

На правах рукописи

РЯБИНИНА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА АМФИБИЙ В УСЛОВИЯХ
ХИМИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ**

1.5.15. Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2024

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

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры экологии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»
Романова Елена Борисовна

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

доктор биологических наук, доцент, директор ФГБУ «Объединенная дирекция Мордовского государственного природного заповедника имени П. Г. Смидовича и национального парка «Смольный» (г. Саранск)
Ручин Александр Борисович

Ведущая организация: Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук (г. Самара)

Защита диссертации состоится «_____» г. в _____ на заседании диссертационного совета 24.2.340.05 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина 23, Институт биологии и биомедицины

E-mail: dis212.166.12@gmail.com

факс: (831) 462-30-85

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: <https://diss.unn.ru/files/2024/1429/diss-Ryabinina-1429.pdf>, с авторефератом – в сети Интернет на сайте ВАК России по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Д. Е. Гаврилко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Важной задачей экологической физиологии является оценка влияния абиотических факторов и выявление адаптивных изменений, протекающих неодинаково не только в различных систематических группах амфибий, но и у близких видов (Вершинин, 2004). Современным универсальным инструментом цитомного анализа является микроядерный тест, основанный на особенности пролиферирующих клеток (в первую очередь эритроцитов разной степени созревания) под воздействием мутагенов образовывать особые ядерные структуры – микроядра (Жулева, Дубинин, 1994; Захаров, Крысанов, 1996; Логинов, 2004; Манских, 2006; Кузина, 2011; Кривцова и др., 2021; Крюков, 2023; Luzhna et al., 2013; Mansi et al., 2014 и др.), формирующиеся в процессе нарушений генетического материала (Migliore et al., 1997; Ковалева, 2008; Кривцова и др., 2021), как из отстающих ацентрических фрагментов, возникших в результате структурных aberrаций хромосом (кластогенный эффект), так и целых хромосом, задерживающихся в анафазе на экваторе клетки (анеугенный эффект). В связи с постоянной высокой эритропоэтической активностью костного мозга особую актуальность приобретает сравнительный учет хромосомных нарушений в молодых клетках костного мозга и зрелых эритроцитах периферической крови. Несмотря на относительную изученность механизмов возникновения микроядер (Квасов и др., 2000; Прошин, 2007; Ковалева, 2008; Кривцова и др., 2021; Крюков, 2023; Woznicki et al., 2004; Koh-ichi et al., 2011), отдельные характеристики хромосомных нарушений, изменчивости генома и взаимосвязь их с факторами окружающей среды до сих пор остаются несистематизированными. Между тем, исследования цитогенетических показателей имеют не только практическую значимость, связанную с оценкой качества среды путём биоиндикации, но и способствуют получению характеристик популяционного гомеостаза, определяющего выживание животных в условиях нарастающей антропогенной нагрузки. В последние годы сформировалось четкое представление о зеленых лягушках, как сложном комплексе криптических видов с присутствием диплоидных и полиплоидных форм (Боркин и др., 2004; Ivanov et al., 2019). Поскольку точная идентификация зеленых лягушек затруднена из-за их морфологического сходства, для уточнения видовой принадлежности целесообразно дополнительное молекулярно-генетическое определение видов. Появляется все больше работ, посвященных использованию бесхвостых амфибий в качестве индикаторов накопления токсичных микроэлементов (кадмия, свинца, ртути) (Зарипова, 2009; Banks et al., 2017; Северцова и др., 2013; Комов и др., 2017 и др.). Представители бесхвостых амфибий озерная (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) и прудовая (*P. lessonae* Camerano, 1882) лягушки ведут околководный и придонный образ жизни и накапливают тяжелые металлы диффузно через кожу, при дыхании и алиментарным путем – с водными объектами питания (Комов и др., 2017). Известно, что в условиях повышенного содержания тяжелых металлов у амфибий отмечены изменение сроков развития, аномалии, преждевременная гибель (Blaustein et al., 2003; Crawshaw, 2003; Sparling et al., 2006; Jepson, 2011), изменение уровня метаболизма (Rowe et al., 1998, 2001), поведенческих реакций (Wright et al., 2005), нарушение работы эндокринной и иммунной систем (Blaustein, Kiesecker, 2002). Несмотря на имеющиеся сведения еще недостаточно информации о способности тяжелых металлов к биоконцентрированию, фрагментарны данные о содержании и распределении металлов в организме близкородственных видов амфибий, имеющих различную биотопическую приуроченность и единичны сведения о связи показателей генетической нестабильности (микроядер) с аккумуляцией тяжелых металлов в органах и тканях организма.

С учетом вышеизложенного **целью работы** является сравнительный аутэкологический анализ цитогенетических характеристик *P. ridibundus* и *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae) в градиенте загрязнения среды обитания на примере водных объектов Нижегородской области в период с 2016 по 2022 гг. и обоснование возможности их применения в цитогенетическом мониторинге.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выполнить химический анализ водной среды с расчетом удельного индекса загрязненности воды (УКИЗВ), с последующей ординацией водных объектов Нижегородской области на основе показателей гидрохимического состава.

2. Провести видовую идентификацию зеленых лягушек рода *Pelophylax* морфологическими и молекулярно-генетическими методами.

3. Изучить видоспецифичность количественных гематологических показателей зеленых лягушек в качественно различных условиях водной среды, определенных по УКИЗВ, в пределах зоны толерантности.

4. Оценить встречаемость микроядер в периферической крови (нормохроматофильных эритроцитах, НХЭ) и костном мозге (полихроматофильных эритроцитах, ПХЭ) зеленых лягушек рода *Pelophylax* в разных гидрохимических условиях среды обитания.

5. Оценить морфофизиологические параметры по индексам органов зеленых лягушек, обитающих в качественно различных условиях водной среды.

6. Провести сравнительный анализ накопления и распределения металлов (Cr, Mn, Fe, Cu, Al, Zn, Sr) в органах и тканях *P. ridibundus* и *P. lessonae*.

Научная новизна и теоретическая значимость исследования. Впервые проведена оценка цитогенетического гомеостаза амфибий, обитающих в водных объектах урбанизированной территории и выявлено повышение генетической нестабильности организма (возрастание доли микроядер в клетках крови и костном мозге) при ухудшении качества водной среды обитания. Предложены собственные классификационные характеристики типов микроядер в эритроцитах амфибий, основанные на измерении их площади. Впервые установлено перераспределение соотношения видов микроядер в клетках организма в градиенте загрязнения водной среды, за счет возрастания доли прикрепленных микроядер. Впервые выявлена взаимосвязь между цитогенетическими, морфофизиологическими показателями гомеостаза и биоаккумуляцией тяжелых металлов в тканях и органах амфибий. Результаты диссертации носят фундаментальный характер и могут быть использованы при изучении микроэволюционных процессов видов на антропогенно-трансформированных территориях.

Практическая значимость работы. С учетом оценки комплекса цитогенетических и морфофизиологических показателей для целей биомониторинга могут быть рекомендованы оба вида зеленых лягушек. Проведение эколого-генетического мониторинга с использованием классических индикаторных видов позволяет оценить экологическую обстановку конкретной территории, выявить мутагенные факторы среды и виды нарушений ядерного материала в соматических клетках разной степени зрелости. Материалы диссертации, выводы и результаты могут найти применение при решении природоохранных задач и совершенствовании методов регуляции численности индикаторных видов на урбанизированных территориях.

Соответствие паспорту научной специальности. Результаты диссертационного исследования полностью соответствует шифру специальности 1.5.15. Экология, конкретно области исследования – экофизиология (факториальная экология).

Положения, выносимые на защиту:

1. В условиях комплексного гидрохимического загрязнения среды обитания, оцениваемого по удельному комбинаторному индексу загрязненности воды (УКИЗВ), диапазон экологической толерантности озерной лягушкой шире по сравнению с прудовой лягушкой; условной границей, разделяющей виды, является значение УКИЗВ, больше 5.

2. В экстремальных условиях загрязнения водной среды установлена более выраженная интенсификация кроветворения прудовых лягушек по сравнению с озерными лягушками, что проявляется в повышенном содержании в крови лейкоцитов и эритроцитов.

3. В условиях экстремального гидрохимического загрязнения выявлены межвидовые различия по частоте ядерных аномалий, заключающиеся в повышенном содержании в костном мозге и периферической крови прудовых лягушек клеток с микроядрами (за счет вклада микроядер прикрепленного вида).

4. Специфика гидрохимических условий среды определяет индукцию микроядер в клетках крови и костного мозга обоих видов амфибий, а биоаккумуляция тяжелых металлов влияет на морфофизиологические (индексы сердца, печени, почек) параметры преимущественно озерных лягушек.

Апробация результатов. Автор принимал личное участие в постановке задач исследования, сборе материала, проведении лабораторной и статистической обработки, а также обсуждении и теоретическом осмыслении полученных результатов. Доля личного участия автора в сборе материала, написании и подготовке публикаций составляет 80–95%.

Основные результаты работы доложены и представлены на научно-практических конференциях: Индикация состояния окружающей среды: теория, практика, образование, Москва, 2017; Техногенные системы и экологический риск: 1-ой Международной (XIV Региональная) научной конференции, Обнинск, 2017; Современные проблемы биологической эволюции: 3-й Международной конференции к 130-летию со дня рождения Н.И. Вавилова и 110-летию со дня основания Государственного Дарвинского музея, Москва, 2017; Экология: факты, гипотезы, модели: конференции молодых ученых, посвященной памяти Н.В. Глотова, Екатеринбург, 2018; XXIII Нижегородской сессии молодых ученых (технические, естественные, математические науки), Княгинино, 2018; Экология речных бассейнов: 9-ой Международной научно-практической конференции, Владимир, 2018; Биоразнообразие и антропогенная трансформация экосистем: всероссийской науч.-практ. конф., посвященной памяти проф. А.И. Золотухина и 85-летию Балашовского института, Саратов, 2018; Биология - наука XXI века: международной Пущинской школе-конференции молодых ученых, 23-27 апреля, 2018, г. Пущино, 2018; Биосистемы: организация, поведение, управление: 71-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых, 17–20 апреля 2018, Н. Новгород, 2018; Biodiversity and Wildlife Conservation Ecological Issues: 2nd International Young Scientists Conference, Dedicated to the 75th Anniversary of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia (5-7 October, 2018, Tsaghkadzor, Armenia), Yerevan, 2018; Биосистемы: организация, поведение, управление: 72-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых, 23-26 апр. 2019, Нижний Новгород, 2019; Современная герпетология: проблемы и пути решения: 2-ой международной конференции герпетологов России и сопредельных стран, посвященной 100-летию герпетологии Зоологического института РАН (25–27 ноября 2019), Санкт-Петербург, 2019; Экологический сборник 7: всероссийской (с международным участием) молодежной научной конференции, Тольятти, 2019; Экология и природопользование: прикладные аспекты: X Международной научно-практической конференции, Уфа, 2020; Биосистемы: организация, поведение, управление: 73-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых, Н. Новгород, 2020; Вопросы герпетологии: VIII съезде Герпетологического общества им. А.М. Никольского при РАН «Современные герпетологические исследования Евразии», Москва, 2021; Экология речных бассейнов, Владимир, 2021; Биосистемы: организация, поведение, управление: 74-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых, Нижний Новгород, 2021; Биосистемы: организация, поведение, управление: 75-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых, 19–22 апреля 2022, Нижний Новгород, 2022; Биосистемы: организация, поведение, управление: 76-ой Всероссийской школе-конференции молодых ученых, 11–14 апреля 2023, Н. Новгород, 2023; Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2023, Севастополь, 2023; Медико-физиологические проблемы экологии человека: IX Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 35-летию Ульяновского государственного

университета, 17-19 октября 2023, Ульяновск, 2023; Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, причины возникновения, теоретическое и практическое значение: третьей научно-методической конференции, 12–15 октября, Екатеринбург, 2023.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 36 научных работ, из которых: 9 – входят в Перечень ВАК РФ и международные реферативные базы данных и системы цитирования, 26 – статей и тезисов в материалах международных, российских и региональных конференций; 1 – учебное пособие.

Структура и объём работы. Решение поставленных задач определило структуру диссертационной работы, состоящую из введения, 8 глав, заключения, выводов. Диссертация изложена на 141 странице. Работа иллюстрирована 37 таблицами и 36 рисунками. Список использованной литературы включает 183 источника, в том числе 83 иностранных авторов.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю д.б.н., профессору Е. Б. Романовой за разработку темы исследования, неоценимую поддержку, руководство и помощь. Автор считает своим приятным долгом выразить искреннюю благодарность за внимание к работе и квалифицированные советы д.б.н., профессору Д. Б. Гелашвили; за конструктивные замечания и помощь в статистической обработке данных д.б.н. В. Н. Якимову. Автор выражает большое уважение и сердечную благодарность к.б.н., доценту кафедры зоологии и экологии Пензенского государственного университета О. А. Ермакову за организацию работ по молекулярному определению вида амфибий и ценные консультации. Автор признателен доценту кафедры ботаники и зоологии к.б.н. А. А. Лебединскому за консультации и поддержку. Автор выражает благодарность директору Научно-исследовательского института химии при ННГУ им Н. И. Лобачевского д.х.н., профессору Е. В. Сулейманову и к.физ.-мат.н., научному сотруднику А. В. Борякову за благоприятную рабочую обстановку, поддержку и возможность выполнения работы с использованием оборудования ЦКП «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» (ЦКП «НМиРТ»). Автор выражает слова благодарности соавторам, коллегам, коллективу ИББМ ННГУ им. Н. И. Лобачевского за помощь, внимание и участие в выполнении работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ В ВОДНЫХ И НАЗЕМНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

В главе приведен обзор современных сведений о механизме формирования микроядер, как основных показателей генетической нестабильности в эукариотических клетках различных организмов. Рассмотрены причины образования микроядер и применение микроядерного теста для оценки влияния экологических факторов на живые организмы; для скрининга и мониторинга мутагенов различной природы.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика районов и объектов исследования

Лабораторные и полевые исследования проводили в течение полевых сезонов 2016–2022 гг. на территории Нижегородской области. Сбор амфибий осуществляли в естественных и искусственных объектах (участки реки, искусственные и природные озера, болота урбанизированной территории). В работе были использованы зооиндикаторы (всего 556 особей): лягушка озерная *P. ridibundus* (Pallas, 1771) (391 особь) и лягушка прудовая *P. lessonae* (Camerano, 1882) (165 особей) из природных популяций 12 водных объектов.

Расположение исследованных водных объектов на карте Нижегородской области представлено на рисунке 1.

2.2. Гидрохимический анализ исследованных водных объектов

Для характеристики абиотических условий среды одновременно со сбором амфибий, были взяты пробы воды в соответствии с ГОСТом 31862-2012. Гидрохимический анализ проводили в лаборатории с помощью спектрофотометра Nach DR-2800 (NACH LANGE GmbH, Германия). Оценивали концентрации (мг/л) следующих показателей загрязнения: железо, марганец, медь, свинец, никель, цинк, хром, кобальт, нитраты, нитриты, хлориды, сульфаты, сульфиды, нефтепродукты. При расчете удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ, РД 52.24.643-2002) руководствовались свободным перечнем № 3, включающим ингредиенты, которые важны при проведении отдельных научно-исследовательских работ или решении производственных задач. В расчетах учитывали показатели, превышающие норматив качества воды для водоемов рыбохозяйственного назначения (ПДКрыб-хоз) (Нормативы качества..., 2010).

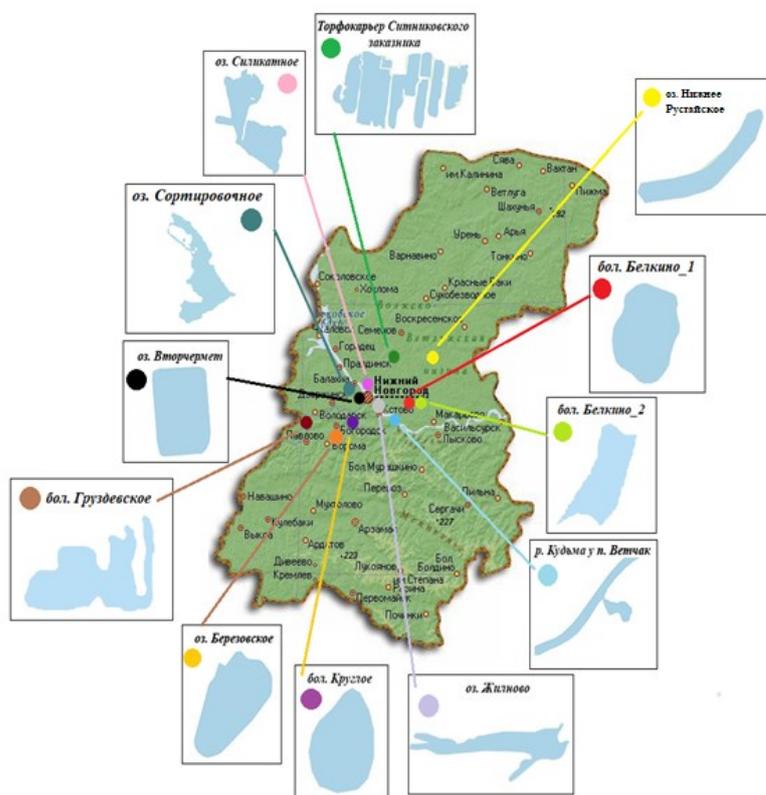


Рисунок 1. Ситуационный план. Расположение исследованных водных объектов на карте Нижегородской области

2.3. Видовая идентификация зеленых лягушек рода *Pelophylax*

Первичная видовая идентификация лягушек проводилась по общепринятым, при определении зеленых лягушек, внешним морфологическим признакам (Банников и др., 1977; Таращук, 1985; Борисовский и др., 2000; Коцержинская, 2000). Молекулярно-генетическая идентификация видов проведена в лаборатории молекулярной экологии и систематики животных на кафедре зоологии и экологии Пензенского государственного университета под руководством к.б.н., доцента О.А. Ермакова. В качестве образцов тканей для выделения ДНК использовали часть пальца передней конечности амфибий (40 особей). ДНК выделяли методом высаливания (Aljanabi, Martinez, 1997) в сочетании с лизисом протеиназой К. Использовали два молекулярно-генетических маркера: для митохондриальной ДНК (мтДНК), наследуемой по материнской линии – фрагмент первой субъединицы гена цитохром оксидазы (COI), для ядерной ДНК (ядДНК), имеющей

«менделевский» тип наследования – интрон 1 гена сывороточного альбумина (SAI-1) (Plötner et al., 2008). Идентификация видов проводилась при помощи мультиплексной тест-системы, состоящей из общего и видоспецифичных праймеров (Ermaikov et al., 2019). Для верификации результатов идентификации мультиплексной тест-системой проведено секвенирование гена ND2 мтДНК (1038 п.н.) у 12 экз. (30 % выборки) и фрагмента гена SAI яДНК (871 п.н.) у 9 экз. (23 % выборки). Полученные продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле (размер стеклянной пластинки 8 × 10 см) с последующим окрашиванием бромидом этидия для УФ-визуализации. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems) («Thermo Scientific», США) с применением наборов BigDye® Terminator 3.1 (Applied Biosystems) и тех же праймеров, что использовались при амплификации.

2.4. Оценка общего числа лейкоцитов и эритроцитов в крови зеленых лягушек

Кровь для анализа получали с помощью инсулинового шприца из сердца лягушки. Определение количественного содержания лейкоцитов и эритроцитов проводили в камере Горяева (Исаева, Вязов, 1996).

2.5. Микроядерный тест

Приготовление и окраска мазков крови и костного мозга осуществлялась по стандартной методике (Меньшиков и др., 1987; Гематология... , 2004). Учет эритроцитов с микроядрами проводили на микроскопе Meiji Techno (Япония, иммерсия, ув. x1500) с помощью электронного гематологического счетчика С-5М (Жулева, Дубинин, 1994; Крюков, 2023 и др.). Для каждой особи просматривали по 2 препарата, анализируя по 1000 эритроцитов на препарат. Полученные результаты выражали в промилле (‰).

В полихроматофильных клетках костного мозга, ПХЭ (рисунок 2) и зрелых нормахроматофильных эритроцитов крови, НХЭ (рисунок 3) дифференцировали четыре вида микроядер: 1. Оформленные (а) – хорошо оформлены, располагающиеся на некотором удалении от ядра и не связанные с ним; 2. Прикрепленные (б) – некрупные, соединяющиеся с основным, хорошо оформленным ядром, имеющим четкую округлую форму или неровную поверхность; 4. Разрыхленные (в) – крупные ядерные образования, представляющие собой разрыхленный ядерный материал 3. Палочковидные (г) – некрупные, располагающиеся на периферии, имеющие вытянутую форму в виде палочек. Окуляр микрометром проводили измерение большой (2а) и малой (2б) оси каждого микроядра и рассчитывали его площадь (мкм²) по формуле эллипса: $S = \pi ab$, где: а – большая полуось эллипса, b – малая полуось эллипса, $\pi = 3.14$.

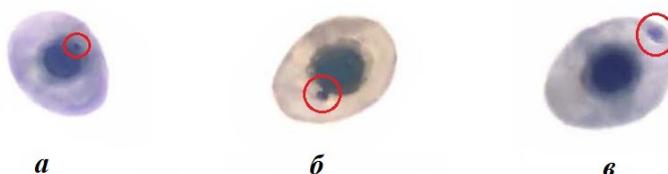


Рисунок 2. Виды микроядер в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) костного мозга зеленых лягушек (микроскоп Meiji Techno, ув. x1500, иммерсия): а – оформленные; б – прикрепленные; в – разрыхленные

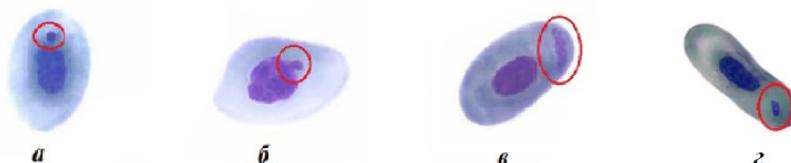


Рисунок 3. Виды микроядер в нормахроматофильных эритроцитах (НХЭ) периферической крови зеленых лягушек (микроскоп Meiji Techno, ув. x1500, иммерсия): а – оформленные; б – прикрепленные; в – разрыхленные; г – палочковидные

2.6. Анализ морфофизиологических параметров лягушек по индексам органов

Индексы внутренних органов (печень, почки, сердце, селезенка, гонады, тимус) вычисляли как отношение массы органа к массе тела (%) (Ивантер, 1985; Шварц и др., 1968). Массу тела амфибий определяли на технических весах с точностью до 0,02 г (ошибка измерения $\pm 0,01$). Массу органов - на торсионных весах Waga Torsyjna-WT с точностью до 0,1 мг (ошибка измерения $\pm 0,03$).

2.7. Определение содержания металлов в тканях зеленых лягушек

Содержание металлов (Al, Mn, Sr, Cu, Cr, Fe, Zn) в тканях и органах лягушек определяли атомно-эмиссионным методом с помощью AES-ICP-спектрометра Prodigy High Dispersion ICP (Teledyne Leeman Labs, США). Использовалось оборудование ЦКП «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» (НИИхимии при ННГУ им. Н.И. Лобачевского). Для анализа использовали микроволновую систему пробоподготовки MS-6. Правильность определения металлов контролировалась периодическим анализом стандартных образцов, а возможное загрязнение проб в ходе анализа – регулярным определением холостых проб. По полученным данным рассчитывали коэффициент биологического поглощения (КБП) металлов, как отношение концентрации металла в тканях и органах к их содержанию в воде (Перельман, 1982) и коэффициент накопления (Кн), как отношение валового содержания металла в организме (мг/кг) к его концентрации в воде (мг/л) (Приказ Росрыболовства №695 от 04.08.2009). Согласно классификации Врончинского (1974) степень накопления металлов оценивали: слабая – $K_n \leq 50$; умеренная – $51 \leq K_n \leq 200$; высокая – $201 \leq K_n \leq 1000$; сверхвысокая $K_n > 1000$.

2.8. Статистическая обработка

Все расчеты проводили в среде R (R Core Team, 2020) (Якимов, 2019) с применением пакетов программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., USA) и Statistica 8 (StatSoft Inc., OK, USA). Предварительная проверка данных на соответствие нормальному распределению по критериям Шапиро – Уилка, Лиллиефорса, Андерсона-Дарлинга, показала, что выборки не подчиняются нормальному распределению, поэтому центральные тенденции и рассеяние изученных показателей описывали медианой (Me) и интерквартильным размахом (IQR) (значения 25-го и 75-го перцентилей). 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), коэффициентов ранговой корреляции Спирмена (ρ) и γ -корреляции (при анализе взаимосвязи), Уилкоксона (W) (при сравнении зависимых выборок), для сравнения долей использовали критерий z с поправкой Холма. Для выявления отличий между группами объектов по совокупности показателей использовался многомерный дисперсионный анализ с использованием лямбды Уилкса (λ Wilks) в качестве критериальной статистики. Ввиду несоответствия первичных данных нормальному распределению, значимость отличий (p-значения) рассчитывалась путем рандомизации с использованием перестановочной процедуры (Шитиков, Розенберг, 2014). Классификацию выборок проводили методом главных координат, позволяющим получить координаты объектов в осях максимальной вариации и кластерным анализом на основе метода объединения Уорда, который направлен на выявление кластеров из сходных объектов. В свою очередь сходство рассчитывалось как евклидово расстояние в пространстве логарифмированных значений частных коэффициентов. За величину уровня статистической значимости принимали $\alpha = 0.05$, при множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. Гидрохимический анализ и характеристика абиотических условий обитания зеленых лягушек Нижегородской области

На основе данных гидрохимического анализа и расчёта УКИЗВ определяли класс качества воды исследованных водных объектов. Для стандартизации вклада различных

загрязнителей в результаты дальнейшего анализа в качестве исходных данных были использованы частные оценочные коэффициенты, которые учитывают кратность превышения ПДКрыб-хоз *i*-го ингредиента на водном объекте. Ввиду того, что исходные значения частных оценочных коэффициентов имеют сильно скошенное вправо распределение, перед проведением анализа была проведена их логарифмическая трансформация $\log(x+1)$. С целью группирования водных объектов по гидрохимическим показателям использовали кластерный анализ на основе метода объединения Уорда. Результатом кластеризации явилась дендрограмма, показывающая иерархическую группировку водных объектов. В целях обоснования количества кластеров использовали анализ силуэтов, согласно которому были выделены пять кластеров (А, Б, В, Г, Д), в каждом из которых содержались водные объекты с близкими показателями химического загрязнения среды (рисунок 4). Статистический анализ между группами объектов по совокупности гидрохимических показателей методом многомерного дисперсионного анализа с использованием лямбды Уилкса (λ Wilks = 0.0001, $F=14.34$, $df=36$, $p < 0.001$) выявил значимые различия между выделенными кластерами.

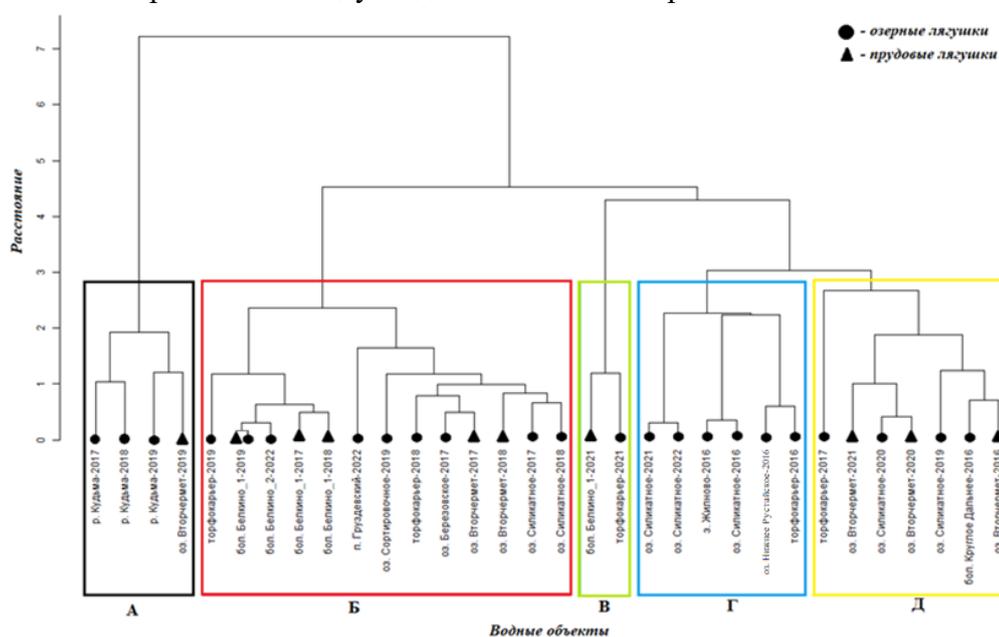


Рисунок 4. Дендрограмма иерархической кластеризации водных объектов Нижегородской области на основе гидрохимического состава. По оси отложено расстояние объединения

Для выявления закономерностей группирования изученных водных объектов был применен метод главных координат, который позволяет получить координаты объектов в осях максимальной вариации. В результате была построена ординационная диаграмма в пространстве двух первых главных координат, куда были спроецированы векторы, соответствующие исходным переменным (рисунок 5). Кластеры выделены с применением выпуклой оболочки. На диаграмме кластеры расположились в порядке возрастания слева направо по градиенту химического загрязнения водной среды, оцениваемого по УКИЗВ. При этом отметим, что в кластеры входили водные объекты, в которых доминировали разные виды лягушек, за исключением кластера Г (усредненное значение УКИЗВ = 4.66, IV класс, грязная, разряд «а»). Кластер Г включал четыре водных объекта (оз. Силикатное, оз. Жилново, оз. Нижнее Рустайское, торфокарьер Ситниковского заказника), в которых в разные годы встречались только озерные лягушки (100 особей). Эти водоемы отличались от остальных водных объектов более приемлемым уровнем водообмена и отсутствием импактных источников загрязнения, что, по-видимому, создает более благоприятные абиотические условия обитания. В водных объектах остальных кластеров присутствовали и озерные, и прудовые лягушки: в кластере Д (усредненное значение УКИЗВ=5.10, IV

класс, грязная, разряд «а») четыре выборки составляли озерные лягушки, три выборки – прудовые лягушки; в кластере Б (усредненное значение УКИЗВ=9.10, IV класс, очень грязная, разряд «г») восемь выборок составляли озерные лягушки, пять выборок – прудовые лягушки. В бол. Белкино_1, входящим в этот кластер в 2019 году озерные и прудовые лягушки обитали совместно – в условиях синтопии. В малочисленный кластер В (усредненное значение УКИЗВ=26.61, V класс, экстремально грязная) входило по одной выборке озерных и прудовых лягушек; кластер А (усредненное значение УКИЗВ=42.30, V класс, экстремально грязная) включал три выборки озерных лягушек и одну – прудовых лягушек.

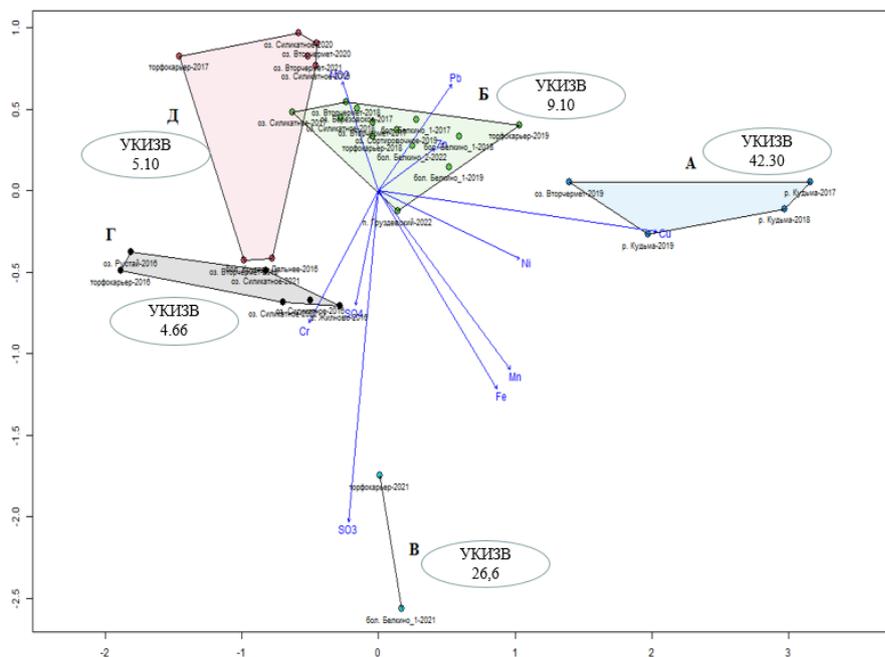


Рисунок 5. Ординационная диаграмма распределения водных объектов в пространстве двух первых главных координат, рассчитанных на основе показателей гидрохимического состава. На осях указаны значения доли общей изменчивости, объясняемой соответствующими главными координатами. Буквами (А, Б, В, Г, Д) обозначены выделенные кластеры, группирующиеся по гидрохимическому составу

Сравнение относительных частот распределения лягушек выявило преобладание озерных и иллюстрировало более широкий диапазон их толерантности по сравнению с прудовыми по градиенту УКИЗВ водных объектов (таблица 1).

Таблица 1

Распределение озерных и прудовых лягушек по кластерам

Показатели/Кластеры	Г	Д	Б	А+В
	IV класс, грязная			V класс, экстремально грязная
Градиент УКИЗВ, отн. ед	4.66	5.1	9.1	31.3
Численность, шт. / Доля озерных лягушек	100 / 1.0	75 / 0.64	154 / 0.63	62 / 0.66
Численность, шт. / Доля прудовых лягушек	0 / 0	43 / 0.36	90 / 0.37	32 / 0.34
p- значение при сравнении долей	<0.001	0.004	0.001	0.003

Таким образом, по градиенту химического загрязнения среды в порядке ухудшения качества воды водных объектов (от IV класса, грязная/очень грязная к V классу,

экстремально грязная), представительство видов зеленых лягушек менялось. Озерные лягушки присутствовали на всем диапазоне УКИЗВ. Прудовые лягушки встречались в водных объектах с УКИЗВ более 5.0.

ГЛАВА 4. Молекулярно-генетическая идентификация вида зеленых лягушек

Результаты мультиплексного типирования маркера мтДНК озерных лягушек показали равное соотношение гаплотипов «восточной» и «западной» форм. Исследование маркера яДНК выявило наличие только аллелей «западной» формы. В выборках прудовых лягушек все изученные особи имели только видоспецифические маркеры *P. lessonae*, как митохондриальной, так и ядерной ДНК (рисунок 6).

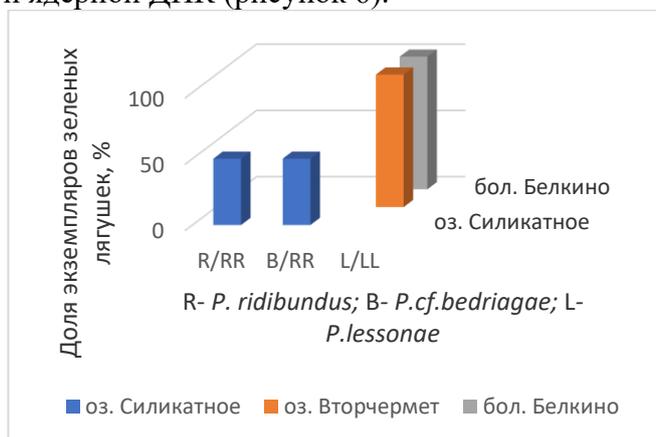


Рисунок 6. Генетическая характеристика выборок зеленых лягушек

Таким образом, выборочный молекулярно-генетический анализ показал, что озерная лягушка представлена двумя генетическими дифференцированными криптическими формами «западной» (*P. ridibundus*) и «восточной» (анатолийской лягушкой *P. cf. bedriagae*). У прудовой лягушки все экземпляры были представлены генетически «чистыми» видоспецифическими для *P. lessonae* маркерами (L/LL).

ГЛАВА 5. Гематологические показатели зеленых лягушек рода *Pelophylax*, обитающих в различных гидрохимических условиях среды

Глава посвящена анализу гематологических показателей озерных и прудовых лягушек, обитающих в водных объектах, группирующихся по гидрохимическому составу.

Озерные лягушки. Выявлены значимые различия по содержанию лейкоцитов ($H=25.07$, $p<0.001$) и эритроцитов ($H=53.74$, $p<0.001$) крови особей из разных кластеров. По содержанию лейкоцитов значимо различались выборки озерных лягушек, обитающие в наименее загрязненном кластере Г и кластерах Б (с более высоким уровнем загрязнения, УКИЗВ = 9.1) и А (с экстремальным загрязнением водной среды, УКИЗВ = 42.3).

По количеству эритроцитов различия между выборками были более существенными, выявлены значимые различия между выборками кластера Г и особями всех остальных кластеров ($H=53.74$, $p<0.001$). Показано, что в условиях ухудшения качества водной среды обитания, оцениваемого по УКИЗВ, суммарное содержание лейкоцитов и эритроцитов в крови озерных лягушек снижалось (рисунок 7).

Установлена отрицательная корреляция количественных гематологических показателей озерных лягушек с ионами кобальта ($\gamma = -0.437$, $p=0.009$), никеля ($\gamma = -0.480$, $p=0.003$), показывающая, что с повышением содержания в поверхностных водах водных объектов тяжелых металлов в организме озерных лягушек наблюдалось снижение процессов лейкопоэза. Показана взаимосвязь снижения в крови озерных лягушек эритроцитов с повышением содержания в воде нитратов ($\gamma = -0.619$, $p=0.003$).

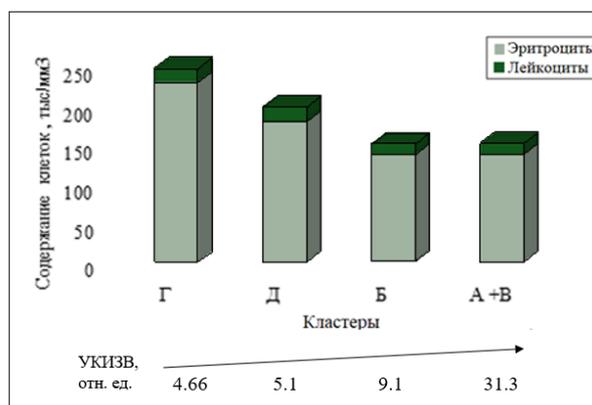


Рисунок 7. Изменение количества лейкоцитов и эритроцитов в периферической крови озерных лягушек по градиенту химического загрязнения среды, определенного по УКИЗВ
 Г – УКИЗВ = 4.66; Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А+В – УКИЗВ = 31.3. Стрелка показывает направление градиента УКИЗВ. Значимые различия по критерию Данна, D. Содержание лейкоцитов: $D_{A+B-Г}=4.28$, $p<0.001$; $D_{Б-Г}=4.26$, $p<0.001$. Содержание эритроцитов: $D_{A+B-Г}=6.56$, $p<0.001$; $D_{A+B-Д}=3.68$, $p=0.001$; $D_{Б-Г}=5.86$, $p<0.001$; $D_{Г-Д}=2.84$, $p=0.026$

Прудовые лягушки. По градиенту ухудшения гидрохимических условий среды содержание в крови прудовых лягушек лейкоцитов и эритроцитов изменялось волнообразно: количество лейкоцитов оставалось высоким в условиях грязных (кластер Д, УКИЗВ=5.10) и в экстремально грязных (кластер В, УКИЗВ=26.61) вод. Наиболее низкое содержание в крови лейкоцитов и эритроцитов отмечено у прудовых лягушек кластера Б (УКИЗВ= 9.10). В экстремальных условиях водной среды (кластер А+В) в крови прудовых лягушек отмечено повышенное содержание эритроцитов и лейкоцитов, по сравнению с особями, обитающими в очень грязненной воде (кластер Б, IV класс, очень грязная, разряд «Г») (рисунок 8).

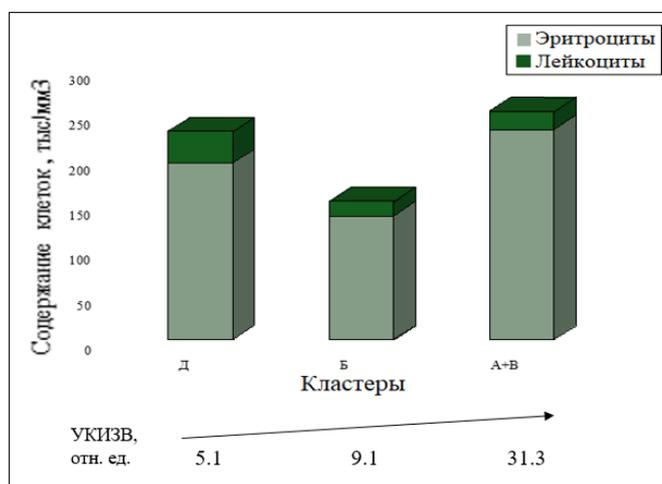


Рисунок 8. Изменение количества лейкоцитов и эритроцитов в периферической крови прудовых лягушек по градиенту химического загрязнения среды
 Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А+В – УКИЗВ = 31.3. Стрелка показывает направление градиента УКИЗВ. Значимые различия по критерию Данна, D. Содержание лейкоцитов: $D_{A-Б}=2.99$, $p=0.016$; $D_{A-Д}=4.09$, $p<0.001$; $D_{Б-В}=4.32$, $p<0.001$; $D_{Б-Д}=7.70$, $p<0.001$. Содержание эритроцитов: $D_{Б-В}=3.18$, $p=0.008$; $D_{Б-Д}=3.70$, $p=0.001$

Выявлена взаимосвязь снижения в крови прудовых лягушек эритроцитов ($\gamma_{Pb} = -0.726$, $p=0.01$; $\gamma_{Ni} = -0.668$, $p=0.034$) и лейкоцитов ($\gamma_{Pb} = -0.851$, $p=0.001$; $\gamma_{Ni} = -0.863$, $p=0.001$) от содержания в водных объектах тяжелых металлов (свинца и никеля).

Таким образом, установлено снижение числа лейкоцитов в условиях экстремального загрязнения среды у обоих видов лягушек, при этом содержание клеток в крови прудовых было значимо выше, по сравнению с озерными лягушками. Количество эритроцитов в крови двух видов менялось разнонаправленно: у озерных – показатель снижался; у прудовых - повышался.

ГЛАВА 6. Цитогенетическая характеристика лягушек рода *Pelophylax*

Глава посвящена оценке встречаемости микроядер в периферической крови (нормохроматофильных эритроцитах, НХЭ) и костном мозге (полихроматофильных эритроцитах, ПХЭ) *P. ridibundus* и *P. lessonae*, обитающих в водных объектах, группирующихся по гидрохимическому составу.

6.1. Анализ видов микроядер в нормохроматофильных эритроцитах (НХЭ)

В эритроцитах крови озерных лягушек и прудовых лягушек наиболее часто встречались прикрепленные микроядра. Доля разрыхленных, оформленных и палочковидных была значительно меньше. Наиболее крупными были разрыхленные микроядра (6.99 ± 0.32 мкм²). В эритроцитах прудовых в экстремально загрязненных условиях среды сумма НХЭ с микроядрами ($z = 14.16$, $p < 0.001$), а также доли: оформленных – $z = 4.63$, $p = 0.00004$; прикрепленных – $z = 12.98$, $p < 0.001$; палочковидных – $z = 3.77$, $p = 0.00016$; разрыхленных – $z = 4.82$, $p = 0.000001$ микроядер были значимо выше, чем у озерных лягушек.

Таким образом, установлено, что в условиях ухудшения качества среды у озерных и прудовых лягушек наблюдается возрастание суммы клеток с микроядрами, за счет вклада прикрепленных микроядер; по этим показателям прудовые лягушки оказались более реактивным видом, по сравнению с озерными.

6.2. Анализ видов микроядер в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ)

Сумма микроядер в ПХЭ озерных лягушек возрастала по градиенту ухудшения гидрохимических условий среды за счет вклада оформленных и разрыхленных видов микроядер. Соотношение видов микроядер в эритроцитах костного мозга прудовых лягушек различалось в зависимости от уровня загрязненности водной среды. Сумма ПХЭ с микроядрами ($z = 2.39$, $p = 0.016$), а также доли отдельных видов микроядер (оформленные – $z = 9.16$, $p < 0.001$; разрыхленные – $z = 7.29$, $p < 0.001$) в эритроцитах озерных лягушек в экстремально загрязненных условиях водной среды (кластер А) были значимо выше, а доля прикрепленных видов ($z = 5.00$, $p = 0.000001$) ниже, чем в клетках костного мозга прудовых лягушек.

Таким образом, установленное для обоих видов лягушек возрастание доли ПХЭ с микроядрами в условиях ухудшения качества среды, определялось разным вкладом: у озерных лягушек - за счет оформленных и разрыхленных микроядер; у прудовых – за счет прикрепленных. Межвидовые различия в условиях синтопии выражались в повышенной доле ПХЭ у прудовых лягушек за счет вклада микроядер прикрепленного вида.

6.3. Сравнительный анализ видов микроядер в нормохроматофильных (НХЭ) и полихроматофильных (ПХЭ) эритроцитах зеленых лягушек

Соотношение видов микроядер в ПХЭ и НХЭ обуславливалось спецификой гидрохимических условий среды и видовой принадлежностью особей. Так, у озерных лягушек (кластер А) суммарное содержание клеток с микроядрами в крови и костном мозге не различалось. В ПХЭ преобладали оформленные ($z = 22.78$, $p < 0.001$) и разрыхленные ($z = 10.57$, $p < 0.001$) микроядра. В условиях кластера Б в ПХЭ озерных лягушек наблюдалось более высокое содержание оформленных и палочковидных микроядер, доля разрыхленных и прикрепленных микроядер была меньше по сравнению с их содержанием в НХЭ. У

особей кластера Д в ПХЭ доля оформленных была больше, а доли разрыхленных, палочковидных и прикрепленных микроядер меньше по сравнению с НХЭ (рисунок 9).

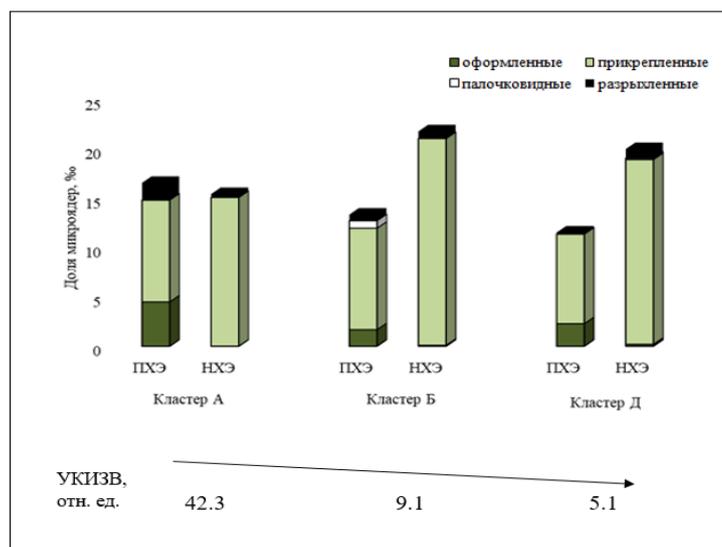


Рисунок 9. Соотношение видов микроядер в эритроцитах крови и костного мозга озерных лягушек в разных условиях среды
А – УКИЗВ = 42.30; Б – УКИЗВ = 9.10; Д – УКИЗВ = 5.10. Стрелка показывает направление градиента УКИЗВ. ПХЭ – полихроматофильные эритроциты; НХЭ – нормохроматофильные эритроциты

У прудовых лягушек (кластер А) суммарное содержание микроядер в крови было выше, чем в костном мозге ($z=11.20$, $p<0.001$) за счет повышенной доли эритроцитов с разрыхленными ($z=4.58$, $p<0.001$) и прикрепленными ($z=11.58$, $p<0.001$) микроядрами. Доля оформленных микроядер в ПХЭ выше, чем в клетках крови. В условиях кластера Б соотношение видов микроядер сохранялось, при этом общее количество клеток с микроядрами в крови и в костном мозге было значительно меньше (рисунок 10).

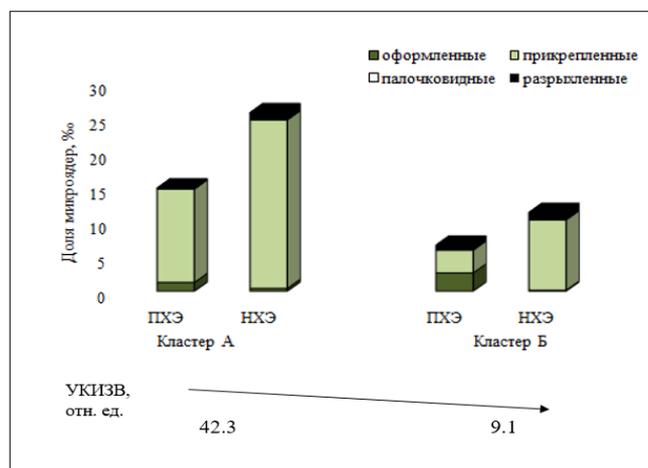


Рисунок 10. Соотношение видов микроядер в эритроцитах крови и костного мозга прудовых лягушек в разных условиях среды
А – УКИЗВ = 42.30; Б – УКИЗВ = 9.10. Стрелка показывает направление градиента УКИЗВ. ПХЭ – полихроматофильные эритроциты; НХЭ – нормохроматофильные эритроциты

Таким образом, соотношение микроядер в клетках разной степени зрелости у обоих видов в экстремальных условиях среды изменялось за счет вклада разрыхленных микроядер, доля которых была выше у озерных лягушек в ПХЭ, а у прудовых в НХЭ.

6.4. Анализ взаимосвязи количества нормохроматофильных (НХЭ) и полихроматофильных (ПХЭ) клеток с микроядрами от гидрохимических условий среды

Возрастание доли микроядер в клетках системы крови лягушек по градиенту химического загрязнения водной среды обуславливалось, как суммарным комплексным загрязнением среды, так и спецификой воздействия конкретных загрязнителей, в первую очередь тяжелых металлов, способных оказывать генотоксическое воздействие на живые организмы. Коэффициентом корреляции Спирмена с учетом поправки Бонферрони выявлена взаимосвязь увеличения частоты ядерных аномалий в эритроцитах разной степени зрелости озерных (таблица 2) и прудовых лягушек (таблица 3) с содержанием в поверхностных водах сульфатных и нитратных ионов и тяжелых металлов.

Таблица 2

Анализ взаимосвязи показателей цитогенетического гомеостаза озерных лягушек от концентрации загрязнителей водной среды обитания

Показатель	Химические загрязнители	ρ – коэффициент корреляции	p -значение*
Полихроматофильные эритроциты (ПХЭ) костного мозга			
Разрыхленные микроядра	нитраты	0.88	0.045
Оформленные микроядра	сульфаты	0.73	0.040
Оформленные микроядра	марганец	-0.69	0.045
Оформленные микроядра	железо	-0.76	0.013
Нормохроматофильные эритроциты (НХЭ) крови			
Палочковидные микроядра	марганец	-0.59	0.006

Примечание: * - В таблице приведены статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони

Содержание тяжелых металлов (Fe, Mn) приводило к снижению доли оформленных микроядер в клетках костного мозга обоих видов. Прудовые лягушки характеризовались более выраженной генетической нестабильностью, по сравнению с озерными, что проявлялось в связи широкого спектра ядерных нарушений с химическими загрязнителями среды обитания, включая нефтепродукты, ионы кобальта, никеля, свинца, цинка, серы (таблица 3).

Таблица 3

Анализ взаимосвязи показателей цитогенетического гомеостаза прудовых лягушек от концентрации загрязнителей водной среды обитания

Показатель	Химические загрязнители	ρ – коэффициент корреляции	p -значение*
1	2	3	4
Полихроматофильные эритроциты (ПХЭ) костного мозга			
Разрыхленные микроядра	нитраты	0.73	0.030
Оформленные микроядра	сульфаты	0.73	0.025
Оформленные микроядра	марганец	-0.69	0.003
Оформленные микроядра	железо	-0.76	0.045

1	2	3	4
Нормохроматофильные эритроциты (НХЭ) крови			
Палочковидные микроядра	кобальт	0.50	0.045
Разрыхленные микроядра	свинец	0.51	0.034
Разрыхленные микроядра	кобальт	0.58	0.006
Сумма микроядер	нефтепродукты	0.65	0.045
Палочковидные микроядра	сульфиды	0.80	<0.001
Палочковидные микроядра	УКИЗВ	-0.44	0.015
Палочковидные микроядра	нефтепродукты	-0.49	0.045
Сумма микроядер	цинк	-0.53	0.025
Сумма микроядер	свинец	-0.57	0.009
Прикрепленные микроядра	свинец	-0.59	0.045
Разрыхленные микроядра	нефтепродукты	-0.60	0.004
Сумма микроядер	кобальт	-0.72	<0.001
Сумма микроядер	никель	-0.72	<0.001
Прикрепленные микроядра	никель	-0.73	<0.001
Прикрепленные микроядра	кобальт	-0.73	<0.001

Примечание: * - В таблице приведены статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони

Таким образом, в условиях комплексного гидрохимического загрязнения среды обитания наблюдалось возрастание генетической нестабильности зеленых лягушек, проявляющееся значительным увеличением доли микроядер оформленного, прикрепленного, разрыхленного и палочковидных видов в эритроцитах разной степени зрелости (ПХЭ и НХЭ).

ГЛАВА 7. Морфофизиологические параметры зеленых лягушек в различных гидрохимических условиях среды

Глава диссертации посвящена оценке индексов органов (печени, почек, сердца, селезенки, гонад, тимуса) для уточнения реакции организма лягушек на особенности гидрохимического состава водной среды.

Озерные лягушки. В условиях ухудшения качества водной среды наблюдалось снижение индекса почек и гонад. При этом в градиенте ухудшения условий среды отмечено возрастание индекса селезенки: у особей кластера Д – в 2.85 раза, кластера Б – в 2.69 раза, кластера А – в 2.64 раза, по сравнению с особями менее загрязненного кластера Г (рисунок 11).

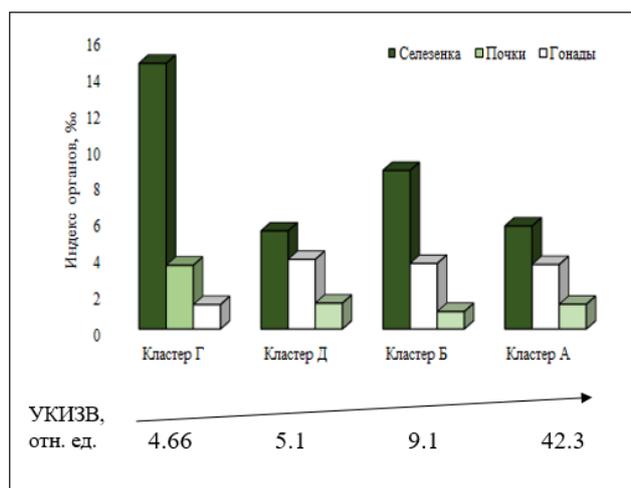


Рисунок 11. Изменение индексов органов озерных лягушек по градиенту ухудшения условий водной среды обитания

Г – УКИЗВ = 4.66; Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А – УКИЗВ = 42.30. Стрелка показывает направление градиента УКИЗВ. Значимые различия по критерию Данна, D. Индекс почек: $D_{Г-А}=4.15$, $p=0.00019$; $D_{Г-Б}=5.10$, $p=0.000002$; $D_{Г-Д}=3.85$, $p=0.00046$. Индекс селезенки: $D_{Г-А}=3.46$, $p=0.0032$; $D_{Г-Б}=3.96$, $p=0.00044$; $D_{Г-Д}=3.98$, $p=0.00041$. Индекс гонад: $D_{Г-А}=3.06$, $p=0.012$; $D_{Г-Д}=3.43$, $p=0.0035$

Индекс тимуса не изменялся. В условиях кластера Б индекс печени и сердца озерных лягушек превышал аналогичный показатель особей, обитающих в менее загрязненной водной среде.

Прудовые лягушки. По градиенту условий среды установлено значимое снижение индекса тимуса и индекса почек, а также возрастание индекса селезенки. У особей кластера Б индекс селезенки был в 5.13 раза, у особей кластера А в 5.72 раза больше, по сравнению с особями менее загрязненного кластера Д (рисунок 12).

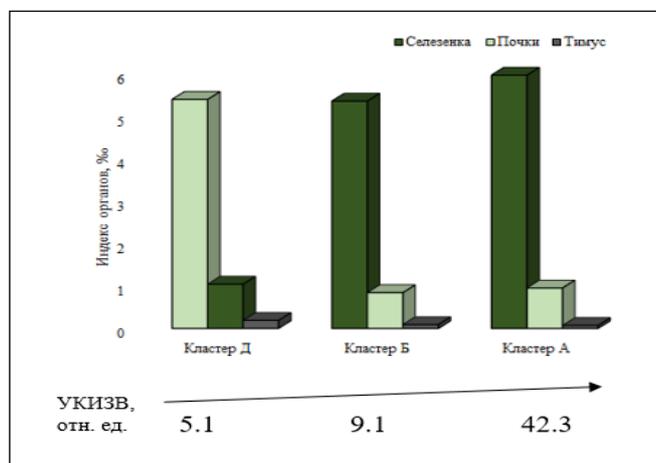


Рисунок 12. Изменение индексов органов прудовых лягушек в градиенте ухудшения условий водной среды обитания

Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А – УКИЗВ = 42.30. Стрелка показывает направление градиента УКИЗВ. Значимые различия по критерию Данна, D. Индекс почек: $D_{Д-А}=5.47$, $p<0.001$; $D_{Д-Б}=5.15$, $p=0.000001$. Индекс селезенки: $D_{Д-А}=6.14$, $p<0.001$; $D_{Д-Б}=3.97$, $p=0.0002$. Индекс тимуса: $D_{Д-А}=3.84$, $p=0.0003$; $D_{Д-Б}=2.93$, $p=0.0085$

Коэффициентом корреляции Спирмена выявлена взаимосвязь изменения морфофизиологических параметров зеленых лягушек с содержанием отдельных загрязнителей в водной среде обитания (таблица 4).

Анализ взаимосвязи морфофизиологических параметров лягушек с гидрохимическими показателями водных объектов

Сравниваемые пары	ρ -коэффициент корреляции	p – значение
<i>Озерные лягушки</i>		
Индекс тимуса, ‰ – концентрация Fe, мг/л	0.57	0.02
Индекс селезенки, ‰ – концентрация Ni, мг/л	0.63	0.01
Индекс почек, ‰ – концентрация Ni, мг/л	-0.54	0.02
Индекс селезенки, ‰ – концентрация S ²⁻ , мг/л	-0.55	0.02
Индекс сердца, ‰ – концентрация Cr, мг/л	-0.60	0.01
Индекс гонад, ‰ – концентрация Co, мг/л	-0.69	0.009
<i>Прудовые лягушки</i>		
Индекс селезенки, ‰ – концентрация Ni, мг/л	0.55	0.01
Индекс печени, ‰ – концентрация NO ₃ ⁻ , мг/л	0.78	0.01
Индекс почек, ‰ – концентрация Cr, мг/л	-0.46	0.02
Индекс почек, ‰ – концентрация Fe, мг/л	-0.47	0.03
Индекс гонад, ‰ – концентрация Co, мг/л	-0.55	0.01
Индекс почек, ‰ – концентрация Ni, мг/л	-0.63	0.01

Таким образом, при ухудшении гидрохимических условий среды у обоих видов лягушек выявлено однонаправленное возрастание индекса селезенки и снижение индекса почек; индексы печени и сердца не изменялись. Индексы гонад и тимуса менялись разнонаправленно: индекс гонад – снижался, индекс тимуса – не изменялся (озерные лягушки); индекс тимуса – снижался, индекс гонад не изменялся (прудовые лягушки). В экстремальных условиях водной среды межвидовые различия в морфофизиологических параметрах проявлялись повышенными значениями индексов печени, сердца, селезенки и пониженным значением индекса почек прудовых лягушек, по сравнению с озерными.

ГЛАВА 8. Накопление металлов тканями и органами зеленых лягушек рода *Pelophylax*

Глава посвящена комплексному исследованию и сравнительной оценке содержания и распределения металлов (Mn, Cu, Cr, Al, Fe, Zn, Sr), играющих ключевую роль в аутэкологических процессах, в органах и тканях (мышцы, кожа, кости, гонады, печень, сердце, селезенка, кровь) озерных и прудовых лягушек, обитающих в водных объектах: оз. Силикатное (кластер Д), оз. Вторчермет (кластер А) заречной части г. Нижнего Новгорода.

В высоких концентрациях металлы обнаружены в селезенке (Cr), костях (Zn, Sr), печени (Cu) озерных лягушек. Динамика накопления металлов органами и тканями озерных лягушек в целом была схожей с прудовыми лягушками, у которых высокие коэффициенты биологического поглощения металлов выявлены для Mn, Sr, Zn (костная ткань), Fe (печень, селезенка), Cu (сердце). У обоих видов амфибий Cu накапливалась в более высоких концентрациях в гемопоэтических тканях, выполняющих функции кровообращения (сердце, печень, селезенка). Отметим, что в водоеме повышенного загрязнения (оз. Вторчермет) у прудовых лягушек отмечено уменьшение значения коэффициентов накопления (Кн), рассчитанных по валовому содержанию концентрации металлов в организме, относительно загрязнителей водной среды: Mn, Cu, Fe, Sr. Этот факт свидетельствует о способности бесхвостых амфибий не допускать чрезмерного накопления микроэлементов в организме, что является адаптацией к существованию в экстремальных гидрохимических условиях среды.

Видовые закономерности накопления металлов из воды представлены по убыванию в виде следующих рядов активности:

прудовые лягушки: Zn > Cr > Al > Cu > Fe > Sr > Mn;
озерные лягушки: Fe > Zn > Mn > Cu > Cr > Al > Sr.

Приоритетное поступление Cr, Mn, Al и Sr происходило из водной среды через кожу (перкутанный путь). Активное накопление Zn осуществлялось преимущественно через желудочно-кишечный тракт (энтеральный путь), что подтверждалось высокими значениями КБП Zn для печени прудовых (КБП = 2724.4) и озерных (КБП = 2268.18) лягушек.

Накопление металлов в организме амфибий оказывало существенное влияние на морфофизиологические и цитогенетические показатели обоих видов. При этом для озерных лягушек установлены более выраженные изменения индексов органов (печень, почки, тимус, сердце) значения которых коррелировали с содержанием в тканях/органах ионов Mn, Cu, Sr, Zn, Cr и Al. Для прудовых лягушек установлена корреляционная взаимосвязь биоаккумуляции металлов в тканях и органах с содержанием в крови эритроцитов и клеток с микроядрами.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе выполнения работы результаты позволяют прийти к заключению о существовании определенных закономерных изменений в популяциях зеленых лягушек рода *Pelophylax* урбанизированных территорий. Сравнение эколого-физиологических механизмов цитогенетического гомеостаза двух видов зеленых лягушек показывает, что более существенные различия проявляются в экстремально загрязненных условиях среды. Внутривидовая изменчивость гематологических показателей лягушек, группирующихся в кластерах разного гидрохимического состава, свидетельствует о снижении интенсивности лейко- и эритропоза по градиенту ухудшения водной среды обитания. В экстремальных условиях среды прудовые лягушки характеризуются более выраженной интенсификацией кроветворения.

Генетическая нестабильность, оцениваемая по индукции микроядер амфибий импактных территорий, определяется составом, концентрацией загрязнителей водной среды обитания и таксономической принадлежностью животных (даже в пределах одного рода). Анализ суммарного содержания микроядер показывает высокую частоту встречаемости микроядер в эритроцитах крови и костного мозга у особей, обитающих в более загрязненных условиях среды. У обоих видов амфибий по градиенту ухудшения среды выявлена индукция микроядер в клетках крови и костного мозга, более выраженная у прудовых лягушек. Маркером средового стресса является увеличение в клетках разной степени зрелости микроядер прикрепленного вида. В гетерогенных клетках костного мозга, с высокой скоростью обновления, преимущественно встречаются незрелые эритроциты с микроядрами оформленного типа. По-видимому, в период дальнейшего митотического деления и созревания эритроцитов, происходит слияние и трансформация микроядер, что приводит к преобладанию в кровяном русле, в первую очередь, эритроцитов с микроядрами прикрепленного и разрыхленного видов. Выявлены межвидовые различия по суммарному содержанию эритроцитов с микроядрами и соотношению микроядер в костном мозге лягушек двух видов в градиенте ухудшения водной среды обитания и в условиях синтопического обитания. Определяющими факторами нарушения цитогенетического гомеостаза амфибий являются, как химическая природа конкретного загрязнителя, так и их суммарное воздействие.

Сравнительный анализ изменения фиксированного набора показателей двух видов зеленых лягушек в зоне экологической толерантности по гидрохимическому градиенту ухудшения среды обитания показывает, что из десяти цитогенетических признаков – семь

изменяются однонаправленно (70.0%), а три – разнонаправленно (30.0%); из шести морфофизиологических признаков – четыре изменяются однонаправленно (66.6%), а два – разнонаправленно (33.3%) (таблица 5).

Таблица 5

Сравнительный анализ показателей *P. ridibundus* и *P. lessonae* в зоне экологической толерантности по гидрохимическому градиенту ухудшения среды обитания

Показатели	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. lessonae</i>
Зона экологической толерантности в градиенте водных объектов	Встречаются на всем диапазоне УКИЗВ 4.66 – 42.30	Встречаются в водных объектах с УКИЗВ > 5.0
Гематологические показатели		
Содержание лейкоцитов (тыс/мм ³)	снижение	снижение
Содержание эритроцитов (тыс/мм ³)	снижение	повышение
Цитогенетические показатели		
Доля НХЭ с прикрепленными микроядрами	повышение	повышение
Доля НХЭ с палочковидными микроядрами	снижение	снижение
Доля ПХЭ с оформленными микроядрами	повышение	повышение
Доля ПХЭ с прикрепленными микроядрами	повышение	повышение
Доля ПХЭ с палочковидными микроядрами	без изменений	без изменений
Сумма НХЭ с микроядрами в крови	повышение	повышение
Сумма ПХЭ с микроядрами в костном мозге	повышение	повышение
Доля НХЭ с оформленными микроядрами	снижение	без изменений
Доля НХЭ с разрыхленными микроядрами	снижение	без изменений
Доля ПХЭ с разрыхленными микроядрами	повышение	снижение
Морфофизиологические показатели		
Индекс печени, ‰	без изменений	без изменений
Индекс почек, ‰	снижение	снижение
Индекс сердца, ‰	без изменений	без изменений
Индекс селезенки, ‰	повышение	повышение
Индекс гонад, ‰	снижение	без изменений
Индекс тимуса, ‰	без изменений	снижение

Таким образом, для целей биомониторинга могут быть рекомендованы оба вида зеленых лягушек и оба набора цитогенетических и морфофизиологических показателей. Анализ морфофизиологических показателей позволяет дополнить наши представления о связи химических аномалий окружающей среды с генетической нестабильностью живых организмов. У амфибий лимфоидная и кроветворная системы объединены в единый лимфомиелоидный комплекс, в котором органы и ткани тесно связаны между собой сетью кровеносных и лимфатических сосудов, обеспечивающей обмен клеточными элементами. От степени согласованной работы лимфоидных органов и их клеток зависит быстрота и сбалансированность иммунного ответа на ксенобиотики, а, следовательно, и цитогенетическая стабильность организма. При разнообразии конкретных путей и механизмов приспособления видов к среде обитания им, как целостной экологической группе, свойственна единая адаптивная стратегия, реализуемая в виде уникального комплекса морфофизиологических и цитогенетических адаптаций, дополняющих друг друга и обеспечивающих существование и выживание в стрессовых условиях водной среды.

Многолетний цитогенетический мониторинг позволил проследить за развитием генотоксических эффектов у индикаторных видов амфибий и охарактеризовать водную среду их обитания как неблагоприятную. Полагаем, что дальнейшее изучение генетической нестабильности видов на молекулярном уровне приведет к более глубокому пониманию механизмов цитогенетического гомеостаза, обеспечивающего выживание и сохранение видов в условиях нарастающей антропогенной нагрузки.

ВЫВОДЫ

1. Химический анализ водной среды с расчетом удельного индекса загрязненности воды (УКИЗВ) и последующей ординацией на основе показателей гидрохимического состава позволил выделить пять кластеров, основными загрязнителями в которых являлись ионы меди, марганца, хрома, цинка, кобальт, железо, никель, соединения серы в концентрациях, превышающих ПДКрыб-хоз. Определены в порядке возрастания в градиенте химического загрязнения водной среды наименее загрязненные водные объекты, входящие в: кластеры Г (УКИЗВ=4.66), Д (УКИЗВ=5.10), Б (УКИЗВ=9.10) и В (УКИЗВ=26.61) и А (УКИЗВ=42.30) с экстремальным загрязнением среды. Выявлено преобладание *P. ridibundus* в градиенте УКИЗВ водных объектов урбанизированной территории, что иллюстрировало более широкий диапазон их толерантности по сравнению с *P. lessonae*.

2. Показано, что озерная лягушка Нижегородской области представлена двумя генетическими дифференцированными криптическими формами «западной» (*P. ridibundus*) и «восточной» (анатолийской лягушкой *P. cf. bedriagae*). Соотношение генетически «чистых» *P. ridibundus* и особей с интрогрессивной мтДНК *P. cf. bedriagae* в выборке озерных лягушек оз. Силикатное равно 1:1. Прудовая лягушка (оз. Вторчермет) характеризуется генетически «чистыми» видоспецифическими для *P. lessonae* маркерами.

3. Выявлено снижение числа лейкоцитов и эритроцитов в крови *P. ridibundus*, коррелирующее с повышенным содержанием в поверхностных водах ионов кобальта, никеля и нитратов. В экстремальных условиях водной среды содержание в крови *P. lessonae* лейкоцитов и эритроцитов повышалось, что свидетельствовало о выраженной интенсификации кроветворения.

4. По градиенту ухудшения качества среды в крови и костном мозге амфибий установлено возрастание суммарного количества клеток с микроядрами и доли клеток с микроядрами прикрепленного вида. В клетках костного мозга у озерных лягушек в экстремальных условиях среды преобладали оформленные и разрыхленные микроядра, образующиеся вследствие отставания отдельных хромосом, в отличие от прудовых лягушек, у которых преобладали прикрепленные микроядра, формирующиеся за счет фрагментации генетического материала. Соотношение микроядер в клетках разной степени зрелости обоих видов лягушек в экстремально загрязненных условиях среды различалось: в костном мозге озерных преобладали оформленные и разрыхленные микроядра, прудовых – оформленные; в крови озерных лягушек преобладали – прикрепленные, прудовых – прикрепленные и разрыхленные микроядра. Выявлена взаимосвязь увеличения частоты ядерных аномалий в костном мозге озерных и прудовых лягушек с содержанием в поверхностных водах сульфатных и нитратных ионов; тяжелых металлов (Fe, Mn, Zn, Co, Pb, Ni).

5. Выявлено изменение морфофизиологических параметров прудовых и озерных лягушек, проявляющиеся возрастанием индекса селезенки и снижением индекса почек, при ухудшении гидрохимических условий среды. Выявлена корреляционная взаимосвязь изменения морфофизиологических параметров зеленых лягушек от содержания в воде тяжелых металлов (Ni, Fe, Cr, Co).

6. Выявлено высокое содержание металлов в селезенке (Cr), костях (Zn, Sr), печени (Cu) *P. ridibundus*. У *P. lessonae* высокие коэффициенты биологического поглощения тяжелых металлов выявлены для Mn, Sr, Zn (костная ткань), Fe (печень, селезенка), Cu (сердце). Видовые закономерности накопления металлов из воды, оцениваемые по установленным коэффициентам накопления (КН), расположились по убыванию в виде следующих рядов активности: *P. lessonae*: Zn > Cr > Al > Cu > Fe > Sr > Mn; *P. ridibundus*: Fe > Zn > Mn > Cu > Cr > Al > Sr.

СПИСОК ТРУДОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. Romanova, E.B. Leukocytic indices and micronucleus in erythrocytes as population markers of the immune status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) living in various biotopic conditions / E.B. Romanova, K.V. Shapovalova, **E.S. Ryabinina**, D.B. Gelashvili // *Biology Bulletin*. – 2019. – Vol. 46. – № 10. – P. 1230–1238.
2. Romanova, E.B. Cytogenetic Approach to Primary Assessment of Habitat Quality / E.B. Romanova, **E.S. Ryabinina** // *Opera Med Physiol*. – 2018. – V. 4. № 1. – P. 19–22.
3. Romanova, E.B. Body Size, Age, Phenetic, Morphophysiological, and Cytogenetic Characteristics of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Ranidae) Populations Inhabiting Polluted Thermal Reservoirs of Kamchatka / E.B. Romanova, **E.S. Ryabinina**, S.M. Lyapkov // *Biology Bulletin*. – 2021. – Vol. 48. – № 7. – P. 1004–1016.
4. Romanova, E.B. Heavy Metal Accumulation in the tissues and organs of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) and *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) (Amphibia: Ranidae) inhabiting the waterbodies of Nizhny Novgorod / E.B. Romanova, **E.S. Ryabinina**, A.V. Boryakov // *Biology Bulletin*. – 2021. – Vol. 48. – № 10. – P. 130–137.
5. Romanova, E.B. Cytogenetic effects of complex pollution of water bodies of the Nizhni Novgorod region / E.B. Romanova, **E.S. Ryabinina** // *Opera Medica et Physiologica*. – 2020. – № 1. – Vol. 6. – P. 20–26.
6. Romanova, E.B. Ecological and Physiological Analysis of Immune Responses of *Pelophylax ridibundus* and *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae) in Anthropogenically Transformed Territories / E.B. Romanova, S.A. Lukonina, **E.S. Ryabinina**, V.D. Plotnikova // *Biology Bulletin*. – 2023. – Vol. 50. – № 10. – P. 2719–2729.

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

7. Романова, Е.Б. Лейкоцитарный состав крови и микроядра в эритроцитах амфибий загрязненных водных объектов Нижегородской области / Е.Б. Романова, К.В. Шаповалова, **Е.С. Рябинина** // *Принципы экологии*. – 2018. – № 2. – С. 125–139.
8. Романова, Е.Б. Скрининговый цитогенетический метод учета микроядер в крови прудовых лягушек как индикатор состояния водных биологических ресурсов / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // *Вестник Камчатского государственного технического университета*. – 2019. – Вып. 49. – С. 43–49.
9. Романова, Е.Б. Сравнительный анализ окислительной модификации белков сыворотки крови как оценка адаптации озерных и прудовых лягушек (Amphibia: Ranidae) Нижегородской области к разным гидрохимическим условиям среды / Е.Б. Романова, К.В. Шаповалова, **Е.С. Рябинина** // *Проблемы региональной экологии*. – 2020. – № 1. – С. 5–11.

Статьи, материалы, труды, тезисы международных и региональных конференций

10. Романова, Е.Б. Анализ микроядер в эритроцитах амфибий, обитающих в водоемах урбанизированной территории Нижегородской области / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // *Индикация состояния окружающей среды: теория, практика, образование*. М.: Буки-В, 2017. – С. 344–349.
11. Романова, Е.Б. Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами у амфибий, обитающих в различных экологических условиях / Е.Б. Романова, К.В. Шаповалова, **Е.С. Рябинина** // *Техногенные системы и экологический риск*. 1-ая Международная (XIV Региональная) научная конференция. Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2017. – С. 158–161.
12. Романова, Е.Б. Адаптивные реакции системы крови амфибий к разным гидрохимическим условиям водной среды обитания / Е.Б. Романова, К.В. Шаповалова, **Е.С.**

Рябинина // Современные проблемы биологической эволюции: 3-я Межд. конф. к 130-летию со дня рождения Н.И. Вавилова и 110-летию со дня основания Государственного Дарвинского музея. М.: ГДМ, 2017. – С. 219–222.

13. Романова, Е.Б. Индукция микроядер и окислительная модификация белков сыворотки крови видов-индикаторов антропогенно-трансформированных территорий / Е.Б. Романова, К.В. Шаповалова, **Е.С. Рябинина** // Научное обозрение. Биологические науки. – 2017. – № 5 – С. 33–37

14. Романова, Е.Б. Индукция микроядер у амфибий урбанизированных и антропогенно-нарушенных территорий / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Экология: факты, гипотезы, модели. Материалы конф. молодых ученых, посвященной памяти Н.В. Глотова. ИЭРиЖУрО РАН. - Екатеринбург: «Руэкшен», 2018. – С. 129–132.

15. Романова, Е.Б. Цитогенетические характеристики клеток костного мозга и эритроцитов крови озерных лягушек водоемов Нижегородской области / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Материалы докладов XXIII Нижегородской сессии молодых ученых (технические, естественные, математические науки). – Княгинино: НГИЭУ, 2018. –Том 2. – С. 152–153.

16. Романова, Е.Б. Индикация состояния водных объектов Нижегородской области с использованием онтогенетических популяционных характеристик видов-зооиндикаторов / Е.Б. Романова, К.В. Шаповалова, **Е.С. Рябинина** // Экология речных бассейнов: Труды 9-ой Международной научно-практической конференции. Владимир: «Аркаим», 2018. – С. 445–451.

17. Романова, Е.Б. Оценка нестабильности генома методом анализа микроядер в эритроцитах амфибий трансформированных экосистем Нижегородской области / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Биоразнообразии и антропогенная трансформация экосистем. Всерос.науч.-практ. конф., посвященной памяти проф. А.И. Золотухина и 85-летию Балашовского института, 17-18.05.2018 г. Балашов / Под ред. А.А. Овчаренко. – Саратов: Саратовский источник, 2018. – С. 168–172.

18. Романова, Е.Б. Цитогенетическая нестабильность природных популяций амфибий в условиях техногенных систем / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Биология - наука XXI века: Сб. тезисов 22-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых, 23-27 апреля, 2018, г. Пущино, 2018. – С. 399–400.

19. Романова, Е.Б. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность популяций амфибий Нижегородской области / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 71-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 17–20 апреля 2018 г.). Н. Новгород, Университет Лобачевского, 2018. – С. 193.

20. Romanova, E.B. Use of the micronucleus test for the assessment of the ecological state of the water objects of the urban areas of Nizhny Novgorod region / E.B. Romanova, **E.S. Ryabinina** // Biodiversity and Wildlife Conservation Ecological Issues. Abstract Book of the 2nd International Young Scientists Conference, Dedicated to the 75th Anniversary of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia (5-7 October, 2018, Tsaghkadzor, Armenia). – Yerevan, 2018, P. 39–40.

21. Романова, Е.Б. Сравнительные данные по содержанию микроядер в эритроцитарных клетках прудовых лягушек, обитающих в загрязненной водной среде / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Актуальная биотехнология. Воронеж: ООО «Биоактуаль», 2019. – С. 490–494.

22. **Рябинина, Е.С.** Биоаккумуляция тяжелых металлов в тканях озерных лягушек городского водоема / **Е.С. Рябинина**, Е.Б. Романова, А.В. Боряков // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 72-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых, 23-26 апр. 2019. Нижний Новгород: Университет Лобачевского, 2019. – С. 192.

23. Романова, Е.Б. Исследование цитогенетической стабильности зеленых лягушек Нижегородской области микроядерным тестом / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Современная герпетология: проблемы и пути решения. Материалы Второй международной конференции герпетологов России и сопредельных стран, посвященной 100-летию герпетологии Зоологического института РАН (Санкт-Петербург, Россия, 25–27 ноября 2019). Санкт-Петербург: Зоологический институт РАН, 2019. – С. 72.

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

25. Романова, Е.Б. Цитогенетическая нестабильность и накопление тяжелых металлов в тканях озерных лягушек урбанизированной территории / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина**, К.В. Шаповалова, А.В. Боряков // Вода: химия и экология. –2019. – № 10–12. – С. 93–98.

26. Романова, Е.Б. Динамика цитогенетических эффектов в популяции прудовых лягушек урбанизированной территории / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Экология и природопользование: прикладные аспекты: материалы X Международной научно-практической конференции. Уфа: Изд-во БГПУ, 2020. – С. 246–251.

27. Романова, Е.Б. Аккумуляция тяжелых металлов индикаторными видами амфибий / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина**, А.В. Боряков // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Н. Новгород. Университет Лобачевского, 2020. – С. 182.

28. Романова, Е.Б. Микроядерный тест как модель мониторинга генотоксического загрязнения водной среды / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Вопросы герпетологии: VIII съезд Герпетологического общества имени А.М. Никольского при РАН «Современные герпетологические исследования Евразии». Москва: КМК, 2021. – С. 226–228.

29. Романова, Е.Б. Оценка рисков негативного воздействия гидрохимического загрязнения на генетический аппарат клеток зооиндикаторов микроядерным тестом / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Экология речных бассейнов. Владимир: Аркаим. г. Владимир, 2021. – С. 227–234.

30. Романова, Е.Б. Цитогенетические эффекты комплексного загрязнения водных объектов Нижегородской области за четыре года исследования / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижний Новгород, ННГУ, 2021. – С. 188.

31. Плотникова, В.Д. Иммуноцитологические эффекты комплексного загрязнения водных объектов Нижегородской области / В.Д. Плотникова, Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 75-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижний Новгород, 19–22 апреля 2022 г. Н. Новгород, 2022. – С. 169.

32. Плотникова, В.Д. Иммуногематологические аспекты адаптации зеленых лягушек рода *Pelophylax* в условиях средового стресса / В.Д. Плотникова, **Е.С. Рябинина**, Е.Б. Романова, // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 76-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 11–14 апреля 2023 г.). Н. Новгород, Университет Лобачевского, 2023. – С. 254.

33. **Рябинина, Е.С.** Межвидовые различия цитогенетического гомеостаза амфибий в сходных гидрохимических условиях среды / **Е.С. Рябинина**, Е.Б. Романова // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 76-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 11–14 апреля 2023 г.). Н. Новгород, Университет Лобачевского, 2023. – С. 275.

34. Романова, Е.Б. Оценка цитогенетических последствий антропогенного загрязнения водных объектов исследования / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2023. Севастополь: СевГУ, 2023. – С. 88–93.

35. Романова, Е.Б. Цитогенетические изменения в крови зеленых лягушек, обитающих в сходных гидрохимических условиях среды / Е.Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Медико-физиологические проблемы экологии человека: Материалы IX Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 35-летию Ульяновского государственного университета (17-19 октября 2023 г.). Ульяновск: УлГУ, 2023. – С. 296–299.

Учебное пособие

36. Романова, Е.Б. Методы оценки цитогенетических эффектов водной среды с использованием амфибий / Е. Б. Романова, **Е.С. Рябинина** // Экологический мониторинг. Часть XI: Учебное пособие. Под ред. Д.Б. Гелашвили. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2023. – С. 61–69.