

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»

На правах рукописи

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)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Е.Б. Романова

Нижний Новгород
2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КРОВЕТВОРЕНИИ, СОСТАВЕ И СВОЙСТВАХ КРОВИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА <i>AMPHIBIA</i>	11
1.1. Современное состояние учения о гемопоэзе амфибий	11
1.2. Клетки периферической крови амфибий	19
1.3. Окислительный стресс как реакция организма на экстремальные условия среды	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Характеристика объектов исследования	38
2.2. Гидрохимический анализ водной среды обитания амфибий	42
2.3. Метод определения клеточного состава костного мозга (миелограмма) амфибий	42
2.4. Методы определения содержания эритроцитов, количественного и качественного лейкоцитарного состава крови (лейкоцитарная формула) амфибий	45
2.5. Метод окислительной модификации белков сыворотки крови амфибий	46
2.6. Статистический анализ экспериментальных данных	47
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	48
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА АБИОТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ОБИТАНИЯ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК РОДА <i>PELOPHYLAX</i> НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ	48
ГЛАВА 4. ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КОСТНОГО МОЗГА ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК РОДА <i>PELOPHYLAX</i>	58
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК РОДА <i>PELOPHYLAX</i>	74

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ	96
МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО	
ОКИСЛЕНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК РОДА	
<i>PELOPHYLAX</i>	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ВЫВОДЫ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	126
ПРИЛОЖЕНИЕ	147

ВВЕДЕНИЕ

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 развертывание 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 развертывания 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.

Степень разработанности темы исследования. Амфибии, в частности, зеленые лягушки рода *Pelophylax*, являются объектом широкого спектра экологических исследований (Леонтьева, Семенов, 1997; Захаров и др., 2000; 2001; Пескова, 2001, 2003, 2004; 2019; Сурова, 2002; Шилова, 2005; Максимов, 2010; Вершинин, 2013, 2014, 2017, 2018; Вершинин, Вершинина, 2013; Закс, 2013; Зарипова, 2012; Свинин, 2016; Шиян, 2011; Минеева, Минеев, 2014;

Якушева, 2015; Корзиков, 2016; Файзулин и др., 2017; Кузовенко, 2018; Иванов, 2019; Arian, Cicek, 2014; Kuznetsov et al., 2015; Parris et al., 2004; Raffel et al., 2006 др.). Амфибии представляют собой класс, который делает определенный прорыв в совершенствовании системы адаптивного иммунитета.

Однако получение иммуногематологических характеристик популяций в широком спектре изменчивости гидрохимических условий обитания вида необходимы для изучения стратегий их адаптаций. При значительном объеме исследований по крови амфибий отсутствуют исследования по сравнительному анализу адаптивных реакций системы крови зеленых лягушек, обитающих в сходных и различающихся условиях водной среды

Цель работы: определение эколого-физиологических показателей иммуногемопоеза 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 периферической крови амфибий, обитающих в качественно различных условиях водной среды.

5. Провести анализ связи изученных показателей интенсивности иммуногемопоеза 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 биохемилюминометре 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КРОВЕТВОРЕНИИ, СОСТАВЕ И СВОЙСТВАХ КРОВИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА АМФИБИЙ (AMPHIBIA)

1.1. Современное состояние учения о гемопоэзе амфибий

Гемопоэтическими органами у представителей позвоночных являются: у рыб – почка, селезенка, кишечник; у амфибий — селезенка, печень, костный мозг; у рептилий – костный мозг и селезенка; у млекопитающих – костный мозг и лимфатические узлы (Хамидов и др., 1978). Таким образом, костный мозг как дифференцированный орган гемопоэза впервые появляется именно у амфибий (Cooper, 1976; Галактионов, 2005; Хамидов и др., 1978).

Костный мозг локализован во внутренней полости трубчатых костей и представляет собой тканевое объединение ретикулярной стромы, плотно упакованных гемопоэтических и лимфоидных клеток, а также разветвленной сети капилляров. Основное назначение костного мозга – продукция клеток крови и лимфоцитов (Галактионов, 2005; Хамидов и др., 1978). Однако он принимает участие в пролиферации форменных элементов крови лишь в весенне-летний период, когда метаболические процессы достигают наивысшего уровня. Кроме того, у бесхвостых амфибий при метаморфозе костный мозг обеспечивает возрастающую потребность организма в кислороде.

Костный мозг является важным органом кроветворения и иммунной системы. В настоящее время проводится много работ по изучению строения костного мозга, его клеточного состава и роли у живых организмов (Акуленко, 2008; Скрипченко, 1990, 1991, 2009; Грушко, 2009, 2010а; Захаров, Рассохин, 2002; Зеленцова, Скоркина, 2004). Но результаты этих исследований фрагментарны и неоднозначны.

Костный мозг является центральным органом гемопоэза и иммунной системы амфибий. В процессе эволюции от амфибий до млекопитающих костный мозг превращается из органа дополнительного кроветворения в главный орган гемопоэза (Скрипченко, 2009). Однако строение костного мозга у этих классов позвоночных изучено недостаточно, а некоторые данные весьма противоречивы (Грушко, 2010). По сравнению с нижерасположенными на эволюционной лестнице рыбами, у амфибий иммунная система усиливается включением в работу костного мозга, печени, вторичных лимфоидных узлов (Du Pasquier et al., 1989). У хвостатых и бесхвостых амфибий представлена функционирующая костномозговая ткань, содержащая плазматические клетки (Goldstine et al., 1975) и выполняющая функцию поставщика стволовых кроветворных элементов для формирования Т- и В-клеточных популяций. Полости бедренных и плечевых костей у хвостатых амфибий заполнены соединительной тканью, включающей ретикулиновые волокна, ретикулярные клетки, адипоциты и эндотелиальные клетки. Костный мозг отделен от кости оболочкой.

У рептилий в связи с усложнением двигательной системы развиваются совершенно новые формы взаимодействия между стромальными и гемопоэтическими клетками. У них появляются островки лимфоподобных клеток, с центрально расположенной фагоцитирующей ретикулярной клеткой. Встречаются также и клеточные группировки, в которых центральное положение занимает макрофаг, который в свою очередь окружают его лимфоподобные клетки и клетки гранулоцитарного ряда. Считается, что эти клеточные группы довольно устойчивые образования. Костномозговой лимфопоэз, наряду с селезеночным, приводит к лимфоидному характеру периферической крови у пресмыкающихся.

У птиц костный мозг становится центральным органом гемопоэза, но в связи с пневматизацией костей резко сокращается число очагов локализации костного мозга. У птиц наблюдается специфическая дифференцировка клеток

стромы костного мозга, на это указывает ослабление фагоцитарной функции адипоцитов и утрата способности к фагоцитозу ретикулярными клетками, которые являются частью островков размножения лимфоподобных клеток. Это указывает на усовершенствование механизма взаимодействия стромальных и гемопоэтических клеток.

У млекопитающих увеличивается доля фагоцитирующих ретикулярных клеток и макрофагов. Адипоциты лишены способности к фагоцитозу. Появляется четкая очаговость ростков эритропоэза в костном мозге. Т.е. макрофаги становятся центрами очагов гемопоэза, отростчатые ретикулярные клетки – очагов гранулопоэза (Скрипченко, 2009; Грушко, 2010а).

Также костный мозг является центральным органом иммунной системы, наряду с печенью и лимфоидными узлами. Иммунная система выступает мощной защитой организма от чужеродных веществ, обеспечивая поддержание постоянства антигенного состава внутренней среды организма и генетической стабильности соматических клеток в процессе онтогенеза (Галактионов, 2005; Хаитов и др., 1995; Хаитов, 2000). Отряд безногих амфибий имеет лимфоидную систему, а именно: тимус, селезенку, про- и мезонефрос, лимфоидные образования слизистой кишечника, также есть лимфомиелоидная ткань в печени. У бесхвостых и хвостатых амфибий имеется функционирующая костномозговая ткань, которая в своем составе имеет плазматические клетки и выполняет функцию поставщика стволовых кроветворных элементов для формирования Т- и В-клеточных популяций (Галактионов, 2005).

Функционирование иммунной системы происходит на двух уровнях. Первый составляют неспециализированные защитные механизмы (врожденный иммунитет). Его составляют кожные покровы, слизистые, внутренние барьеры организма, лимфоузлы, фагоцитирующие клетки, гуморальные факторы (лизозим, комплемент, интерферон и др.). Второй уровень иммунологических функций составляют механизмы, определяющие

способность организма к специфическому ответу на конкретные антигены (адаптивный иммунитет). Три основных типа клеток (Т-лимфоциты, В-лимфоциты и антигенпрезентирующие клетки) формируют гуморальную и клеточную формы адаптивного иммунитета (Хаитов и др., 1995; Галактионов, 2005).

По результатам исследований Грушко (Грушко, 2010а) основную часть костного мозга у лягушек составляют адипоциты (60 %). Также были отмечены пигментные клетки, которые концентрировались по периферии, и кроветворные элементы, представленные клетками всех рядов.

Кроветворная ткань представляет собой гетерогенную популяцию клеток, пролиферирующих в разных направлениях, — очень четко скоординированный механизм, поддерживающий любые потребности организма в клетках того или иного гистогенетического ряда. Основой этого механизма является родоначальная гемопоэтическая (стволовая) клетка, которая и определяет весь процесс нормального кроветворения. Одна из основных особенностей стволовой клетки — способность к поддержанию популяции (Хамидов и др., 1978; Гомеостаз..., 1992). Стволовые клетки составляют менее 0,01% всех клеток костного мозга (Борисов, 2005). Но их роль чрезвычайно важна для организма, поскольку они являются родоначальниками всех клеток крови и клеток иммунной системы (Борисов, 2005). От количества стволовых клеток, степени их морфологической целостности зависят и регенераторные потенции органов гемопоэза (Хамидов и др., 1978).

Кроветворение позвоночных животных включает эритро-, миело- и тромбопоэз и характеризуется наличием обособленных очагов (Хамидов и др., 1978, Абрамов, 1985). 80-90% стволовых клеток находятся в состоянии покоя. 10-20% стволовых клеток находятся в разных фазах деления. В результате митоза из них формируются два вида дочерних клеток. Одни сохраняют свойства родительских (т.е. остаются вначале недифференцированными, а

позднее превращаются в Т- и В-лимфоциты), а другие - дифференцируются в клетки предшественники (миелоциты), формируя гранулоциты, макрофаги, эритроциты и тромбоциты. Всего стволовая клетка дает начало шести росткам дифференцировки (рис. 1.1):

1. Мегакариоцитарному, заканчивающемуся образованием тромбоцитов.
2. Эритроидному, с формированием безъядерных, переносящих кислород эритроцитов.
3. Гранулоцитарному, с тремя дополнительными направлениями дифференцировки: базофилов, эозинофилов, нейтрофилов. Эти клетки принимают непосредственное участие в процессах воспаления, фагоцитоза и являются участниками неспецифической резистентности организма.
4. Моноцитарно-макрофагальному - с образованием моноцитов, поступающих в различные органы и ткани, где они преобразуются в гистиоциты, ретикулоциты печени, макрофаги селезенки, микроглию нервной ткани.
5. Т-клеточному - дифференцировка этих клеток происходит в тимусе.
6. В-клеточному - в отличие от Т-клеток В-клеточная дифференцировка характеризуется практически полной завершенностью в костном мозге (Борисов, 2005). Процентное распределение В-клеток в различных органах лягушек выглядит следующим образом: югулярные тела - 50%, костный мозг - 14%, кровь - 14%, селезенка - 10%, тимус - 1%.

Основным источником В-клеток у лягушек, как и у млекопитающих, является костный мозг. Именно переход к наземному образу жизни, потребовавшему развития конечностей, определил костномозговую ткань как существенное или доминирующее место в

преимущественном развитии В-клеточного ростка дифференцировки (Галактионов, 2005).

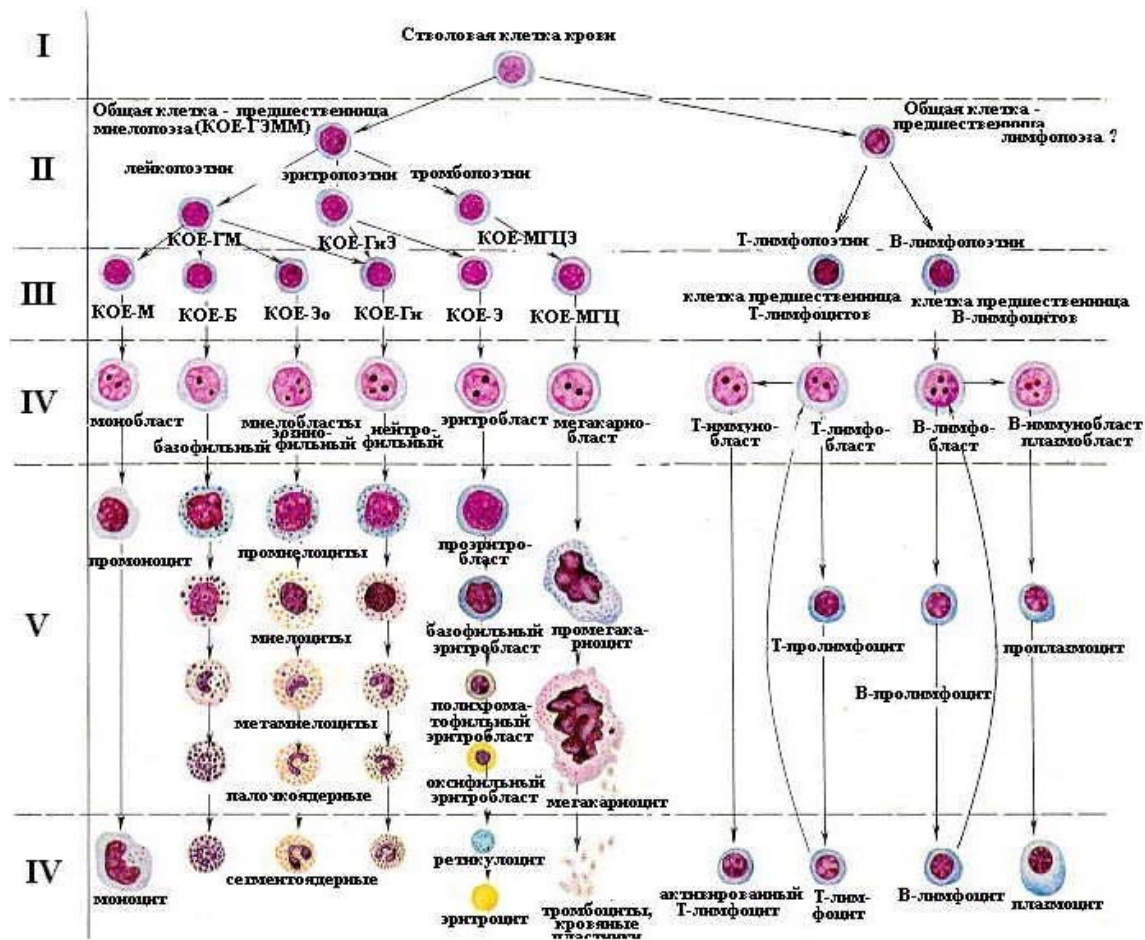


Рисунок 1.1. Схема кроветворения (www.pirogov-center.ru/clinic/5/)

Из миелобластов в результате созревания образуются палочкоядерные, а затем сегментоядерные клетки (базофилы, эозинофилы, нейтрофилы). Промиелоциты и миелоциты способны к делению и составляют пролиферирующую группу. Более зрелые клетки нейтрофильного ряда (метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные клетки) обычно считаются неспособными к делению, однако, претерпевают созревание, составляя созревающую группу. Основные характеристики миелоидного ряда: миелоидные клетки периферической крови (гранулоциты) – крупные клетки с ядерно – цитоплазматическим

соотношением, сдвинутым в сторону цитоплазмы. Цитоплазма миелоидных клеток оксифильная и, начиная со стадии промиелоцита, обязательно содержит специфическую зернистость. Гранулоциты осуществляют основную свою функцию, находясь в тканях (Атлас клеток..., 1998). В периферической крови и гемопоэтических тканях земноводных отсутствуют типичные базофильные гранулоциты (Хамидов и др., 1978).

Промиелоцит – ядро фиолетовое, круглое или овальное с эксцентричным или центральным положением, тонкая ядерная мембрана. Цитоплазма голубая. Гранулы азуро-, эозинофильные. Миелоцит – ядро красно – фиолетовое, овальное или с небольшой выемкой с эксцентричным положением. Неотчетливая ядерная мембрана. Голубовато-розовая цитоплазма. Метамиелоцит – ядро фиолетовое, толстое, подковообразное или с выемкой с эксцентричным или центральным положением. Ядерная мембрана присутствует. Нейтро-, эозинофильные гранулы (Атлас клеток..., 1998).

По Хамидову эритроидный ряд можно разделить на стадии эритробласта и нормобласта. Эритробласт – округлая клетка с большим ядром, содержащим ядрышки (Хамидов и др., 1987).

Нормобласты – клетки, которые способны еще митотически делиться и в то же время накапливать гемоглобин. Нормобласты можно разделить на базофильные, полихроматофильные и оксифильные. Оксифильные нормобласты у всех позвоночных, кроме млекопитающих, вымываются в кровь и функционируют как зрелые эритроциты. Нормобласты имеют типичную окраску и часто круглую форму (Хамидов и др., 1987). По мере созревания от пронормоцита, до полихроматофильного нормоцита клетка от круглой формы постепенно переходит в овальную, ядро уменьшается в размерах и также от круглой формы постепенно переходит в овальную, становится плотным, почти бесструктурным, темно – фиолетового цвета, располагается эксцентрично. Цитоплазма становится больше.

Для поддержания постоянного количества эритроцитов, циркулирующих в крови, такое же количество эритроцитов должно выводиться или разрушаться. При изменении условий жизнедеятельности организма величина костномозговой продукции эритроцитов увеличивается или уменьшается в зависимости от потребностей организма в эритроцитах. Разрушение эритроцитов осуществляется макрофагами селезенки. Поддержание постоянства уровня гемоглобина и количества эритроцитов в крови обеспечивается как за счет выработки в организме специфических веществ, так и гормонов, стимулирующих или угнетающих эритропоэз. Гормоны, по – видимому, в значительной мере реализуют свое влияние на эритропоэз путем регуляции синтеза эритропоэтина (Атлас клеток..., 1998).

Исследования, посвященные изучению клеток костного мозга зеленых лягушек фрагментарны (Сюзюмова, Гребенникова, 1987; Вершинин, Старовойтенко, 2001). В работе Грушко определены основные особенности локализации и строения кроветворной ткани озерной лягушки. Установлено, что в весенне-летний период у самок озерной лягушки 40 % массы костного мозга составляют развивающиеся клетки крови. Показано, что здесь формировались клетки крови всех рядов, а именно эритроидного, миелоидного, мегакариоцитарного, лимфоидного (Грушко, 2010а).

Целью исследования в другой работе Грушко являлось изучение морфофизиологии красного костного мозга лягушки (*Rana ridibunda*, Pall., 1771) и прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*, Linnaeus, 1758). У обеих групп животных в костном мозгу формировались клетки крови всех рядов, причем, как у ящериц, так и у лягушек наибольшая доля формирующихся клеток приходилась на эритроциты и гранулоциты (Грушко, 2010б).

Наличие достаточно хорошо развитого костного мозга трубчатых костей – эволюционное достижение амфибий. Так как, его функция – продуцировать клетки крови и клетки иммунной системы из родоначальной гемопоэтической клетки его роль трудно переоценить.

В наземных биоценозах урбанизированной территории амфибии являются одной из доминирующих групп позвоночных животных и являются удобным объектом биомониторинга антропогенно нарушенных территорий (Леонтьева, Семенов, 1997; Большаков, Пястолова, Вершинин, 2001). Из множества различных методов оценки состояния популяций, особое внимание уделяется гематологическому подходу, позволяющему оценить адаптивный потенциал и физиологическое состояние организма в постоянно меняющихся условиях среды (Чернышова, Старостин, 1994; Романова, Романова, 2003; Вершинин, 2004; Пескова, 2004; Романова, Егорихина, 2006; Силс, 2008; Романова, 2010; Cooper, 1976; Manning, Horton, 1982 и др.).

1.2. Клетки периферической крови амфибий

К форменным элементам крови позвоночных относятся красные кровяные клетки – эритроциты, главная функция которых – транспорт кислорода и углекислого газа; кровяные пластинки – тромбоциты, участвующие в реакциях свертывания крови и белые кровяные клетки – лейкоциты, играющие важную роль в защите организма от микробов, вирусов патогенных простейших, любых чужеродных веществ, т.е. обеспечивают иммунитет (Коган и др., 1984).

Лейкоциты – одна из самых реактивных клеточных систем организма, поэтому их количество меняется при самых различных воздействиях. Увеличения числа лейкоцитов в крови называют лейкоцитозом. Различают реактивные и физиологические лейкоцитозы.

Реактивные (истинные) лейкоцитозы развиваются при воспалительных процессах и инфекционных заболеваниях. В большинстве случаев происходит увеличение числа нейтрофилов, т.е. наблюдается нейтрофильный лейкоцитоз. Эозинофильный лейкоцитоз отмечается при многих аллергических болезнях, глистных инвазиях. Лимфоцитоз возникает при инфекционных заболеваниях и интоксикациях. Наличие лейкоцитоза устанавливается путем подсчета отдельных видов лейкоцитов – лейкоцитарной формулой.

Лейкоциты делятся на две группы: гранулоциты (зернистые) и агранулоциты (незернистые). В группу гранулоцитов входят нейтрофилы, эозинофилы и базофилы, а в группу агранулоцитов – лимфоциты и моноциты (Хамидов и др., 1978).

Нейтрофилы (рис. 1.2) – это округлые клетки диаметром 10-15 мкм, имеющие узкое ядро. В зависимости от степени зрелости клетки делятся на юные, палочкоядерные и сегментоядерные. Чаще всего встречаются сегментоядерные. Комплекс Гольджи расположен у ядра, ЭПР выражен слабо. Особенностью нейтрофилов амфибий является то, что в их цитоплазме плохо выявляется специфическая зернистость. Гранулы нейтрофилов лягушек и жаб небольших размеров, имеют однородный умеренно плотный матрикс. Клеточная мембрана нейтрофилов образует многочисленные псевдоподии, указывающие на высокую локомоторную активность. Основная функция нейтрофилов – защитная. Эта функция обеспечивается их специфическими свойствами: самостоятельной подвижности, фагоцитозу, высокой активности ряда ферментов (Хамидов, 1978).

Нейтрофилы прибывают первыми на место повреждения тканей. Они выпускают псевдоподии, проходят через стенку капилляров и активно перемещаются в тканях к месту проникновения микробов. Контактируя с микробами или чужеродными частицами, нейтрофилы фагоцитируют их, переваривают и уничтожают за счет собственных ферментов и бактерицидных веществ. Кроме фагоцитоза, нейтрофилы секретируют в окружающую среду лизосомные катионные белки и гистоны (Петров, 1987).

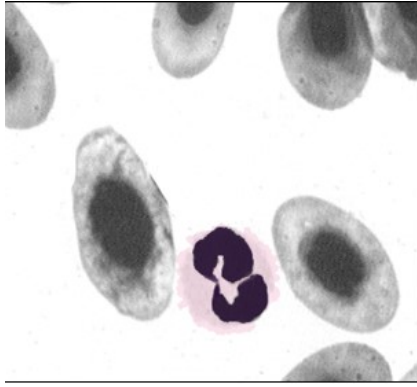


Рисунок 1.2. Сегментоядерный нейтрофил периферической крови амфибий

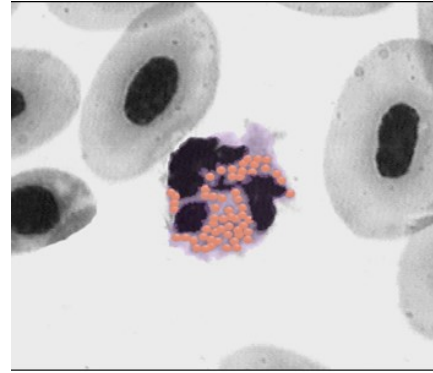


Рисунок 1.3. Эозинофильный гранулоцит периферической крови амфибий

Цифровые изображения препаратов клеток крови выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x 1500)

Эти «резервные клетки» могут быстро мобилизовываться при стрессовых ситуациях. Они способны получать энергию путем анаэробного гликолиза и поэтому могут существовать в тканях, бедных кислородом (Шмидт, 1996).

Эозинофилы имеют округлую форму, содержат небольшое плотное ядро. Гранулы крупнее нейтрофильных, отчетливо выявляются в виде ярко-розовых вкраплений. Однако количество их значительно меньше, чем в нейтрофилах. Эозинофильные гранулы имеют овальную или удлиненную форму. Эозинофилы амфибий (рис. 1.3) составляют в среднем 4 - 10 % всех лейкоцитов. На светло-голубом фоне цитоплазмы отчетливо видны равномерно распределенные специфические гранулы. В них выявляются ядра, состоящие из 2-3 эксцентрично расположенных сегментов. Мелкозернистая цитоплазма содержит большое количество вакуолей с прозрачным содержимым, в ней обнаруживаются мелкоочаговые скопления рибосом. Комплекс Гольджи хорошо развит и занимает обширную зону в центре клетки. В цитоплазме находится несколько небольших митохондрий, расположенных между гранулами. Гранулы эозинофилов амфибии – крупные округлые органойды с гомогенным плотным матриксом. Для большинства

специфических гранул характерно наличие в матриксе небольших цитоплазматических островков. Все гранулы имеют однородную структуру и относятся к одной популяции (Хамидов и др., 1978).

Основная функция эозинофилов заключается в обезвреживании и разрушении токсинов белкового происхождения, чужеродных белков, комплексов антиген – антитело. Установлено, что эти клетки появляются в местах локализации чужеродных белков и паразитов, при аллергических реакциях (Петров, 1987; Хамидов, 1978).

Процент базофильных гранулоцитов (рисунок 1.4) в периферической крови земноводных варьирует от 8 до 37% (Западнюк, 1983). Базофилы (тучные клетки) амфибий резко отличаются от других клеток крови. Они меньше, чем нейтрофилы и эозинофилы, рыхлое ядро их обычно имеет центральное расположение и характеризуется слабой выраженностью сегментации. Ядро базофилов лягушек и жаб не разделено на сегменты и расположено в центре клетки. Как правило, оно имеет округлую или овальную форму. Комплекс Гольджи располагается вблизи ядра. Специфические гранулы имеют округлую форму и достигают больших размеров. Матрикс гранул неоднородный (Хамидов и др., 1978).

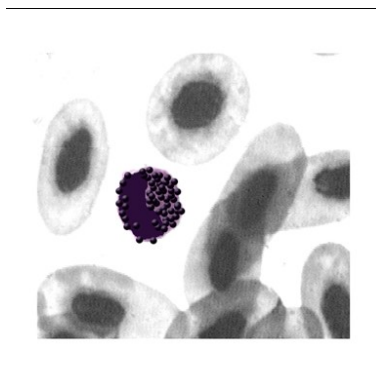


Рисунок 1.4. Базофильный гранулоцит периферической крови амфибий

Функции базофилов обусловлены наличием в них биологически активных веществ. Они продуцируют гистамин и гепарин. Количество базофилов нарастает во время заключительной фазы острого воспаления и немного увеличивается при хроническом воспалении. Гепарин базофилов

препятствует свертыванию крови в очаге воспаления, а гистамин расширяет капилляры, что способствует рассасыванию и заживлению. Число базофилов возрастает при различных аллергических реакциях (Лебедев, Понякина, 1985; Петров, 1987).

У земноводных различают большие и малые лимфоциты. Количество больших лимфоцитов составляет 5-19 % от всех лейкоцитов крови, а малых – 19-50% (Западнюк, Западнюк, Захария, 1974). Лимфоциты – округлые клетки диаметром 5 – 15 мкм. Цитоплазма зрелых лимфоцитов сине-голубая, чаще с псевдоподиями. Ядро грубое, неравномерно окрашивается в темно-сиреневый цвет. По форме ядро может быть круглым, бобовидным или овальным. Комплекс Гольджи и ЭПР развиты слабо. Лимфоциты земноводных, как правило, имеют сферическую форму, часто содержат псевдоподии. Основной объем занимает фиолетовое глыбчатое ядро (Хамидов и др., 1978).

Лимфоциты (рис. 1.5) отвечают за формирование специфического иммунитета и осуществляют функцию иммунного надзора в организме, обеспечивая защиту от всего чужеродного и сохраняя генетическое постоянство внутренней среды. Лимфоциты обладают удивительной способностью различать в организме «свое» и «чужое» вследствие наличия в их оболочке специфических участков – рецепторов, активирующихся при контакте с чужеродными белками. Лимфоциты осуществляют синтез защитных антител, лизис чужеродных клеток, обеспечивают иммунную память и уничтожение мутантных клеток.

Различают тимусзависимые (Т – клетки) и тимуснезависимые (В – клетки) лимфоциты. Т – лимфоциты играют ведущую роль в иммунном надзоре. При ослаблении их функций возрастает опасность развития опухолей, аутоиммунных заболеваний, повышается склонность к разным инфекциям (Хамидов и др., 1978).

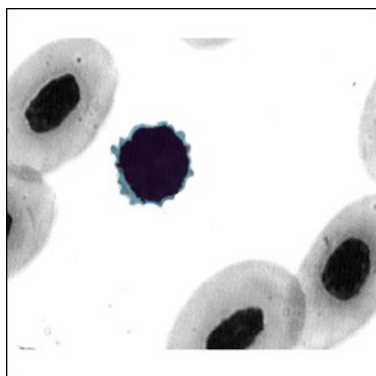


Рисунок 1.5. Лимфоцит периферической крови амфибий

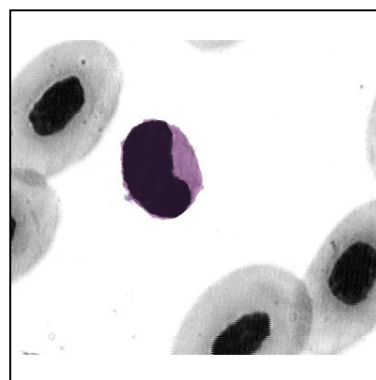


Рисунок 1.6. Моноцит периферической крови амфибий

В – лимфоциты образуются в костном мозге. После встречи с антигеном В-лимфоцит мигрирует в костный мозг, селезенку и лимфатические узлы, где они размножаются и трансформируются в плазматические клетки, которые являются продуцентами антител – γ -глобулинов (Хамидов, Акилов, Турдыев, 1978). Основная функция – участие в формировании гуморального иммунного ответа посредством активной продукции специфических антител (иммуноглобулинов) (Галактионов, 2005). Часть лимфоцитов у лягушек может преобразовываться в веретеновидные клетки, а последние – трансформироваться в макрофаги (Гольдберг, 1973).

Содержание моноцитов (рис. 1.6) в периферической крови невелико и колеблется в пределах 2-10 %. Они отличаются своеобразным строением. Ядро имеет неправильные контуры и расположено эксцентрично, цитоплазма заполнена множеством разных внутриклеточных структур. В периферической крови лягушек и жаб моноциты встречаются в незначительном количестве – 0,2%. Это крупные клетки бобовидной или подковообразной формы с ядром, расположенным в центре. Цитоплазма серовато-голубоватого цвета, в ней много вакуолей, комплекс Гольджи расположен вблизи ядра. В цитоплазме выявлено значительное количество азурофильных гранул (Хамидов и др., 1978).

Моноциты появляются в очаге воспаления после нейтрофилов. В очаге воспаления моноциты фагоцитируют микробы, а также погибшие лейкоциты,

поврежденные клетки воспаленной ткани, очищая очаг воспаления и подготавливая его для регенерации.

Количество крови у лягушек составляет 4,2 – 4,9% веса тела. Лейкоцитов в крови лягушки – 2410-39100 в 1 мм³. Количество их зависит от вида лягушки, пола и времени года (Западнюк, Западнюк, Захария, 1974).

Лейкоцитарная формула (в %) амфибий по Западнюку (1974) выглядит следующим образом: лимфоцитов – 24 – 69, моноцитов – 0 – 0,5, базофилов – 8 – 37, эозинофилов – 6 – 26, нейтрофилов – 8,5 – 17.

Лейкоцитарная формула (в %) амфибий по Романовой (2010) имеет вид: лимфоцитов – (67,66±0,98) %, моноцитов – (2,18±0,98) %, эозинофилов – (7,53±0,97) %, нейтрофилов – (15,67±0,99) %.

Различные нарушения морфологической структуры клеток крови могут служить показателем неблагоприятного состояния среды обитания животных. В системе комплексного биологического мониторинга водных экосистем всё чаще используются земноводные (Чернышова, Старостин, 1994; Леонтьева, Семенов, 1997; Пескова, 2001, 2004). К настоящему времени количество работ, посвященных изучению специфики гематологических показателей амфибий, населяющих антропогенно трансформированные территории, сравнительно невелико (Жукова, Пескова, 1999; Исаева, Вязов, 1997 и др.). Большинство исследователей в качестве показателя степени загрязнённости водоёмов используют изменение лейкоцитарной формулы (лейкограммы) периферической крови амфибий (Минеева, Минеев, 2010, 2014).

Периферическая кровь лягушек может быть использовать как тест-система для оценки загрязненности окружающей среды пестицидами. Исследователи выделяют два основных типа изменений в белой крови, определяемых концентрацией пестицида. При первом типе изменений периферической крови бесхвостых амфибий в условиях загрязнения наблюдается лейкоцитоз. Второй тип реакции свидетельствует о попытке организма земноводных справиться с высокими дозами токсиканта. Наблюдается лейкоцитоз, который сопровождается нейтропенией при явном

лимфоцитозе. Кроме того, показано, что вместе с падением общего количества нейтрофильных гранулоцитов выявляется присутствие юных и палочкоядерных нейтрофилов (Жукова, Пескова, 1999).

Канадские ученые в лабораторных условиях анализировали воздействие 6 пестицидов на отловленных в природе (Канада) головастика лягушки *Rana pipiens*. В течение 3-х недель их выращивали в воде, содержащей смесь этих пестицидов в различной концентрации, а затем добавляли культуры паразитической нематоды *Rhabdias ranae*. Оценивали иммунологические показатели крови и степень зараженности нематодами. Показано, что присутствие пестицидов существенно снижает пролиферацию лимфоцитов. Пролиферация восстанавливалась через 3 недели во всех подопытных группах, кроме подвергавшейся воздействию пестицидов в максимальной концентрации. В группе, находившейся в воде с максимальным содержанием пестицидов, отмечается снижение числа фагоцитов после появления нематод. В этой группе отмечается и максимальный уровень заражения. Таким образом, пестициды снижают иммунный ответ у земноводных и понижают их устойчивость к паразитарным инфекциям (Christin et al., 2003).

В Северной Америке так же исследовали действие широко используемого пестицида атразина в концентрации от 0 до 20 мг/л на эмбрионов, личинок и взрослых особей разных видов бесхвостых амфибий. Экспозиция на атразин икры *Rana pipiens*, *R. sylvatica* и *Bufo americanus* не влияла на вылупляемость или смертность через 96 ч после вылупления. Однако, отмечено дозозависимое увеличение процента появления деформированных личинок у всех 3-х видов. У взрослых *Rana pipiens* экспозиция в атразин приводила к усилению букальной и торакальной вентиляции. Однако, т.к. атразин не влиял на гемоглобин, это респираторное расстройство, по-видимому, не является следствием снижением способности крови переносить кислород. Лягушки, экспонируемые к наиболее высокой концентрации атразина, переставали питаться на время эксперимента, но их масса не менялась, видимо за счет компенсаторного поглощения воды.

Вредная для амфибий концентрация атразина значительно превышает обнаруживаемую в водах Северной Америки (Allran, Karasov, 2001).

На кровь амфибий оказывает существенное влияние гербицид симазин. Обработка животных симaziном (концентрация действующего вещества – 0,5 и 5 мг/л) в течение 7 суток в период икрометания позволила изучить формирование уровней эритроцитов с микроядрами и проследить взаимосвязь этого процесса с нарушением деления клеток. Изучалось также воздействие гербицида на изменение частоты аберраций хромосом в клетках костного мозга. Анализ периферической крови животных, обработанных симaziном, показал присутствие большего числа клеток с микроядрами, по сравнению с контролем. При обработке амфибий гербицидом отмечены различные формы повреждения ядра, представленные фрагментацией и конденсацией хроматина, а также образование большого числа безъядерных клеточных форм.

Анализ клеток костного мозга показал, что симазин в изученной концентрации не вызывает достоверного изменения частоты аберраций хромосом. Костный мозг представлен гетерогенными клетками, обладающими высокой скоростью обновления, в которых повреждения ДНК элиминируются, не проходя в следующий клеточный цикл. Таким образом, показаны цитотоксический эффект симазина и роль высоких темпов обновления крови травяной лягушки на число регистрируемых повреждений хромосом (Кожуро, Семенчик, Афонин, 2003).

Одним из важнейших факторов воздействия на организм амфибий является свинец. Источником воздействия свинца на организм являются бензин, вода, красители и промышленные эмиссии. Токсичность свинца проявляется в отношении кроветворной системы, периферической и центральной нервной системы, почек, желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, репродуктивной системы.

Изучение гематологических особенностей амфибий в градиенте антропогенной трансформации среды позволило установить существенные

изменения, происходящие в крови животных и популяций, подверженных воздействию урбанизации и загрязнения. Отмечены качественные различия в адаптивной стратегии (на примере гемопоэза) 3-х видов лягушек рода *Rana* при антропогенной трансформации среды. Показано, как различия в популяционном полиморфизме близких видов могут сказываться на их судьбе в условиях антропогенной трансформации среды (Вершинин, 2004).

Минеев и Минеева (2010, 2014) изучали патологические изменения эритроцитов периферической крови озёрной лягушки Саратовского водохранилища. Характерными загрязняющими веществами являются соединения меди, марганца, фенолов и сульфатов. Исследования показали, что в условиях Саратовского водохранилища лишь у 5.88% озёрных лягушек эритроциты не имели патологий. У 20.59% амфибий обнаружены эритроциты с каким-либо одним видом патологии.

Проведено изучение изменений общего количества лейкоцитов, лейкоцитарной формулы периферической крови и оценена стабильность развития по показателю флуктуирующей асимметрии популяций зеленых лягушек *Rana lessonae* и *Rana ridibunda*, обитающих в городских водоемах г. Нижнего Новгорода и Нижегородской обл. (Романова, 2003). Обнаруженные изменения белой крови земноводных в зависимости от величины антропогенного воздействия в исследованных водоемах автор сводит к 2-м типам. При 1-м типе (уровень стабильности развития популяций, по Захарову, 2 балла) выявлена нейтропения, увеличенное содержание эозинофилов и общая лейкопения. При 2-м типе – более интенсивном антропогенном воздействии и отклонении состояния организма от условий нормы, оцениваемом по Захарову в 3 балла, лейкограммы лягушек отличались большими негативными изменениями. Установлен лейкоцитоз, сопровождающийся нейтропенией, эозинофилией, базофилией и снижением общего числа лимфоцитов. При отсутствии отклонений в стабильности развития от условно нормального состояния выявлен близкий к нормальному баланс параметров лейкограмм. Возрастающее число лимфоцитов и юных форм

нейтрофилов в периферической крови земноводных свидетельствует о стимуляции процессов, обеспечивающих защитную реакцию организма. Установлена корреляционная взаимосвязь между интегральным показателем стабильности развития, содержанием эозинофилов и лимфоцитов у особей популяций зеленых лягушек, обитающих в исследованных водоемах (Романова, Романова, 2003).

В селезенке зеленых лягушек (*Rana esculenta*) подсчитывали общее количество ядросодержащих клеток, и в тестах розеткообразования определяли функциональную активность популяций иммунокомпетентных клеток (Т- и В-лимфоцитов). Уровень стабильности развития популяций зеленых лягушек оценивали по величине интегрального показателя флуктуирующей асимметрии. Балл величины стабильности развития земноводных определяли по 5-балльной шкале отклонения величины флуктуирующей асимметрии. Установлено наличие отрицательной зависимости между абсолютным содержанием Т-лимфоцитов в селезенке амфибий и показателем асимметрии во всех исследованных точках. Таким образом, анализ морфогенетических и иммунологических показателей популяций зеленых лягушек в разных экологических условиях обитания показал сходный характер реакции на воздействие внешней среды. Достаточно высокие значения коэффициента корреляции между ними свидетельствуют о возможности использования любого из примененных подходов при первичной оценке качества среды обитания (Романова, 2004).

Действие реакционных масс иприта в большей степени влияло на форменные элементы крови. Обнаружено, что объективными индикаторами воздействия на характеристики крови является соотношение сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. У лягушек значение показателя возрастает по мере увеличения воздействующей концентрации, развивалась лейкомоидная реакция нейтрофильного типа. У жабы токсикант вызывал лейкомоидную реакцию лимфатического типа с увеличением значения показателя лимфоцитов. Результаты клинико-лабораторного исследования крови

подтверждали большую чувствительность жабы, по сравнению с лягушкой, к воздействию токсиканта, сохраняющей в большей степени свойства иммунной системы (Конешова и др., 2001).

Саратовскими учеными исследовалась токсичность зомана и его реакционных масс для обитателей пресных водоемов; проведены эксперименты с озерной лягушкой и зеленой жабой. Показано, что при воздействии зомана среднесмертельной концентрации по мере увеличения экспозиции наблюдается тенденция к росту количества лимфоцитов на фоне уменьшения числа эозинофилов и базофилов. Изменения свидетельствуют о повышении напряжения гуморального звена иммунитета, что подтверждается характером лейкомоидной реакции лимфатического типа. Сравнительный анализ ответной реакции форменных элементов периферической крови лягушки показывает, что по мере увеличения воздействующей токсодозы реакционной массы на 24 ч наблюдения определяется тенденция к снижению количества лимфоцитов, отмечается незначительное повышение содержания сегментоядерных нейтрофилов на фоне некоторого снижения базофилов и эозинофилов, что определяет также нейтрофильный тип лейкомоидной реакции. Предположено, что в пораженном организме иммунная система в большей степени, по сравнению с влиянием зомана, сохраняет свои функции, что обуславливает более высокую выживаемость организма (Коненова, Шляхтин, Конешов, 2001).

Таким образом, анализ экспериментальных данных показал, что повышение защитных свойств крови амфибий под воздействием природных и антропогенных факторов может происходить разными путями: может наблюдаться лейкоцитоз, сопровождающийся нейтропенией при явном лимфоцитозе, может, наоборот, происходить снижение общего числа лимфоцитов при повышении содержания сегментоядерных нейтрофилов. Тип реакции белой крови амфибий на загрязнение, по мнению Жуковой и Песковой (1999), не зависит от природы токсиканта. В экологическом мониторинге реакция белой крови животных используется для оценки

стрессовых эффектов факторов среды при различных техногенных воздействиях.

1.3. Окислительный стресс как реакция организма на экстремальные условия среды

Кислород – основа существования и развития жизни на нашей планете. Все живое на Земле имеет общую химическую структуру и общие биохимические процессы. В большом количестве биохимических реакций в организме принимают участие свободные радикалы, источниками свободных радикалов в биосистемах являются активные формы кислорода (АФК), где АФК генерируются во всех частях клетки (Тренева, 2009).

В настоящее время накоплено много сведений о роли продуктов свободно-радикального окисления. Большая часть их генерируются фагоцитами, Т-лимфоцитами при воспалительных реакциях и выполняют защитную роль, уничтожая патогенные микроорганизмы, измененные и мутировавшие клетки. Важную роль играют медиаторов межклеточных взаимодействий, которые участвуют при поддержании жизнедеятельности организмов, в адаптивных реакциях, в обеспечении надежности работы защитных систем организма (иммунная система и система детоксикации), то есть в процессах, которые обеспечивают гомеостаз, физиологический статус и взаимоотношения организмов в экосистемах (Зенков и др., 2001; Дубинина, 2006; Герасимова, 2010) (рис. 1.7).



Рисунок 1.7. Основные пути участия АФК в метаболических процессах

Свободные радикалы — это химические соединения, которые содержат в своем составе один или несколько неспаренных электронов. Наличие неспаренных электронов повышает реакционную способность атома или молекулы за счет того, что они действуют как акцепторы электронов и как бы «крадут» электроны у других молекул. Этот процесс «захвата» чужих электронов по сути является окислением, при этом свободные радикалы в этом процессе являются окислителями, так как именно они провоцируют отдачу электронов другими молекулами (Halliwell, 1996). Свободные радикалы могут образовываться во внешней среде (например, вследствие электромагнитного излучения — радон, космическое излучение; при загрязнении среды тяжелыми металлами), а также вследствие антропогенных факторов, таких как продукты внутриклеточного метаболизма. Так, например, железо являясь металлом переменной валентности, участвует в катализируемом окислении белков. Также механизм действия железа как тяжелого металла заключается в основном в стимуляции образования активных форм кислорода и в ингибировании активных групп ферментов, в том числе и антиоксидантных (Гильденскиольд, 1992; Будников, 1998). Медь по своей химической природе сильнее связывается с органическими соединениями по сравнению с другими металлами. Ионы меди способны вытеснять функциональные металлы из ферментов и восстанавливать молекулярный кислород до активных форм кислорода. Эти свойства делают медь сильным токсикантом при избыточных дозах (Маркосян, 2003).

Самыми распространенными являются гидроксильные радикалы ($\text{OH}^\cdot$), супероксидный радикал ($\text{O}_2^\cdot$) и оксид азота ($\text{NO}^\cdot$). Также в роли окислителей выступают такие молекулы, как перекись водорода (H_2O_2) и пероксинитрат ($\text{ONOO}^\cdot$), которые не являются свободными радикалами, но могут приводить к их образованию посредством цепных химических реакций (Дубинина, 2006; Левин, Васенина, 2013) (рис. 1.8).

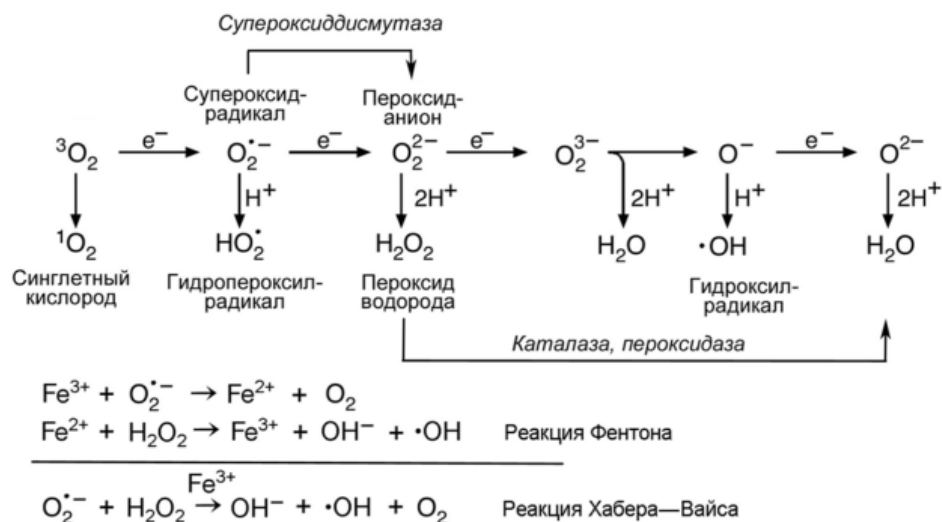


Рисунок 1.8. Механизм образования свободных форм кислорода

Свободные радикалы и соединения, способные в ходе цепных реакций приводить к их образованию, рассматриваются в рамках единой группы, которую обозначают как активные формы кислорода (АФК), они способны приводить к различным окислительным процессам в клетке. АФК являются продуктами метаболических процессов, протекающие в норме в организме. Генерация АФК происходит по пути окислительно-восстановительных реакций при участии кислорода в различных структурах клетки и при различных ее состояниях (Владимиров, 1998; Fray, 2001).

Обсуждая биологическую роль свободно-радикальных процессов, несмотря на установленный факт активации свободно-радикального окисления при многих патологических состояниях, необходимо подчеркнуть, что эти процессы являются нормальными, физиологически значимыми и постоянно протекающими во всех органах и тканях. В норме все клетки продуцируют АФК. В покое клетка тратит от 2 до 15 % поступающего кислорода на образование АФК (Путилина, 2004).

Процесс свободно-радикального окисления является регуляторным в норме и патогенным при изменении скорости его протекания. Из этого следует, что предотвращение чрезмерной активации свободно-радикального

окисления можно рассматривать как один из важнейших механизмов поддержания гомеостаза (Искусных, 2004; Путилина и др., 2008).

Супероксидный анион-радикал является родоначальником многих других АФК. Основным источником генерации $O_2^{\cdot-}$ являются ферментативные системы (НАДФН-оксидазу фагоцитирующих клеток, НАДФН-оксидазу нефагоцитирующих клеток, ферментативные комплексы микросомального окисления и др.). Уровень спонтанно образующегося $O_2^{\cdot-}$ составляет $10^{-12} - 10^{-11}$ моль (Дубинина, 1992; Янковский, 2000; Зенков и др., 2001). При стимуляции фагоцитов может образовываться до $10 \text{ нмоль } O_2^{\cdot-} / \text{час} \times 10^4$ клеток. Наибольшее количество $O_2^{\cdot-}$ образуется в фагоцитирующих клетках в процессе «дыхательного взрыва» (Murrel et al., 1990). Образовавшийся при этом супероксидный анион-радикал имеет бактерицидное, цитотоксическое и иммунорегуляторное действие. Высокая активность «дыхательного взрыва» макрофагов микроглии позволяет рассматривать ее как систему мобильных и мультифункциональных иммунных клеток нервной системы, которые выполняют универсальную роль в защите нервной ткани (Дубинина, 2006).

Гидроксильный радикал ($OH^{\cdot}$) является наиболее токсичным из всех активных форм кислорода. Он проявляет мутагенное и цитотоксическое действие при состоянии окислительного стресса. Его время жизни колеблется $2 \times 10^{-9} - 8 \times 10^{-9}$ сек (Gurer-Orhan et al., 2002). Генерация $OH^{\cdot}$ происходит в присутствии в присутствии ионов железа и меди, $O_2^{\cdot-}$, перекиси (H_2O_2). При окислительном стрессе создаются условия, при которых происходит высвобождение железа из комплексов с белками, вызывая их деструкцию в биологических жидкостях (плазма, синовиальная жидкость). В нормальных физиологических условиях ионы меди не играют важной роли при образовании $OH^{\cdot}$, т.к. они образуют стойкие комплексы, а аминокислотными остатками белковых молекул (Дубинина, 2006).

Активные формы кислорода участвуют в регуляции апоптоза, активизируют и подавляют экспрессию генов, регулируют рост и

дифференциацию клеток, свертывание крови и др. Например, перекись водорода влияет на процессы агрегации тромбоцитов, регулирует синтез гистамина и его выброс из тучных клеток (Akagi et al., 1994). Также H_2O_2 стимулирует рост фибробластов животных и человеческих лейкемических клеток, пролиферацию эндотелиальных клеток (Дубинина, 2006).

Активные формы кислорода являются метаболитами процессов обмена веществ и выполняют определенные функции в организме. Но при патологических состояниях, которые сопровождаются продукцией АФК, они начинают проявлять свою реакционную способность, связанную с разрушением клеточных структур и токсической окислительной деструкцией биомолекул тканей – белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот. Содержание АФК в клетках поддерживается на определенном уровне за счет функционирования многокомпонентной антиоксидантной системы (АОС) (Владимиров и др., 1991). Компоненты антиоксидантной защиты подразделяют на высокомолекулярные (белковые) и низкомолекулярные соединения. Антиоксидантная система проявляет специфическую и неспецифическую антиоксидантную активность. Действие специфической АОС направлено на снижение количества оксидантов путем разрушения и связывания АФК. Это приводит к разрыву цепей свободно-радикальных реакций. Действие неспецифической АОЗ направлено на снижение дополнительной продукции свободных радикалов, например, устранение металлов переменной валентности за счет их связывания (Halliwell, Gutteridge, 1990) (рис. 1.9).

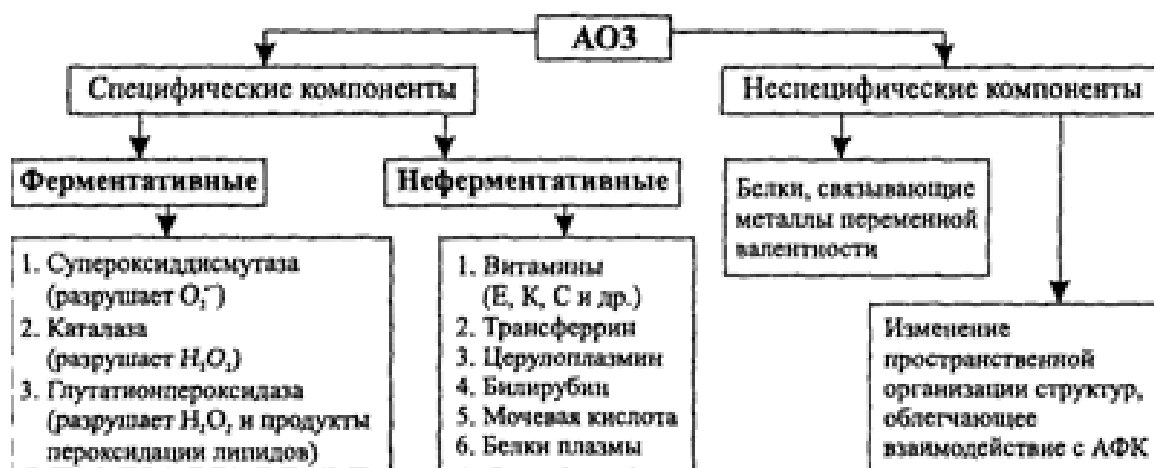


Рисунок 1.9. Компоненты антиоксидантной защиты в организме

Основное значение АОС в тканях – защита от токсического воздействия оксидантов при нормальном функционировании систем организма и при состоянии окислительного стресса. В организме присутствует баланс между элементами АОЗ, ферментативные элементы могут также выступать и в качестве прооксидантов, являясь источниками АФК, при окислительном стрессе. Также и ферментативные компоненты могут вносить вклад в генерацию АФК при некоторых патологических состояниях.

Длительный окислительный стресс снижает резервно-адаптационные возможности организмов и формирует различные типы нарушений, в первую очередь, нервной и иммунной систем. Окислительный гомеостаз организма поддерживается сбалансированной работой прооксидантной и антиоксидантной системам (Joanisse, Storey, 1996; Dawson et al., 2015).

В ряде работ показано, что представители батрахофауны (зеленые лягушки рода *Pelophylax*) урбанизированных ландшафтов, способны аккумулировать ксенобиотики и выдерживать большие антропогенные нагрузки (Мисюра и др., 2004; Пескова, 2004). Выживанию гидробионтов в этих условиях среды способствует изменение уровня белково-липидного, углеводного обмена (гликогена), а также возрастание в печени ферментов микросомальной фракции, проводящих детоксикацию организма. Наблюдаемая при этом активация свободно-радикальных процессов (Wall et

al., 2012), направлена на поддержание окислительного гомеостаза организма (Falfushinska et al., 2008, Муравлева, 2010). Однако высокая интенсивность проокислительных реакций может привести к развитию окислительного стресса, сопровождающегося снижением активности антиоксидантной защиты организма (Сурова, 2002; Brodtkin et al., 2003).

Резюме. Подводя итог обзора литературы, отметим, что любой адаптивный или патологический процесс протекает на фоне интенсификации свободно-радикального окисления биосубстратов (Кондратьев и др., 1998; Татьянаенко и др., 1998) и изменчивости системы крови (Романова, Романова, 2003; Вершинин, 2004; Пескова, 2004; Минеев, Минеева, 2010 и др.). В ответ на это происходит активация антиоксидантной системы (АОС) организма. Ее представляют низкомолекулярные соединения – ловушки радикалов, к которым относятся витамины (А, С, Е, Д и К), биофлавоноиды, низкомолекулярные тиолы (глутатион и эрготионеин), а также антиперекисные ферменты: супероксиддисмутаза, глутатионпериоксидаза, глутатионредуктаза, каталаза (Соколовский, 1984; Губский и др., 1992; Капралов и др., 1993; Дубинина, 2006; Муравлева, 2010 и др.). Конечный результат процесса адаптации или приспособление организма к новым условиям окружающей среды или срыв адаптивных механизмов. Следствием этого является развитие патологического состояния, определяемое в итоге одним из главных факторов регуляции метаболизма – взаимоотношением антиоксидантных и прооксидантных механизмов, иными словами, способностью АОС защитить клетку от свободных радикалов и перекисей (Антиоксиданты ..., 1984; Левицкий и др., 1994; Дубинина, 2006).

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика объектов исследования

Лабораторные и полевые исследования проводили в течение 2016-2018 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. 2.1).

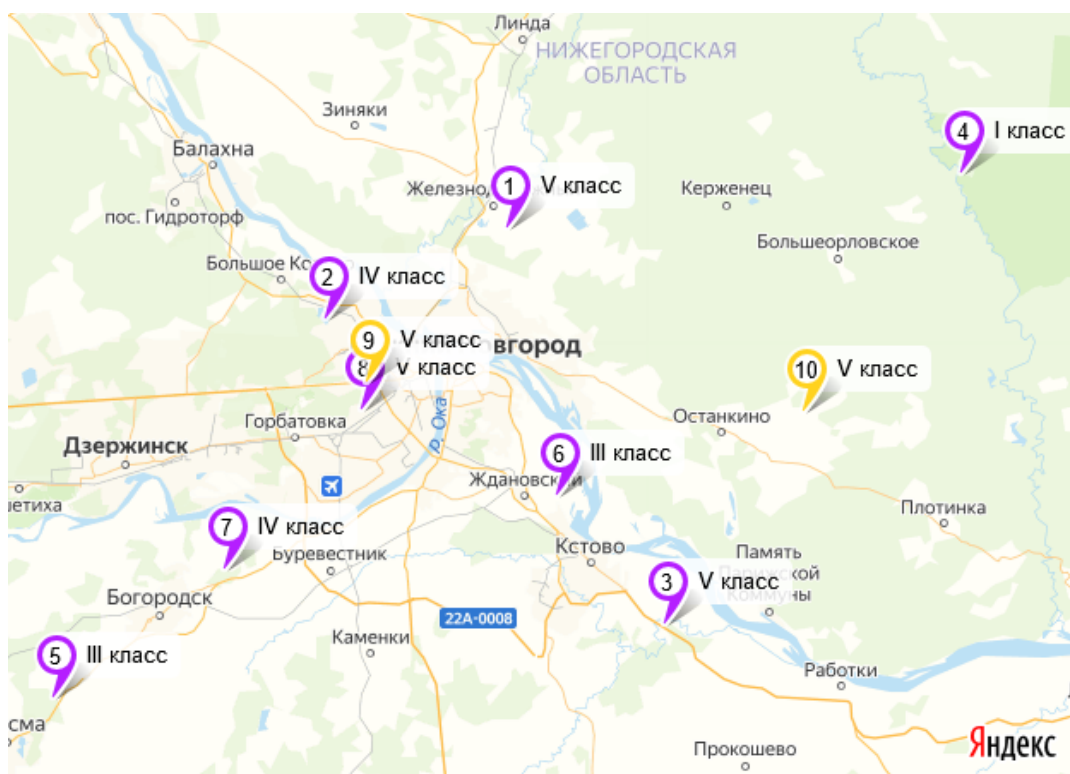


Рисунок 2.1. Ситуационный план. Места сбора амфибий в Нижегородской области

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

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

Краткая характеристика водных объектов, в которых были собраны зеленые лягушки и объем собранного материала представлены в таблице 2.1.

Краткая характеристика водных объектов и объем собранного материала

№	Место сбора	Год исследования	Число особей	Краткая характеристика водного объекта
1	2	3	4	5
Озерные лягушки (<i>Pelophylax ridibundus</i>)				
1	Торфокарьер Ситниковского орнитологического заказника (координаты: широта 56°43'42,93'', долгота 44°07'17,99')	2016	15	Крупная система водоемов выработанных торфяных месторождений разного типа и возраста на месте переходных и низинных болот. Водоемы имеют неодинаковую глубину и разный характер растительности. Имеются небольшие участки неразработанных и восстановившихся после торфоразработок низинных и переходных болот. На территории ведутся выборочные рубки леса на дрова, охотничье хозяйство (осенняя охота), любительское рыболовство
		2017	20	
		2018	20	
		2019	20	
2	оз. Силикатное (г. Н.Новгород, Сормовский р-н); географические координаты: широта 56.370912, долгота 43.777608	2016	15	Искусственный водоем, антропогенная нагрузка значительная. Зона многоэтажной застройки, высокая рекреационная нагрузка, автотранспортное и хозяйственно-бытовое загрязнение
		2017	20	
		2018	8	
		2019	20	
3	р. Кудьма у п. Ветчак (Нижегородская обл., Кстовский р-н); географические координаты: широта 56.096735, долгота 44.314317	2017	20	Основные загрязнители поступают в реку от предприятий г. Богородска и нефтеперерабатывающего завода г. Кстово
		2018	20	
		2019	20	

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5
4	оз. Рустай (Нижегородская обл., Семеновский р-н, ГПЗ «Керженский»); географические координаты: широта 56°21'9.88'', долгота 43°53'49.93''	2016	15	Естественный водоем, старица реки Керженец. Антропогенная нагрузка слабая (рекреационное воздействие)
5	Болото Круглое Дальнее (Нижегородская обл., Богородский р-н); географические координаты: широта 56°02'47.45'', долгота	2016	15	Естественный водоем, антропогенная нагрузка слабая (место сбора ягод)
6	оз. Жилново (Нижегородская обл., Кстовский р-н); географические координаты: широта 56°21'28.80'', долгота 44°15'37.41''	2016	15	Естественный водоем, пойменный. Антропогенная нагрузка значительная (рекреационное и культурно-бытовое воздействие)
7	оз. Березовское (Нижегородская обл., Богородский р-н); географические координаты: широта 43.622971731141, долгота 56.146989027575	2017	20	Озеро часто посещается рыбаками, на расстояние 500 метров от озера находится автостоянка и жилые застройки п. Приозерный
8	оз. Сортировочное (Нижний Новгород, Канавинский р-н); географические координаты: широта 43.838322 долгота 56.288801	2019	20	Озеро окружено березовой рощей и песчаными пляжами, берег пологий, испытывает рекреационное и культурно-бытовое воздействие
Всего			283 особей	
Прудовые лягушки (<i>Pelophylax lessonae</i>)				

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5
9	оз. Вторчермет (г. Н.Новгород, Канавинский р-н); географические координаты: широта 56.311944, долгота 43.848889	2016	15	Искусственный водоем. Антропогенная нагрузка значительная, находится в зоне многоэтажной застройки, испытывает влияние ОАО «Вторчермет»
		2017	20	
		2018	20	
		2019	20	
10	болото п. Белкино (Нижегородская обл., Борский р-н); географические координаты: широта 56.286208, долгота 44.548075	2017	20	Низинное болото, расположено рядом с частными огородами и садами
		2018	20	
		2019	20	
Всего				135 особей
Итого				418 особей

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).

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).

2.2. Гидрохимический анализ водной среды

В исследованных водоемах в прибрежной зоне были отобраны пробы воды, в которых с помощью спектрофотометра Nash DR-2800 определены химические загрязнители: железо общее, марганец, медь, хром, нитрат-ионы (NO_3), нитрит-ионы (NO_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>) по формуле:

$$S_j' = S_j / N_j,$$

где S_j – комбинаторный индекс загрязненности воды в j -м створе; N_j – число учитываемых в оценке ингредиентов; S_j' – удельный комбинаторный индекс загрязненности воды в j -створе.

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 сразу же после забоя амфибий из бедренной кости (Тодоров, 1968). Приготовление мазков костного мозга и их окраска осуществлялась по стандартной методике (Гематология, 2004). Учет клеток костного мозга проводился с помощью микроскопа с иммерсионной системой при общем увеличении $\times 1500$. По окрашенным препаратам проводили дифференцировку клеток миелоидного (миелобласты, промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты) и эритроидного (эритробласты, пронормоциты, нормоциты базофильные и

полихроматофильные) рядов. Миелобласты – это родоначальные клетки гранулоцитарного ряда, чаще круглой, реже полигональной формы, отличаются нежной структурой ядер. Ядро содержит 2–5 ядрышек, окрашенных в синий или голубой цвет. Голубая цитоплазма окружает ядро небольшим пояском, содержит умеренное количество неспецифической азурофильной зернистости, имеющей переходные оттенки от красного до фиолетового цвета (рис. 2.2а). Промиелоциты – ядро фиолетовое, круглое или овальное с эксцентричным или центральным положением, тонкая ядерная мембрана. Цитоплазма голубая. Гранулы азуро-, эозинофильные (рис. 2.2б). Миелоциты – ядро красно – фиолетовое, овальное или с небольшой выемкой с эксцентричным положением. Неотчетливая ядерная мембрана. Голубовато-розовая цитоплазма (рис. 2.2в). Метамиелоциты – ядро фиолетовое, толстое, подковообразное или с выемкой с эксцентричным или центральным положением. Ядерная мембрана присутствует (рис. 2.2г).

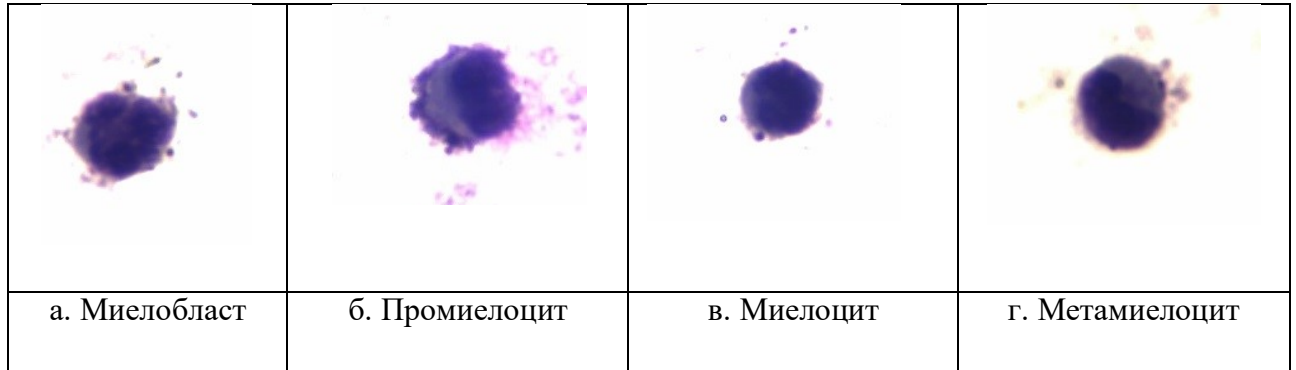


Рисунок 2.2. Клетки миелоидного ростка костного мозга (а, б, в, г)

Эритробласты – являются морфологически различными родоначальными клетками элементов эритроидного ростка. Это большие круглые клетки диаметром 15–25 мкм или около 20 мкм и более, имеют большое овальное или круглое ядро, занимающее большую часть клетки, окрашивающееся в темный красно-фиолетовый цвет. Цитоплазма имеет различные размеры, насыщенно-синий цвет с фиолетовым оттенком, с зоной

просветления вокруг ядра в некоторых клетках (рис. 2.3а). Пронормоциты – морфологически близки к эритробластам, но отличаются от них меньшей величиной (12-18 мкм), более грубой структурой ядра. Форма клетки круглая или овальная. Цитоплазма значительной величины, базофильная, окрашивается в синий цвет (рис. 2.3б). Базофильные нормоциты обычно имеют размеры 10-18 мкм. Ядро круглое, плотное, не содержит нуклеол. Структура ядра более грубая, чем у пронормоцита, с четким разделением на базихроматин и оксихроматин, в результате чего ядро имеет колесовидную структуру. Цитоплазма базофильная, темно- или светло-синяя (рис. 2.3в). Полихроматофильные нормоциты по размеру меньше базофильных – 9-12 мкм. Форма круглая или овальная. Ядро плотное. Цитоплазма клеток, накапливая гемоглобин, воспринимает кислые краски и в зависимости от степени насыщения гемоглобином при окрашивании приобретает цвет от серовато-синего до серовато-розового – полихроматофилия (рис. 2.3г).

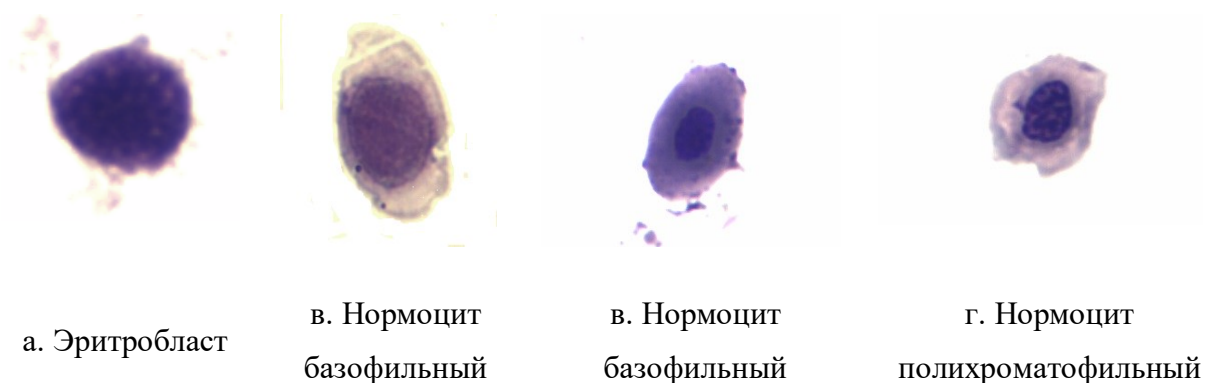


Рисунок 2.3. Клетки эритроидного ростка костного мозга (а, б, в, г)

В каждом мазке анализировали по 100 клеток, получая процентное содержание различных ядросодержащих клеток миелоидной ткани. По полученным результатам рассчитывали интегральный индекс миелограммы, как 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 были рассчитаны интегральные лейкоцитарные индексы (отн. ед) (Мустафина и др., 1999; Ткаченко, Дерхо, 2014; Sabagnaetal., 2005):

1. Кровно-клеточный показатель, ККП:
$$= \frac{\mathcal{E} + ПН + СН}{Л + М};$$
2. Реактивный ответ нейтрофилов, РОН=
$$\frac{ПН \bullet СН}{(Л + М) \bullet \mathcal{E}};$$
3. Лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс, ИЛГ=
$$\frac{Л \bullet 10}{\mathcal{E} + ПН + СН};$$
4. Индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов, ИСНЛ:
$$= \frac{ПН + СН}{Л};$$
5. Индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов, ИСЛЭ:
$$= \frac{Л}{\mathcal{E}};$$
6. Индекс соотношения нейтрофилов и эозинофилов, ИСНЭ =
$$\frac{ПН + СЭ}{\mathcal{E}};$$
7. Индекс сдвига лейкоцитов, ИСЛ =
$$\frac{\mathcal{E} + Б + \sum Н}{М + Л};$$
8. Индекс ядерного сдвига нейтрофилов ИЯСН=
$$\frac{ПН + Мл + ЮН}{СН},$$

где *Мл* – миелоциты; *ЮН* – юные нейтрофилы; *ПН* – палочкоядерные нейтрофилы; *СН* – сегментоядерные нейтрофилы; *Э* – эозинофилы; *Б* – базофилы; *М* – моноциты; *Л* – лимфоциты.

2.5. Метод окислительной модификации белков и свободно-радикального окисления

Уровень окислительной модификации белков (ОМБ) сыворотки крови лягушек измеряли по методу, основанному на реакции взаимодействия окисленных альдегидных и кетонных аминокислотных остатков белков с 2,4 – динитрофенилгидразином (ДНФ) с образованием альдегид- (АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) при спонтанном окислении. Оптическую плотность 2,4 – ДНФГ регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 при пяти длинах волн. Для альдегидных карбонильных производных спектр поглощения регистрировали при длине волны 230; 270 нм. Для алифатических кетонных карбонильных производных нейтрального характера – при длине волны 370 нм, основного характера – при длине волны 430; 530 нм. Расчет содержания 2,4 – ДНФГ в сыворотке крови выражали в единицах оптической плотности на мл сыворотки (ОЕ/мл) (Дубинина, 2006).

Интегральные показатели свободно-радикального окисления оценивали методом индуцированной перекисью водорода и сульфатом железа хемилюминесценции на биохемилюминометре БХЛ-07 (Kuzmina et al., 1983). Анализировали следующие параметры: индекс $I_{\max}$, мВ – максимальную интенсивность хемилюминесценции проб сывороток крови, показывающую потенциальную способность объекта к свободнорадикальному окислению; индекс S, мВ – светосумму хемилюминесценции за 30 секунд, для расчета показателя $1/S$ (отн.ед.) – общей антиоксидантной активности сыворотки крови; $\lg(-2a')$ – показатель характеризующий скорость восстановления антиоксидантной защиты.

2.6. Статистических анализ экспериментальных данных

Полученные первичные данные проверяли на нормальность распределения по критериям Шапиро–Уилка, Лиллиефорса, Колмогорова – Смирнова. Критериями нормальности оценивали нулевую гипотезу о

соответствии анализируемых показателей нормальному распределению. Если критерии показывали разные результаты, то предпочтение отдавали критерию Шапиро–Уилка, как более надежному (Реброва, 2006). 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 множественном сравнении 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 применением поправки Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. Характеристика абиотических условий обитания лягушек рода *Pelophylax*

В исследованных водоемах г. Н Новгорода и Нижегородской области в прибрежной зоне были отобраны пробы воды и выполнен количественный химический анализ. По результатам анализа для каждого водоема был рассчитан удельный комбинаторный индекс загрязненности воды (УКИЗВ) и определен класс качества воды.

Результат гидрохимического анализа водных объектов выявил в большинстве водных объектов превышение норматива качества воды для водоемов рыбохозяйственного назначения ($\text{ПДК}_{\text{рыб-хоз}}$) по содержанию железа, марганца, меди, хрома, сульфидов и нефтепродуктов. Норматив качества воды для водоемов рыбохозяйственного назначения ($\text{ПДК}_{\text{рыб-хоз}}$) (Нормативы качества воды..., 2010) был выбран нами, как наиболее жесткий из существующей нормативно-технической документации. На протяжении всего периода наблюдений в водах торфокарьера и оз. Вторчермет сохранялись высокие концентрации (мг/л) железа, марганца, меди и цинка. Воды участка р. Кудьмы у пос. Ветчак характеризовались значительным загрязнением медью, марганцем и нефтепродуктами. В концентрациях, существенно превышающих $\text{ПДК}_{\text{рыб-хоз}}$ содержались: никель, кобальт, цинк и свинец. В болоте п. Белкино отмечено высокое содержание железа, марганца, меди, хрома, никеля, кобальта, цинка, свинца и сульфидов. В водах оз. Силикатное в 2018–2019 гг. выявлено значительное превышение $\text{ПДК}_{\text{рыб-хоз}}$ по содержанию меди (в 55–25.5 раз) и марганца (в 45–30 раз) и существенное превышение содержания никеля, кобальта, цинка, свинца. Согласно удельному комбинаторному индексу загрязненности воды (УКИЗВ) за период наблюдений качество воды в водоемах ухудшилось. Так, в 2016 году воды торфокарьера характеризовались как слабо загрязненные, II класс; воды оз. Силикатное и оз. Вторчермет, относились к III классу, умеренно загрязненные. Результаты гидрохимического анализа в 2017 году показали, соответствие вод уже IV

классу, грязная. В 2019 году качество воды в четырех из пяти наблюдаемых водных объектов характеризовалось V баллом, экстремально грязная (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 $ПДК_{\text{рыб-хоз}}$ i -го ингредиента на водном объекте. Ввиду того, что исходные значения частных оценочных коэффициентов имели сильно смещенное «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 приблизительно на 75% (показатель детерминации $R^2=0.75$) дисперсия общего уровня загрязнения водных объектов определялась дисперсией концентрации ионов меди (рис. 3.1).

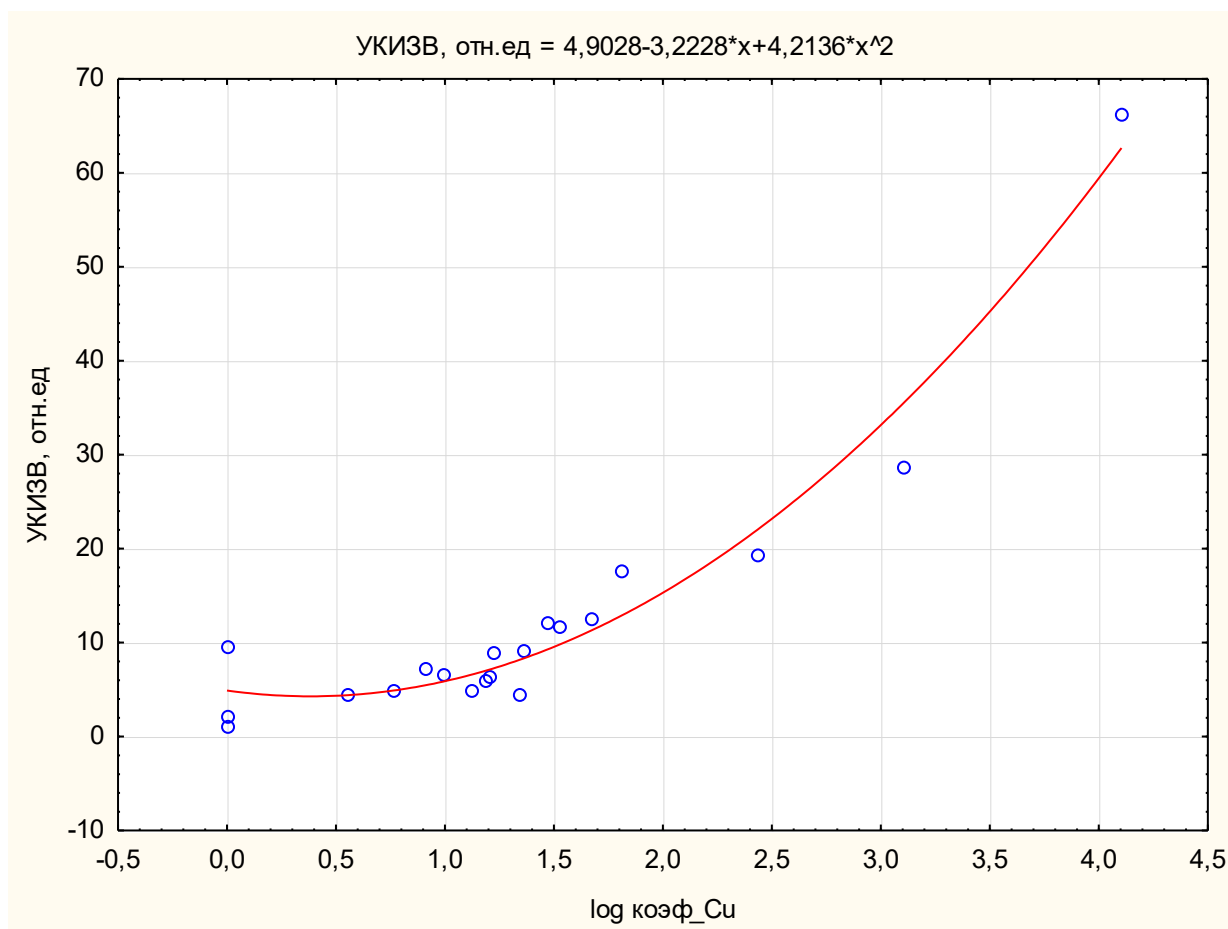


Рисунок 3.1. Зависимость между интегральным показателем загрязненности воды и содержанием меди в пробах воды

По оси абсцисс логарифм частного оценочного коэффициента содержания меди;

По оси ординат – удельный комбинаторный индекс загрязненности воды (УКИЗВ), отн. ед.

В целях классификации водных объектов на основании особенностей их загрязнения различными компонентами проведен кластерный анализ на основе евклидова расстояния с применением метода полной связи и ординация с использованием метода главных компонент.

По результатам кластерного анализа были выделены группы водных объектов сходные по гидрохимическому составу (рис. 3.2). Наиболее близкими между собой по анализируемым показателям в течение трех лет (2017–2019) наблюдений оказались пробы воды бол. Белкино в водах которого доминировали прудовые лягушки. Гидрохимические условия среды обитания озерных и прудовых лягушек в других водоемах такой стабильностью не отличались, качество воды в них за исследованный период существенно изменялось (от III к V классу), что отражалось в попадании водных экосистем в разные годы в разные кластеры (например, оз. Вторчермет).

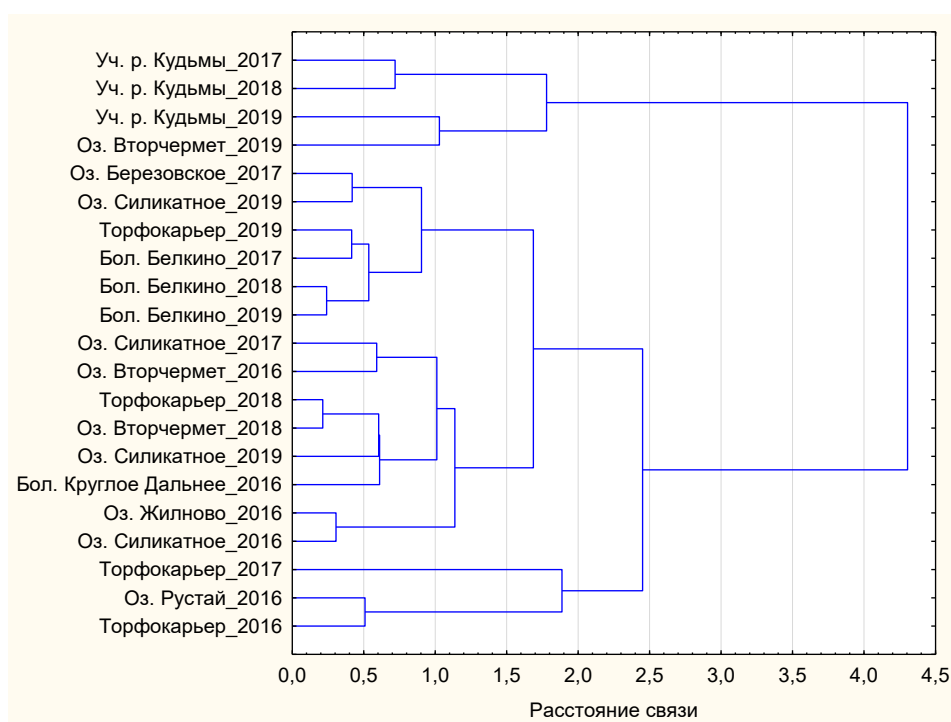


Рисунок 3.2. Дендрограмма сходства водных объектов по гидрохимическим условиям

Для уточнения и анализа гидрохимических особенностей водной среды обитания амфибий и сокращения исходных характеристик водных объектов мы воспользовались методом главных компонент и рассчитали несколько новых признаков, линейных индексов (главных компонент). С

вычислительной точки зрения количество главных компонент равно числу исходных переменных, но обычно основная доля информации, позволяющая различать объекты, «концентрируется» в гораздо меньшем числе компонент, которые и рассматриваются как их полноценная характеристика. Участие компонент в дифференциации водных экосистем было неодинаково.

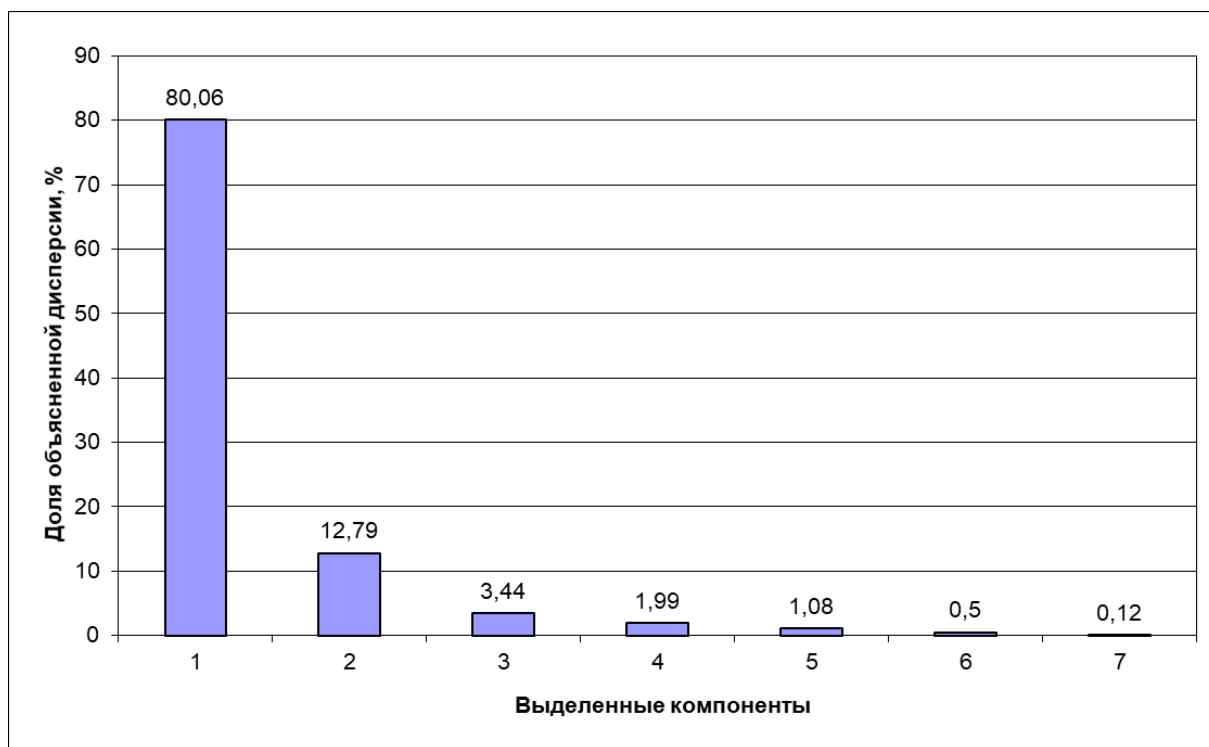


Рисунок 3.3. Доля объясненной дисперсии главных компонент

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, её, как и все последующие, по всей видимости, не целесообразно использовать в дальнейшем рассмотрении (рис. 3.3).

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). График гидрохимического состава водных объектов в пространстве выделенных главных компонент показывал, насколько хорошо каждая переменная воспроизводится в найденной системе координат: чем ближе переменная к единичной окружности, тем лучше она воспроизведена текущим набором выделенных факторов (рис. 3.4).

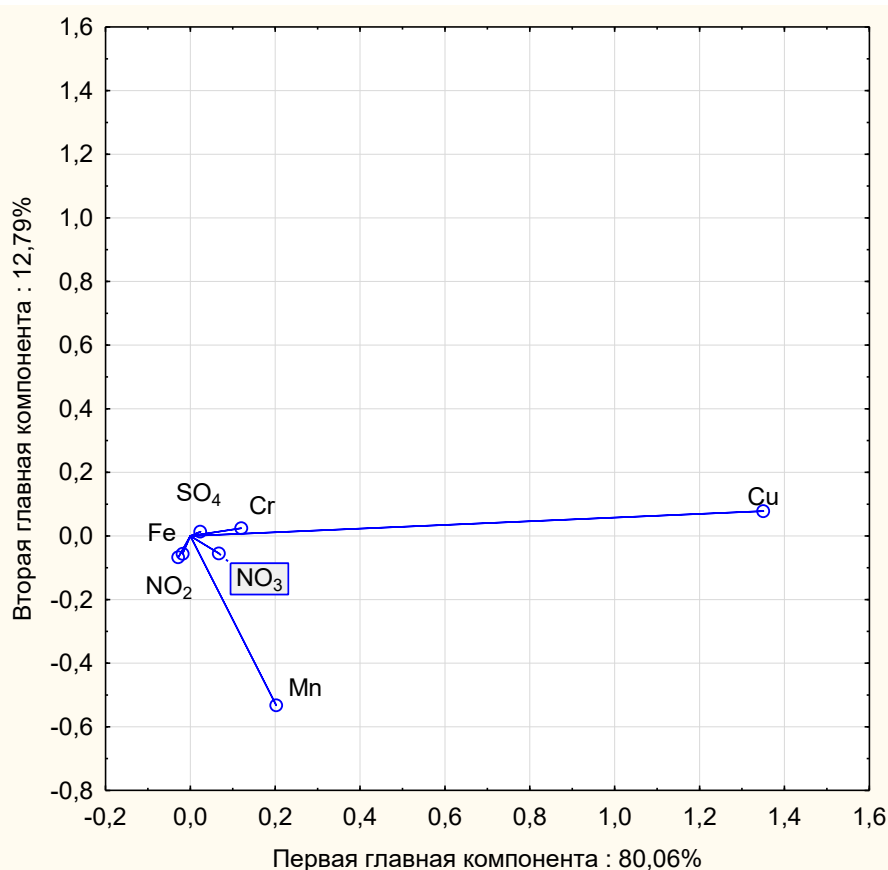


Рисунок 3.4. Анализируемые гидрохимические показатели в пространстве главных компонент

Таким образом, были определены факторные оси в пространстве меньшей размерности, на которые были проецированы анализируемые гидрохимические показатели. Относительный вклад переменных в дисперсию факторной оси пропорционален их факторным нагрузкам: наибольший относительный вклад в первую главную компоненту вносила медь, а во вторую – марганец.

Проведенный кластерный анализ и ординация с использованием метода главных компонент позволили выделить четыре группы водных объектов, формирующих отдельные кластеры (рис. 3.5).

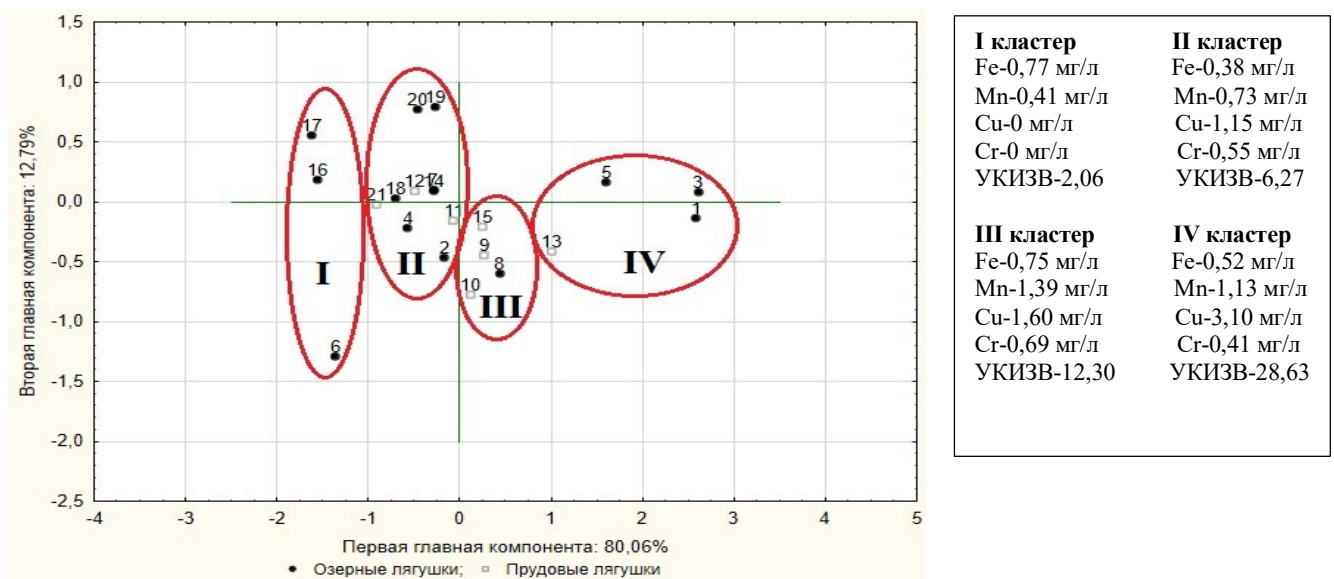


Рисунок 3.5. График рассеивания водных объектов в пространстве главных компонент

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

С учетом вида распределения центральные тенденции и рассеяние значений логарифмов частных оценочных коэффициентов содержания химических загрязнителей в водных объектах описывали медианой (Me) и интерквартильным размахом (IQR) (значения 25-го и 75-го процентилей).

Все выделенные кластеры характеризовались наличием комплекса химических загрязнителей, среди которых концентрации отдельных показателей существенно преобладали в конкретных кластерах. Вначале отметим, что 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. Первый (I) кластер объединил наименее загрязненные водные объекты с доминированием озерных лягушек: торфокарьер_2016, торфокарьер_2017а и оз. Рустай_2016. Содержание железа и марганца не превышало 2 ПДК_{рыб-хоз}. Медиана УКИЗВ для водоемов второго кластера составляла – 2.06; интерквартильный размах 8.37. Второй (II) кластер – включал пробы вод оз. Вторчермет (2016-2018), в котором доминировали прудовые лягушки и пять водоемов (оз. Круглое Дальнее_2016; оз. Жилново_2016; оз. Силикатное_2016_2017_2019; оз.Березовское_2017; торфокарьер_2018) с доминированием озерных лягушек. Этот кластер характеризовался меньшим, по сравнению с третьим кластером содержанием железа, значение УКИЗВ составило: медиана 6.27, интерквартильный размах 2.33. Третий (III) кластер объединил пробы вод бол. Белкино за три года наблюдений (2017-2019) и торфокарьера (2019), в которых отмечено относительно высокое содержание марганца, а также, железа, меди и хрома. Значение УКИЗВ третьего кластера: медиана 12.30, интерквартильный размах 3.10. Четвертый (IV) кластер, занимающий первый квадрант, объединил водоемы с наиболее высоким содержанием меди (медиана – 3.10; интерквартильный размах 1.67) и высоким показателем УКИЗВ (медиана – 28.63 отн. ед. интерквартильный размах – от 19.34 до 66.10 отн. ед.) (табл. 3.2).

Сравнительный анализ гидрохимических условий обитания лягушек разных видов по критерию Манна-Уитни выявил различия по содержанию хрома ($z=2.20$, $p=0.02$). 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).

**Медиана и интерквартильный размах логарифмов частных
оценочных коэффициентов, учитывающих кратность превышения
ПДК_{рыб-хоз} химических веществ в выделенных кластерах**

Номер кластера	Железо		Марганец		Медь		Хром	
	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR
I	0.77	0.37	0.41	1.84	0.00	0.00	0.00	0.00
II	0.38	0.20	0.73	0.07	1.15	0.31	0.55	0.09
III	0.75	0.13	1.39	0.33	1.60	0.24	0.69	0.82
IV	0.52	0.21	1.13	0.40	3.10	1.67	0.41	0.21
Статистические показатели	N=11.67, p=0.0086; D ₂₋₃ =3.08, p=0.012		N=7.88, p=0.04		N=16.43, p=0.0009; D ₁₋₄ =3.51, p=0.002; D ₂₋₄ =2.69, p=0.042; D ₂₋₃ =2.98, p=0.016		N=13.27, p=0.0041; D ₁₋₃ =3.37, p=0.0044	

Примечание: В таблице приведены статистически значимые различия по критерию Данна с учетом поправки Бонферрони. N - критерий Крускала-Уоллеса; D - критерий Данна. Me- – медиана; IQR – интерквартильный размах, включающий 50 % значений показателя в выборке (значения 25-го и 75-го перцентилей).

Таким образом, использованные методы многомерной статистики позволили получить более полное количественное описание водных объектов исследования и представить массив полученных показателей в наглядном, интегрированном и обобщенном виде. Использование метода главных компонент позволило выделить группы водоемов с близкими показателями химического загрязнения среды и доминированием разных видов лягушек, а также водоемы, отличающиеся от остальных своими специфическими гидрохимическими условиями.

Резюме. Химическое загрязнение всех исследованных водных объектов урбанизированной территории Нижегородской области было относительно высоким. Классификация кластерным анализом и ординацией с использованием метода главных компонент позволила разделить водные объекты по основным гидрохимическим показателям на четыре кластера. Водные объекты IV кластера характеризовались наиболее высокими

показателями удельного комбинаторного индекса загрязнённости воды (УКИЗВ). Во всех группах (кластерах) в разном соотношении отмечено превышение ПДК_{рыб-хоз} для железа, марганца, меди и хрома. При этом, больше железа обнаружено в III кластере по сравнению со II кластером; меди – в четвертом по сравнению со первым и вторым кластерами; хрома – в третьем по сравнению со первым кластером. УКИЗВ показал стабильно экстремальное загрязнение в водах болота Белкино, участка р. Кудьмы, ухудшение качества водной среды оз. Вторчермет, оз. Силикатное, торфокарьера в течение периода наблюдений. Водные объекты с доминированием озерных лягушек имели более низкое содержание хрома, по сравнению с водоемами, где обитали прудовые лягушки.

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 установить имеются ли количественные и/или качественные изменения окислительных реакций и иммуногематологических показателей при адаптации разных видов зеленых лягушек к сходным и существенно отличающимся гидрохимическим условиям среды. Детальному рассмотрению этих вопросов посвящены следующие главы диссертационного исследования.

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КОСТНОГО МОЗГА ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК РОДА *PELOPORHUS* НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Выявление механизмов, закономерностей функционирования и динамики живых систем (популяций, видов, экосистем), а также, изучение конкретных путей и форм адаптивного потенциала представителей разных видов в изменяющихся условиях среды является одной из важнейших задач экологической иммуотоксикологии. В адаптациях организма к антропогенному средовому стрессу, ведущую роль выполняют главные физиологические системы: нервная, иммунная, кровеносная, эндокринная. У бесхвостых амфибий впервые появляются эволюционные предшественники всей совокупности лимфоидных и миелоидных органов млекопитающих. В их числе: тимус, селезенка и добавочные миелоидные органы, напоминающие гемолимфатические узелки млекопитающих (Cooper, 1976; Manning, Horton, 1982), а также функционирующая костномозговая ткань, содержащая плазматические клетки и выполняющая функцию поставщика стволовых кроветворных элементов для формирования Т- и В- клеточных популяций (Turpen et al., 1982), что обосновывает возможность оценки гематологических и иммунологических параметров этих животных в качестве показателей состояния среды. Теоретическая значимость биоиндикационных исследований связана с поиском общих эколого–физиологических закономерностей функционирования иммунной системы в условиях антропогенной трансформации среды обитания.

Костный мозг у бесхвостых амфибий является центральным органом, продуцирующим из родоначальной гемопоэтической клетки, клетки крови и иммунной системы (Грушко, 2010б, Скрипченко, 2009, Cooper, 1976; Turpen, 1989). Костный мозг бесхвостых амфибий обеспечивает процессы метаболизма и пролиферацию форменных элементов крови в период метаморфоза (Галактионов, 2005; Хамидов и др., 1978). Количественный и

качественный клеточный состав костномозговой продукции определяет развертывание неспецифических и специфических реакций иммунитета, обуславливая резистентность и реактивность организма (Хаитов, Пинегин, 1999).

У лягушек костный мозг располагается внутри костномозговых полостей трубчатых костей конечностей, состоит из стромы, сосудистого и гемопоэтического компонентов (Грушко, 2010б). Строму костного мозга образуют ретикулярные клетки и их волокна, адипоциты (до 60 %), формирующие жировую ткань и макрофаги. Между адипоцитами в петлях ретикулярной стромы располагаются разнообразные клетки миелоидного и эритроидного рядов кроветворения (Грушко, 2010а). Эти клетки резко отличаются друг от друга по размерам, форме и характерными ядрами. Миелоидная клетка-предшественник может дифференцироваться в костном мозгу в гранулоцит (нейтрофил, эозинофил или базофил), или в макрофаг (зрелый моноцит), или в тучную клетку или в миелоидную дендритную клетку врождённой иммунной системы. Гранулоциты, также называемые сегментоядерными или полиморфноядерными лейкоцитами за их необычную форму ядер, делятся на три короткоживущих подтипа: эозинофилы, базофилы и нейтрофилы. Клетки-предшественники гранулоцитов дифференцируются по тому или иному типу в ходе процесса, который называется гранулопоэз. В ходе этого процесса миелоидная клетка-предшественник последовательно проходит трансформации от общего для всех трёх линий миелобласта (миелоидного предшественника) в общий для всех трёх линий промиелоцит. Промиелоциты затем превращаются в уникальные миелоциты, которые дифференцируются в также уникальные для каждой из трёх линий метамиелоциты, затем в палочкоядерные гранулоциты, а затем в зрелые гранулоциты – базофилы, эозинофилы или нейтрофилы (Junqueira, 2005). [Junqueira, Carneiro. Basic Histology, Text and Atlas. McGraw-Hill Companies. 2005, 573 p.]. Эритробласт (нормобласт) – клетка-предшественник красного (эритроидного) кровяного ростка. В костном мозге эритробласты проходят

основные стадии своего развития: пронормоцит – базофильный нормоцит – полихроматофильный нормоцит – оксифильный нормоцит – зрелый эритроцит.

При значительном объеме исследований по изучению системы крови амфибий (Вершинин, 2004; Пескова, 2004; Минеева, Минеев, 2010; Силс, 2008; Романова, 2011; Романова и др., 2013; Coico et al., 2003 и др.), практически отсутствуют сведения по сравнительному анализу клеточного состава костного мозга близкородственных видов, обитающих на антропогенно-трансформированных территориях.

Настоящая глава диссертации посвящена дифференцированной оценке клеточного состава миелоидного и эритроидного рядов костного мозга озерных (*Pelophylax ridibundus*, Pallas, 1771) и прудовых лягушек (*Pelophylax lessonae*, Camerano, 1882), обитающих в разных и сходных гидрохимических условиях среды.

Озерные лягушки. В составе клеток костного мозга (миелограммах) озерных лягушек всех исследованных водоемов преобладали клетки миелобластного ряда.

Наиболее высокое содержание клеток эритробластного ряда выявлено у озерных лягушек водных объектов, группирующихся в I кластере. По сравнению с другими водными объектами, водоемы I кластера были менее загрязнены железом, марганцем, содержание в них меди и хрома не превышало ПДК_{рыб-хоз} для этих элементов. Миелограммы озерных лягушек водных объектов I кластера отличались высокой долей эритробластов (медиана 18.5%) и базофильных нормоцитов (медиана 22.0%), на фоне невысокого содержания всех типов клеток миелобластного ряда (табл. 4.1).

Миелограммы озерных лягушек водных объектов II кластера, напротив, характеризовались преобладанием клеток миелобластного ряда, в первую очередь миелобластов, доля которых почти в два раза превышала аналогичный показатель лягушек IV кластера. Отметим, также статистически более низкое содержание в составе костного мозга промиелоцитов ($D_{1.4}=4.96$, $p < 0.001$) и

метамиелоцитов ($D_{1-4}=4.50$, $p=0.00002$) по сравнению с лягушками водных объектов IV кластера (табл. 4.2; 4.3).

Таблица 4.1

Показатели миелобластного и эритробластного рядов костного мозга озерных лягушек водных объектов I кластера

Показатель	Me	25%	75%	IQR
<i>Клетки миелобластного ряда</i>				
Миелобласты, %	26.0	19.0	30.0	11.0
Промиелоциты, %	7.0	5.0	10.0	5.0
Миелоциты, %	7.0	5.0	8.0	3.0
Метамиелоциты, %	7.0	3.0	11.0	8.0
<i>Клетки эритробластного ряда</i>				
Эритробласты, %	18.5	16.0	22.0	6.0
Пронормоциты, %	8.0	6.0	12.0	6.0
Нормоциты базофильные, %	22.0	18.0	27.0	9.0
Нормоциты полихроматофильные, %	2.0	1.0	3.0	2.0
Индекс миелограммы, %	0.90	0.71	1.08	0.37

Таблица 4.2

Показатели миелобластного и эритробластного рядов костного мозга озерных лягушек водных объектов II кластера

Показатель	Me	25%	75%	IQR
1	2	3	4	5
<i>Клетки миелобластного ряда</i>				
Миелобласты, %	51.0	46.0	54.0	8.0
Промиелоциты, %	9.0	7.0	10.0	3.0
Миелоциты, %	7.0	4.0	7.0	3.0
Метамиелоциты, %	7.0	5.0	9.0	4.0
<i>Клетки эритробластного ряда</i>				
Эритробласты, %	11.0	8.0	12.0	4.0

Продолжение таблицы 4.2

1	2	3	4	5
Пронормоциты, %	5.0	3.0	7.0	4.0
Нормоциты базофильные, %	10.0	7.0	12.0	5.0
Нормоциты полихроматофильные, %	1.0	1.0	2.0	1.0
Индекс миелограммы, отн. ед	2.75	2.33	3.35	1.02

Процентное содержание миелобластов в миелограммах лягушек I и IV кластеров составляло (26.0 – 33.5 %) (табл. 4.1; 4.3) и было статистически значимо ниже по сравнению с содержанием миелобластов в составе костного мозга озерных лягушек II кластера, доля которых составляла 51% (табл. 4.2) ($D_{1-4}=4.81$, $p=0.00004$; $D_{2-4}=8.44$, $p<0.001$) (табл. 4.4).

Таблица 4.3

Показатели миелобластного и эритробластного рядов костного мозга озерных лягушек водных объектов IV кластера

Показатель	Me	25%	75%	IQR
<i>Клетки миелобластного ряда</i>				
Миелобласты, %	33.5	32.0	35.0	3.0
Промиелоциты, %	15.0	14.0	17.5	3.5
Миелоциты, %	9.0	7.0	10.0	3.0
Метамиелоциты, %	11.0	10.0	12.5	2.5
<i>Клетки эритробластного ряда</i>				
Эритробласты, %	16.0	14.0	17.0	3.0
Пронормоциты, %	7.0	6.5	8.0	1.5
Нормоциты базофильные, %	6.5	6.0	8.0	2.0
Нормоциты полихроматофильные, %	1.0	0.5	1.0	0.5
Индекс миелограммы, отн. ед.	2.28	1.98	2.45	0.46

Таким образом, эритропоэтическая активность костного мозга озерных лягушек, обитающих в наименее загрязненных водных объектах (I кластер)

была выше, по сравнению с выборками озерных лягушек урбанизированных водоемов первого и четвертого кластеров, у которых зарегистрировано пониженное содержание эритробластов (особи II кластера), пронормоцитов (особи II кластера) и нормоцитов базофильных (особи II и IV кластеров) (рис. 4.1).

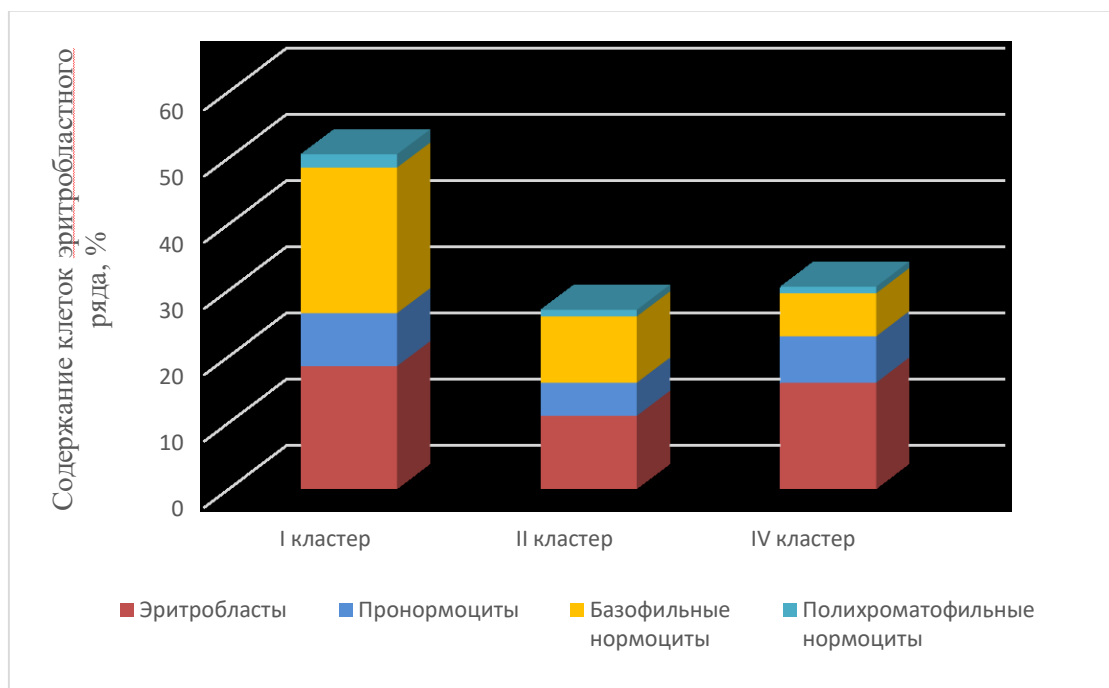


Рисунок 4.1. Содержание клеток эритробластного ряда костного мозга озерных лягушек (*P. ridibundus*) Нижегородской области

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 наименее загрязненных водных объектов I кластера (рис. 4.2).

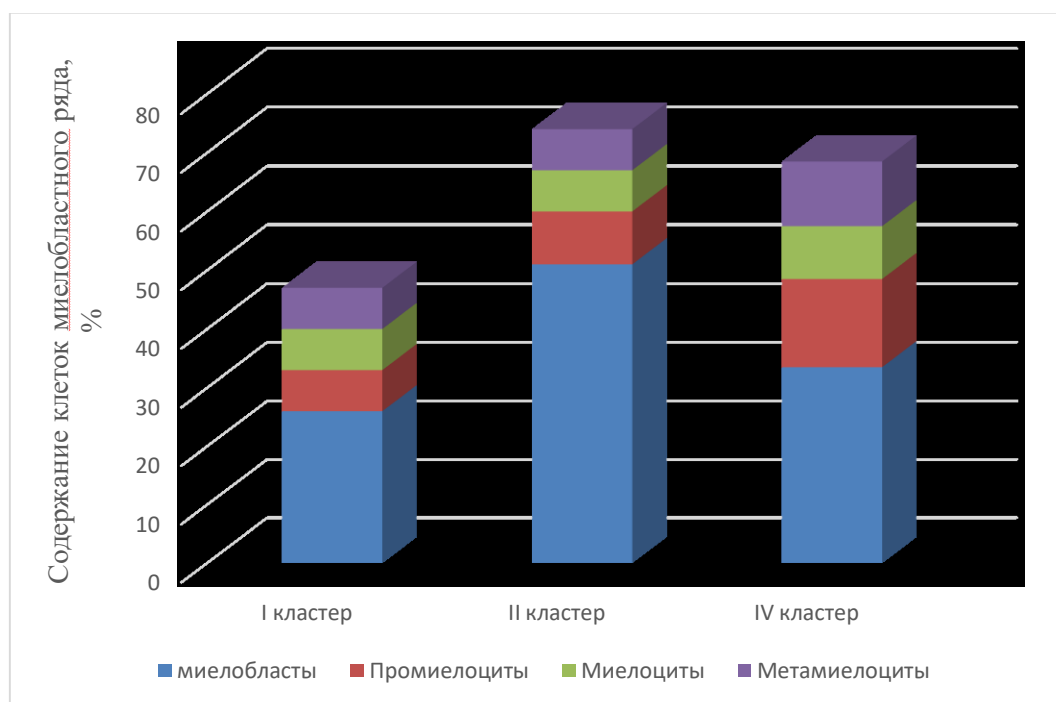


Рисунок 4.2. Содержание клеток миелобластного ряда в костном мозге озерных лягушек (*P. ridibundus*) Нижегородской области

Так, доля промиелоцитов в 2.1 раза ($D_{1-2} = 6.25$; $p < 0.001$), доля миелоцитов в 1.3 раза ($D_{1-4} = 2.95$; $p = 0.009$), доля метамиелоцитов в 1.57 раза ($D_{1-4} = 3.80$; $p = 0.0004$) было значимо выше у озерных лягушек водных объектов с высоким содержанием меди (IV кластер), по сравнению с аналогичными показателями лягушек I кластера (табл. 4.4).

Таблица 4.4

Статистический анализ медианных величин показателей миелограмм озерных лягушек при попарном сравнении групп (критерий Данна)

Показатель	Номера сравниваемых кластеров		Статистические показатели	
	первый	второй	Кр. Данна	p
1	2	3	4	5
<i>Клетки миелобластного ряда</i>				
Миелобласты, %	IV	I	2.18	0.08
	IV	II	4.81	0.00004
	I	II	8.44	< 0.001
Промиелоциты, %	IV	I	6.25	< 0.001
	IV	II	4.96	< 0.001
	I	II	2.42	0.04
Миелоциты, %	IV	I	2.95	0.009
	IV	II	3.88	0.0003
	I	II	0.62	1.00
Метамиелоциты, %	IV	I	3.80	0.0004

Продолжение таблицы 4.4

1	2	3	4	5
	IV	II	4.50	0.00002
	I	II	0.23	1.00
<i>Клетки эритробластного ряда</i>				
Эритробласты, %	IV	I	1.18	0.71
	IV	II	3.76	0.0005
	I	II	5.90	< 0.001
Пронормоциты, %	IV	I	0.76	1.00
	IV	II	2.78	0.016
	I	II	4.22	0.00007
Нормоциты базофильные, %	IV	I	7.48	< 0.001
	IV	II	2.31	0.06
	I	II	7.11	< 0.001
Нормоциты полихроматофильные, %	IV	I	3.65	0.0007
	IV	II	2.38	0.05
	I	II	2.02	0.12
Индекс миелограммы, отн.ед	IV	I	4.12	0.0001
	IV	II	2.34	0.057
	I	II	8.10	< 0.001

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые показатели ($\alpha < 0.05$)

Таким образом, в условиях более высокого загрязнения водоемов, определенного по удельному комбинаторному индексу загрязненности воды (УКИЗВ) наблюдалась перестройка соотношения клеточного состава костного мозга озерных лягушек, проявляющаяся в увеличении доли миелоидных и снижении доли эритроидных клеток.

Прудовые лягушки. Гидрохимические условия обитания прудовых лягушек по сравнению озерными были более сходным. Во всех водоемах присутствовали медь, марганец и хром в концентрациях существенно превышающих ПДК_{рыб-хоз.} Значимо различались водоемы по содержанию железа: загрязнение водной объектов III кластера было в два раза выше, чем водных объектов II кластера.

Доля промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов в составе костного мозга прудовых лягушек II кластера оказалась значимо меньше аналогичных показателей прудовых лягушек III кластера (табл. 4.5; 4.7).

Таблица 4.5

**Показатели миелобластного и эритробластного рядов костного
мозга прудовых лягушек водных объектов II кластера**

Показатель	Me	25%	75%	IQR
<i>Клетки миелобластного ряда</i>				
Миелобласты, %	33.0	30.5	42.0	11.5
Промиелоциты, %	11.5	8.5	15.0	6.5
Миелоциты, %	9.0	6.0	11.0	5.0
Метамиелоциты, %	7.0	5.0	8.0	3.0
<i>Клетки эритробластного ряда</i>				
Эритробласты, %	18.5	14.5	20.0	5.5
Пронормоциты, %	10.0	8.0	13.0	5.0
Нормоциты базофильные, %	6.0	2.5	10.0	7.5
Нормоциты полихроматофильные, %	1.5	1.0	2.0	1.0
Индекс миелограммы, отн.ед	1.86	1.22	2.33	1.11

В миелограммах прудовых лягушек III кластера преобладали клетки миелоидного ряда (табл. 4.6).

Таблица 4.6

**Показатели миелобластного и эритробластного рядов костного
мозга прудовых лягушек водных объектов III кластера**

Показатель	Me	25%	75%	IQR	
<i>Клетки миелобластного ряда</i>					
Миелобласты, %	34.0	33.0	38.5	5.5	
Промиелоциты, %	15.5	14.0	18.0	4.0	
Миелоциты, %	11.5	10.0	13.0	3.0	
Метамиелоциты, %	8.5	7.5	10.0	2.5	
<i>Клетки эритробластного ряда</i>					
Эритробласты, %	15.0	13.0	16.5	3.5	
Пронормоциты, %	8.0	6.0	9.5	3.5	
Нормоциты базофильные, %	3.5	3.0	5.5	2.5	
Нормоциты полихроматофильные, %	1.0	0.0	1.0	1.0	
Индекс миелограммы, отн.ед.	2.45	2.12	2.83	0.71	

Состав клеток эритробластного ряда костного мозга у прудовых лягушек исследованных водных объектов практически не различался, выявлено только повышение доли пронормоцитов ($U=1.98$, $p=0.04$) в миелограммах лягушек II кластера, что иллюстрировало небольшую активацию эритропоэза у особей, обитающих в специфических гидрохимических условиях среды этих водных объектов (табл. 4.7).

Таблица 4.7

Статистический анализ медианных величин показателей миелограмм прудовых лягушек при попарном сравнении групп (критерий Манна–Уитни)

Показатель	Сумма рангов в сравниваемых кластерах		Статистические показатели		
	III	II	U	Z	p
<i>Клетки миелобластного ряда</i>					
Миелобласты, %	413.0	407.0	197.0	0.06	0.94
Промиелоциты, %	523.5	296.5	86.5	3.05	0.002
Миелоциты, %	510.5	309.5	99.5	2.70	0.006
Метамиелоциты, %	486.5	333.5	123.5	2.05	0.039
<i>Клетки эритробластного ряда</i>					
Эритробласты, %	337.5	482.5	127.5	1.94	0.051
Пронормоциты, %	336.0	484.0	126.0	1.98	0.046
Нормоциты базофильные, %	364.5	455.5	154.5	1.21	0.22
Нормоциты полихроматофильные, %	337.5	482.5	127.5	1.94	0.051
Индекс миелограммы, отн.ед.	509.5	310.5	100.5	2.67	0.007

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые показатели ($\alpha < 0.05$)

Сравнительный анализ миелограмм зеленых лягушек рода *Pelophylax*. Сравнительный анализ миелограмм озерных и прудовых лягушек, обитающих в сходных гидрохимических условиях обитания (II кластер), выявил различия в соотношении клеток как миелобластного, так и эритробластного рядов костного мозга (табл. 4.8).

Таблица 4.8

Статистический анализ медианных величин показателей миелограмм озерных и прудовых лягушек (критерий Манна–Уитни)

Показатель	Сумма рангов		Статистические показатели		
	Озерные лягушки	Прудовые лягушки	U	Z	p
<i>Клетки миелобластного ряда</i>					
Миелобласты, %	3284	371	161	5.06	< 0.001
Промиелоциты, %	2570	1084	425.5	2.32	0.02
Миелоциты, %	2517	1137.5	372.5	2.86	0.004
Метамиелоциты, %	2830.5	824.5	614.5	0.36	0.71
<i>Клетки эритробластного ряда</i>					
Эритробласты, %	2331	1324	186	4.80	0.000002
Пронормоциты, %	2389.5	1265.5	244.5	4.19	0.00002
Нормоциты базофильные, %	3064.5	590.5	380.5	2.78	0.005
Нормоциты полихроматофильные, %	2757	898	612	0.38	0.69
Индекс сдвига миелограммы, отн. ед.	3155.5	499.5	289.5	3.72	0.0001

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые показатели ($\alpha < 0.05$)

Так, у озерных лягушек содержание миелобластов в составе костного мозга была выше, а промиелоцитов и метамиелоцитов значимо ниже, по сравнению с прудовыми лягушками (рис. 4.3). Межвидовых различий по содержанию метамиелоцитов не выявлено.

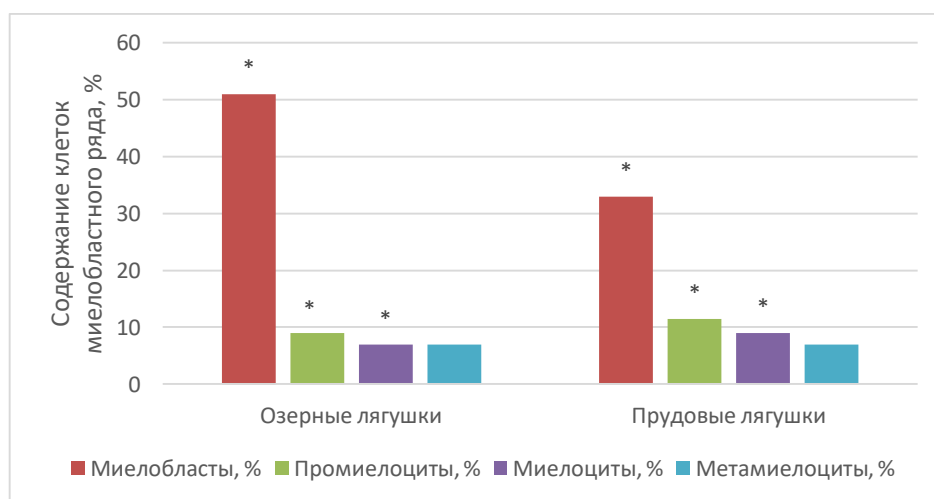


Рисунок 4.3. Содержание клеток миелобластного ряда в костном мозге озерных и прудовых лягушек Нижегородской области

* – статистически значимые межвидовые различия

Сравнительный анализ количественного содержания клеток эритробластного ряда костного мозга у озерных и прудовых лягушек, обитающих в близких гидрохимических условиях среды, позволил сделать следующее обобщение. У прудовых лягушек содержание эритробластов и пронормоцитов в миелограммах было соответственно в 1,68 раза и 2,0 раза выше, чем в составе костного мозга озерных лягушек. Базофильные нормоциты, напротив, преобладали в миелограммах озерных лягушек. Количество полихроматофильных нормоцитов в миелограммах обоих видов не различалось (рис. 4.4).

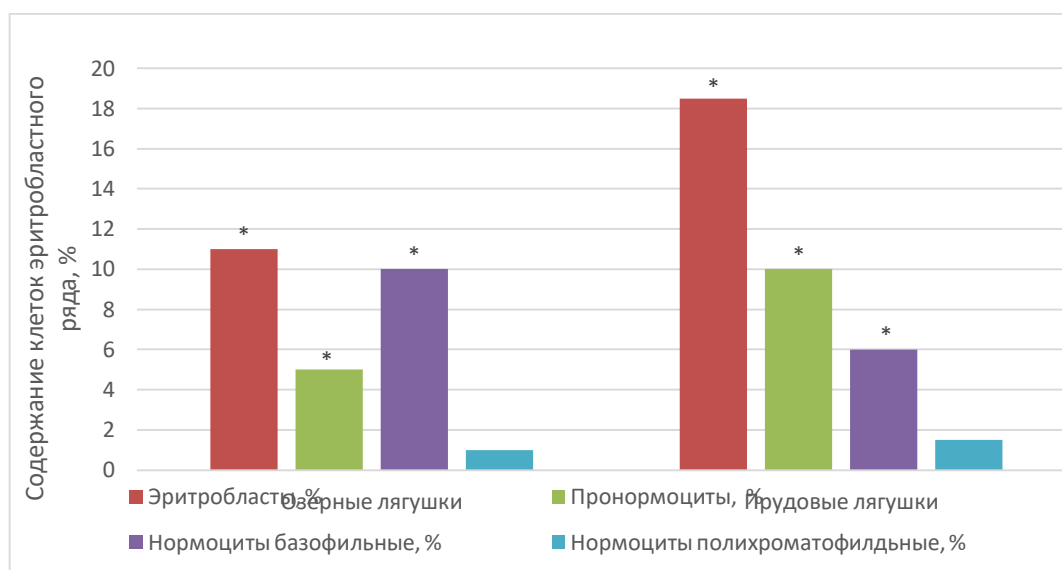


Рисунок 4.4. Содержание клеток эритробластного ряда в костном мозге озерных и прудовых лягушек Нижегородской области

* – 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, свидетельствовали о более высокой эритропоэтической активности костного мозга.

Перестройка клеточного состава костного мозга зеленых лягушек определялась, по всей видимости, комплексом абиотических факторов, в том числе, и концентрацией приоритетных загрязнителей водной среды. Для выяснения существования зависимости между показателями миелограмм озерных лягушек и гидрохимическим составом среды обитания был выполнен непараметрический ранговый корреляционный анализ по Спирмену (ρ). Установлено существование статистически значимой сильной взаимосвязи между индексом сдвига миелограммы и содержанием в водоеме железа ($\rho = -0.81$; $p = 0.04$); хлоридов ($\rho = 0.88$; $p = 0.01$); сульфатов ($\rho = 0.88$; $p = 0.018$) и нефтепродуктов ($\rho = 0.89$; $p = 0.015$). Так, при возрастании в водоеме концентрации нефтепродуктов (мг/л) у озерных лягушек наблюдалось возрастание индекса сдвига миелограммы ($\rho = 0.89$, $p = 0.01$) за счет снижения доли клеток эритробластного ряда. Установлено супрессорное действие приоритетных загрязнителей водной среды на эритроидный росток гемопоэза зеленых лягушек. Так, при высоких концентрациях в водных объектах меди ($\rho = -0.72$; $p < 0.05$) и марганца ($\rho = -0.75$; $p < 0.05$) отмечено снижение в составе миелограмм базофильных нормоцитов. Хром подавлял созревание полихроматофильных нормоцитов ($\rho = -0.64$; $p < 0.05$) (табл. 4.9).

Таблица 4.9

Анализ взаимосвязи показателей миелограмм зеленых лягушек с гидрохимическими показателями среды обитания

Сравниваемые пары		Коэффициент корреляции, ρ ($p < 0.05$)
Показатель миелограммы	Показатель загрязнения	
1	2	3
Число промиелоцитов, %	УКИЗВ, отн. ед.	0.84
Число базофильных нормоцитов, %	УКИЗВ, отн. ед.	0.86
Индекс сдвига, отн.ед	Cl^- , мг/л	0.88
Индекс сдвига, отн.ед	SO_4^{2-} , мг/л	0.88
Индекс сдвига, отн.ед	Нефтепродукты, мг/л	0.89

Продолжение таблицы 4.9

1	2	3
Число полихроматофильных нормоцитов, %	Cr, мг/л	-0.64
Число базофильных нормоцитов, %	Cu, мг/л	-0.72
Число базофильных нормоцитов, %	Mn, мг/л	-0.75
Индекс сдвига, отн.ед	Fe, мг/л	-0.81

В целом, показано существование статистически значимой взаимосвязи между показателями миелограммы амфибий и гидрохимическим составом среды. Выявлена сильная положительная взаимосвязь между показателем гидрохимического загрязнения водных объектов, определенного по удельному комбинаторному индексу загрязненности воды (УКИЗВ) и содержанием в составе костного мозга промиелоцитов ($\rho = 0.84$; $p < 0.05$) и нормоцитов базофильных ($\rho = 0.86$; $p < 0.05$).

Согласно литературным данным у земноводных, обитающих в среде, загрязненной тяжелыми металлами и нефтепродуктами, выявляются разнообразные адаптивные изменения, проявляющиеся в возрастании индекса лимфоидных органов, числа лейкоцитов и угнетении иммунных реакций (Пескова, 2004; Силс, 2008). Многие ксенобиотики оказывают непосредственное воздействие на эритробластный ряд гемопоэза гидробионтов. Так, воздействие селена, свинца, алюминия обуславливает развитие анемии и тормозит активность ферментов, участвующих в обмене железа (Chmielnicka, Nasiadek, 1998). При интенсивном загрязнении воды медью, марганцем, цинком в эритроцитах рыб повышается концентрация гемоглобина, в тоже время размеры клеток красной крови сокращаются почти вдвое, что приводит к нарушению регуляции кислотно-щелочного равновесия, адсорбции токсинов и изменению ферментативных процессов из-за сокращения функционально-активной поверхности эритроцитов (Лугаськова, 1997). Смесь тяжелых металлов (цинк, никель, медь и кадмий) обуславливает увеличение общего количества эритроцитов и гемоглобина у

рыб (Степанова, Чуйко, Цельмович, 1997). Влияние ионов кадмия на гемопоэз выражается в уменьшении и содержания эритроцитов и ретикулоцитов в периферической крови (Maskova et al, 1996). Количество эритроцитов может снижаться под воздействием хлората (NaClO) (McCauley et al, 1995), нефти и нефтепродуктов (Lutcavage et al, 1995). Различные химические соединения меди, марганца и сульфаты, приводят к развитию хронического стресса у лягушек и повышению индекса сдвига лейкоцитов (Минеева, Минеев, 2010). Естественные и антропогенные факторы окружающей среды разной степени интенсивности нарушают тонкие межклеточные взаимодействия, что приводит к подавлению реактивности отдельных популяций клеток. Вариабельность ответов отдельных звеньев миелопоэза является установленным фактом (Хаитов, Пинегин, 1995; Земсков, 1997; Хаитов и др., 2000) и отражает пластичность компенсаторных возможностей организма.

Резюме. Проведенное нами исследование выявляет изменчивость показателей гемопоэза в градиенте химического загрязнения. В условиях ухудшения качества водной среды у амфибий наблюдалось уменьшение доли клеток эритробластного и миелобластного рядов дифференцировки костного мозга. При общих адаптивных реакциях у озерной и прудовой лягушек, межвидовые различия хорошо выражены и проявлялись в активизации кроветворения у прудовых лягушек в условиях повышенного загрязнения среды обитания. Адаптивной реакцией озерных лягушек к существованию в измененных условиях водной среды являлась перестройка соотношения клеточного состава костного мозга и активация клеток миелоидного ряда, обеспечивающих впоследствии механизмы врожденной естественной резистентности организма.

Полученные результаты позволили сформулировать положение, выносимое на защиту:

С ухудшением 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.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛЯГУШЕК РОДА *PELOPHYLAX*

Кровь и кроветворная система весьма чувствительны к действию любых факторов окружающей среды, поэтому обитание животных в водоемах урбанизированной территории, заставляет их приспосабливаться к специфичности условий, используя набор универсальных эффекторных клеток, взаимодействие которых поддерживает гомеостаз организма. В состав лейкоцитарной формулы входят лимфоциты – одна из наиболее объемных групп иммунокомпетентных клеток (Лебедев, Понякина, 1990), реализующие механизмы адаптивного иммунитета. Для поддержания гомеостаза организма в специфичных условиях среды обитания животные используют набор универсальных эффекторных клеток. У амфибий это набор неспецифических лейкоцитов; представленный макрофагами, моноцитами, нейтрофилами, базофилами и эозинофилами. Моноциты и макрофаги обеспечивают фагоцитоз, «представление антигенов» и высвобождение цитокинов (Coico et al., 2003; Zimmerman et al., 2010). Нейтрофилы играют важную роль в антибактериальном иммунитете и участвуют в развитии воспалительной реакции. Базофилы и эозинофилы обладают высокоспецифичными функциями. Роль базофилов заключается в активном высвобождении гистамина при поступлении определённого антигена, что приводит к увеличению проницаемости кровеносных сосудов, усилению кровотока и привлечению других гранулоцитов к очагу воспаления. Эозинофилы являются самыми функционально активными элементами крови у амфибий и реализуют противогельминтную иммунную защиту (Малютина, 2008; Шевкопляс, Лопатин, 2008; Романова и др., 2013; Johnson, Fonte, 2013). Считается, что эта защита реализуется благодаря способности эозинофилов обеспечивать в нужный момент «взрывную» продукцию пероксида и супероксидных радикалов (Coico et al., 2003). Совокупность этих клеток, среди которых большую долю составляют нейтрофильные гранулоциты, обеспечивают

реакции неспецифической естественной защитной системы организма. В состав суммарных лимфоцитов входит целый ряд морфологически однотипных клеток: Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, нулевых клеток (Лебедев, Понякина, 1990), реализующие механизмы адаптивного иммунитета. Поэтому в процессе адаптации к среде обитания у амфибий изменяются показатели клеточной и гуморальной защиты, что отражается на морфологическом составе крови.

Настоящая глава диссертации посвящена определению общего количества эритроцитов, лейкоцитов и дифференцированной оценке лейкоцитарного состава крови озерных (*Pelophylax ridibundus*, Pallas, 1771) и прудовых лягушек (*Pelophylax lessonae*, Camerano, 1882), обитающих в разных и сходных гидрохимических условиях среды.

Оценку параметров лейкоцитарной системы крови изучали путем сравнения выборок озерных и прудовых лягушек, группирующихся по гидрохимическому составу, согласно проведенной кластеризации и ординации методом главных компонент. Как известно, лейкоцитарный состав крови включает две группы клеток: агранулоциты (моноциты, лимфоциты), на их долю приходится около 50-70% клеток и гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы и базофилы), характеризующиеся большим разнообразием (Никитин, 1949; Силс, 2008; Чернышова, Старостин, 1994 и др.). Анализ лейкоцитарных формул периферической крови исследованных выборок из популяций озерных лягушек выявил изменения, касающиеся всех рядов дифференцировки клеток и большинства интегральных индексов. Проведение сравнений по критерию Краскела – Уоллиса (H) и Данна (D) выявило перераспределение соотношения лейкоцитарного состава у амфибий, обитающих в конкретных гидрохимических условиях среды.

Озерные лягушки. Количественное содержание лейкоцитов у выборок из популяций, группирующихся в разных кластерах, статистически значимо не различалось, однако выявлены 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 (табл. 5.1).

Таблица 5.1

Общее количество лейкоцитов и эритроцитов (тыс./мм³) в периферической крови озерных лягушек водных объектов разного гидрохимического состава

Кластеры	Численность особей, n	Количество лейкоцитов, тыс./мм ³		Количество эритроцитов, тыс./мм ³	
		Me	IQR	Me	IQR
I	50	13.0	9.0	175.0	29.0
II	105	13.0	7.0	175.0	95.0
IV	40	11.0	8.5	114.0	49.0
Статистические показатели:					
<i>Кр. Крускала–Уоллеса, H</i>		3.13		51.06	
<i>Уровень значимости, p</i>		0.21		<0.001	
<i>Кр. Данна, D, значение p</i>				D ₁₋₄ =6.41, p<0.001 D ₂₋₄ =6.44, p<0.001 D ₁₋₂ =1.10, p=0.80	

Примечание: Me – медиана; IQR – интерквартильный размах; H – множественный критерий Крускала-Уоллиса; D – попарный критерий Данна.

В лейкограммах озерных лягушек I (74%), II (75 %) и IV (68.0%) кластеров большую долю составляли лимфоциты. При этом доля больших лимфоцитов в крови особей IV кластера была пониженной (D₁₋₂=4.15, p <0.001; D₁₋₄=3.70, p=0.0006; D₄₋₂=1.11, p=0.78) (табл. 5.2; 5.3; 5.4).

Таблица 5.2

Показатели лейкоцитарной системы крови озерных лягушек водных объектов I кластера, объединенных по гидрохимическому составу методом ординации

Показатель	Me	25%	75%	IQR
1	2	3	4	5
<i>Лейкоцитарная формула крови</i>				
Миелоциты, %	9.0	8.0	11.0	3.0
Сумма нейтрофилов, %	7.0	4.0	10.0	6.0
В том числе: юные, %	2.0	2.0	3.0	1.0

Продолжение таблицы 5.2

Палочкоядерные, %	2.0	1.0	3.0	2.0
Сегментоядерные, %	3.0	0.0	4.0	4.0
Базофилы, %	2.0	1.0	3.0	2.0
Эозинофилы, %	4.0	3.0	5.0	20
Моноциты, %	2.0	1.0	4.0	3.0
Лимфоциты большие, %	25.0	23.0	28.0	5.0
Лимфоциты малые, %	49.0	45.0	51.0	6.0
<i>Лейкоцитарные индексы</i>				
ККП	0.1	0.1	0.2	0.006
РОН	0.018	0.0001	0.043	0.04
ИЛГ	77.7	61.8	107.1	45.32
ИСНЛ	0.1	0.03	0.1	0.08
ИСЛЭ	18.0	14.4	27.0	12.6
ИСНЭ	1.5	0.5	2.0	1.5
ИСЛ	0.2	0.1	0.2	0.08
ИЯСН	2.9	0.07	4.7	4.67

Таблица 5.3

**Показатели лейкоцитарной системы крови озерных лягушек
водных объектов II кластера, объединенных по гидрохимическому
составу методом ординации**

Показатель	Me	25%	75%	IQR
1	2	3	4	5
<i>Лейкоцитарная формула крови</i>				
Миелоциты, %	7.0	4.0	10.0	6.0
Сумма нейтрофилов, %	5.0	3.0	7.0	4.0
В том числе: юные, %	1.0	1.0	3.0	2.0
Палочкоядерные, %	1.0	0.0	2.0	2.0

Продолжение таблицы 5.3

1	2	3	4	5
Сегментоядерные, %	2.0	1.0	3.0	2.0
Базофилы, %	4.0	3.0	6.0	4.0
Эозинофилы, %	5.0	4.0	7.0	3.0
Моноциты, %	2.0	1.0	3.0	2.0
Лимфоциты большие, %	24.0	19.0	29.0	10.0
Лимфоциты малые, %	51.0	44.0	54.0	10.0
<i>Лейкоцитарные индексы</i>				
ККП	0.1	0.1	0.1	0.06
РОН	0.001	0.0001	0.008	0.008
ИЛГ	96.3	68.0	130.0	62.0
ИСНЛ	0.08	0.06	0.1	0.04
ИСЛЭ	15.4	9.7	20.8	11.04
ИСНЭ	0.5	0.2	1.0	0.76
ИСЛ	0.2	0.1	0.3	0.14
ИЯСН	3.0	1.0	6.5	5.50

Таблица 5.4

**Показатели лейкоцитарной системы крови озерных лягушек
водных объектов IV кластера, объединенных по гидрохимическому
составу методом ординации**

Показатель	Me	25%	75%	IQR
1	2	3	4	5
<i>Лейкоцитарная формула крови</i>				
Миелоциты, %	7.0	4.0	9.0	5.0
Сумма нейтрофилов, %	8.5	5.5	15.0	9.5
В том числе: юные, %	3.0	1.0	5.0	4.0
Палочкоядерные, %	2.0	1.0	4.5	3.50
Сегментоядерные, %	4.0	2.0	6.5	4.5

Продолжение таблицы 5.4

Базофилы, %	4.0	3.0	5.5	2.5
Эозинофилы, %	6.5	3.0	11.0	8.0
Моноциты, %	2.0	2.0	4.0	2.0
Лимфоциты большие, %	20.0	14.5	24.0	9.5
Лимфоциты малые, %	48.0	38.0	54.0	16.0
<i>Лейкоцитарные индексы</i>				
ККП	0.2	0.07	0.3	0.24
РОН	0.013	0.0001	0.063	0.06
ИЛГ	47.3	29.27	129.2	99.89
ИСНЛ	0.1	0.04	0.2	0.15
ИСЛЭ	9.2	4.95	20.5	15.56
ИСНЭ	0.9	0.67	1.5	0.83
ИСЛ	0.3	0.15	0.5	0.35
ИЯСН	3.0	2.05	4.8	2.79

Качественный состав лейкоцитарного состава крови иллюстрировал специфическую адаптивную реакцию особей на гидрохимические особенности среды обитания. Результаты анализа лейкоцитарных формул крови и лейкоцитарных индексов выявили количественно-качественные изменения в иммунологических показателях крови, которые были выражены при небольших отклонениях гидрохимических условий среды (I кластер) и более ярко проявлялись в условиях более сильного специфического загрязнения водных объектов (II и IV кластер) (табл. 5.5).

При этом снижалась специфическая реакция иммунной системы организма озерных лягушек (содержание лимфоцитов), что компенсировалось повышением неспецифической защитной системой крови (содержание нейтрофильных гранулоцитов).

Статистический анализ медианных величин лейкоцитарных показателей крови озерных лягушек при попарном сравнении выделенных кластеров (критерий Данна)

Лейкоцитарный показатель	Номера сравниваемых кластеров		Статистические показатели	
	первый	второй	Кр. Данна	p
1	2	3	4	5
<i>Лейкоцитарная формула крови</i>				
Миелоциты, %	IV	I	3.21	0.03
	IV	II	0.05	1.00
	I	II	3.90	0.002
Сумма нейтрофилов, %	IV	I	1.98	0.14
	IV	II	4.77	0.000005
	I	II	2.71	0.01
Юные нейтрофилы, %	IV	I	1.32	0.55
	IV	II	2.99	0.008
	I	II	1.60	0.32
Палочкоядерные нейтрофилы, %	IV	I	0.18	1.00
	IV	II	4.04	0.00015
	I	II	4.14	0.0001
Сегментоядерные нейтрофилы, %	IV	I	2.67	0.02
	IV	II	4.50	0.00002
	I	II	1.56	0.35
Базофилы, %	IV	I	4.54	0.00001
	IV	II	1.96	0.14
	I	II	3.53	0.001
Эозинофилы, %	IV	I	2.63	0.02
	IV	II	0.45	1.00
	I	II	2.72	0.019
Моноциты, %	IV	I	0.52	1.00
	IV	II	0.85	1.00
	I	II	0.27	1.00

Продолжение таблицы 5.5

1	2	3	4	5
Лимфоциты большие, %	IV	I	4.15	< 0.001
	IV	II	3.70	0.0006
	I	II	1.11	0.78
<i>Лейкоцитарные индексы</i>				
ККП	IV	I	2.00	0.13
	IV	II	3.17	0.004
	I	II	0.96	1.00
РОН	IV	I	0.48	1.00
	IV	II	3.68	0.0006
	I	II	3.36	0.002
ИЛГ	IV	I	2.00	0.13
	IV	II	3.23	0.003
	I	II	1.02	0.91
ИСНЛ	IV	I	2.12	0.1
	IV	II	5.04	0.000001
	I	II	2.82	0.014
ИСЛЭ	IV	I	3.52	0.001
	IV	II	1.95	0.15
	I	II	2.24	0.07
ИСНЭ	IV	I	0.59	1.00
	IV	II	3.58	0.001
	I	II	4.61	0.00001
ИСЛ	IV	I	3.13	0.005
	IV	II	3.37	0.002
	I	II	0.22	1.00
ИЯСН	IV	I	0.33	0.98
	IV	II	0.11	1.00
	I	II	0.28	0.99

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты сравнения

Наиболее высокий показатель индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ=0.3) значимо различающийся ($H=13.01$, $p=0.001$) в водоемах разных кластеров

иллюстрировал более выраженные отклонения в лейкоцитарной системе крови озерных лягушек в условиях высокого специфического загрязнения водных объектов медью (IV кластер). Как известно, повышенное содержание нейтрофилов, снижение доли лимфоцитов и увеличение отношения доли нейтрофилов к лимфоцитам являются показателями острого стресса у позвоночных животных. Высокие значения индексов: ККП; ИСЛ, ИСНЛ для популяций, группирующихся в IV кластере по сравнению с выборками II кластера, обусловленные увеличением содержания эозинофилов, сегментоядерных нейтрофилов и снижением числа лимфоцитов, показывали, что регулирующие системы крови работают всегда, но по-разному, в зависимости от условий. При сильном воздействии (экстремальное загрязнение водной среды, УКИЗВ=28.6) лейкоцитарное формулы крови озерных лягушек не имели выраженного лимфоцитарного профиля, что свидетельствовало о возрастании неспецифической реактивности организма (рис. 5.1).

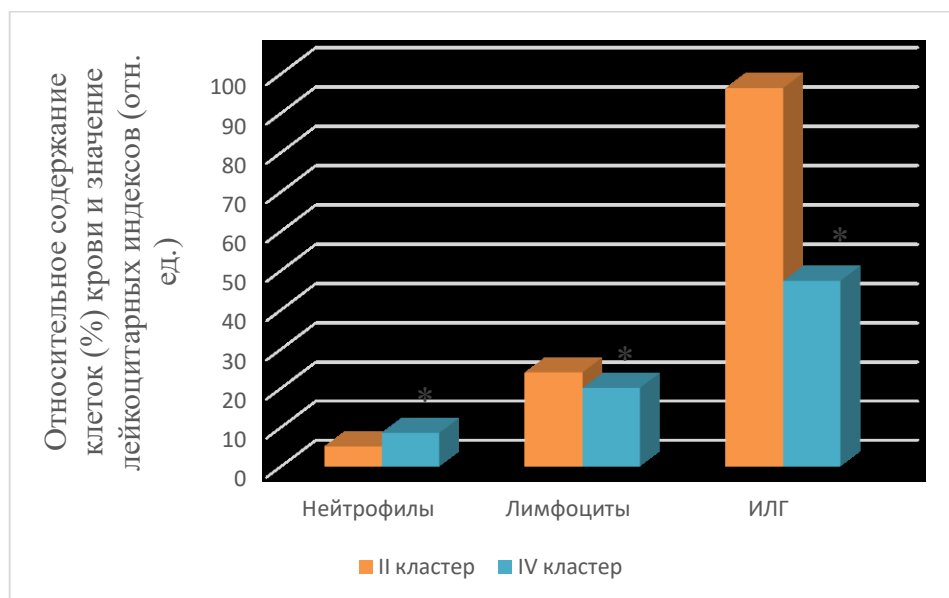


Рисунок 5.1. Относительное содержание и соотношение клеток гранулоцитарного и агранулоцитарного рядов в крови озерных лягушек, обитающих в качественно разных гидрохимических условиях среды

* – статистически значимые различия

Низкие значения индекса ККП и ИСЛ в выборках озерных лягушек I и II кластеров обуславливались приростом в периферической крови доли лимфоцитов и уменьшением доли эозинофилов. Известно, что повышение доли нейтрофилов и снижение доли лимфоцитов отражает у амфибий стресс-индуцированную реакцию лейкоцитов (Cabagna et al., 2005; Davis, Maerz, 2008). В качестве праймирующих агентов, определяющих механизмы, направленность иммунных реакций и активность лейкоцитов, выступают цитокины (Харченко, 2009). По-видимому, специфика гидрохимических условиях водной среды приводила в организме амфибий к усилению продукции воспалительных медиаторов, обуславливающих пролиферацию, а впоследствии и миграцию лимфоцитов, что хорошо иллюстрировалось возрастанием реактивного ответа нейтрофилов (РОН) ($H=20.72$, $p < 0.001$). Наше предположение о том, что поддержание иммунологической реактивности организма амфибий в условиях повышенного загрязнения среды определяется функциональной активностью нейтрофилов подтверждалось и что подтверждалось низким показателем лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса (ИЛГ) ($D=3.13$, $p=0.003$) 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. В лейкограммах лягушек, обитающих в водоемах с высоким содержанием меди, хрома и нефтепродуктов, наблюдалась тенденция к росту количества нейтрофилов на фоне уменьшения числа лимфоцитов. Эти изменения свидетельствовали о повышении неспецифической защитной системы крови.

Прудовые лягушки. С повышением загрязнённости водной среды количество лейкоцитов и эритроцитов в крови прудовых лягушек снижалось. Так число лейкоцитов у особей, обитающих в менее загрязнённых водных объектах (II кластер), превышало аналогичный показатель прудовых лягушек III кластера в 1.68 раза (табл. 5.6).

Таблица 5.6

Общее количество лейкоцитов и эритроцитов (тыс/мм³) в периферической крови прудовых лягушек водных объектов разного гидрохимического состава

Кластеры	Численность особей, n	Количество лейкоцитов, тыс/мм ³		Количество эритроцитов, тыс/мм ³	
		Me	IQR	Me	IQR
II	40	18.5	10.0	165.0	18.8
III	40	11.0	6.0	110.5	61.0
Статистические показатели:					
<i>Кр. Манна–Уитни, U</i>		4.58		2.54	
<i>Уровень значимости, p</i>		0.000005		0.01	

Примечание: Me – медиана; IQR – интерквартильный размах.

Большую долю клеток в лейкоцитарных формулах крови прудовых лягушек II (таблица 5.7) и III (таблица 5.8) кластеров составляли лимфоциты, при этом внутри выборок доля малых лимфоцитов, более чем в 2,5 раза превышала долю больших форм. Периферическая кровь прудовых лягушек II кластера, по сравнению с особями III кластера характеризовалась пониженным содержанием малых лимфоцитов и базофилов, доля нейтрофильных гранулоцитов (в том числе юных форм) и доля эозинофилов были повышенными (табл. 5.7).

Таблица 5.7

Показатели лейкоцитарной системы крови прудовых лягушек водных объектов II кластера, объединенных методом ординации по гидрохимическому составу

Показатель	Me	25%	75%	IQR
1	2	3	4	5
<i>Лейкоцитарная формула крови</i>				
Миелоциты, %	6.0	3.5	7.0	3.5
Сумма нейтрофилов, %	8.0	5.5	10.0	4.5
В том числе: юные, %	3.0	2.0	5.0	3.0
Палочкоядерные, %	2.0	0.5	3.0	2.5

Продолжение таблицы 5.7

1	2	3	4	5
Сегментоядерные, %	2.0	1.0	4.0	3.0
Базофилы, %	4.0	3.0	5.0	2.0
Эозинофилы, %	8.5	5.5	14.0	8.5
Моноциты, %	3.0	2.0	4.5	2.5
Лимфоциты большие, %	18.0	14.0	21.0	7.0
Лимфоциты малые, %	50.5	46.5	54.5	8.0
<i>Лейкоцитарные индексы</i>				
ККП	0.2	0.1	0.3	0.2
РОН	0.005	0.0	0.015	0.015
ИЛГ	49.6	30.6	80.8	50.1
ИСНЛ	0.1	0.0	0.1	0.1
ИСЛЭ	8.3	4.3	14.3	10.0
ИСНЭ	0.5	0.2	1.0	0.76
ИСЛ	0.3	0.2	0.5	0.2
ИЯСН	3.3	1.9	6.8	4.8

В лейкоцитарных формулах прудовых лягушек, обитающих в более неблагоприятных условиях (III кластер) сохранялся лимфоцитарный профиль, что свидетельствовало о преобладании в иммунном ответе специфической составляющей. (табл. 5.8).

Таблица 5.8

**Показатели лейкоцитарной системы крови прудовых лягушек
водных объектов III кластера, объединенных методом ординации по
гидрохимическому составу**

Показатель	Me	25%	75%	IQR
1	2	3	4	5
<i>Лейкоцитарная формула крови</i>				
Миелоциты, %	5.0	3.0	6.0	3.0

Продолжение таблицы 5.8

1	2	3	4	5
Сумма нейтрофилов, %	5.0	3.0	7.5	4.5
В том числе: юные, %	1.0	1.0	3.0	2.0
Палочкоядерные, %	1.0	0.0	3.0	3.0
Сегментоядерные, %	2.0	1.0	2.0	1.0
Базофилы, %	5.0	4.0	7.5	3.5
Эозинофилы, %	5.0	2.0	7.0	5.0
Моноциты, %	3.0	2.0	4.0	2.0
Лимфоциты большие, %	17.0	13.5	21.0	7.5
Лимфоциты малые, %	59.0	52.0	64.0	12.0
<i>Лейкоцитарные индексы</i>				
КПП	0.1	0.06	0.1	0.09
РОН	0.005	0.00	0.01	0.01
ИЛГ	86.0	65.4	164.0	98.5
ИСНЛ	0.04	0.02	0.1	0.05
ИСЛЭ	14.3	10.1	27.0	16.9
ИСНЭ	0.7	0.26	1.4	1.11
ИСЛ	0.2	0.12	0.3	0.18
ИЯСН	4.1	2.17	7.3	5.08

Отклонения в лейкоцитарных формулах крови прудовых лягушек II и III кластеров иллюстрировали и лейкоцитарные индексы: индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ). Значимо низкие значения ИЛГ и ИСЛЭ и высокий КПП свидетельствовали о развитии в крови прудовых лягушек в условиях повышенного загрязнения лейкомоидной реакции лимфатического типа (табл. 5.9, рис. 5.2).

Таблица 5.9

Статистический анализ медианных величин лейкоцитарных показателей крови прудовых лягушек при попарном сравнении кластеров (критерий Манна–Уитни)

Лейкоцитарный показатель	Сумма рангов в сравниваемых кластерах		Статистические показатели		
	III	II	U	Z	p
	<i>Лейкоцитарная формула крови</i>				
Миелоциты, %	1491.0	1749.0	671.0	1.23	0.21
Сумма нейтрофилов, %	1338.5	1901.5	518.5	2.70	0.006
Юные нейтрофилы, %	1314.0	1926.0	494.0	2.93	0.003
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1574.0	1666.0	754.0	0.43	0.66
Сегментоядерные нейтрофилы, %	1413.0	1826.0	593.5	1.98	0.04
Базофилы, %	1857.0	1383.0	563.0	2.27	0.02
Эозинофилы, %	1160.0	2080.0	340.0	4.42	0.00001
Моноциты, %	1598.0	1642.0	778.0	0.20	0.83
Лимфоциты большие, %	1585.5	1654.5	765.0	0.32	0.74
Лимфоциты малые, %	2051.0	1189.0	369.0	4.14	0.00003
	<i>Лейкоцитарные индексы</i>				
ККП	1124.5	2115.5	304.5	4.67	0.000002
РОН	1607.0	1633.0	787.0	0.12	0.90
ИЛГ	2116.5	1123.5	303.5	4.77	0.000002
ИСНЛ	1416.0	1824.0	596.0	1.95	0.05
ИСЛЭ	1959.0	1281.0	461.0	3.25	0.001
ИСНЭ	1707.5	1532.5	712.5	0.83	0.40
ИСЛ	1235.0	2005.0	415.0	3.69	0.0002
ИЯСН	1672.0	1568.0	748.0	0.49	0.62

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты сравнения

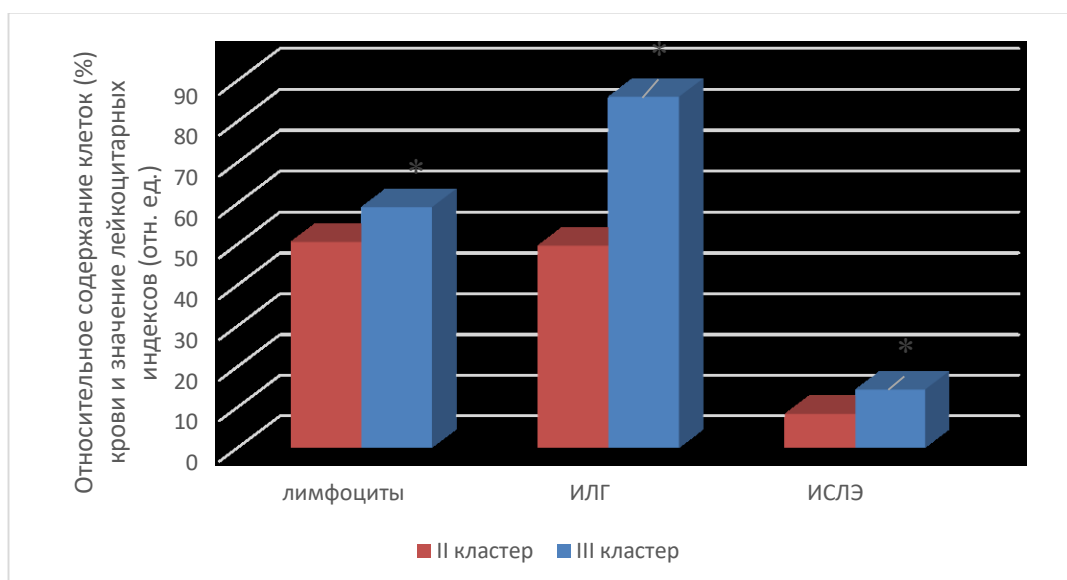


Рисунок 5.2. Относительное содержание лимфоцитов и соотношение клеток гранулоцитарного и агранулоцитарного рядов в крови прудовых лягушек, обитающих в качественно разных гидрохимических условиях среды
* – статистически значимые различия

Таким образом, у зеленых лягушек выявлены межвидовые различия в путях адаптации на уровне системы крови к комплексу гидрохимических условий среды. Несомненный интерес представляла оценка лейкоцитарной системы крови озерных и прудовых лягушек, обитающих в сходных гидрохимических условиях среды, т.е. в водных объектах, сгруппированных во II кластере.

При общих адаптивных реакциях двух видов на загрязнение водной среды, межвидовые различия в периферической крови прудовых и озерных лягушек в условиях низкого содержания железа и комплексного загрязнения медью, марганцем и хромом ($УКИЗВ=6.27$ отн.ед.), также были выраженными. У озерных лягушек по сравнению с прудовыми отмечено повышение содержания лимфоцитов ($u=4.36$, $p < 0.001$), снижение количества нейтрофилов ($u=3.88$, $p = 0.0001$) и эозинофилов ($u=3.64$, $p = 0.0002$). Изменения в соотношении гранулоцитов к агранулоцитам в составе лейкограмм, подтверждалось и более высокими показателя индексов ККП

($u=4.50$, $p < 0.001$) (рис. 5.3) и ИСЛ ($u=4.57$, $p < 0.001$) (рис. 5.4) у прудовых лягушек по сравнению с озерными.

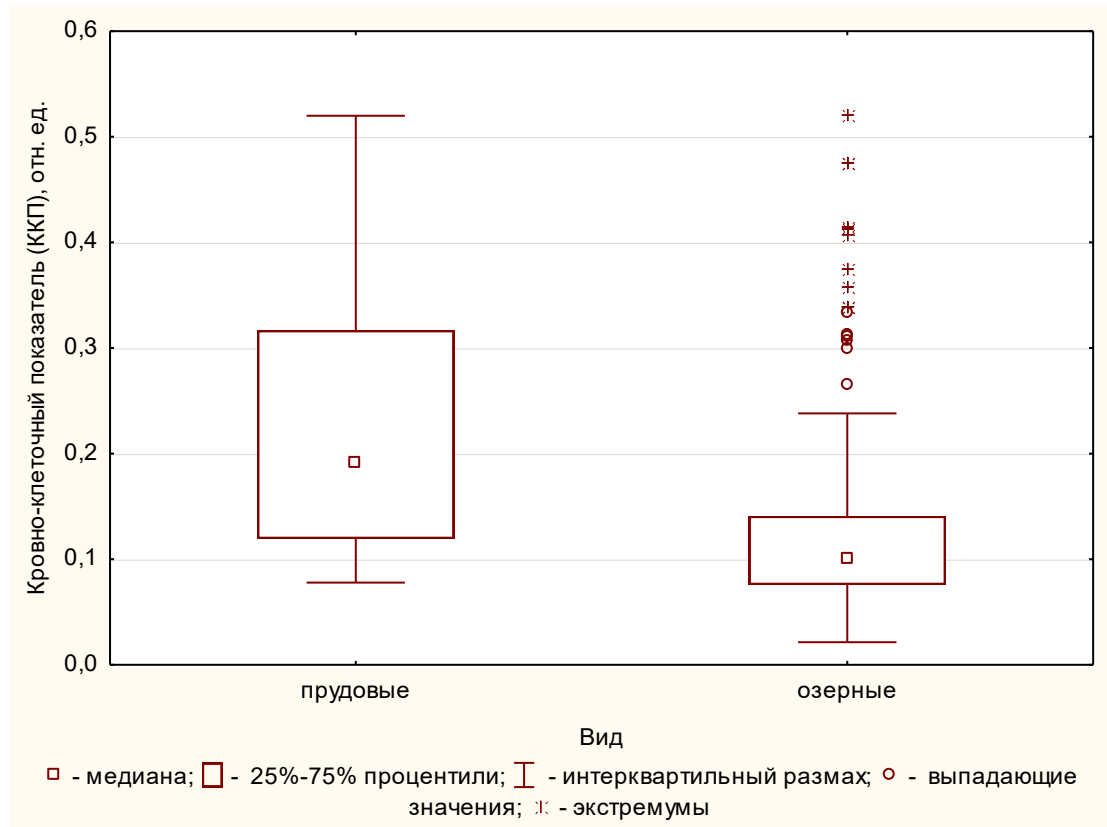


Рисунок 5.3. Величина интегрального кровно-клеточного показателя (ККП) у прудовых и озерных лягушек, обитающих в сходных гидрохимических условиях среды обитания

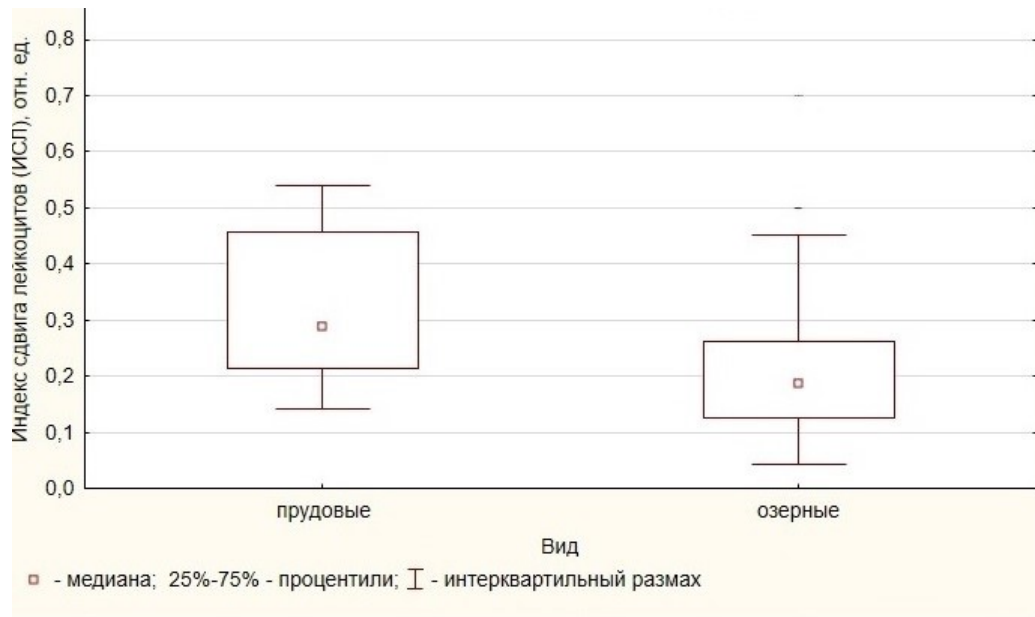


Рисунок 5.4. Величина индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ) у прудовых и озерных лягушек, обитающих в сходных гидрохимических условиях среды обитания

Более низкие значения лейкоцитарных индексов у прудовых лягушек: ИСЛЭ ($u=3.63$, $p = 0.0002$) (рис. 5.5) и ИЛГ ($u=4.57$, $p < 0.001$) (рис. 5.6) обуславливались повышенной долей в крови эозинофилов ($u=3.64$, $p = 0.0002$), юных ($u=3.52$, $p = 0.0004$) и палочкоядерных ($u=2.41$, $p = 0.015$) нейтрофильных гранулоцитов.

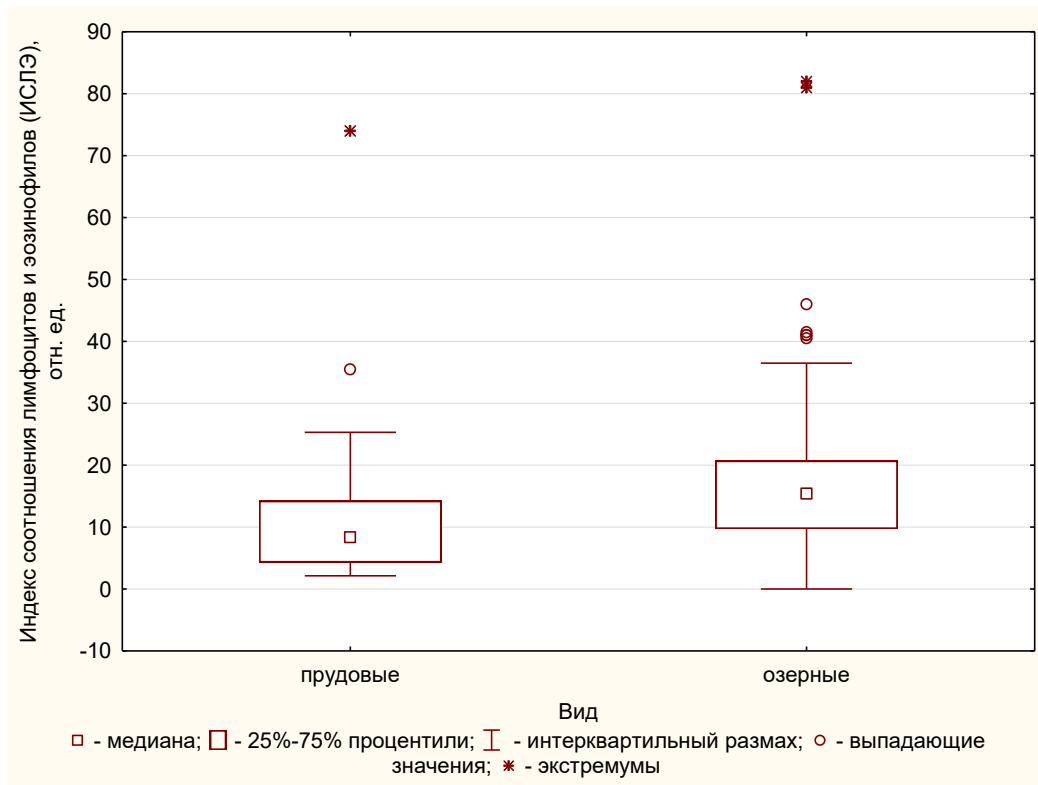


Рисунок 5.5. Величина индекса соотношения лимфоцитов и эозинофилов (ИСЛЭ) у прудовых и озерных лягушек, обитающих в сходных гидрохимических условиях среды обитания

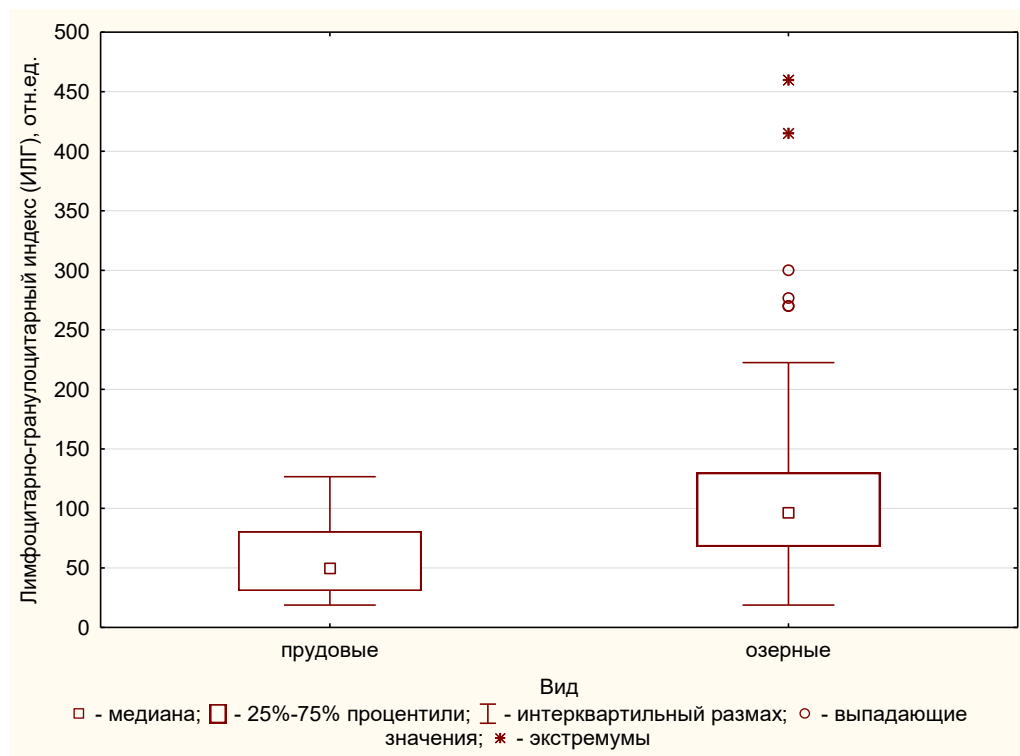


Рисунок 5.6. Величина лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса (ИЛГ) у прудовых и озерных лягушек, обитающих в сходных гидрохимических условиях среды обитания

В целом, полученные результаты показывают, что комплекс абиотических и антропогенных факторов урбанизированной территории активно воздействует на иммунокомпетентные клетки организма, вызывая существенные отклонения в функционировании иммунной системы исследованных популяций животных. По данным химического анализа вод исследованных водоемов в них присутствуют соединения Fe и таких тяжелых металлов, как Mn, Cu, Cr в концентрациях, превышающих ПДК_{рыб-хоз} (Приложение, таблицы 1–xxx). Из литературных источников известно, при воздействии меди снижается жизнеспособность полиморфноядерных лейкоцитов и подавляется фагоцитарная активность (Baginski, 1998). Под воздействием соединений железа возможно нарушение пролиферативного ответа лимфоцитов (Cardier et al., 1997). Совокупное влияние этих химических может оказывать супрессорное воздействие на иммунную систему амфибий.

С помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена выявлена статистически значимая взаимосвязь между гематологическими показателями амфибий и гидрохимическими условиями среды их обитания. Отрицательная корреляция установлена для общего содержания в периферической крови лейкоцитов ($\rho = -0.55$, $p < 0.05$) и эритроцитов ($\rho = -0.69$, $p < 0.05$) с величиной удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ), а также количества миелоцитов с концентрацией в водных объектах меди ($\rho = -0.53$, $p < 0.05$), хрома ($\rho = -0.55$, $p < 0.05$); количества эозинофилов с концентрацией в водных объектах железа ($\rho = -0.50$, $p < 0.05$). Выявились также положительные ассоциации между содержанием в крови базофилов с концентрацией в водных объектах марганца ($\rho = 0.53$, $p < 0.05$) и меди ($\rho = 0.54$, $p < 0.05$) (табл. 5.10).

**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 Cr , мг/л	-0.55
Общее число эритроцитов – УКИЗВ, отн.ед	-0.69

На фоне влияния комплекса абиотических факторов интегральная ответная реакция организма амфибий, оцениваемая по лейкоцитарным индексам крови, определялась, в числе прочего, и загрязнением водной среды (УКИЗВ) ($\rho = 0.53$, $p < 0.05$).

Результаты сравнения параметров лейкоцитарной системы амфибий в разных и сходных гидрохимических условиях среды расширяют наши теоретические представления о закономерностях изменения общей реактивности организма и путях адаптации на уровне системы крови. При этом большинство изменений в организме, если не напрямую детерминированы влиянием иммунологических факторов, то являются иммуно–опосредованными (Галактионов, 2004). Иммунологические взаимоотношения организма со средой обитания являются результатом воздействия, с одной стороны, антигенов, а с другой – распознавания и реагирования на эти антигены иммунной системы организма, ведущую роль в которых играют иммунокомпетентные клетки. Любые воздействия,

изменяющие иммунологическую реактивность организма животных, могут нарушать формирование сложных механизмов обеспечения гомеостатического равновесия в системе «организм-среда обитания». Вследствие этого особенно актуален поиск популяционных маркеров, позволяющих оценить работу эффекторных механизмов иммунной системы, а также уровень иммунологической реактивности, определяющие процесс формирования адаптационных реакций организма.

Резюме. Гидрохимические особенности среды в сочетании с антропогенной нагрузкой, приводили к наиболее сильным изменениям иммунологической реактивности организма, что отражалось в отклонениях лейкоцитарного профиля крови амфибий. У озерных лягушек комплексное воздействие химических загрязнителей, техногенного происхождения в высоких концентрациях (меди, хрома и нефтепродуктов) вызывало активизацию процесса эритропоэза и напряжение неспецифической защитной системы крови. Изменение функциональной активности лейкоцитарных клеток крови озерных лягушек, иллюстрировало экологическую пластичность вида и обеспечивало устойчивое функционирование организма под действием антропогенного пресса. Лейкоцитарная формула крови прудовых лягушек в условиях усиления загрязнённости водной среды, оцениваемой по УКИЗВ иллюстрировала развитие лейкемоидной 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 биотопических условиях, отражала 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 антропогенного пресса. Таким образом, использованные интегральные показатели обладали информативностью, что позволяет рассматривать их в качестве популяционных маркеров иммунного статуса амфибий, постоянно адаптирующихся к изменяющимся условиям среды.

Полученные результаты позволили нам сформулировать положение, выносимое на защиту:

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).

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

Любая стрессорная реакция организма сопровождается кратковременным подъемом в тканях организма активных форм кислорода и развитием окислительного стресса. Окислительный стресс является стимулятором, который помогает включить клеточную адаптацию организма (Дубинина, 1998; Smith, 1992). В настоящее время накоплено много сведений о роли продуктов свободно-радикального окисления, как важных медиаторов межклеточных взаимодействий, с помощью которых организмы адаптируются к конкретным условиям среды (Дубинина, 2006; Меньщикова и др., 2006). Развертывание каскада окислительных реакций в организме, как известно, связано с превращением отдельных аминокислотных остатков в карбонилпроизводные, их дезаминированием, потерей каталитической активности и увеличением чувствительности к протеолитической деградации (Дубинина, 2006). При окислительной модификации белков в них образуются альдегидные и кетонные группы аминокислотных остатков (карбонильные группы), повышенный уровень которых является показателем-маркером свободно-радикального окисления и окислительного стресса.

Окислительные процессы находятся под контролем основных регуляторных систем организма. Длительный окислительный стресс снижает резервно-адаптационные возможности организмов и формирует различные типы нарушений, в первую очередь, нервной и иммунной систем. Окислительный гомеостаз организма поддерживается сбалансированной работой прооксидантной и антиоксидантной систем. В ряде работ показано, что представители батрахофауны (зеленые лягушки рода *Pelophylax*) урбанизированных ландшафтов, способны аккумулировать ксенобиотики и выдерживать большие антропогенные нагрузки (Joanisse, Storey, 1996; Dawson et al., 2017). Выживанию гидробионтов в этих условиях среды способствует

изменение уровня белково-липидного, углеводного обмена (гликогена), а также возрастание в печени ферментов микросомальной фракции, проводящих детоксикацию организма. Наблюдаемая при этом активация свободно-радикальных процессов (Wall et al., 2012), направлена на поддержание окислительного гомеостаза организма (Falfushinska et al., 2008). Однако высокая интенсивность проокислительных реакций может привести к развитию окислительного стресса, сопровождающегося снижением активности антиоксидантной защиты организма (Сурова, 2002; Brodtkin et al., 2003).

В настоящей главе проведена сравнительная оценка интенсивности окислительных реакций по уровню карбонильных производных в сыворотке крови природных популяций озерных (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) и прудовых (*Pelophylax lessonae* Camerano, 1882) лягушек, обитающих в разных и сходных, с точки зрения гидрохимии биотопических условиях.

Озерные лягушки. Показано, что уровень окисления как альдегидных, так и кетонных аминокислотных остатков белков сыворотки крови озерных лягушек, обитающих в наиболее загрязненных водных объектах IV кластера, намного превышал аналогичные показатели озерных лягушек I, II и III кластеров (табл. 6.1).

Таблица 6.1

Содержание альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови озерных лягушек водных объектов разного гидрохимического состава

Кластеры	Показатели ОМБ, ОЕ/мл											
	АДНФГ						КДНФГ					
	230нм			270нм			370нм			430нм		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Me	25%	75%	Me	25%	75%	Me	25%	75%	Me	25%	75%
1. Первый	10.50	7.90	14.70	2.50	1.80	4.00	2.00	1.50	4.10	1.20	1.00	2.40

Продолжение таблицы 6.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
2. Второй	9.30	4.40	14.5	4.93	2.03	13.1	4.30	1.41	7.90	2.98	1.01	6.80
3. Третий	2.51	0.65	4.59	0.94	0.26	3.20	1.81	0.28	2.12	0.98	0.40	2.08
4. Четвертый	32.00	4.98	40.0	12.0	2.10	24.0	14.0	2.21	18.0	12.8	2.00	19.0
<i>Статистические показатели</i>	H = 21.91 p = 0.0001			H = 20.57 p = 0.0001			H = 17.85 p = 0.0005			H = 17.14 p = 0.0007		
	$D_{3-4}=4.60$ p < 0.001 $D_{1-3}=3.65$ p = 0.001; $D_{3-2}=3.70$ p = 0.001			$D_{1-4} = 2.69$ p = 0.04; $D_{4-3} = 3.97$ p = 0.0004; $D_{3-2} = 3.60$ p = 0.001			$D_{1-4} = 2.69$ p = 0.04; $D_{4-3} = 3.92$ p = 0.0005; $D_{3-2} = 2.84$ p = 0.02			$D_{1-4} = 2.87$ p = 0.02; $D_{4-3} = 3.68$ p = 0.001; $D_{3-2} = 2.71$ p = 0.03		

Примечание: АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны; КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны; Ме – медиана; 25% – значение 25-го квартиля; 75% – значения 75-го квартиля; H – множественный критерий Крускала-Уоллиса; D – попарный критерий Данна. В таблице приведены статистически значимые различия по критерию Данна с учетом поправки Бонферрони.

Такая модификация могла являться регуляцией скоординированного действия белков-ферментов, локализованных в разных тканях организма озерных лягушек (рис. 6.1).

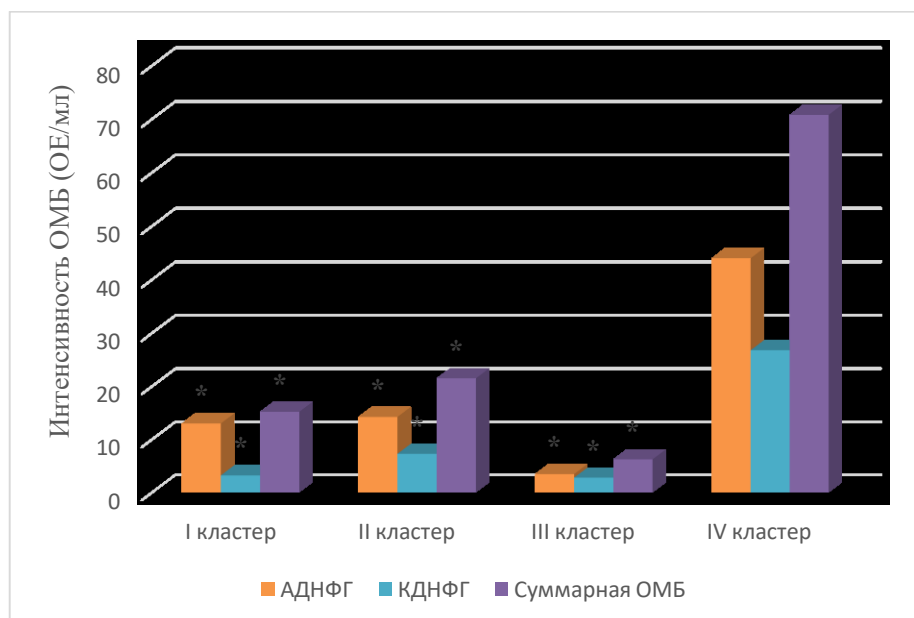


Рисунок 6.1. Изменение интенсивности ОМБ (ОЕ/мл) в сыворотке крови озерных лягушек

* – статистически значимые различия

При сравнении по критерию Вилкоксона (W) полученных результатов окислительной модификации белков выявлены статистически значимые различия у озерных лягушек торфокарьера, свидетельствующие о снижении интенсивности окислительных реакций альдегидных карбонильных производных за период трехлетних наблюдений (2017-2019 гг.) (табл. 6.2). При этом содержание кетонных карбонильных производных высокомолекулярных белков сыворотки крови озерных лягушек торфокарьера не изменялось.

Таблица 6.2

Изменение интенсивности ОМБ в сыворотке крови озерных лягушек *P. ridibundus* торфокарьера в течение 2017-2018-2019 гг.

Показатель	Показатели ОМБ, ОЕ/мл				
	АДНФГ		КДНФГ		
	230 нм	270 нм	370 нм	430 нм	530 нм
2017 год					
Me	10.5	2.5	2.0	1.2	1.0
25%	7.9	1.8	1.5	1.0	0.5
75%	14.7	4.0	4.1	2.4	1.8
IQR	6.8	2.2	2.6	1.4	1.3
2018 год					
Me	8.2	2.89	1.7	1.15	0.43
25%	5.3	1.9	1.3	0.87	0.16
75%	14.0	4.0	2.69	1.8	0.9
IQR	8.7	2.10	1.39	0.92	0.74
W	0.85	0.24	0.92	0.97	1.64
p	0.39	0.81	0.35	0.33	0.09
2019 год					
Me	2.51	0.94	1.81	0.98	0.29
25%	0.65	0.26	0.28	0.40	0.15
75%	4.59	3.20	2.12	2.08	0.75
IQR	3.93	2.93	1.84	1.67	0.59
W	2.55	2.41	1.78	0.31	0.94
p	0.01	0.01	0.07	0.75	0.34

Примечание: АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны; КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны; Me – медиана; 25% - значение 25-го квартиля; 75% - значение 75-го квартиля; IQR – интерквартильный размах; W – критерий Вилкоксона; p – уровень значимости. Жирным выделены статистически значимые показатели

По мнению ряда исследователей альдегидфенигидразоны (АДНФГ) являются ранними маркерами, а кетондинитрофенилгидразоны (КДНФГ) – поздними маркерами окислительной деструкции белковой молекулы (Антиоксиданты ..., 1984; Drapier et al., 1999). Поскольку у озерных лягушек торфокарьера при длительном наблюдении установлено снижение степени окисления АДНФГ, иллюстрирующие начальные стадии развертывания окислительного стресса, и отсутствие изменений в окислении КДНФГ, можно полагать, что резервно-адаптационные возможности организма, связанные, в первую очередь, с выработкой антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксиредоксинов и др.) предотвращали дальнейшее окислительное повреждение белковых молекул.

У озерных лягушек участка р. Кудьмы интенсивность окислительных реакций как альдегидных (АДНФГ), так и кетонных (КДНФГ) аминокислотных остатков белков в течение трех полевых сезонов оставалась высокой, что свидетельствовало о глубоких нарушениях окислительного гомеостаза организма животных в условиях экстремального загрязнения водного объекта (V класс качества воды) (табл. 6.3). При этом прослеживалась тенденция к снижению количественных значений наблюдаемых показателей окисления, что могло быть связано с выработкой как индуцированных антиоксидантов, так и снижением биосинтеза белков, под влиянием токсических загрязнителей водного объекта.

Таблица 6.3

**Интенсивность ОМБ в сыворотке крови озерных лягушек *P. ridibundus*,
(уч. р. Кудьмы, 2017-2019 гг.)**

Показатель	Показатели ОМБ, ОЕ/мл				
	АДНФГ		КДНФГ		
	230 нм	270 нм	370 нм	430 нм	530 нм
1	2	3	4	5	6
	2017 год				
Me	59.7	42.3	37.4	34.0	9.1

Продолжение таблицы 6.3

1	2	3	4	5	6
25%	57.5	38.0	35.7	32.9	8.4
75%	61.5	45.3	39.7	39.2	10.5
IQR	4.00	7.30	4.00	6.30	2.10
	2018 год				
Me	38.0	24.0	18.0	16.4	5.2
25%	33.0	18.0	15.5	13.6	4.2
75%	40.0	27.0	22.0	20.5	6.4
IQR	7.0	9.00	6.5	6.9	2.2
W	3.91	3.92	3.91	3.88	3.82
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2019 год				
Me	4.30	2.06	2.20	1.63	1.59
25%	1.11	0.92	1.17	0.34	0.44
75%	6.27	3.00	3.04	2.35	3.13
IQR	5.15	2.08	1.86	2.01	2.69
W	3.40	3.41	3.41	3.40	3.17
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Примечание: АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны; КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны; Me – медиана; 25% - значение 25-го квартиля; 75% - значение 75-го квартиля; IQR – интерквартильный размах; W – критерий Вилкоксона; p – уровень значимости. Жирным выделены статистические значимые показатели

Сравнительная оценка окислительной модификации белков в сыворотке крови озерных лягушек оз. Силикатное так же демонстрировала закономерность снижения интенсивности окисления при длительном обитании особей в условиях сильного загрязнения водной среды (табл. 6.4).

**Интенсивность ОМБ в сыворотке крови озерных лягушек *P. ridibundus*
(оз. Силикатное, 2017, 2019 гг.)**

Показатель	Показатели ОМБ, ОЕ/мл				
	АДНФГ		КДНФГ		
	230 нм	270 нм	370 нм	430 нм	530 нм
	2017 год				
Me	11.4	12.5	6.8	5.8	4.3
25%	9.2	9.6	5.6	4.9	3.6
75%	13.3	13.3	8.2	6.8	7.3
IQR	4.00	3.7	2.6	1.9	3.7
	2019 год				
Me	3.65	1.88	1.31	1.09	0.91
25%	1.87	0.70	0.50	0.609	0.63
75%	5.01	2.72	2.61	2.43	1.43
IQR	3.14	2.02	2.10	1.82	0.80
W	3.91	3.92	3.91	3.91	3.51
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0,0004

Примечание: АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны; КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны; Me – медиана; 25% - значение 25-го квартиля; 75% - значение 75-го квартиля; IQR – интерквартильный размах; W – критерий Вилкоксона; p – уровень значимости. Жирным выделены статистические значимые показатели

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. В наших экспериментах 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 $tg(-2a')$ ($Z_{1-2} = 4.22$, $p < 0.001$) (табл. 6.5).

Параметры хемилюминесценции сыворотки крови озерных лягушек антропогенно-трансформированной городской территории

Водные объекты	S, мВ	I_{max}, мВ	tg (-2α')
<i>Озерные лягушки</i>			
II кластера (оз. Силикатное)	698.6±64.6	166.6±6.4	97.4±4.9
IV кластера (оз. Сормовской ТЭЦ)	785.4±53.3	128.2±7.6	57.0±8.4
<i>Статистические показатели: кр. Манна-Уитни</i>	<i>u</i> = 2.81, <i>p</i> = 0.25	<i>u</i> = 3.22 , <i>p</i> = 0.003	<i>u</i> = 4.22 , <i>p</i> = < 0.001

При этом наибольшая способность к свободно-радикальному окислению зарегистрирована у особей популяции оз. Силикатное, а максимальная скорость восстановления антиоксидантной системы, зафиксирована у популяций лягушек оз. Сормовской ТЭЦ, что, по-видимому, связано с особенностями реализацией окислительного гомеостаза в разных гидрохимических условиях среды обитания. Можно предположить, что белки сыворотки крови озерных лягушек исследованных популяций характеризовались относительной устойчивостью к окислительному стрессу и выработкой адаптации к специфическим загрязнителям водной среды, что, повышало возможность существования амфибий в условиях сильного химического загрязнения среды обитания (VI-V балл качества воды).

Таким образом, длительное существование озерных лягушек в грязных и экстремально грязных водных объектах приводило к изменению содержания уровня карбонильных производных в сыворотки крови, обусловленных активацией свободнорадикальных процессов и развитию окислительного стресса. Установлена также сильная отрицательная взаимосвязь интенсивности свечения исследуемых образцов сыворотки крови (*I*_{max}) лягушек, с содержанием в водоеме железа ($\rho = -0.93$, $p = 0.02$) и никеля ($\rho = -0.92$, $p = 0.03$).

Прудовые лягушки. В течение трех лет наблюдений прудовые лягушки доминировали в двух водных экосистемах: оз. Вторчермет и бол. Белкино, с высоким содержанием марганца, по результатам гидрохимического анализа эти водные объекты попали в разные кластеры. Сравнительный анализ содержания альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови прудовых лягушек этих популяций, свидетельствовал о более выраженном характере процесса окислительной модификации белков у особей оз. Вторчермет, входящих во II кластер, по отношению к прудовым лягушкам бол. Белкино (табл. 6.6).

Таблица 6.6

Содержание альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови прудовых лягушек водных объектов разного гидрохимического состава

Кластеры	Показатели ОМБ, ОЕ/мл											
	АДНФГ						КДНФГ					
	230нм			270нм			370нм			430нм		
	Me	25%	75%	Me	25%	75%	Me	25%	75%	Me	25%	75%
II	44.2	6.28	56.0	34.0	4.75	39.3	31.0	4.87	34.3	27.06	4.31	31.5
III	10.2	5.97	15.4	7.00	4.40	13.6	4.69	2.20	12.4	4.80	2.60	10.8
<i>Статистические показатели</i>	u = 8.11 p < 0.001			u = 8.07 p < 0.001			u = 8.11 p < 0.001			u = 8.07 p < 0.001		

Примечание: АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны; КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны; Me – медиана; 25% – значение 25-го перцентиля; 75% – значения 75-го перцентиля; u – попарный критерий Манна-Уитни.

При сравнении полученных результатов за два года (2017-2018 гг) статистически значимых различий по уровню АДНФГ и КДНФГ у прудовых лягушек оз. Вторчермет не выявлено. Анализ окислительной модификации белков у особей этой популяции в 2019 году выявил снижение интенсивности окисления как альдегидных (АДНФГ), так и кетонных (КДНФГ) аминокислотных остатков (табл. 6.7).

**Интенсивность ОМБ в сыворотке крови прудовых лягушек *P. lessonae*,
(оз. Вторчермет, 2017-2019 гг.)**

Показатель	Показатели ОМБ, ОЕ/мл				
	АДНФГ		КДНФГ		
	230 нм	270 нм	370 нм	430 нм	530 нм
	2017 год				
Me	52.3	38.5	32.4	29.2	18.1
25%	44.9	35.9	31.0	26.40	13.90
75%	59.0	42.3	37.1	32.2	19.2
IQR	14.1	6.4	6.1	5.8	5.3
	2018 год				
Me	54.0	34.8	32.3	30.2	17.9
25%	43.0	32.0	29.0	27.0	14.7
75%	58.0	38.8	36.3	32.0	19.8
IQR	15.0	6.80	7.30	5.0	5.1
W	0.44	1.94	0.67	0.05	0.06
p	0.65	0.052	0.50	0.95	0.95
	2019 год				
Me	1.65	1.24	2.07	1.41	0.68
25%	0.8	0.51	0.4	0.35	0.15
75%	5.21	2.37	3.65	2.9	1.22
IQR	4.41	1.86	3.25	2.54	1.06
W	3.62	3.51	3.52	3.51	3.17
p	0.0002	0.0004	0.0004	0.0004	0.001

Примечание: АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны; КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны; Me – медиана; 25% - значение 25-го квартиля; 75% - значение 75-го квартиля; IQR – интерквартильный размах; W – критерий Вилкоксона; p – уровень значимости. Жирным выделены статистические значимые показатели

Тенденция к снижению интенсивности окисления белков выявлена и у прудовых лягушек, обитающих в бол. Белкино (табл. 6.8), свидетельствующая о выработке у амфибий приспособительных реакций к загрязнителям водной среды и формировании относительной устойчивости к окислительному стрессу в течении наблюдаемого периода (2017-2019 гг.).

**Интенсивность ОМБ в сыворотке крови прудовых лягушек *P. lessonae*,
(бол. Белкино, 2017-2019 гг.)**

Показатель	Показатели ОМБ, ОЕ/мл				
	АДНФГ		КДНФГ		
	230 нм	270 нм	370 нм	430 нм	530 нм
	2017 год				
Me	15.5	14.4	13.0	11.7	8.6
25%	13.8	13.3	11.8	8.9	5.8
75%	16.2	14.8	13.2	13.3	10.4
IQR	2.4	1.5	1.4	4.4	4.6
	2018 год				
Me	7.5	5.2	3.75	3.3	1.4
25%	5.7	4.3	2.3	2.4	0.96
75%	9.1	6.9	4.43	4.1	1.60
IQR	3.4	2.6	2.13	1.7	0.64
W	3.88	3.88	3.91	3.77	3.91
p	0.0001	0.0001	0.00008	0.0001	0.00008
	2019 год				
Me	3.41	1.25	1.18	0.94	0.66
25%	2.21	0.95	0.32	0.29	0.32
75%	7.6	1.82	2.16	1.64	3.03
IQR	5.3	0.86	1.84	1.35	2.71
W	2.80	2.66	2.80	2.66	2.20
p	0.005	0.007	0.005	0.007	0.027

Примечание: АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны; КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны; Me – медиана; 25% - значение 25-го квартиля; 75% - значение 75-го квартиля; IQR – интерквартильный размах; W – критерий Вилкоксона; p – уровень значимости. Жирным выделены статистические значимые показатели

Представляло особый интерес оценить степень окисления белков лягушек разных видов, обитающих в сходных гидрохимических условиях среды, т.е. в водных объектах II кластера. Показано, что показатели ОМБ, регистрируемые при всех пяти длинах волн, у прудовых лягушек

статистически значимо превышали аналогичные показатели озерных лягушек (табл. 6.9).

Таблица 6.9

Сравнительный анализ интенсивности ОМБ сыворотки крови озерных и прудовых лягушек, обитающих в близких гидрохимических условиях водной среды по критерию Манна- Уитни

Показатели ОМБ		Сумма рангов (озерные)	Сумма рангов (прудовые)	U	Z	p
АДНФГ	230 нм	3419.0	4582.0	1004.0	4.71	<0.001
	270 нм	3435.0	4440.0	1020.0	4.52	<0.001
КДНФГ	370 нм	3330.5	4544.5	915.5	5.04	<0.001
	430 нм	3347.0	4528.0	932.0	4.96	<0.001
	530 нм	3108.5	3912.5	963.5	4.10	<0.001

Так, например, содержание альдегидных карбонильных производных белков в сыворотке крови прудовых в 6.9 раза превышало содержание АДНФГ в сыворотке крови озерных, зарегистрированное при длине волны 270 нм ($u=4.52$, $p < 0.001$) (рис. 6.2).

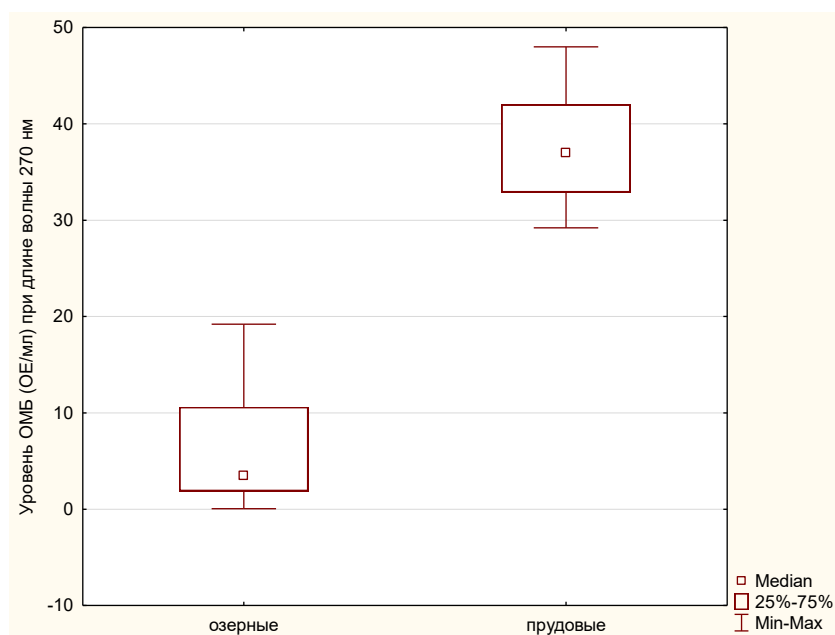


Рисунок 6.2. Уровень альдегид-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови озерных и прудовых лягушек, обитающих в сходных гидрохимических условиях среды

Уровень алифатических кетонных карбонильных производных нейтрального характера (зарегистрированных при длине волны 370 нм) в сыворотке крови прудовых, более чем в 7.2 раза превышал аналогичный показатель озерных лягушек ($u=5.04$, $p < 0.001$) (рис. 6.3). Из представленных данных можно сделать вывод, что белки сыворотки крови прудовых лягушек больше подвержены окислению по сравнению с аналогичным показателем озерных лягушек и процесс окислительной модификации белков крови прудовых лягушек имел статистически значимо более выраженный характер.

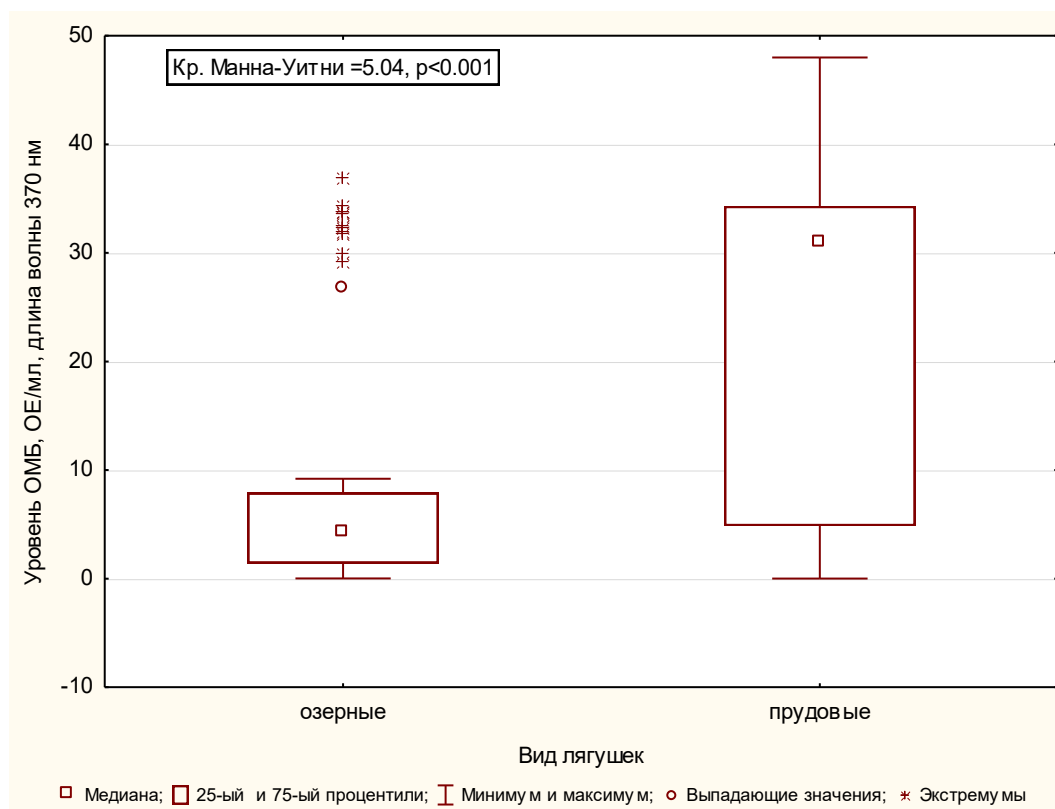


Рисунок 6.3. Уровень кетон-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови озерных и прудовых лягушек, обитающих в близких гидрохимических условиях среды

Приоритетными загрязнителями водных объектов являлись железо, медь, марганец, хром, обладающие способностью вызывать спонтанное окисление белков (Дубинина, 2006), следовательно, высокая чувствительность к окислению белков сыворотки крови амфибий могла быть индуцирована, в том числе, и наличием в водной среде тяжелых металлов. Известно, что из окружающей среды соединения тяжелых металлов (меди, железа, никеля,

свинца и др.) легко проникают в трофические цепи, включаются в метаболические циклы и вызывают разнообразные физиологические нарушения, участвуя в генерации активных форм кислорода, в ингибировании активных групп ферментов, в том числе и антиоксидантных (Шугалей и др., 1992; Дубинина, 2006; Меньщикова и др., 2006). Окисление аминокислотных остатков в присутствии металлов переменной валентности (например, железа, меди), кислорода, перекиси водорода затрагивает ту часть белковой молекулы, которая участвует в связывании металла (Дубинина, 2006). Реакция образования гидроксильного радикала в присутствии металлов переменной валентности, проходит по схеме:



Установлена прооксидантная роль металлов переменной валентности (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+}) как в химических, так и биологических модельных системах (Беленичев и др., 2002; Pereira et al., 2013). Иницирующая роль металлов в образовании свободных форм кислорода, а также преобразование некоторых из них из прооксидантов в антиоксиданты и наоборот (Cu^{2+} , Co^{2+}) зависит от связывания металла, изменения его концентрации, отсутствия достаточного количества восстановителей в биологических системах. Отметим также, что медь по своей химической природе сильнее связывается с органическими соединениями по сравнению с другими металлами. Ионы меди способны вытеснять функциональные металлы из ферментов и восстанавливать молекулярный кислород до активных форм кислорода, что делает медь при высоком содержании в среде обитания сильным токсикантом.

В свою очередь анализ зависимости интенсивности окисления белков с содержанием в водной среде обитания ионов меди выявил прямую корреляцию между этими показателями ($r = 0.51$; $p = 0.03$) и показал, что примерно на 26% (показатель детерминации $R^2 = 0.26$) дисперсия содержания альдегидинитрофенилгидразонов (АДНФГ) в сыворотке крови зеленых, определенных при длине волны 270 нм объясняется дисперсией концентрации ионов меди в водных объектах (мг/л) (рис. 6.4).

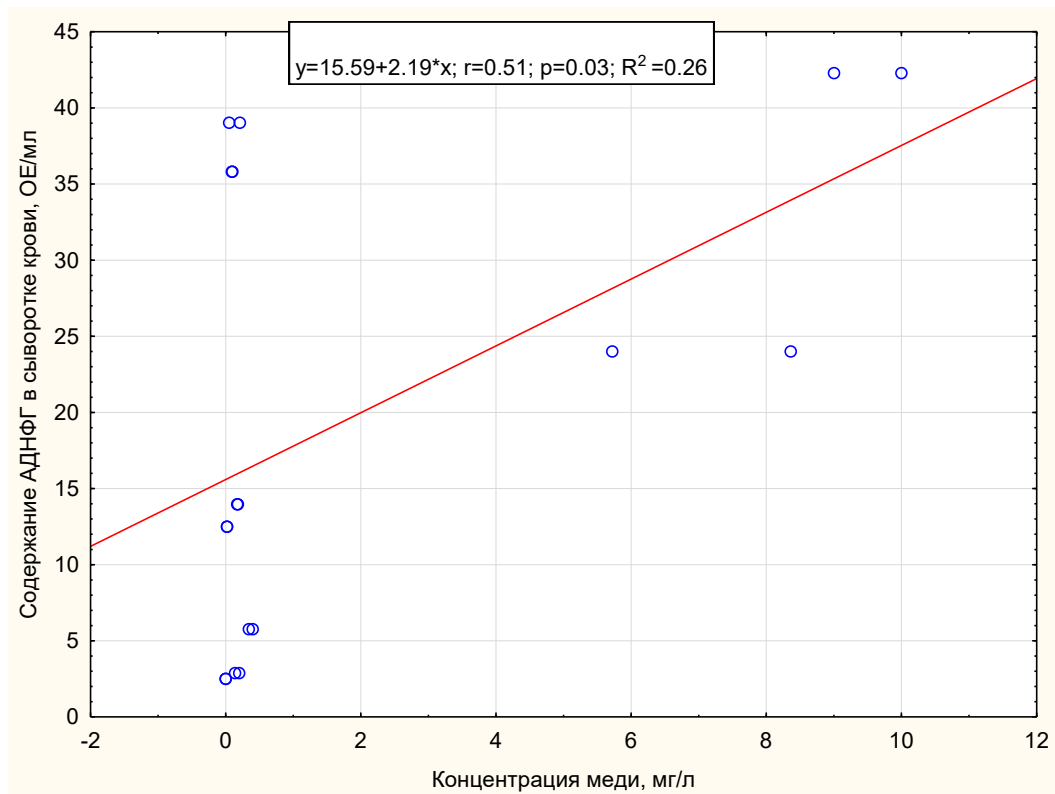


Рисунок 6.4. Возрастание интенсивности окисления белков сыворотки крови в зависимости от содержания ионов меди в водной среде обитания зеленых лягушек

Как известно, наличие корреляции между двумя показателями не обязательно означает наличие прямой причинно-следственной связи между ними (Реброва, 2003). Согласованные изменения окислительной модификации белков могли быть следствием количественной вариации и других химических загрязнителей среды обитания зеленых лягушек. Так, с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена выявлены положительные ассоциации между ранними (АДНФГ) и поздними (КДНФГ) маркерами окислительной деструкции с концентрацией в водных объектах нитратов (табл. 6.10).

Таблица 6.10

Анализ взаимосвязи показателей окислительной модификации белков с концентрацией в водных объектах нитратов (мг/л)

Показатели ОМБ	Длина волны, нм	Коэффициент корреляции Спирмена, ρ ($p < 0.05$)
АДНФГ	230	0.60
	270	0.67
КДНФГ	370	0.68
	430	0.62
	530	0.62

Общепринято, что организм животного не способен восстанавливать нитраты, поскольку ткани животных не содержат нитрат- и нитрит восстанавливающих ферментов. Действие нитратов на развитие окислительного стресса может быть опосредованным, поскольку нитраты, являясь типичными ксенобиотиками, вовлекаются в метаболические процессы, в ходе которых восстанавливаются сначала до нитрита, а затем до катиона аммония, через образование ряда промежуточных продуктов (Hjelt et al., 1995; Реутов, Дьяконова, 1996). Нитриты, являясь сильными окислителями, всасываются в кровь и под воздействием фермента нитратредуктазы восстанавливаются до нитритов, которые взаимодействуют с гемоглобином крови и окисляют в нем 2-х валентное железо в 3-х валентное. В результате образуется вещество метгемоглобин, который уже не способен переносить кислород. Поэтому нарушается нормальное дыхание клеток и тканей организма (тканевая гипоксия), вследствие чего накапливается молочная кислота, холестерин и резко падает количество белка.

Анализ состояния окислительного гомеостаза зеленых лягушек по показателям прооксидантной–антиоксидантной активности методом главных компонент позволил провести классификацию исследованных выборок. По графику каменистой осыпи были выделены две главные компоненты, первая из которых описывала приблизительно 38.69 % общей вариации. Вторая

главная компонента объясняла 34.97 % общей вариации. В первую компоненту, соответствующую собственному значению 1.93, наибольший вклад вносило окисление: альдегидных аминокислотных остатков белков (сильная отрицательная корреляция -0.956), кетонных аминокислотных остатков (сильная отрицательная корреляция -0.966), суммарная окислительная модификация белков (сильная отрицательная корреляция -0.988). Вторая главная компонента имела сильную положительную корреляцию (0.936) с максимальной интенсивностью хемилюминесценции, отражающей уровень свободных радикалов в исследуемых пробах и умеренную отрицательную корреляцию (-0.798) с показателем $\text{tg}(-2\alpha')$, иллюстрирующим скорость восстановления антиоксидантной защиты (рис. 6.5).

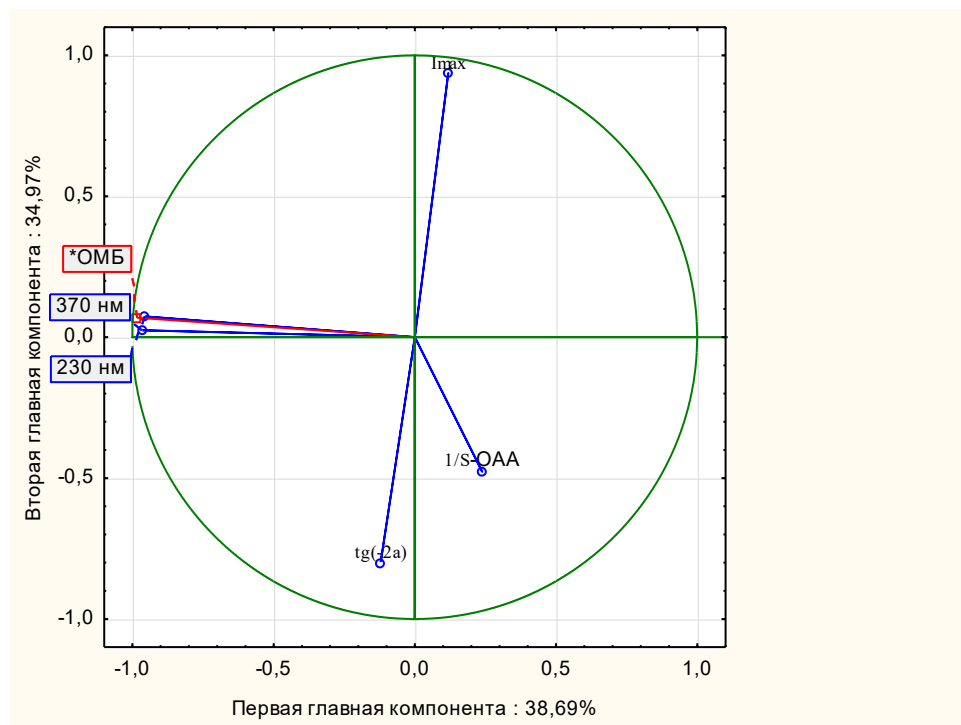


Рисунок 6.5. График факторных координат, построенный на основе параметров активности прооксидантной–антиоксидантной систем озерных и прудовых лягушек

График распределения выборок амфибий в пространстве главных компонент (рис. 6.6) визуализирует полученный результат. Три выборки из популяций озерных лягушек 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. Напомним, что положительную часть первой главной компоненты в большей степени определяли показатели антиоксидантного гомеостаза организма: $I_{\max}$ и $\text{tg}(-2\alpha)$. По совокупности исследованных показателей для зеленых лягушек установлена разная степень выраженности окислительного стресса и связь между выборками прудовых лягушек более тесная, чем для выборок озерных лягушек.

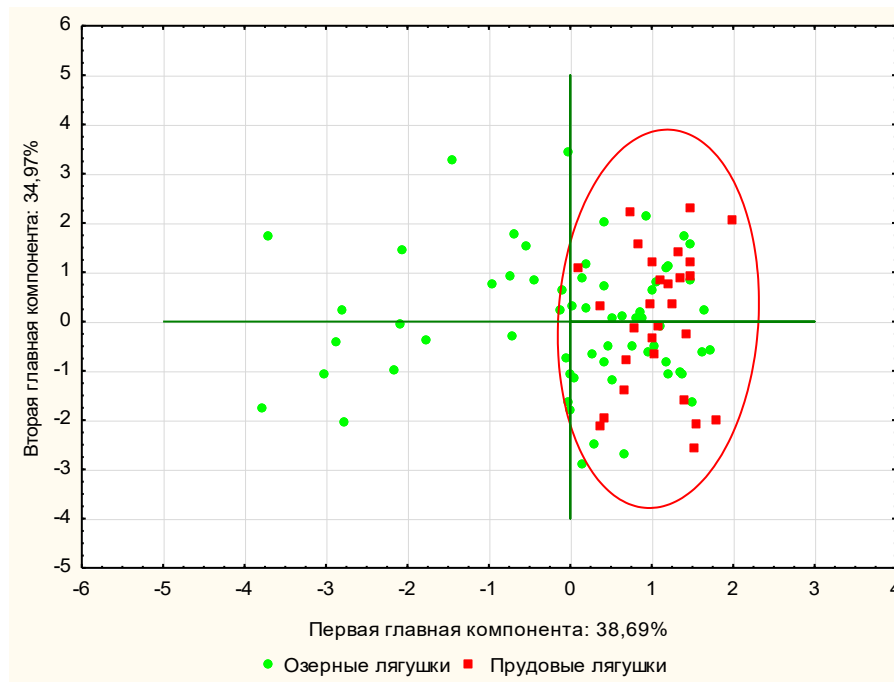


Рисунок 6.6. Распределение выборок озерных и прудовых лягушек в пространстве главных компонент
Зеленый цвет - озерные лягушки. Красный цвет - прудовые лягушки

Таким образом, в условиях загрязнения показатели про-, антиоксидантного равновесия организма лягушек смещались в сторону интенсификации свободно-радикального окисления и усиления работы антиоксидантной системы.

Резюме. Состояние окислительного стресса связано с функционированием антиоксидантной и про-оксидантной систем, соотношение которых в организме изменяется под влиянием различных факторов внешней среды и поддерживается на более высоком

сбалансированном уровне, обеспечивая выживание видов. Чрезмерная активация свободно-радикальных реакций вносит вклад в разбалансировку основных интегральных систем организма, в том числе и иммунной системы, поскольку вызывает деструкцию иммуноглобулинов, белков-ферментов, рецепторов, структурных белков и ионных каналов, что сопровождается нарушениями метаболизма, функций тканей и органов и приводит к гибели организмов. Условия среды, вызывающие необходимость адаптивного ответа, могут быть выражены относительно непродолжительными отклонениями различных показателей от их средних значений, либо изменениями среднего уровня воздействующих факторов (Шилов, 1985). Адаптации амфибий к комплексному загрязнению водной среды проявлялись в усилении окислительной модификации белков в сыворотке крови. Окисление белков, как известно, приводит к их деградации с образованием пептидов (Дубинина, 2006), выполняющих ведущую роль в регуляции метаболических процессов в общей системе адаптации к окислительному стрессу. В тканях происходит постоянная генерация активных форм кислорода, которые, являясь сигнальными молекулами, обеспечивают сохранение нормального метаболического фона, необходимого для функционирования клеток и органов. С активными формами кислорода связана экспрессия редокс-чувствительных генов, необходимых для включения адаптационных механизмов организма в экстремальных условиях (Smith, 1992). Это обеспечивает мобилизацию антиоксидантной защиты, которая участвует в снижении уровня реакционноспособных соединений, препятствуя тем самым проявлению их токсического действия в тканях.

Установлена взаимосвязь комбинаторного индекса загрязнения водной среды (УКИЗВ) и параметров окислительного гомеостаза (альдегидных карбонильных производных, алифатических кетонных карбонильных производных нейтрального и основного характера), а также комплексное влияние загрязнителей водной среды на интенсивность окислительных реакций в сыворотке крови озерных и прудовых лягушек. Уровень

окислительного стресса у разных видов связан с реализацией окислительного гомеостаза в различных гидрохимических условиях среды. Адаптации амфибий к комплексному загрязнению водной среды проявлялись в усилении окислительной модификации белков в сыворотке крови, при этом интенсивность окислительных процессов у прудовых более выражена по сравнению с озерными лягушками. В условиях сильного загрязнения показатели про-, антиоксидантного равновесия организма смещаются 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. Для озерных лягушек установлено изменение активности свободно-радикальных реакций $I_{\max}$ (мВ) и скорости восстановления антиоксидантной системы $tg(-2a')$ организма в качественно разных условиях среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Зеленые лягушки (*Pelophylax*) представляют собой комплекс, включающий прудовую лягушку (*Pelophylax lessonae*), гибридогенный таксон – съедобную лягушку (*P. esculentus*) и сложный комплекс криптических видов озерной лягушки (*P. ridibundus*) (Боркин, 1998; Кузьмин, 1999; Боркин и др., 2015; Иванов, 2019; Hotz et al., 2013; Akin et al., 2010). Эти виды широко распространены, играют важную роль в трофических цепях и благодаря особенностям онтогенеза, являются связующим звеном между водными и наземными экосистемами. Молекулярно-генетическими исследованиями показано, что озерная лягушка, распространенная на огромной территории восточного ареала, представляет собой комплекс из двух криптических форм (Akin et al., 2010; Plother et al., 2008, 2010; Ермаков и др., 2013; Иванов, 2015, 2019; Кузовенко, 2018). При этом распределение генетических маркеров криптических форм в восточной части ареала озерной лягушки в большей степени зависит от географических и климатических факторов, чем от факторов антропогенной природы (Иванов, 2019).

Согласно многочисленным исследованиям, родительские виды комплекса европейских зеленых лягушек (озерная и прудовая лягушка), достаточно хорошо различаются по своей биотопической приуроченности и численности. Озерная лягушка заселяет преимущественно крупные глубокие водоемы открытых природных ландшафтов, обитая в условиях сильного антропогенного загрязнения среды – заселяет и небольшие водоемы (Berger, 1976; Гаранин, 1983; Лада, 1995; Боркин, 1998; Кузьмин, 1999, 2012 и др.). Прудовая лягушка, напротив, обитает преимущественно в небольших лесных замкнутых водоемах, в том числе в пересыхающих и заболачивающихся. Видовые различия проявляются в репродуктивном поведении, в возрастной и аллометрической изменчивости промеров тела зеленых лягушек (Okulova, Bogdanov, 2002), а также в образе жизни: прудовая лягушка, в большей мере, чем озерная связана с наземными биотопами. Биотопическая дифференциация зеленых лягушек связана и с особенностями мест их зимовок. Озерная

лягушка зимует преимущественно на дне водоемов, зарывшись в ил (в связи с чем пяточный бугор у нее низкий приплюснутый), прудовая – зимует на суше и для закапывания в грунт в качестве приспособления у нее имеется высокий, лопатовидный пяточный бугор.

Озерная и прудовая лягушка встречаются на территории Европейской части России не только симпатрично (с перекрыванием своих ареалов), но и синтопично (в одном и том же водоеме) (Замалетдинов и др., 2005), при этом представленность озерных лягушек выше, чем прудовых. Показано, что эти виды амфибий отличаются по типу митохондриального и ядерного геномов (Иванов, 2015, 2019; Замалетдинов и др., 2005, 2015; Закс, 2013) и в условиях урбоценозов наблюдается преобладание озерной лягушки, имеющей митохондриальную ДНК «восточной» формы (Файзулин и др., 2015, 206, 2017; Кузовенко, 2018). Установлено, что особи с митохондриальным геномом «восточного» типа легко адаптируются в условиях антропогенной трансформации местообитаний (Ермаков и др., 2013, 2014, 2016; Файзулин и др., 2017).

Можно полагать, что доминирование одного вида над другим на одной территории обусловлено лучшей адаптацией доминанта к экологическим условиям среды, позволяющей оставлять более жизнеспособное и конкурентоспособное потомство. В этой связи интересным и актуальным является сравнительная оценка на уровне иммуногемопоза адаптивных реакций прудовых и озерных лягушек в градиенте гидрохимических условий среды. Нашими исследованиями выявлены различия в механизмах адаптации прудовых и озерных лягушек, проявляющиеся более существенно при высоком уровне загрязнения, определенном с помощью УКИЗВ. При общих адаптивных реакциях зеленых лягушек к условиям повышенного загрязнения среды обитания, межвидовые различия проявлялись в более выраженной активизации эритропоэтической активности кроветворения у прудовых лягушек по сравнению с озерными. 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.

Межвидовые различия в периферической крови к комплексному воздействию химических загрязнителей, техногенного происхождения в высоких концентрациях (меди, хрома и нефтепродуктов) у изученных видов зеленых лягушек также выражены. У озерных лягушек выявлено усиление неспецифических реакций гуморального звена иммунитета, что подтверждалось повышением содержания в периферической крови нейтрофилов. Лейкоцитарная формула крови прудовых лягушек характеризовалась 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).

Любая стрессорная реакция организма сопровождается кратковременным подъемом в тканях организма активных форм кислорода и развитием окислительного стресса. Окислительный стресс является стимулятором, который помогает включить клеточную адаптацию организма (Дубинина, 1998; Smith, 1992). Адаптации амфибий к комплексному загрязнению водной среды проявлялись в усилении окислительной модификации белков в сыворотке крови, при этом белки сыворотки крови прудовых лягушек оказались более подвержены окислению по сравнению с озерными.

С целью изучения взаимосвязи между различными показателями системы крови и выявления скрытых факторов, которые бы упростили процесс классификации изучаемых выборок из популяций озерных и

прудовых лягушек мы воспользовались методом главных компонент. С помощью построения графика «каменистой осыпи» были выделены две главные компоненты (факторные оси), представляющие собой линейную комбинацию первоначальных переменных. Первая факторная ось, соответствующая максимальному собственному значению (2313.23) описывала приблизительно 85.06% общей дисперсии. Вторая факторная ось с собственным значением 406.34 описывала 14.94% общей дисперсии. В первую факторную ось наибольший относительный вклад вносили переменные: содержание в периферической крови эритроцитов, лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ) крови (положительные корреляции) и содержание альдегидных (АДНФГ) и кетонных (КДНФГ) карбонильных производных в сыворотке крови лягушек (отрицательные корреляции). Во вторую факторную ось наибольший относительный вклад вносили клетки эритроидного: эритробласты, пронормоциты, нормоциты базофильные, % (положительная корреляция) и миелоидного: миелобласты, промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты, % (отрицательная корреляция) рядов костного мозга (рис. 1). Следовательно, первую главную компоненту, можно обозначить как воздействие на периферическую кровь (эритроциты, лейкоцитарный состав и интенсивность окислительных реакций белков сыворотки). Вторую же ось, можно обозначить как воздействие на центральный орган иммунной системы – костный мозг.

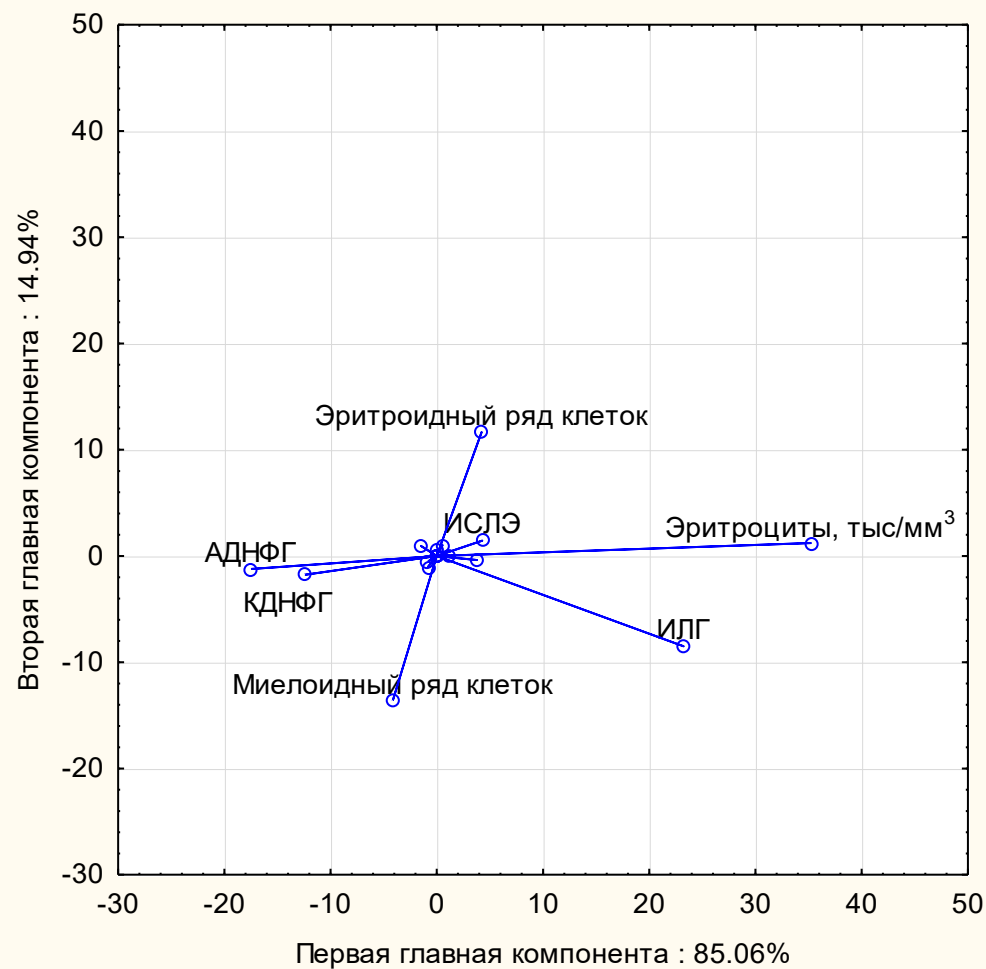


Рисунок 1. Расположение анализируемых иммуногематологических показателей в пространстве главных компонент

График рассеивания исследованных выборок озерных и прудовых лягушек, группирующихся в четырех кластерах, выделенных при кластеризации и ординации гидрохимических показателей, наглядно визуализирует их расположение в новом факторном пространстве (рис. 2). В зависимости от специфики гидрохимического состава водной среды иммуногематологические ответы со стороны озерных и прудовых лягушек носили разносторонний характер. Адаптациогенез озерных лягушек, располагающихся в первом и четвертом квадрантах, в большей степени определялся усилением неспецифических реакций иммунной системы и усиленным выбросом из костного мозга в кровотоки эритроцитов (что

подтверждалось низким содержанием основных типов эритроидных клеток в составе костного мозга), обеспечивающих кислородом органы и ткани.

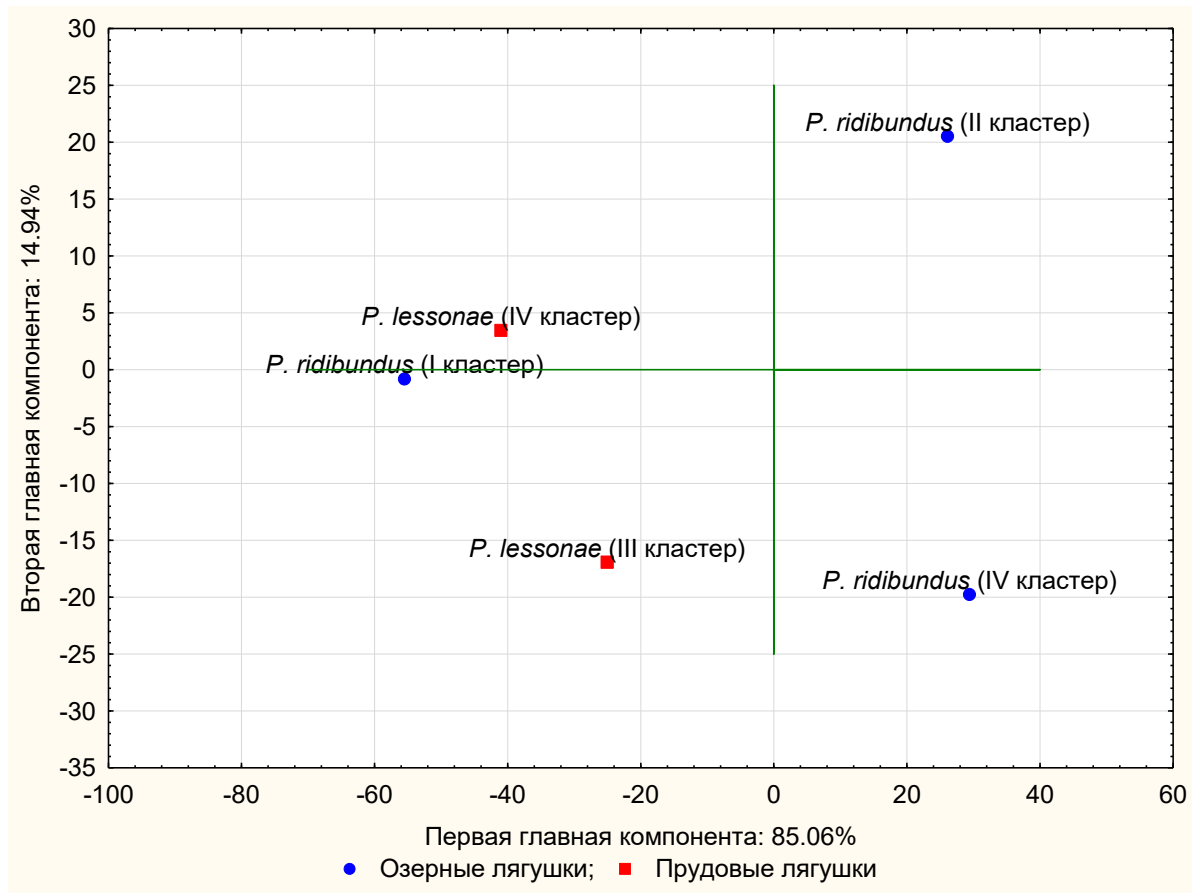


Рисунок 2. График рассеивания озерных и прудовых в пространстве главных компонент, выделенных при анализе иммуногематологических показателей

Результатом эритроцитоза являлось увеличение кислотной емкости крови, которая повышается на 4-10% (Горизонтов, 1981), что обеспечивало выживание и существование амфибий в условиях гидрохимического стресса.

Расположение прудовых лягушек во втором и третьем квадрантах факторного пространства иллюстрировало закономерное преобразование имеющихся адаптационных приспособлений организма животных к условиям среды, реализующееся, среди прочего, в большей степени через перестройку соотношения клеточного состава костного мозга и усиление специфической защитной системы крови. Разброс выборок озерных лягушек в факторном пространстве, свидетельствовал о более широких адаптивных возможностях

по уровню иммуногемопоеза к комплексному воздействию химических загрязнителей водной среды и иллюстрировал экологическую пластичность вида. Адаптивные возможности прудовых лягушек к комплексу гидрохимических факторов среды были 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 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. Лейкоцитарные 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаленихина, Ю.В. Окислительная модификация белков тимуса крыс под влиянием меди в ультрадисперсной форме / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина, Г.И. Чурилов // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 11. – С. 1315–1319.
2. Акуленко, Н.М. Сезонная динамика эритропоза и его топографическое распределение у лягушки озерной / Н.М. Акуленко // Вестник Запорожского национального университета. – 2008. – № 2. – С. 5–9.
3. Антиоксиданты и адаптация: Сб. науч. тр. (Под ред. В.В. Соколовского) – Л.: ЛСГМИ, 1984. – 62 с.
4. Афанасьев, Ю.И. Гистология, цитология и эмбриология / Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский. – М.: Медицина, 2002. – 744 с.
5. Банников, А.Г. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР / А.Г. Банников, И.С. Даревский, В.Г. Ищенко, А.К. Рустамов, Н.Н. Щербак. – М.: Просвещение, 1977. – 414 с.
6. Большаков, В.Н. Специфика формирования видовых сообществ животных в техногенных и урбанизированных ландшафтах / В.Н. Большаков, О.А. Пястолова, В.Л. Вершинин. // Экология, 2001. – № 5. – С. 343-354.
7. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2005. – 736 с.
8. Боркин, Л.Я. Морфологические аномалии в природных популяциях амфибий: что мы изучаем и как оцениваем? / Л.Я. Боркин // Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды: материалы междунар. школы конф. Екатеринбург: Урал. ун-т, 2014. – С. 144-149.
9. Боркин, Л.Я. О криптических видах (на примере амфибий) / Л.Я. Боркин, С.Н. Литвинчук, Ю.М. Розанов, Д.В. Скоринов // Зоолог. журнал. -2004. – Т. 83. Вып. 8. – С. 936-960.

10. Боркин, Л.Я. Оценка встречаемости морфологических аномалий в природных популяциях (на примере амфибий) / Л.Я. Боркин, О.С. Безман-Мосейко, С.Н. Литвинчук // Тр. Зоологического института РАН. – 2012. – Т. 316, № 4. – С. 324-343.
11. Бродский, И.Б. Микроядра как маркеры хромосомных изменений клеток / И.Б. Бродский, С.А. Брянцева, А.М. Ковалева // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2012. – № 1. – С. 86.
12. Будников, Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соросовский образовательный журнал, 1998. – № 5. – С. 23–29.
13. Будников, Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем / Г.К. Будников // Биология. Казанский госуниверситет. – 1998. – С. 25–31.
14. Вершинин, В.Л. Аномалии амфибий как источник информации об адаптивном и эволюционном потенциале / В.Л. Вершинин, С.Д. Вершинина, Н.С. Неустроева // Известия РАН. Сер. биол., 2018. – № 1. – С. 80–88.
15. Вершинин, В.Л. Видовой комплекс амфибий в экосистемах крупного города / В.Л. Вершинин // Экология. – 1995. – №4. – С. 299-306.
16. Вершинин, В.Л. Гемопоз бесхвостых амфибий – специфика адаптациогенеза видов в современных экосистемах / В.Л. Вершинин // Зоологический журнал – 2004. – Т.83, №11. – С. 1367 – 1374.
17. Вершинин, В.Л. Основы методологии и методы исследований аномалий и патологий амфибий / В.Л. Вершинин. - Екатеринбург:Урал. ун-т, 2015. - 80 С.
18. Вершинин, В.Л. Специфика эритро- и лимфопоэза морфы *striata* у сеголеток *Rana arvalis* Nilss. и *R. Ridibunda* L. на урбанизированной территории / В.Л. Вершинин, Ю.Л. Старовойтенко // Структура и функциональная роль животного населения в природных и трансформированных экосистемах. – Днепропетровск: ДНУ, 2001. – С. 123-124.

19. Вершинин, В.Л. Сравнительный анализ содержания гемоглобина у четырех видов бесхвостых амфибий Уральской горной страны / В.Л. Вершинин, С.Д. Вершинина // Доклады РАН. – 2013. – Т. 450, № 4. – С. 488–491.
20. Вершинин, В.Л. Функциональные особенности популяций амфибий в градиенте урбанизации / В.Л. Вершинин // Известия Самарского научного центра РАН. – 2014 –Т. 16, №. 5 (1). – С. 344–348.
21. Вершинин, В.Л., Буракова А.В, Вершинина С.Д. Сравнительный анализ паразитоценозов амфибий сем. Ranidae (Anura) в градиенте урбанизации / В.Л. Вершинин, А.В. Буракова, С.Д. Вершинина // Экология, 2017. – №5. – С. 385–395.
22. Владимиров, Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран / Ю.А. Владимиров // Биофизика. – 1987. – Т. 32, № 5. – С. 830–844.
23. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Вестник РАМН. – 1998. – № 7. – С. 43-51.
24. Галактионов, В.Г. Эволюционная иммунология: учебное пособие / В.Г. Галактионов. – М.: Академкнига, 2005. – 408 с.
25. Гелашвили, Д. Б. Принципы и методы экологической токсикологии / Д. Б. Гелашвили, В.С. Безель, Е.Б. Романова, М.Е. Безруков, А.А. Силкин, А.А. Нижегородцев; под ред. проф. Д. Б. Гелашвили. – Нижний Новгород: ННГУ, 2016. – 702 с.
26. Гелашвили, Д.Б. Особенности морфометрических и морфогенетических показателей популяций зеленых лягушек рода *Rana*, Нижнего Новгорода и Нижегородской области / Д.Б. Гелашвили, В.В. Логинов, Е.Б. Романова // Вестник Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского. – 2004. – Вып. 3(5). – С. 73 – 79.
27. Гелашвили, Д.Б. Структурно-информационный анализ стабильности развития амфибий / Д.Б Гелашвили, Е.В. Чупрунов, В.В. Логинов, А.А. Силкин // Третья конференция герпетологов Поволжья, Тольятти, 5–7

- февр., 2003: Материалы региональной конференции. Тольятти, Самара. – 2003. – С. 44 – 47.
28. Гематологический атлас / М. Г. Абрамов. - 2-е изд., перераб. и доп. –М.: Медицина, 1985. – 344 с.
 29. Гематология. Новейший справочник / Под ред. К.М. Абдулкадырова. СПб.: Сова, 2004. – 928 с.
 30. Герасимова, Е.Л. Потенциометрия в исследовании антиоксидантной активности биологических объектов / Е.Л. Герасимова // Тезисы докладов Съезда аналитиков России. Москва (пансионат «Клязьма»). – 2010 – С. 79.
 31. Гильденскиольд, Р.С., Новиков Ю.В., Хамидулин Р.С. Тяжелые металлы в окружающей среде и их влияние на организм / Р.С. Гильденскиольд, Ю.В. Новиков, Р.С. Хамидулин // Гигиена и санитария. – 1992. – №6. – С. 6–9.
 32. Гольдберг, Д. И. Гематология животных / Д.И. Гольдберг, Е.Д. Гольдберг, Н.Г. Шубин. – Томск: Томский ун-т, 1973. – 180 с.
 33. Гомеостаз и регуляция физиологических систем организма / В. А. Лищук, Б. Лорд, В. П. Кентера и др. — Новосибирск: Наука. Сиб. Отделение, 1992. – 253с.
 34. Горизонтов, П.Д. Система крови как основа резистентности и адаптации организма / П. Д. Горизонтов. - Физиологический журнал СССР, 1981. – Вып. 27 (3). - С. 317-321.
 35. Грушко, М.П. Красный костный мозг озерной лягушки (*Rana ridibunda*) и прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*) / М.П. Грушко // Морфология. – 2010. – Т. 137. – №1. – С. 31 – 34. (а)
 36. Грушко, М.П. Красный костный мозг озерной лягушки (*Rana ridibunda*) и прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*) / М.П. Грушко // Морфология. – 2010. – №1. – С. 50–65. (б)
 37. Губский, Ю.И. Изменение структурного состояния фракционированного хроматина печени при Е-гиповитаминозе / Ю.И.

- Губский, Е.Л. Левицкий, Р.Г. Примак // Укр. биохим. журн. – 1992. – Т. 64, №5. – С. 89 – 91.
38. Дубинина, Е.Е. Антиоксидантная система плазмы крови / Е.Е. Дубинина // Укр. Биохим. Журнал. – 1992. – Т.64. –№2. – С. 3-14.
 39. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты / Е.Е. Дубинина. – СПб.: Издательство «Медицинская пресса», 2006. – 400 с.
 40. Ермаков, О.А. Генетические формы озёрной лягушки (*Pelophylax ridibundus* complex) Западного Кавказа по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК / О.А. Ермаков, Е.П. Симонов, А.Ю. Иванов, Р.И. Замалетдинов, А.И. Файзулин // Труды ИБВВ РАН. - Вып. 73 (76). - 2016а. - С. 70-76.
 41. Ермаков, О.А. Диагностика и распространение «западной» и «восточной» форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* s.l. в Пензенской области (по данным анализа гена COI мтДНК) / О.А. Ермаков, М.М. Закс, С.В. Титов // Вестн. Тамбовского ун-та. - 2013. - Т. 18. Вып. 6. - С. 2999-3002.
 42. Ермаков, О.А. Распространение «западной» и «восточной» форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* s.l. на территории Самарской и Саратовской областей (по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК) / О.А. Ермаков, А.И. Файзулин, М.М. Закс, Э.И. Кайбелева, Ф.Ф. Зарипова // Изв. Са-мар. центра РАН. - 2014. - Т. 16. №5 (1). - С. 409-412.
 43. Жукова, Т.И. Реакция крови бесхвостых амфибий на пестицидное загрязнение / Т.И. Жукова, Т.Ю. Пескова // Экология. – 1999. – № 4. – С. 288–292.
 44. Жулева, Л. Ю., Дубинин Н. П. Использование микроядерного теста для оценки экологической обстановки в районах Астраханской области / Л.Ю Жулева, Н.П. Дубинин // Генетика. – 1994. – Т. 30, № 7. – С. 999 – 1004.

45. Закс, М.М. Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*) из Пензенской области / М.М. Закс, Н.В. Быстракова, О.А. Ермаков, С.В. Титов // Современная герпетология: проблемы и пути их решения. Статьи по материалам докладов Первой междунар. молодежной конф. герпетологов России и сопредельных стран. - СПб., 2013. - С. 86-89.
46. Закс, М.М. Экология зеленых лягушек (*Rana esculenta complex*) Пензенской области: распространение, популяционная изменчивость, влияние антропогенных факторов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Закс Михаил Михайлович. – Пенза, 2013. – 19 с.
47. Замалетдинов, Р.И. Молекулярно-генетическая характеристика лягушек *Pelophylax esculentus* комплекса на восточной периферии ареала (Поволжье, Республика Татарстан) / Р.И. Замалетдинов, А.В. Павлов, М.М. Закс, А.Ю. Иванов, О.А. Ермаков // Вест. Томского государственного ун-та. Биология. -2015. - № 3 (31). - С. 54-66.
48. Замалетдинов, Р.И. О структуре комплекса зеленых лягушек в Раифском участке Волжско-Камского заповедника / Р.И. Замалетдинов, Л.Я. Боркин, С.Н. Литвинчук, Ю.М. Розанов // Тр. Волжско-Камского государственного природного заповедника. - Казань, 2005. Вып. 6. - С. 326-333.
49. Западнюк, И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария. – Киев: Высшая школа, 1983. – 383 с.
50. Западнюк, И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк и др. – Киев: Высш. школа, 1983. – 383 с.
51. Зарипова, Ф.Ф. Эколого-фаунистическая характеристика земноводных урбанизированных территорий республики Башкортостан: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Зарипова Фалия Фуатовна. – Тольятти, 2012. – 21 с.

52. Захаров, Ю. М. Эритробластический островок Текст. / Ю. М. Захаров, А. Г. Рассохин. – М.: Медицина, 2002. – 280с.
53. Захаров, В.М. Здоровье среды: методика оценки / В.М. Захаров, А.С. Баранов, В.И. Борисов и др.– М.: Центр экологической политики России, 2000. – 68 с.
54. Захаров, В.М. Здоровье среды: методика оценки / В.М. Захаров, А.С. Баранов, В.И. Борисов и др.– М.: Центр экологической политики России, 2000. – 68с.
55. Захаров, В.М. Онтогенез и популяция: оценка стабильности развития в природных популяциях / В.М. Захаров, Н.П. Жданова, Е.Ф. Кирик, Ф.М. Шкиль // Онтогенез. – 2001. – Т.32, № 6. – С. 404–421.
56. Зеленцова, А.С. Морфофункциональные особенности эритроцитов лягушек *R. ridibunda* L. в физиологических условиях Текст. / А. С. Зеленцова, М. Ю. Скоркина // Успехи современного естествознания. 2004. – №8. – С. 110.
57. Иванов, А.Ю. Молекулярно-генетическая характеристика озерных лягушек *Pelophylax ridibundus* s.l. из Верхнего Поочья / Иванов А.Ю., Корзиков В.А., Алексеев С.К., Ермаков О.А. // Современные проблемы зоологии, экологии и охраны природы: Материалы чтений и науч. конф., посвящ. памяти проф. Андрея Григорьевича Банникова, и 100-летию со дня его рождения. Москва -24 апреля 2015 г. - М.: Сельскохозяйственные технологии, 2015. - С. 228-232.
58. Иванов, А.Ю. молекулярно-генетические и экологические особенности распространения криптических форм озерной лягушки в восточной части ареала: автореф. канд. дис. – Пенза. – 2019. – 24 с.
59. Исаева, Е.И. Общая оценка иммунного статуса / Е.И. Исаева, О.С. Вязов // Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье среды. – М., 1996. – С. 54–61.
60. Капралов, А.А. Локализация альфа-токоферола в составе клеточного ядра и его возможные функции / А.А. Капралов, Г.В. Петрова, Е.Л.

- Левицкий // Труды конференции "Теоретические и прикладные аспекты молекулярной биологии". – Деп. в ВИНТИ, №816. – 1997. – С. 197 – 214.
61. Кожуро, Ю.И. Анализ мутагенной активности гербицида симазина с использованием клеток крови травяной лягушки / Ю.И. Кожуро, Е.А. Семенчик, В.Ю. Афонин // Актуальные проблемы биологии и экологии: Мат. докл. X молодеж. научн. конф., Сыктывкар, 15-17 апр. 2003. – Сыктывкар, 2003. – С.103–104.
 62. Козинец, Г.И. Атлас клеток крови и костного мозга / Г.И. Козинец – М.: «Триада-Х», 1998. – 160 с.
 63. Кондратьев, Я.Ю. Полиморфные генетические маркеры и сосудистые осложнения сахарного диабета / Я.Ю. Кондратьев, В.Г. Носиков, И.И. Дедов // Проблемы эндокринологии. – 1998. – Т. 44. – С. 43 – 51.
 64. Конешова, Е.Ю. Действие сильнотоксических веществ на форменные элементы крови амфибионтов / Е.Ю. Конешова, Г.В. Шляхтин, С.А. Конешов, Ю.В. Шляхтин // Фундам. и прикладные аспекты функционирования водных экосистем: проблемы и перспективы гидробиологии и ихтиологии в XXI в. Матер. Всерос. научн. конф., Саратов, 27-30 авг. 2001. – Саратов, 2001. – С.90–92.
 65. Корзинов, В.А. Фауна и экология амфибий Северо-запада Верхнего Поочья: автореф. канд. дис. – Калуга. – 2016. – 20 с.
 66. Кузовенко, А.Е. Эколого-фаунистическая характеристика амфибий урбанизированных территорий Самарской области: автореф. канд. дис. – Тольятти. – 2018. – 19 с.
 67. Кузьмин, С.Л. Земноводные бывшего СССР / С.Л. Кузьмин. – М.: Т-во науч. изд. КМК, 1999. – 298 с.
 68. Кузьмина, Е.И. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах / Е.И. Кузьмина, А.С. Нелюбин, М.К. Щенникова // Межвузовский

- сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. – Горький. – 1983. – С. 179 – 183.
69. Кузьмина, Е.И., Нелюбин, А.С., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах / Е.И. Кузьмина, А.С. Нелюбин, М.К. Щенникова // Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. – Горький, 1983. – С. 179–183.
 70. Лебедев, К.А. Субпопуляция и физиологическая активность иммунокомпетентных клеток человека / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина. – М.: Наука, 1990. – 224 с.
 71. Лебедев, К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике / К.А. Лебедева, И.Д. Понякина. – М.: Наука, 1990. – 224с.
 72. Левин, О.С. Диагностика и лечение когнитивных нарушений: учебное пособие/ О.С. Левин, Е.Е. Васенина. – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2013. – 51 с.
 73. Левицкий, Е.Л. Свободно-радикальные повреждения ядерного генетического аппарата клетки / Е.Л. Левицкий, Ю.И. Губский // Укр. биохим. журн. 1994. – Т. 66, №4. – С. 18 –30.
 74. Леонтьева, О.А. Земноводные как биоиндикаторы антропогенных изменений среды / О.А. Леонтьева, Д.В. Семенов // Успехи современной биологии, 1997. – Т.111, вып.6. – С.726–736.
 75. Лугаськова, Н.В. Адаптивные изменения крови рыб в водоёмах с разным типом загрязнения. / Н.В. Лугаськова // I Конгр. ихтиологов России, Астрахань, сент., 1997: Тез. докл. Астрахань. – 1997. – 229 с.
 76. Максимов, С.В. Биоиндикация состояния сред обитания с использованием земноводных рода в условиях Южного Нечерноземья России (на примере Брянской области): автореф. дис.... канд. биол. наук: 03.02.08 / Максимов Сергей Вячеславович. – Брянск, 2010. – 23 с.
 77. Малютина, Т.А. Взаимоотношения в системе паразит-хозяин: биохимические и физиологические аспекты адаптации

- (ретроспективный обзор) / Т.А. Малютина // Российский паразитологический журнал. – 2008. – №1. – С. 1 – 17.
78. Манских, В.Н. К вопросу о механизмах образования микроядер в соматических клетках бесхвостых амфибий в норме и при действии N-нитрозо-N-метилкарбамида /В.Н. Манских // Бюл. экперим. биол. и мед. – 2006. – Т. 141, № 2. – С. 217 – 220.
 79. Маркосян, К.А. Су-Шапероны - внутриклеточные переносчики ионов меди. Функция, структура и механизм действия” (обзор) / К.А. Маркосян, Б.И. Курганов // Биохимия. – 2003. – Т.68. – №8. – С. 1013 – 1025.
 80. Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных». [Электронный ресурс]: Разработан и опубликован в 1985 г. Советом междунар. науч. организаций. (Режим доступа: <http://www/bio/msu/ru/112/ad080012/htm>).
 81. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П., Золотницкая и др. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
 82. Минеева, О.В. Нарушения лейкоцитарной формулы крови озёрной лягушки Саратовского водохранилища / О.В. Минеева, А.К. Минеев // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2011. – №2(2). – С. 94 – 97.
 83. Минеева, О.В. Нарушения морфологии эритроцитов периферической крови озерной лягушки *Rana ridibunda* Pallas / Минеева О.В., Минеев А.К. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – № 2(2). – С. 664 – 667.
 84. Минеева, О.В. Особенности гематологических параметров озерной лягушки *Rana ridibunda* Pallas, 1771 Саратовского водохранилища / О.В. Минеева, А.К. Минеев // Самарская лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2014. – Т. 23, №2. – С. 178-184.

85. Мисюра, А.Н. Оценка механизмов устойчивости отдельных видов земноводных к дестабилизирующим факторам среды обитания / А.Н. Мисюра, Д.А. Сподарец, А.А. Марченковская // Актуальные проблемы сохранения устойчивости живых систем: Матер. 8 Межд. науч. экол. конф. Белгород. – 2004. – С. 132–133.
86. Муравлева, Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев и др. // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С.74 – 78.
87. Мустафина, Ж.Г. Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией / Ж.Г. Мустафина, Ю.С. Крамаренко, В.Ю. Кобцева // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 5. – С. 47 – 48.
88. Николаев, В. Ю. Иммуногематологические характеристики амфибий и рептилий Верхнего и Среднего Поволжья в аутоэкологическом аспекте: автореф. канд. дис. – Нижний Новгород, 2016. – 21 с.
89. Нормативы качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативы предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектах рыбохозяйственного значения (утв. приказом Федерального агентства по рыболовству от 18.01.2010 г. № 20) Информационно-правовой портал: Гарант.ру. URL: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/2070984/#ixzz4mY1P6WRm>
90. Окислительный стресс: Биохим. и патофизиол. аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М.: МАИК "Наука/Интерпериодика", 2001. – 342 с.
91. Пескова, Т.Ю. Адаптационная изменчивость земноводных в антропогенно загрязненной среде: автореф. докт. дис. Тольятти. – 2004. –36 с.

92. Пескова, Т.Ю. Влияние антропогенных загрязнений среды на земноводных / Т.Ю. Пескова. – Волгоград, 2001. – 156с.
93. Пескова, Т.Ю. Гематологические показатели озёрной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Ranidae, Anura) из водоёмов Северо-Западного Предкавказья с различными типами загрязнения / Т.Ю. Пескова, О.Н. Бачевская, Г.К. Плотников // Современная герпетология. – 2019. – Т. 19, вып. 1–2. – С. 40–45.
94. Пескова, Т.Ю. Действие смесей солей тяжелых металлов на головастики бесхвостых земноводных / Т.Ю. Пескова // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2003. – №1. – С.157–164.
95. Петров, Р.В. Иммунология / Р.В. Петров. – М.: Медицина, 1987. – 367 с.
96. РД 52.24.643-2002 Метод комплексной оценки степени загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям / Росгидромет – СПб: Гидрометеиздат, 2003. – 55 с.
97. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
98. 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 / Е.Б. Романова, К.В. Шаповалова, Е.С. Рябинина, Д.Б. Гелашвили // Поволжский экологический журнал. – 2018. – № 1. – С. 60 – 75.
99. Романова, Е.Б. Экологические аспекты организации иммунной системы амфибий / Е.Б. Романова, В.Ю. Николаев, Д.Б. Гелашвили // Современная герпетология. – 2014. – Т.14, вып. ¾. – С. 126–133.
100. Романова, Е.Б. Динамика гематологических показателей периферической крови лягушек рода *Rana* трансформированной городской среды / Е.Б. Романова, М.Н. Егорихина // Экология. – 2006. – № 3. – С. 208-213.

101. Романова, Е.Б. Изменение лейкоцитарной формулы крови озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771) при гельминтозах / Е.Б. Романова, Г.А. Фадеева, К.С. Вершинина, В.Ю. Николаев // Вестник Нижегородского госуниверситета. – 2013. – №5. – С. 141–147.
102. Романова, Е.Б. Иммунофизиологические характеристики популяций зеленых лягушек урбанизированной территории / Е.Б. Романова, В.Ю. Николаев // Изв. Самарского научного центра РАН. – 2014. – Т. 16, № 5(1) – С. 616–622.
103. Романова, Е.Б. Мониторинг состояния иммунной системы зеленых лягушек рода *Rana* в условиях антропогенной трансформации городской среды / Е.Б. Романова // Вестник Нижегородского госуниверситета. – 2010. – №1. – С. 131–134.
104. Романова, Е.Б. Оценка состояния популяций зеленых лягушек рода *Rana* по комплексу показателей гомеостаза / Е.Б. Романова, О.Е. Волкова, М.И. Тихонова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2011. – № 2(2). – С. 119 – 124.
105. Свободные радикалы в живых системах. / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев, А.В. Козлов, А.Н. Осипов, Д.И. Рощупкин // Итоги науки и техники. Биофизика. – 1991. – Т.29. – 250 с.
106. Силс, Е.А. Популяционные особенности гематологических показателей периферической крови сеголеток *Rana ridibunda* Pall. в условиях урбанизации / Е.А. Силс // Экология. – 2008. – № 2. – С. 158 – 160.
107. Силс, Е.А. Сравнительный анализ гематологических показателей остромордой (*Rana arvalis*, Nilsson, 1842) и озерной (*Rana ridibunda*, Pallas, 1771) лягушек городских популяций / Е.А. Силс // Вестник ОГУ. – 2008. – № 10(92). – С. 230 – 235.
108. Скрипченко, Е.В. Особенности стромы костного мозга у представителей различных классов наземных позвоночных // Вестник зоологии. – 1991, №6. – С.67 - 71.

109. Скрипченко, Е.В. Структурный состав стромы костного мозга у бесхвостых амфибий / Е.В. Скрипченко // Вестник зоологии. – 1990. – №3. – С.68 – 71.
110. Скрипченко, Е.В. Структурный состав стромы костного мозга бесхвостых амфибий / Е.В. Скрипченко // Вестник зоологии. – 2009. - № 3. – С. 68 – 71.
111. Смирнова, В.М. Метод комплексной оценки загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям. Определение удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ) и класса качества воды. / В.М. Смирнова, И.С. Макеев, А.В. Благодаткин. – Н. Новгород, 2011. – 19 с.
112. Соколовский, В.В. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе, воспалении, ишемии и стрессе / В.В. Соколовский // Вопр. мед химии. – 1998. – Т. 6, №34. – С. 2 – 11.
113. Степанова, В.М. Изучение реакции рыб на хроническое действие смесей низких концентраций тяжёлых металлов / В.М. Степанова, Г.М. Чуйко, О.Л. Цельмович // Биол. исслед. в Ярослав. гос. ун-те: юбил. сб. тез. конф., 29 нояб. Ярославль. – 1997. – С. 73-75.
114. Сурова, Г.С. Влияние кислой среды на жизнеспособность икры травяной лягушки (*Rana temporaria*) / Г.С. Сурова // Зоол. журнал. – 2002. –Т. 81, № 5. – С. 608–616.
115. Сюзюмова, Л.М. Особенности эритропоэза у личинок бесхвостых амфибий в зависимости от условий развития / Л.М. Сюзюмова, С.И. Гребенникова // Экспериментальная экология низших позвоночных. – 1978. – С. 32-47.
116. Татьянаенко, В.В. Структурно-функциональное изменение биомембран при осложнениях сахарного диабета и их фармакологическая коррекция / В.В. Татьянаенко, Г.Н. Богданов, В.Н. Варфоломеев // Вопр. мед. химии. – 1998. – Т.44, №6. – С. 551 –558.

117. Ткаченко, Е.А. Лейкоцитарные индексы при экспериментальной кадмиевой интоксикации мышей / Е.А. Ткаченко, М.А. Дерхо // Известия ОГАУ. – 2014. – № 3 (47). – С. 81 – 83.
118. Тодоров, Й. Клинические и лабораторные исследования в педиатрии / Й. Тодоров. – София: Медицина и физкультура, 1968. – 1064 с.
119. Файзулин, А.И. Долгоносики (Coleoptera, Curculionidae) в питании бесхвостых амфибий (Amphibia, Anura) Среднего Поволжья / А.И. Файзулин, А.Е. Кузовенко, Ф.Ф. Зарипова, // Экологический сб.5. Тр. молодых ученых Поволжья. Международная науч. конф./ под ред. проф. С.В. Саксонова. –Тольятти: ИЭВБ РАН «Кассандра», 2015. – С. 206-208.
120. Файзулин, А.И. Земноводные (Amphibia) Самаро-Тольяттинской агломерации: видовой состав, распространение и оценка численности / А.И. Файзулин, А.Е.Кузовенко, //В сб.:Татищевские чтения: актуальные проблемы науки и практикиМатериалы XIII Международной научно–практической конф.: в 5 томах. –2016. –С. 77-81.
121. Файзулин, А.И. О распространении съедобной лягушки *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) на территории Волжского бассейна / А.И. Файзулин, Г.А. Лада, С.Н. Литвинчук, В.А. Корзиков, А.О. Свинин, М.М. Закс, А.Ю. Иванов, Ю.М. Розанов, А.Е. Кузовенко, Р.И. Замалетдинов, О.А. Ермаков // Вест. Тамбовского ун-та. Серия: Естественные и технические науки. – 2017. – Т. 22, вып. 5. – С.809-817.
122. Физиология человека. В 3 томах / Под ред. Р. Шмидта, Г. Тевса. – М.: Мир, 1996 – 76с.
123. Хаитов, Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов, Г.Л. Игнатьева, И.Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – 432 с.
124. Хаитов, Р.М. Экологическая иммунология / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов. – М.: ВНИРО, 1995. – 219 с.

125. Хамидов, Д.Х. Кровь и кроветворение у позвоночных животных/ Д.Х. Хамидов, А.Т. Акилов, А.А. Турдыев. – М.: «Фан» УзССР, 1978. – 168 с.
126. Чернышова, Э.В. Периферическая кровь лягушек рода *Rana* как тест-система для оценки загрязнения окружающей среды / Э.В. Чернышова, В.И. Старостин // Изв. РАН. Сер. биол. – 1994. – № 4. – С. 656–660.
127. Шевкопляс, В.Н. Влияние гельминтозов на течение иммунологических процессов у животных / В.Н. Шевкопляс, В.Г. Лопатин // Российский паразитологический журнал. – 2008. – №4. – С. 94–101.
128. Шилова, С.А. Эколого-физиологические критерии состояния популяций животных при действии повреждающих факторов / С.А. Шилова, М.И. Шатуновский // Экология. 2005. – № 1. – С. 32–38.
129. Шиян, А.А. Экологическая характеристика озёрной лягушки (*Rana ridibunda* Pall.) при обитании на полях фильтрации сахарных заводов: автореф. дис.... канд. биол. наук: 03.02.08 / Шиян Анна Александровна.— Саратов, 2011. – 21 с.
130. Шляхтин, Г.В. Методика полевых исследований экологии амфибий и рептилий: учеб. пособие Саратов. гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского / Г.В. Шляхтин, В.Д. Голикова. – Саратов: Саратов. ун-т, 1986 – 76 с.
131. Шляхтин, Г.В. Методика полевых исследований экологии амфибий и рептилий: учеб. пособие / Саратов. гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского / Г.В. Шляхтин, В.Д. Голикова. – Саратов: Саратов. ун-т, 1986. – 76 с.
132. Экологический мониторинг. Методы биологического и физико-химического мониторинга. Часть VI / Под ред. Д.Б. Гелашвили. – Нижний Новгород: Нижегородский университет, 2006. – С. 307–327.
133. Экологический мониторинг. Часть 9 учебное пособие / Под ред. Проф. Д.Б. Гелашвили. – Нижний Новгород: Нижегородский университет, 2017. – С. 36–51.
134. Якушева, Я.А. Эколого-физиологические особенности озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* Pall. условиях загрязнения карбаминовыми

- пестицидами: автореф. дис.... канд. биол. наук: 03.02.08 / Якушева Янина Анатольевна. – Краснодар, 2015. – 23 с.
135. Янковский, О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы. Эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты / О.Ю. Янковский. – С.-Петербург: Игра. – 2000. – 294 с.
 136. Akagi, M. Superoxide anion-induced histamine release from rat peritoneal mast cells / M. Akagi, Y. Katakuse, N. Fukushi, T. Kan, R. Akagi // *Biol. Pharm. Bull.* –1994. – V.17, № 5. – P. 732-734.
 137. Allran, J.W. Effects of atrazine on embryos, larvae and adults of anuran amphibians / J.W. Allran, W.H. Karasov // *Environ. Toxicol, and Chem.* — 2001. — V. 20, №4. —P. 769—775.
 138. Akin, C. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic / C. Akin, C. C. Bilgin, P. Beerli, R. Westaway, T. Ohst, S.N. Litvinchuk., T. Uzzell, M. Bilgin, H. Hotz, G.-D. Guex, J. Plotner // *Journal of Biogeography.* – 2010. – Vol. 37(11). – P. 2111-2124.
 139. Arican, H. Haematology of amphibians and reptiles: a review / H. Arikan, K. Cicek // *North-Western journal of zoology.* –2014. – Vol. 10, № 1. – P. 190–209. [<http://biozoojournals.ro/nwjz/index.html>].
 140. Brodtkin, M. Effects of acid stress in adult *Rana pipiens* / M. Brodtkin, I. Vatnick, M. Simon, H. Hopey // *J. Exp. Zool. A.* – 2003. – Vol. 298. – P.16–22.
 141. Cabagna, M.C. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agro ecosystems of Santa Fe Province, Argentina / M.C. Cabagna, R.C. Lajmanovich, G. Stringhini, J.C. Sanchez-Hernandez, P.M. Peltzer // *Applied Herpetology.* – 2005. – Vol.2. – P. 373 – 380.
 142. Calderaro, M. Oxidative stress by menadione affects cellular copper and iron homeostasis / M. Calderaro, E. Martins, R. Meneghini // *Mol. Cell. Biochem.* – 1993. – Vol. 126. – P.17–23.

143. Chmielnicka, J. The influence of toxic metals on the erythropoieses and iron metabolism (does-effect relationships studies) / J. Chmielnicka, M. Nasiadek // Trace Elem. Exp. Med. – 1998. – № 4. – P. 353 – 354.
144. Christin, M.S. Effect of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens* / M.S. Christin, L. Menard, A.D. Gendron, S. Ruby // Aquatic. toxicology. – 2004. – Vol. 67, № 1. – P. 33–43.
145. Coico, R. Immunology. A Short Course / R. Coico, G. Sunshine, E. Benjamini // Hoboken, NJ: Wiley-Liss Publications, 2003. – 237 p.
146. Cooper, E.L. Comparative immunology // E.L. Cooper. – Engle Wood Cliffs, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1976. – 422 p.
147. Davis, A.K. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists / A.K. Davis, D.L. Maney, J.C. Maerz // Functional Ecology. – 2008. – Vol. 22. – P. 760 – 772.
148. Dawson, N.J. Free-radical first responders: the characterization of CuZnSOD and MnSOD regulation during freezing of the freeze-tolerant North American wood frog, *Rana sylvatica* / N.J. Dawson, B.A. Katzenback, K.B. Storey // Biochim. Biophys. Acta, 2015. – Vol. 1. – P. 97–106.
149. Du Pasquier, L. B-cell development in the amphibian *Xenopus* / L. Du Pasquier, J. Robert, M. Courtet, R. Mubmann // Immunol. Rev. – 2000. – Vol. 157. – P. 201–213.
150. Falfushinska, H. Validation of oxidative stress responses in two population of frogs from Western Ukraine / H. Falfushinska, N. Loumbourdis, L. Romanchuk, O. Stolyar // Chemosphere, 2008. – P. 1096–1101.
151. Frey, P.A. Radical mechanisms of enzymatic catalysis. / P.A. Frey // Annu. Rev. Biochem. – 2001. – V.70. – P.121-148.
152. Goldstine, J.M. The evaluation of anti-parkinson drugs on reserpine-induced rigidity in rats / J.M. Goldstine, A. Barnett, J.B. Malick // European Journal of Pharmacology. – 1975. – Vol. 33(1). P. 183-188.

153. Gurer-Orhan, H. Meta-tyrosin can be toxic to the cells possibly by incorporating into proteins / H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns, N. Ercal // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – V.33. – P.246.
154. Gutteridge, J.M. Damage to biological molecules by iron and copper complexes / J.M. Gutteridge // Amsterdam, 1988. – P. 69–82.
155. Halliwell, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals / B. Halliwell // Pathol. Biol. 1996. –V.44. №1. –P.6-13.
156. Halliwell, B. The antioxidants of human extracellular fluids / B. Halliwell, J.M. Gutteridge // Arch. Biochem. Biophys. – 1990. – V.280. № 1. – P.1-18.
157. Hotz, H. Balancing a cline by influx of migrants: a genetic transition in water frogs of eastern Greece / H. Hotz, P. Beerli, T. Uzzell, G.-D. Guex, N. Pruvost, R. Schreiber, J. Plötner // The Journal of Heredity. – 2013. – Vol. 104. – P. 57-71.
158. Joannis, D.R. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze tolerant wood frog / D.R. Joannis, K.B. Storey // J. Physiol., 1996. –P. 271.
159. Johnson, P.T. Experimental infection dynamics: using immunosuppression and in vivo parasite tracking to understand host resistance in an amphibian-trematode system / P.T. Johnson, B.E. La Fonte // J. Exp. Biol. – 2013. – Vol. 216. – P. 3700–3708.
160. Kuznetsov, D.N. The results on molecular-phylogenetic analysis of Ostertagiinae nematodes (Rhabditida, Strongyloidea) / D.N. Kuznetsov, A.P. Aksunov, A.V. Burakova, V.L. Vershinin, N.A. Kuznetsova, S.E. Spitidonov // Russian Journal of Nematology. – 2015. – V.23, №2. – P. 159.
161. Lutcavage, M.E. Physiologic and clinicopathologic effects of curde oil on loggerhead sea turtles / M.E. Lutcavage, P.L. Lutz, G.D. Bossart, D. M. Hudson // Arch. Environ. Contam. and Toxicol., 1995. – № 4. – P. 417 – 422.
162. Mackova, N.O. Effects of cadmium on haemopoieses in irradiated and non-irradiated mice. 2. Relationship to the number of circulating blood cells and

- haemopoiesis / N.O.Mackova, S. Lenikova, P. Fedorocko, P. Brezani, A. Fedorockova // *Physiol. Res.* 1996. – № 2. – P. 101 – 106.
163. Manning, M.I. RES structure and function of the Amphibia / M.I. Manning, J.D. Horton // *The reticuloendothelial system: a comprehensive treatise* / Eds N. Cohen, Siegel M.M. – New York: London: Plenum Press, 1982. – Vol.3. – P. 393.
 164. McCauley, P.T, The effects of subchronic chlorate exposure in Sprague-Dawley rats. *Drug and Chem.Toxicol.* / P.T. McCauley, M. Robinson, F. Danie, R.Bernard // Olson Greg., 1995. – № 2-3. – P. 185 – 199.
 165. Murrel, G.A. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals / G.A. Murrel, M.J. Francis, L. Bromley // *Biochem. J.*, – 1990. – V.265, №3. – P.659-665
 166. Parris, M.J. Single-host pathogen effectss on mortality and behavioral responses to predators in salamanders (Urodela: Ambystomatidae) / M.J. Parris, A. Davis, J.P. Collins // *Can. J. Zool.* – 2004. – Vol. 82. – P. 1477–1483.
 167. Peskova, T.Yu. Hematological indexes of *Rana ridibunda* in clean and contaminated ponds / T.Yu. Peskova, T.I. Zhukova // *Herpetologia Petropolitana*. — St-Petersburg, 2005. — P. 296—297.
 168. Peskova, T.Yu. Hematological indexes of *Rana ridibunda* inhabiting in clean and contaminated ponds / T.Yu. Peskova, T.I. Zhukova // 12th Ordinary General Meeting Societas Europea Herpetologica: Abstr. — St-Petersburg, 2003. – P. 128– 129.
 169. Plötner, J. Genetic divergence and evolution of reproductivemisolation in eastern Mediterranean water frogs / J. Plötner, T. Uzzell, P. Beerli, Q. Akin, C. Bilgin, C. Haefeli, T. Ohst, F. Köhler, R. Schreiber, G.-D. Guex, S.N. Litvinchuk, R. Westaway, H.-U. Reyer, N. Pruvost, H. Hotz // Glaubrecht, M., Schneider, H. (Eds.), *Evolution in action. Case studies in adaptive radiation and the origin of biodiversity*. Special volume from the SPP 1127

"Radiations - Genesis of Biological diversity" of the DFG. Springer, Berlin – Heidelberg, 2010. – P. 373-403.

170. Plötner, J., Uzzell T., Beerli P., Spolsky C., Ohst T., Litvinchuk S. N., Guex G.-D., Reyer H.-U., Hotz H., 2008. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palaearctic water frogs / J. Plötner, T. Uzzell, P. Beerli, C. Spolsky, T. Ohst, S.N. Litvinchuk, G.-D. Guex, H.-U. Reyer, H. Hotz // *Journal of Evolutionary Biology*. – 2008. – Vol. 21(3). – P. 668-681.
171. Raffel, T.R. Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions / T.R. Raffel, J.R. Rohr, J.M. Kiesecker, P.J. Hudson // *Func. Ecol.* – 2006. – Vol. 20. – P. 819–828.
172. Turpen, J.D. Location of hemopoietic stem cells influences frequency of lymphoid engraftment in *Xenopus* embryos / J.D. Turpen // *J. Immunol.* – 1989. – Vol. 1434. – P. 455–460.
173. Wall, S.B. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling / S.B. Wall, Oh Joo-Yeun, A.R. Diers, A. Landar // *Frontiers in Physiology*, 2012. – P. 7–10.
174. Zimmerman, L.M., Vogel L.A., Bowden R.M. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective / L.M. Zimmerman, L.A. Vogel, R.M. Bowden // *J. Experimental Biology*. – 2010. –Vol. 213. – P. 661 – 671.

Приложение

Озеро Рустай. Озеро находится рядом с поселком Рустай (далее оз. Рустай) (Нижегородская обл., Семеновский р-н; с.ш. 56.21988, в.д. 43.534993), расположен рядом с ГПЗ «Керженский».

Таблица 1.1

Характеристика качества воды озера Рустай (Нижегородская обл., Семеновский район, 2016 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	1,14	0,3	3,8	0,1	11,4
2	Марганец	0,02	0,1	-	0,01	2,0
3	Медь	0,001	1,0	-	0,001	-
4	Свинец	<0,002	0,03	-	0,006	-
5	Никель	<0,006	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1,00	-	0,01	-
7	Хром	0,008	0,05	-	0,02	-
8	Нитраты	20,00	45,0	-	40,0	-
9	Нитриты	0,03	3,30	-	0,08	-
10	Хлориды	110,00	350,0	-	300,0	-
11	Сульфаты	21,00	500,0	-	100,0	-
12	Нефтепродукты	0,03	0,3	-	0,05	-
13	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

Болото Круглое (Нижегородская обл., Богородский р-н; с.ш. 56.024745, в.д. 43.356987). Болото переходного типа с низкорослым древостоем из сосны и березы, в западной части находится открытый водоем со сплавиной, образованной сфагновыми мхами и сабельником болотным. Место сбора ягод (Бака и др., 2004).

Таблица 1.2

Характеристика качества воды болота Круглое (Нижегородская обл., Борский район, 2016 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,1	0,3	-	0,1	-
2	Марганец	0,2	0,1	2,0	0,01	20,0
3	Медь	0,018	1,0	-	0,001	18,00
4	Свинец	0,003	0,03	-	0,006	-
5	Никель	<0,002	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1,0	-	0,01	-
7	Хром	0,07	0,05	1,4	0,02	3,5
8	Нитраты	24,0	45,0	-	40,0	-
9	Нитриты	0,012	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	205,0	350,0	-	300,0	-
11	Сульфаты	37,0	500,0	-	100,0	-
12	Нефтепродукты	2,5	0,3	8,3	0,05	50,0
13	Водородный показатель (ед. рН)	8,0	-	-	-	-

Озеро Жилново (Нижегородская обл., Кстовский р-н; с.ш. 56.212880; в.д. 44.153741). Водоем входит в цепь пойменных озер правобережья Волги, расположенных между г. Н.Новгородом и г. Кстово. Озеро находится за д. Малая Ельня, протяженность озера 1,5 км и ширина до 300 м. Глубина от 2 до 4 метров, есть мелководные участки. Берега зарастают травой, дно илистое (Клевакин, 2009).

Таблица 1.3

Характеристика качества воды озера Жилново (Нижегородская обл., Кстовский район, 2016 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превыше-ние	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,25	0,3	0,8	0,1	2,5
2	Марганец	0,001	0,1	-	0,01	-
3	Медь	0,182	1,0	-	0,001	182,0
4	Свинец	<0,002	0,03	-	0,006	-
5	Никель	<0,006	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1,0	-	0,01	-
7	Хром	0,079	0,05	1,58	0,02	3,95
8	Нитраты	26,0	45,0	-	40,0	-
9	Нитриты	0,017	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	255,0	350,0	-	300,0	-
11	Сульфаты	101,0	500,0	-	100,0	-
12	Нефтепродукты	2,0	0,3	6,6	0,05	40,0
13	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

Озеро Березовское (Нижегородская обл., Богородский р-н; с.ш. 43.6229717, в.д. 56.1469890). Озеро часто посещается рыбаками, на расстоянии около 500 м находится автостоянка. Правый берег заросший, на левом берегу расположен песчаный пляж, а за ним – березовый лес.

Таблица 1.4

Характеристика качества воды озера Березовское (Нижегородская обл., Богородский р-н, 2017 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,105	0,3	-	0,1	1,05
2	Марганец	1,4	0,1	14,0	0,01	140,0
3	Медь	0,08	1,0	-	0,001	80,0
4	Хром	0,052	0,05	1,04	0,02	2,6
5	Нитраты	60,0	45,0	1,3	40,0	1,5
6	Нитриты	0,011	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	370,0	350,0	1,06	300,0	1,2
8	Сульфаты	33,5	500,0	-	100,0	-
9	Сульфиды	15,5	Отсутствие	15,5	Отсутствие	15,5
10	Нефтепродукты	0,15	0,3	-	0,05	3,0
	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

Река Кудьма. Участок реки Кудьма у п. Ветчак (Нижегородская обл., Кстовский р-н; с.ш. 56.096735, в.д. 44.314317). Река является природным южным кордоном лесного массива Зеленый город и правым притоком р.Волга. Основными загрязнителями являются предприятия города Богородск и нефтеперерабатывающий завод г. Кстово.

Таблица 1.5

**Характеристика качества воды уч. реки Кудьма у п. Ветчак
(Нижегородская обл., Кстовский р-н, 2017 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,175	0,3	-	0,1	1,75
2	Марганец	1,05	0,1	10,5	0,01	105,0
3	Медь	6,4	1,0	6,4	0,001	6400,0
4	Хром	0,071	0,05	1,42	0,02	3,55
5	Нитраты	79,0	45,0	1,75	40,0	1,98
6	Нитриты	0,0295	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	445,0	350,0	1,27	300,0	1,48
8	Сульфаты	71,0	500,0	-	100,0	-
9	Сульфиды	11,0	Отсутствие	11,0	Отсутствие	11,0
10	Нефтепродукты	0,21	0,3	-	0,05	4,2
	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

Таблица 1.6

**Характеристика качества воды уч. реки Кудьма у п. Ветчак
(Нижегородская обл., Кстовский р-н, 2018 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентра- ция (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышени е	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,26	0,3	-	0,1	2,6
2	Марганец	1,45	0,1	14,5	0,01	145,0
3	Медь	7,04	1,0	7,04	0,001	7040,0
4	Хром	0,022	0,05	-	0,02	1,1
5	Нитраты	0,6	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,0045	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	107,0	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,007	0,05	-	0,005	1,4
9	Никель	0,011	0,02	-	0,01	1,1
10	Кобальт	0,0335	0,1	0,335	0,01	3,35
11	Цинк	0,06	1,0	-	0,01	6,0
12	Свинец	0,015	0,01	1,5	0,006	2,5
	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

**Характеристика качества воды уч. реки Кудьма у п. Ветчак
(Нижегородская обл., Кстовский р-н, 2019 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентра- ция (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышени е	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,18	0,3	-	0,1	1,8
2	Марганец	0,7	0,1	7,0	0,01	70,0
3	Медь	2,44	1,0	2,44	0,001	2440,0
4	Хром	0,0355	0,05	-	0,02	1,575
5	Нитраты	2,05	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,0315	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	61,25	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,01	0,05	-	0,005	2,0
9	Никель	0,0585	0,02	2,925	0,01	5,85
10	Кобальт	0,1095	0,1	1,095	0,01	10,95
11	Цинк	0,045	1,0	-	0,01	4,5
12	Свинец	0,009	0,01	-	0,006	1,5
	Водородный показатель (ед. рН)	6,0	-	-	-	-

Озеро Силикатное (г. Н. Новгород, Сормовский р-н; с.ш. 56.370912, в.д. 43.777608). Озеро располагается возле завода ЗКПД-4, создан искусственно, является карьером по добыче песка для нужд завода по производству бетонных изделий. Ширина озера 1,5 км, береговая черта в районе завода постоянно меняется в связи с добычей песка. Глубина в озере достигает 20 метров, берег и дно песчаные, вода прозрачная. Заболоченности практически нет. Рядом располагается Новосормовское кладбище, Сормовский канал, проходящий в нескольких десятках метров от захоронений. В 200 метрах от озера ведется строительство крематория.

Таблица 1.8

Характеристика качества воды озера Силикатное (г. Нижний Новгород, Сормовский район, 2016 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,2	0,3	-	0,1	2,0
2	Марганец	0,001	0,1	-	0,01	-
3	Медь	0,09	1,0	-	0,001	90,0
4	Свинец	<0,002	0,03	-	0,006	-
5	Никель	<0,002	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1,0	-	0,01	-
7	Хром	0,089	0,05	1,78	0,02	4,45
8	Нитраты	26,0	45,0	-	40,0	-
9	Нитриты	0,006	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	155,0	350,0	-	300,0	-
11	Сульфаты	27,0	500,0	-	100,0	-
12	Нефтепродукты	1,13	0,3	3,7	0,05	22,6
13	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

Таблица 1.9

Характеристика качества воды озера Силикатное (г. Нижний Новгород, Сормовский район, 2017 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,6	0,3	2,0	0,1	6,0
2	Марганец	0,3	0,1	3,0	0,01	30,0
3	Медь	0,02	1,0	-	0,001	20,0
4	Хром	0,027	0,05	-	0,02	1,35
5	Нитраты	50,0	45,0	1,1	40,0	1,25
6	Нитриты	0,005	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	300,0	350,0	-	300,0	-
8	Сульфаты	39,0	500,0	-	100,0	-
9	Сульфиды	15,0	Отсутствие	15,0	Отсутствие	15,0
10	Нефтепродукты	0,128	0,3	-	0,05	2,56
	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

Таблица 1.10

Характеристика качества воды озера Силикатное (г. Нижний Новгород, Сормовский район, 2018 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,14	0,3	-	0,1	1,4
2	Марганец	0,45	0,1	4,5	0,01	45,0
3	Медь	0,055	1,0	-	0,001	55,0
4	Хром	0,019	0,05	-	0,02	-
5	Нитраты	5,325	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,0057	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	39,75	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,015	0,05	-	0,005	3,0
9	Никель	0,034	0,02	1,71	0,01	3,4
10	Кобальт	0,04	0,1	-	0,01	4,0
11	Цинк	0,038	1,0	-	0,01	3,8
12	Свинец	0,012	0,01	1,2	0,006	2,0
	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

Таблица 1.11

Характеристика качества воды озера Силикатное (г. Нижний Новгород, Сормовский район, 2019 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,09	0,3	-	0,1	-
2	Марганец	0,3	0,1	3,0	0,01	30,0
3	Медь	0,0255	1,0	-	0,001	25,5
4	Хром	0,0495	0,05	-	0,02	2,475
5	Нитраты	1,95	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,0045	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	82,0	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,004	0,05	-	0,005	-
9	Никель	0,0725	0,02	3,625	0,01	7,25
10	Кобальт	0,0595	0,1	-	0,01	5,95
11	Цинк	0,079	1,0	-	0,01	7,9
12	Свинец	0,007	0,01	-	0,006	1,16
	Водородный показатель (ед. рН)	7,5	-	-	-	-

Торфокарьер Ситниковского заказника (Нижегородская обл., Борский р-н; с.ш. 56.43979, в.д. 44.072462). Водоем, находящийся на территории Ситниковского орнитологического заказника. Торфокарьеры представляют собой крупную систему водоемов выработанных торфяных месторождений разного типа и возраста на месте переходных и низинных болот, разработанных способами гидроразмыва и фрезерным. Имеются небольшие участки неразработанных и восстановившихся после торфоразработок низинных и переходных болот. На территории ведутся выборочные рубки леса на дрова, охотничье хозяйство (осенняя охота), любительское рыболовство (Бакка, Киселева, 2008).

Таблица 1.12

**Характеристика качества воды торфокарьера Ситниковского заказника
(Нижегородская обл., Борский р-н, 2016 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превыше- ние	ПДК	Превыше- ние
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	1,83	0,3	6,1	0,1	18,3
2	Марганец	0,01	0,1	-	0,01	-
3	Медь	0,001	1,0	-	0,001	-
4	Свинец	0,004	0,03	-	0,006	-
5	Никель	0,007	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1,0	-	0,01	-
7	Хром	0,189	0,05	-	0,02	-
8	Нитраты	22,0	45,0	-	40,0	-
9	Нитриты	0,046	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	100,0	350,0	-	300,0	-
11	Сульфаты	16,0	500,0	-	100,0	-
12	Нефтепродукты	0,3	0,3	-	0,05	6,0
13	Водородный показатель (ед. рН)	6,0	-	-	-	-

Таблица 1.13

**Характеристика качества воды торфокарьера Ситниковского заказника
(Нижегородская обл., Борский р-н, 2017 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентра- ция (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышени е	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	1,4	0,3	4,7	0,1	14,0
2	Марганец	3,75	0,1	37,5	0,01	375,0
3	Медь	0,00095	1,0	-	0,001	-
4	Хром	0,004	0,05	-	0,02	-
5	Нитраты	21,5	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,075	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	155,0	350,0	-	300,0	-
8	Сульфаты	44,0	500,0	-	100,0	-
9	Сульфиды	22,5	Отсутс твие	22,5	Отсутс твие	22,5
10	Нефтепродукты	0,131	0,3	-	0,05	2,62
	Водородный показатель (ед. рН)	5,5	-	-	-	-

Таблица 1.14

**Характеристика качества воды торфокарьера Ситниковского заказника
(Нижегородская обл., Борский р-н, 2018 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентра- ция (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышени е	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,155	0,3	-	0,1	1,55
2	Марганец	0,29	0,1	2,9	0,01	29,0
3	Медь	0,17	1,0	-	0,001	170,0
4	Хром	0,056	0,05	1,12	0,02	2,8
5	Нитраты	0,61	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,01	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	25,5	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,012	0,05	-	0,005	2,4
9	Никель	0,005	0,02	-	0,01	-
10	Кобальт	0	0,1	-	0,01	-
11	Цинк	0,27	1,0	-	0,01	27,0
12	Свинец	0,001	0,01	-	0,006	
	Водородный показатель (ед. рН)	6,0	-	-	-	-

Таблица 1.15

**Характеристика качества воды торфокарьера Ситниковского заказника
(Нижегородская обл., Борский р-н, 2019 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентра- ция (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышени е	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	1,615	0,3	5,383	0,1	16,15
2	Марганец	3,05	0,1	30,5	0,01	305,0
3	Медь	0,505	1,0	-	0,001	505,0
4	Хром	0,2175	0,05	4,35	0,02	10,875
5	Нитраты	3,5	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,051	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	25,0	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,03	0,05	-	0,005	6,0
9	Никель	0,0915	0,02	4,575	0,01	9,15
10	Кобальт	0,1215	0,1	1,215	0,01	12,15
11	Цинк	3,04	1,0	3,04	0,01	304,0
12	Свинец	0,008	0,01	-	0,006	1,33
	Водородный показатель (ед. рН)	5,0	-	-	-	-

Озеро Сортировочное (г. Н.Новгород, Канавинский р-н; с.ш. 43.838322, в.д. 56.28880). Озеро окружено березовой рощей и песчаными пляжами, берег пологий, испытывает рекреационное и культурно-бытовое воздействие.

Таблица 1.16

Характеристика качества воды оз. Сортировочное (г. Н.Новгород, Канавинский р-н, 2019 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,885	0,3	2,95	0,1	8,85
2	Марганец	0,7	0,1	7,0	0,01	70,0
3	Медь	0,185	1,0	0,185	0,001	185,0
4	Хром	0,118	0,05	2,36	0,02	5,9
5	Нитраты	1,0	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,011	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	32,5	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,011	0,05	0,22	0,005	2,2
9	Никель	0,135	0,02	6,75	0,01	13,5
10	Кобальт	0,008	0,1	-	0,01	-
11	Цинк	0,065	1,0	-	0,01	-
12	Свинец	0,0845	0,01	8,45	0,006	14,083
	Водородный показатель (ед. рН)	5,0	-	-	-	-

Болото пос. Белкино (Нижегородская обл., Борский р-н; с.ш. 56.286208, в.д. 44.548075). Низинное болото, располагающееся в деревне Белкино, рядом с частными огородами и садами.

Таблица 1.17

Характеристика качества воды болота у п. Белкино (Нижегородская обл., Борский р-н, 2017 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоёмы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоёмы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,635	0,3	2,12	0,1	6,35
2	Марганец	2,4	0,1	24,0	0,01	240,0
3	Медь	0,175	1,0	-	0,001	175,0
4	Хром	0,0895	0,05	1,79	0,02	4,48
5	Нитраты	11,85	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,0105	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	202,5	350,0	-	300,0	-
8	Сульфаты	5,0	500,0	-	100,0	-
9	Сульфиды	10,1	Отсутствие	10,1	Отсутствие	10,1
10	Нефтепродукты	0,15	0,3	-	0,05	3,0
	Водородный показатель (ед. рН)	6,0	-	-	-	-

Таблица 1.18

**Характеристика качества воды болота у п. Белкино (Нижегородская
обл., Борский р-н, 2018 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентра- ция (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышени е	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	2,12	0,3	7,1	0,1	21,0
2	Марганец	1,85	0,1	18,5	0,01	185,0
3	Медь	0,37	1,0	-	0,001	370,0
4	Хром	0,086	0,05	1,72	0,02	4,3
5	Нитраты	3,9	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,026	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	8,5	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,02	0,05	-	0,005	4,0
9	Никель	0,07	0,02	3,5	0,01	7,0
10	Кобальт	0,079	0,1	0,79	0,01	7,9
11	Цинк	0,02	1,0	-	0,01	2,0
12	Свинец	0	0,01	-	0,006	-
	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

Характеристика качества воды болота у п. Белкино (Нижегородская обл., Борский р-н, 2019 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	1,575	0,3	5,25	0,1	15,75
2	Марганец	1,4	0,1	14,0	0,01	140,0
3	Медь	0,325	1,0	-	0,001	325,0
4	Хром	0,1215	0,05	2,43	0,02	6,075
5	Нитраты	1,7	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,018	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	0,008	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,122	0,05	2,44	0,005	24,4
9	Никель	0,0635	0,02	3,175	0,01	6,35
10	Кобальт	0,068	0,1	-	0,01	6,8
11	Цинк	0,6	1,0	-	0,01	60,0
12	Свинец	0,005	0,01	-	0,006	-
	Водородный показатель (ед. рН)	6,0	-	-	-	-

Озеро Вторчермет (г. Н. Новгород, Московский район; с.ш. 56.311944, в.д. 43.848889). Водоем создан искусственно на месте добычи грунта. Озеро расположено в окружении городской застройки с плотным зеленым насаждением у берегов. У северного конца озера проходит Московское шоссе (Баканина и др., 2001; Гелашвили и др., 2005). Озеро является активно посещаемой зоной отдыха.

Таблица 1.20

Характеристика качества воды озера Вторчермет (г. Н.Новгород, Канавинский р-н, 2016 год)

№	Показатели загрязнения	Концентрация (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышение	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,2	0,3	-	0,1	2,0
2	Марганец	0,1	0,1	-	0,01	10,0
3	Медь	0,002	1,0	-	0,001	2,0
4	Свинец	<0,002	0,03	-	0,006	-
5	Никель	0,008	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1,0	-	0,01	-
7	Хром	0,05	0,05	-	0,02	2,5
8	Нитраты	12,0	45,0	-	40,0	-
9	Нитриты	0,006	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	130,0	350,0	-	300,0	-
11	Сульфаты	22,0	500,0	-	100,0	-
12	Нефтепродукты	0,95	0,3	3,16	0,05	19,0
13	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

Таблица 1.21

**Характеристика качества воды озера Вторчермет (г. Н.Новгород,
Канавинский р-н, 2017 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентра- ция (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышени е	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,12	0,3	-	0,1	1,2
2	Марганец	0,4	0,1	4,0	0,01	40,0
3	Медь	0,13	1,0	0,13	0,001	130,0
4	Хром	0,05	0,05	-	0,02	2,5
5	Нитраты	0,425	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,0105	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	312,5	350,0	-	300,0	-
8	Сульфаты	48,5	500,	-	100,0	-
9	Сульфиды	13,5	отсутст вие	13,5	Отсутс твие	13,5
10	Нефтепродукты	0,114	0,3	-	0,05	2,28
	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

Таблица 1.22

**Характеристика качества воды озера Вторчермет (г. Н.Новгород,
Канавинский р-н, 2018 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентра- ция (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышени е	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,13	0,3	-	0,1	1,3
2	Марганец	0,1	0,1	-	0,01	10,0
3	Медь	0,095	1,0	-	0,001	95,0
4	Хром	0,06	0,05	1,2	0,02	3,0
5	Нитраты	0,75	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,005	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	80,0	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,007	0,05	-	0,005	1,4
9	Никель	0,01	0,02	-	0,01	-
10	Кобальт	0,0225	0,1	-	0,01	2,25
11	Цинк	0,05	1,0	-	0,01	5,0
12	Свинец	0,0365	0,01	3,65	0,006	6,08
	Водородный показатель (ед. рН)	7,0	-	-	-	-

**Характеристика качества воды озера Вторчермет (г. Н.Новгород,
Канавинский р-н, 2019 год)**

№	Показатели загрязнения	Концентра- ция (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно-бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышени е	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,97	0,3	3,23	0,1	9,7
2	Марганец	2,215	0,1	22,15	0,01	221,5
3	Медь	1,14	1,0	1,14	0,001	1140,0
4	Хром	0,0525	0,05	1,05	0,02	2,625
5	Нитраты	1,4	45,0	-	40,0	-
6	Нитриты	0,0935	3,3	-	0,08	1,16875
7	Сульфаты	92,5	500,0	-	100,0	-
8	Сульфиды	0,071	0,05	1,42	0,005	14,2
9	Никель	0,0595	0,02	2,975	0,01	5,95
10	Кобальт	0,0685	0,1	-	0,01	6,85
11	Цинк	0,14	1,0	-	0,01	14,0
12	Свинец	0,006	0,01	-	0,006	-
	Водородный показатель (ед. рН)	9,0	-	-	-	-