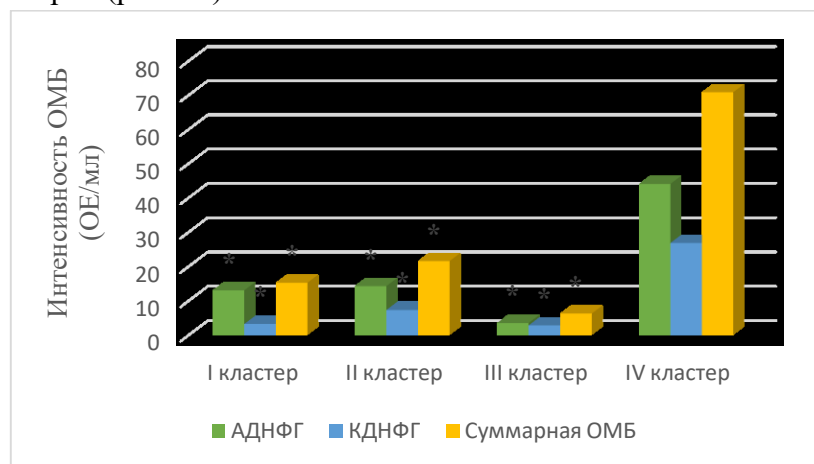


Рисунок 11. Изменение интенсивности ОМБ (ОЕ/мл) в сыворотке крови озерных лягушек
* – статистически значимые различия

В норме работа антиоксидантной и прооксидантной систем организма систем сбалансирована, и при усилении антропогенного стресса, происходит активация антиоксидантной системы организма, защищая его от негативного воздействия. Установлено, что общая антиоксидантная активность (1/S) исследуемых образцов сыворотки крови озерных лягушек была относительно высокой (0.0014 – 0.0017 отн.ед). При этом выявлено изменение активности свободно-радикальных реакций $I_{\max}$ (мВ) ($Z_{1-2} = 3.22$, $p = 0.003$) и скорости восстановления антиоксидантной системы $tg(-2a')$ ($Z_{1-2} = 4.22$, $p < 0.001$).

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. Установлена сильная отрицательная взаимосвязь интенсивности свечения исследуемых образцов сыворотки крови ($I_{\max}$) лягушек, с содержанием в водных пробах железа ($r = -0.93$, $p = 0.02$) и никеля ($r = -0.92$, $p = 0.03$).

Прудовые лягушки. Сравнительный анализ содержания альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови прудовых лягушек свидетельствовал о более выраженном характере процесса окислительной модификации белков 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 (рис. 12).

Уравнение зависимости интенсивности окисления белков от содержания в водной среде ионов меди имело вид: $y = 15.59 + 2.19 \cdot x$ ($r = 0.51$; $p = 0.03$) и показывало, что примерно на 26%

(показатель детерминации $R^2=0.26$) дисперсия содержания АДНФГ в сыворотке крови зеленых, определенных при длине волны 270 нм объяснялась дисперсией содержания ионов меди в водных объектах (мг/л). Коэффициентом ранговой корреляции Спирмена выявлены положительные ассоциации между ранними (АДНФГ) и поздними (КДНФГ) маркерами окислительной деструкции белков сыворотки крови лягушек и концентрацией нитратов в водной среде.

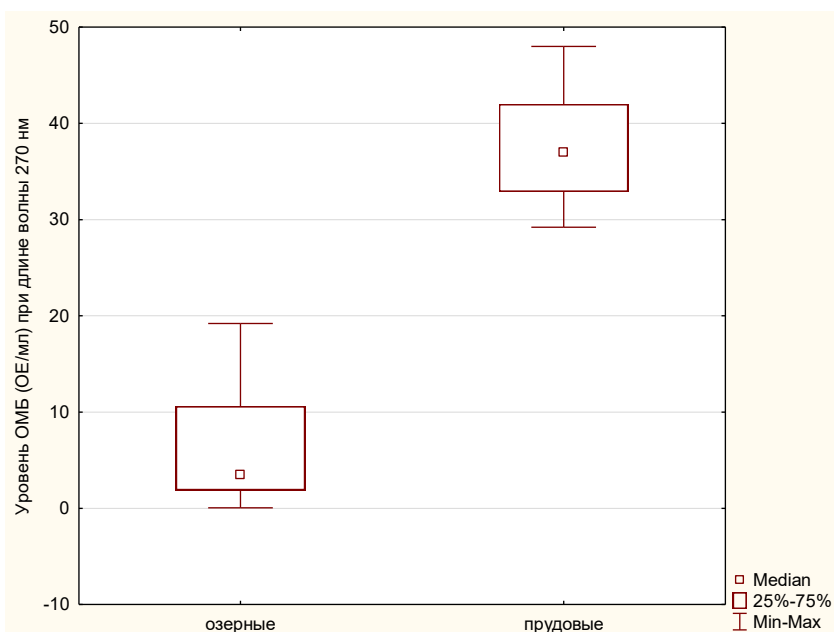


Рисунок 12. Уровень альдегид-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови озерных и прудовых лягушек, обитающих в сходных гидрохимических условиях среды

Анализ состояния окислительного гомеостаза зеленых лягушек по показателям прооксидантной–антиоксидантной активности методом главных компонент позволил провести классификацию исследованных выборок (рис. 13).

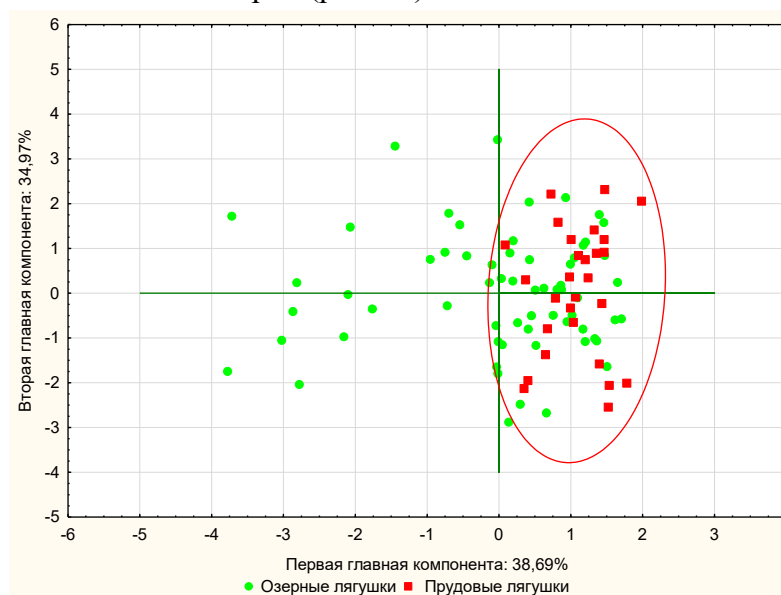


Рисунок 13. Распределение выборок озерных и прудовых лягушек в пространстве главных компонент

Выборки из популяций озерных лягушек оказались разбросаны во всех квадрантах пространства главных компонент. Выборки прудовых лягушек располагались в первом и четвертом квадрантах, т.е. имели положительные значения координат по первой факторной оси, которую в большей степени определяли показатели антиоксидантного гомеостаза организма:

$I_{\max}$ и $\lg(-2a)$. По совокупности исследованных показателей для зеленых лягушек установлена разная степень выраженности окислительного стресса: взаимосвязь между особями прудовых лягушек более тесная, чем между озерными лягушками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенными исследованиями показано, что под влиянием комплекса химических загрязнителей изменяются на уровне иммуногемопоеза адаптивные реакции изученных видов зеленых лягушек водных объектах урбанизированной территории Нижегородской области. С повышением загрязнения водной среды у амфибий наблюдалось уменьшение доли клеток эритробластного и миелобластного рядов дифференцировки костного мозга. Межвидовые различия проявлялись в более выраженной активизации у прудовых лягушек эритропоэтической составляющей кроветворения. Адаптивной реакцией озерных лягушек к существованию в условиях повышения загрязненности водной среды являлось изменение соотношения клеточного состава костного мозга с более выраженной активацией клеток миелоидного ряда (впоследствии обеспечивающих механизмы врожденной естественной резистентности организма). Усиление неспецифической реактивности организма озерных лягушек в условиях экстремального загрязнения водной среды, подтверждалось лейкоцитарными формулами крови, которые не имели выраженного лимфоцитарного профиля. Лейкоцитарные формулы крови прудовых лягушек в условиях повышения загрязнённости водной среды, иллюстрировали развитие лейкомоидной реакции лимфатического типа, т.е. характеризовалась пониженным содержанием нейтрофильных гранулоцитов (в том числе юных форм) и эозинофилов и повышенной долей лимфоцитов.

Процесс иммунологической перестройки в организме озерных и прудовых лягушек, обитающих в разных гидрохимических условиях, отражала и динамика лейкоцитарных индексов: кровно-клеточного показателя (ККП), индекса соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ), лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса (ИЛГ), реактивного ответа нейтрофилов (РОН), индекса соотношения нейтрофилов и эозинофилов (ИСНЭ), индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ). Клеточные и гуморальные формы иммунного реагирования, направленные на дифференциацию «своих» молекул от «чужих», обеспечивали стабильность онтогенеза амфибий под воздействием гидрохимических стрессовых факторов. Используемые интегральные лейкоцитарные индексы обладали информативностью, что позволяет рассматривать их в качестве популяционных маркеров иммунного статуса амфибий, адаптирующихся к постоянно изменяющимся условиям среды.

Установлена взаимосвязь комбинаторного индекса загрязнения водной среды (УКИЗВ) и параметров окислительного гомеостаза, а также комплексное влияние загрязнителей водной среды на интенсивность окислительных реакций в сыворотке крови озерных и прудовых лягушек. Интенсивность окислительных процессов у прудовых лягушек более выражена по сравнению с озерными лягушками. В условиях сильного загрязнения показатели про-, антиоксидантного равновесия организма смещались в сторону интенсификации свободно-радикального окисления и усиления работы антиоксидантной системы, обеспечивая возможность выживания и существования животных в условиях загрязнения и урбанизации. Общая антиоксидантная активность ($1/S$) сывороток крови прудовых и озерных лягушек была сопоставимой.

Взаимосвязь между группирующимися по кластерам озерными и прудовыми лягушками можно изобразить в виде ординационной диаграммы, построенной по изученным показателям (рис. 14). Первая факторная ось описывала приблизительно 85.06% общей дисперсии. Наиболее

высокий относительный вклад в нее вносили переменные: содержание в периферической крови эритроцитов, лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ) крови (положительные корреляции), содержание альдегидных (АДНФГ) и кетонных (КДНФГ) карбонильных производных в сыворотке крови лягушек (отрицательные корреляции). Вторая факторная ось с собственным значением 406.34 описывала 14.94% общей дисперсии. В нее наибольший вклад вносили клетки эритроидного (положительная корреляция) и миелоидного (отрицательная корреляция) рядов костного мозга.

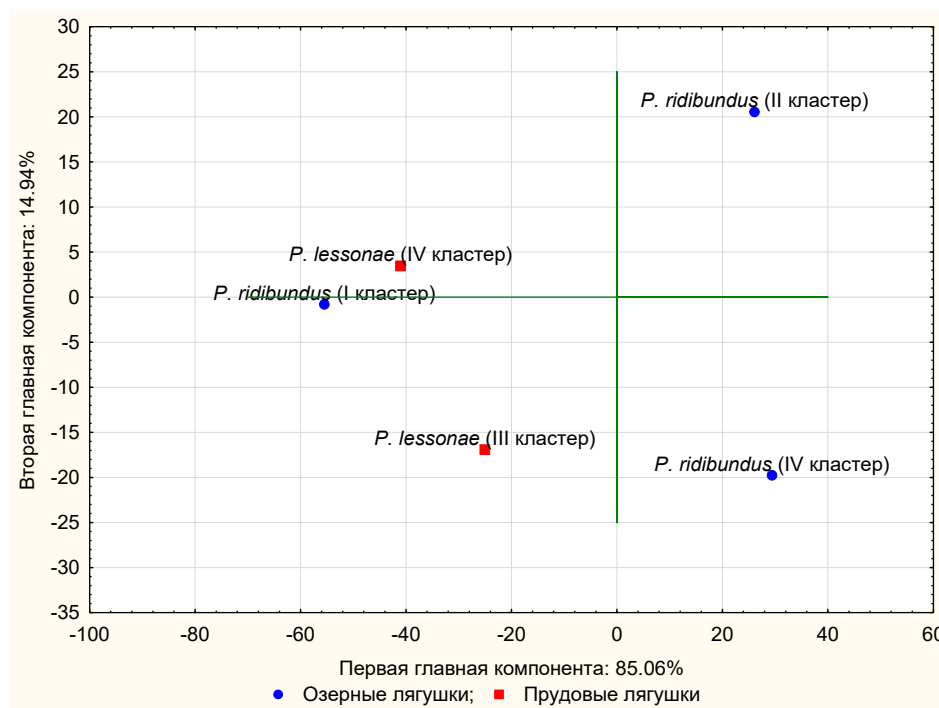


Рисунок 14. Ординационная диаграмма, построенная по комплексу иммуногематологических показателей озерных и прудовых лягушек

Анализ диаграммы показывает, что в зависимости от специфики гидрохимического состава водной среды иммуногематологические ответы со стороны озерных и прудовых лягушек носили видоспецифический характер. Совокупность процессов возникновения, развития и преобразования изменений, обеспечивающих адаптации озерных лягушек, располагающихся в первом и четвертом квадрантах, в большей степени определялась усилением неспецифических реакций иммунной системы и усиленным выбросом из костного мозга в кровоток эритроцитов, обеспечивающих кислородом органы и ткани. Расположение прудовых лягушек во втором и третьем квадрантах факторного пространства иллюстрировало закономерное преобразование имеющихся адаптационных приспособлений организма, в большей степени реализующихся, среди прочего, через перестройку клеточного баланса костного мозга и усиление специфической защитной системы крови (повышенное содержание в крови лимфоцитов). Разброс выборок озерных лягушек в факторном пространстве, свидетельствовал о более широких адаптивных возможностях организма на уровне иммуногемопоза к комплексному воздействию химических загрязнителей водной среды. Адаптивные возможности прудовых лягушек к комплексу гидрохимических факторов среды и экологическая пластичность вида менее выражены.

Полученные результаты открывают перспективу и направление дальнейших исследований, призванных ответить на вопросы фундаментального и прикладного характера о роли иммунных реакций и системы крови амфибий в адаптациях к изменяющимся условиям среды обитания.

ВЫВОДЫ

1. По основным общим гидрохимическим показателям десять водных объектов Нижегородской области, обследованные в период 2016-2019 гг., методом ординации были разделены на четыре кластера. Во всех кластерах в разном соотношении отмечено превышение ПДК_{рыб-хоз} для железа, марганца, меди и хрома. I кластер, объединил наименее загрязненные водные объекты. Содержание железа и марганца в них не превышало 2 ПДК_{рыб-хоз}. Медиана УКИЗВ – 2.06; интерквартильный размах 8.37. II кластер характеризовался меньшим содержанием железа, значение УКИЗВ: медиана 6.27, интерквартильный размах 2.33. В III кластер вошли объекты с высоким содержанием марганца, железа, меди и хрома. Значение УКИЗВ: медиана 12.30, интерквартильный размах 3.10. IV кластер объединил водные объекты с наиболее высоким содержанием меди (медиана – 3.10; интерквартильный размах 1.67) и показателем УКИЗВ УКИЗВ (медиана – 28.63 отн. ед. интерквартильный размах – от 19.34 до 66.10 отн. ед.).

Водные объекты с доминированием озерных лягушек имели более низкое содержание хрома по сравнению с водоемами, где обитали прудовые лягушки.

2. Выявлена более высокая эритропоэтическая активность и пониженное содержание клеток миелоидного ряда костного мозга у озерных лягушек, обитающих в наименее загрязненных водных объектах (I кластер) по сравнению с выборками озерных лягушек из II и IV кластеров, у которых зарегистрировано пониженное содержание эритробластов (особи II кластера), пронормоцитов (особи II кластера) и нормоцитов базофильных (особи II и IV кластеров) и высокое содержание миелобластов, промиелоцитов, метамиелоцитов.

У прудовых лягушек содержание эритробластов и пронормоцитов в миелограммах было соответственно в 1.68 раза и 2,0 раза выше по сравнению с озерными лягушками. Базофильные нормоциты, напротив, преобладали в миелограммах озерных лягушек. Количество полихроматофильных нормоцитов в миелограммах обоих видов не различалось.

3. Выявлено значимое превышение содержания эритроцитов в периферической крови озерных лягушек, обитающих в I и II кластерах, по сравнению с особями IV кластера, характеризующего максимальным значением УКИЗВ и высоким содержанием меди. Количественное содержание лейкоцитов у выборок из популяций озерных лягушек, группирующихся в разных кластерах, статистически значимо не различалось. С ухудшением условий обитания количество лейкоцитов и эритроцитов в крови прудовых лягушек снижалось.

4. Установлены количественно-качественные изменения в лейкоцитарном составе крови амфибий, проявляющиеся более ярко в условиях высокого комплексного загрязнения водных объектов (IV кластер). Высокие значения индексов: ККП; ИСЛ, ИСНЛ для популяций озерных лягушек, группирующихся в IV кластере по сравнению с выборками II кластера, свидетельствовали о возрастании неспецифической реактивности организма. Лейкоцитарное формулы крови озерных лягушек не имели выраженного лимфоцитарного профиля. В лейкоцитарных формулах прудовых лягушек, обитающих в более неблагоприятных условиях (третий кластер) сохранялся лимфоцитарный профиль, что свидетельствовало о преобладании в иммунном ответе специфической составляющей.

Показано, что в условиях низкого содержания железа и комплексного загрязнения медью, марганцем и хромом (II кластер, УКИЗВ=6.27 отн.ед.) четко выражены различия в соотношении гранулоцитов/ агранулоцитов в крови прудовых и озерных лягушек, подтверждающиеся высокими показателя индексов ККП ($u=4.50$, $p < 0.001$) и ИСЛ ($u=4.57$, $p < 0.001$).

5. Установлена высокая интенсивность окислительных реакций как альдегидных (АДНФГ), так и кетонных (КДНФГ) аминокислотных остатков белков крови, свидетельствующая о глубоких нарушениях окислительного гомеостаза организма озерных и прудовых лягушек в условиях экстремального загрязнения водных объектов. Выявлено смещение показателей про- и антиоксидантного равновесия в сторону интенсификации свободно-радикального окисления и усиления работы антиоксидантной системы в организме озерных лягушек. Интенсивность окисления белков крови лягушек коррелировала с содержанием в водной среде обитания ионов меди ($r=0.51$; $R^2=0.26$; $p=0.03$). Выявлена большая подверженность окислению белков крови прудовых лягушек по сравнению с озерными лягушками.

СПИСОК ТРУДОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в Перечень ВАК РФ и международные реферативные базы данных и системы цитирования

1. Romanova, E.B. Myelograms of Marsh (*Pelophylax ridibundus*) and Pool (*Pelophylax lessonae*) Frogs (Amphibia: Ranidae) from Conventionally "Intact" Reservoir of Nizhni Novgorod Region and from Reservoir Transformed by Human Activity DOI: 10.1134/S1062359018100254 / E.B. Romanova, **K.V. Shapovalova**, I. A. Mar'in // Biology Bulletin. – 2018. – Vol. 45. – №. 1 – P. 1250 – 1256 URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38672654>

Романова, Е.Б. Миелограммы озерных (*Pelophylax ridibundus*) и прудовых (*Pelophylax lessonae*) (Amphibia: Ranidae) условно «фоновых» и антропогенно-трансформированных территорий Нижегородской области DOI: 10.18500/1684-7318-2017-3-298-307 / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова**, И.А. Мар'ин // Поволжский экологический журнал. – 2017. – №3. – С. 298 – 307. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=30565828>

2. Romanova, E.B. Leukocytic indices and micronucleus in erythrocytes as population markers of the immune status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) living in various biotopic conditions DOI: 10.1134/S1062359010100273 / E.B. Romanova, **K.V. Shapovalova**, E.S. Ryabinina, D.B. Gelashvili // Biology Bulletin. – 2019. – Vol. 46. – №. 10 – P. 1230 – 1238. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=43258705>

Романова Е.Б. Лейкоцитарные индексы и микроядра в эритроцитах как популяционные маркеры иммунного статуса *Pelophylax ridibundus*, Pallas 1771 (Amphibia: Ranidae), обитающих в различных биотопических условиях DOI: 10.18500/1684-7318-2018-1-60-75 / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова**, Е.С. Рябинина, Д.Б. Гелашвили // Поволжский экологический журнал. – 2018. – № 1. – С. 60 – 75. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=32779299>

3. Романова, Е.Б. Лейкоцитарный состав крови и микроядра в эритроцитах амфибий загрязненных водных объектов Нижегородской области DOI: 10.15393/j1/art/2018/7682 / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова**, Рябинина Е.С. // Принципы экологии. – 2018. – № 2. – С. 125 – 139. URL: https://elibrary.ru/title_about.asp?id=37825

Статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий рекомендованных ВАК

4. Романова, Е.Б. Миелограмма озерных (*Pelophylax ridibundus*) и травяных (*Rana temporaria*) лягушек Нижегородской области / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова** // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2. – 9 с. URL: <http://elibrary.ru/item.asp?id=25869983>

5. Романова, Е.Б. Состояние свободно-радикального окисления сыворотки крови амфибий водоемов урбанизированной территории / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова**, А.В. Козырева // Экология урбанизированных территорий. – 2017. – № 1. – С. 25 – 31. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=29425165>

6. Романова, Е.Б. Сравнительный анализ окислительной модификации белков сыворотки крови как оценка адаптации озерных и прудовых лягушек (*Amphibia: Ranidae*) Нижегородской области к разным гидрохимическим условиям среды / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова**, Е.С. Рябинина // Проблемы региональной экологии. – 2020. – № 1. – С. 5 – 11. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=42978279>

Статьи, материалы, труды, тезисы международных, всероссийских и региональных конференций

7. Романова, Е.Б. Цитогенетическая нестабильность и накопление тяжелых металлов в тканях озерных лягушек урбанизированной территории / Е.Б. Романова, Е.С. Рябинина, **К.В. Шаповалова**, А.В. Боряков // Вода: химия и экология. – 2019. – № 10-12. – С. 93–98. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=43047909>

8. **Шаповалова, К.В.** Цитологический анализ костного мозга амфибий Нижегородской области / **К.В. Шаповалова**, И.А. Марьин // Материалы 69-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 27-28 апреля 2016. – Нижний Новгород: изд-во ННГУ, 2016. – С. 172.

9. **Шаповалова, К.В.** Изменения лейкоцитарного состава крови озерных лягушек условно-фоновых и антропогенно-трансформированных территорий Нижегородской области / **К.В. Шаповалова**, И.А. Марьин // Шаг в будущее: теоретические и прикладные исследования современной науки: Материалы XII молодежной международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, г. Санкт-Петербург, 1-2 ноября 2016 года. – North Charleston, SC, USA: CreateSpace, 2016. – С. 41 – 45.

10. Романова, Е.Б. Сравнительное изучение клеточного состава костного мозга озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*) урбанизированной территории / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова** // XX Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2016. – С. 412.

11. Романова, Е.Б. Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами у амфибий, обитающих в различных экологических условиях / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова**, Е.С. Рябинина // Техногенные системы и экологический риск: Тезисы докладов I Международной (XIV Региональной) научной конференции / Под общ. ред. А.А. Удаловой. – Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2017 – С. 158 – 161.

12. Романова, Е.Б. Адаптивные реакции системы крови амфибий к разным гидрохимическим условиям водной среды обитания / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова**, Е.С. Рябинина // Современные проблемы биологической эволюции: Материалы III Межд. конф к 130-летию со дня рождения Н.И. Вавилова и 110-летию со дня основания Государственного Дарвинского музея. 16-20 окт. 2017. – М.: ГДМ, 2017. – С. 219 – 222.

13. Романова, Е.Б. Биоиндикация состояния водных экосистем по лейкоцитарному профилю крови вида-зооиндикатора / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова** // Труды V Межд. научно-практ. конф.: «Индикация состояния окружающей среды: теория, практика, образование». М.: Буки-В, 2017. – С. 59 – 63.

14. Романова, Е.Б. Особенности гемопоэза озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*) антропогенно-трансформированной территории Нижегородской области / Е.Б. Романова, **К.В.**

Шаповалова, И.А. Марьин // Биосистемы: организация, поведение, управление: 70-я Всероссийская школа-конференция молодых ученых, Нижний Новгород, 26-28 апреля 2017. – Нижний Новгород, 2017. – С. 175.

15. Романова, Е.Б. Индукция микроядер и окислительная модификация белков сыворотки крови видов-индикаторов антропогенно-трансформированных территорий / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова**, Е.С. Рябинина // Научное обозрение. Биологические науки. – 2017. – № 5. – С. 33 – 37. URL: <https://science-biology.ru/ru/article/view?id=1087>

16. **Шаповалова, К.В.** Цитогематологические показатели зеленых лягушек популяций Нижегородской области / К.В. Шаповалова, Е.С. Рябинина // Экологический сборник 6. VI Молодежная научная школа-конференция с международным участием «Актуальные проблемы экологии Волжского бассейна» 14-16 марта 2017. – Тольятти, 2017 С. 414 – 416.

17. **Шаповалова, К.В.** Лейкоцитарный профиль крови озерных (*Pelophylax ridibundus*) и (*P. lessonae*) лягушек Нижегородской области / **К.В. Шаповалова**, Е.Б. Романова // XXIII Нижегородская сессия молодых ученых (технические, естественные, математические науки), 22-23 мая, 2018. Материалы докладов. Изд-во: Нижегородский гос. инженерно-эконом. институт, Княгинино, 2018. – С. 172 – 175.

18. Романова, Е.Б. Оценка окислительной модификации белков и степени симметричности зеленых лягушек Нижегородской области / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова** // IV Международная заочная научно-практическая конференция «Зоологические исследования регионов России и сопредельных территорий» / Под ред. А.И. Дмитриева, Ю.Ю. Давыдовой. – Н. Новгород: Мининский университет, 2018. – С. 143 – 148.

20. Романова, Е.Б. Индикация состояния водных объектов Нижегородской области с использованием онтогенетических популяционных характеристик видов-зооиндикаторов / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова**, Е.С. Рябинина // Экология речных бассейнов: Труды 9-ой Междунар. науч.-практ. конф. /Под общей ред. Т.А. Трифионовой: Владимирский гос. ун-т им. А.Г. и Н.Г. Столетовых. Владимир: «Аркаим», г. Владимир, 2018. – С. 445 – 451.

21. Романова, Е.Б. Содержание микроядер и тяжелых металлов в тканях озерных лягушек, обитающих в загрязненной водной среде / Е.Б. Романова, Е.С. Рябинина, **К.В. Шаповалова**, Боряков А.В // Экологический сборник 7: Труды молодых ученых. Всероссийская (с международным участием) молодежная научная конференция // Под ред. к.б.н. С.А. Сенатора, О.В. Мухортовой, проф. С.В. Саксонова. Тольятти: ИЭВБ РАН, «Анна», 2019 – С. 393–397.

Учебное пособие

22. Романова, Е.Б. Методы оценки иммунного статуса амфибий / Е.Б. Романова, **К.В. Шаповалова** // Экологический мониторинг. Часть 9. Глава 3.: учебное пособие / Под ред. Проф. Д.Б. Гелашвили. – Нижний Новгород: Нижегородский университет, 2017. – С. 36–51.