

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

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

На правах рукописи

Рябинина Елена Сергеевна

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

1.5.15. Экология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Романова Елена Борисовна

Нижегород
2024

О Г Л А В Л Е Н И Е

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Цитогенетические методы индикации экологической напряженности в водных и наземных экосистемах	12
1.1. Цитогенетические аномалии в соматических животных клетках	12
1.2. Микроядерный тест – биомаркер генетической нестабильности и современный инструмент оценки интегрирующего эффекта антропогенных факторов	20
СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
2.1. Характеристика районов и объектов исследования	28
2.2. Гидрохимический анализ исследованных водных объектов	32
2.3. Видовая идентификация зеленых лягушек рода <i>Pelophylax</i>	33
2.4. Оценка общего числа лейкоцитов и эритроцитов в крови лягушек рода зеленых лягушек	35
2.5. Микроядерный тест	36
2.6. Анализ морфофизиологических параметров лягушек по индексам органов	38
2.7. Определение содержания металлов в тканях зеленых лягушек	39
2.8. Статистическая обработка	39
ГЛАВА 3. Гидрохимический анализ и характеристика абиотических условий обитания зеленых лягушек Нижегородской области	41
ГЛАВА 4. Молекулярно-генетическая идентификация вида зеленых лягушек	55
ГЛАВА 5. Гематологические показатели зеленых лягушек рода <i>Pelophylax</i>, обитающих в различных гидрохимических условиях среды	61

ГЛАВА 6. Цитогенетическая характеристика лягушек рода <i>Pelophylax</i>	70
6.1. Анализ видов микроядер в нормохроматофильных эритроцитах (НХЭ)	71
6.2. Анализ видов микроядер в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ)	78
6.3. Сравнительный анализ видов микроядер в нормохроматофильных эритроцитах (НХЭ) и полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) зеленых лягушек	82
6.4. Анализ взаимосвязи количества нормохроматофильных (НХЭ) и полихроматофильных (ПХЭ) клеток с микроядрами от гидрохимических условий среды	86
ГЛАВА 7. Морфофизиологические параметры зеленых лягушек в различных гидрохимических условиях среды	90
ГЛАВА 8 Накопление металлов тканями и органами зеленых лягушек рода <i>Pelophylax</i>	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119
ПРИЛОЖЕНИЕ	142

ВВЕДЕНИЕ

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 и др. 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 криптоических 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; Северцова и др., 2013; Banks et al., 2017; 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 аутоэкологический 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 Пушинской школе-конференции молодых ученых, 23-27 апреля, 2018, г. Пушино, 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.

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.

1.1. Цитогенетические аномалии в соматических животных клетках

Впервые микроядра были обнаружены в эритроцитах и получили название – тельца Жолли, поскольку были открыты американским учёным Уильямом Хауэллом и французским исследователем Джастином Жолли (Jolly, 1905). В конце XIX и в начале XX многие гематологи констатировали, что некоторые вещества, вводимые в организм, могут вызвать резкое повышение числа эритроцитов с тельцами Жолли. Кроме того, было установлено, что помимо телец Жолли, ядерный материал мог выглядеть в виде зернистости или колец, что зависело как от способа фиксации и окраски эритроцитов, так и от видов заболевания или воздействия на организм (Гольдберг, 1980). Тельца Жолли имели ядерное (хроматиновое) происхождение и представляли собой небольшие образования округлой формы, окрашивающиеся в тон хроматина, большей частью единичные, расположенные эксцентрично или в центре эритроцитов, реже встречающиеся в количестве двух-трех в клетке. Эритроциты с тельцами Жолли относили к группе регенеративных форм клеток, появление которых свидетельствует

либо о компенсаторных изменениях эритропоэза, либо о нарушении созревания клеток эритроидного ряда в костном мозге (Воробьев, 1985).

Позднее было установлено, что микроядра – являются патологической структурой и могут наблюдаться в клетках любых тканей, это фрагмент генетического материала в эукариотической клетке, не содержащий полного генома, необходимого для ее выживания (Жулева, Дубинин, 1994; Захаров и др., 1996; Логинов, 2004; Манских, 2006; Кузина, 2011; Кривцова и др., 2021; Крюков, 2023; Luzhna et al., 2013; Mansi et al., 2014 и др.). Микроядра формируются 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). Кроме того, микроядра могут быть следствием амплификации ДНК, наблюдаемой при онкогенезе, в результате которой возникают так называемые двойные минутные хромосомы, которые затем удаляются из клетки (Araldi et al., 2015, Крюков, 2023)

Наличие микроядер в клетках, чаще, рассматривается как морфологический маркер генетической нестабильности (Fenech et al., 2011). Однако, согласно последним данным, сами микроядра также могут являться источником возникновения дополнительной генетической нестабильности. Характерные для микроядер структурные дефекты вызывают нарушение таких ключевых процессов, как репарация и репликация в микроядре, что, в свою очередь, приводит к накоплению множественных повреждений ДНК (Hatch et al., 2013). В случае, если клетка с микроядром продолжает продвижение по клеточному циклу, генетический материал микроядра может быть инкорпорирован в ядро дочерней клетки с привнесением множественных локальных мутаций (Crasta et al., 2012; Zhang et al., 2015).

Причины возникновения и формирование микроядер. Изучением процесса формирования микроядер занимаются многие исследователи (Кисурина-Евгеньева и др., 2016; Бродский и др., 2020; Чередниченко, 2020; Luzhna et al., 2013; Hayash, 2016; Araldi et al., 2015; Fagbenro et al., 2019;

Sommer et al., 2020 и др.). Микроядра образуются в процессе клеточных делений. Они возникают из фрагментов хромосом, которые лишены центромер и поэтому исключаются из клеточных ядер в момент деления клеток. В ходе митоза этот материал попадает только в одну из дочерних клеток (Ковалева, 2008; Guo et al., 2019). В последствии этот генетический материал может быть включенным в основное ядро или сформировать одно или несколько мелких ядер, так называемых микроядер, которые могут состоять из ацентрических фрагментов, возникшей из одной хромосомы (так называемый кластогенный эффект) или могут быть образованы целой хромосомой вследствие не расхождения, вызванного дефектами веретена деления (так называемый анеугенный эффект) (Басыйров, Рахимов, 2005).

Микроядра образуются при перемещении абберантных хроматиновых структур из ядра в цитоплазму. В культивируемых клетках заключение хромосомного материала в отдельную оболочку может происходить либо благодаря отпочкованию части ядерного материала во время фазы синтеза (S-фаза) клеточного цикла, либо благодаря конденсации ядерной оболочки вокруг не разошедшихся хромосом после завершения митоза (Shimizu et al., 1998; Бродский и др., 2012). В большинстве случаев микроядра возникают при замедленном расхождении хромосом к полюсам делящейся клетки (Cimini, 2005; Бродский и др., 2012). При нормальном митозе сестринские хроматиды расходятся к разным полюсам. Движение идет в сторону того полюса, от которого формируется пучок кинетохорных микротрубочек заякоренный фиброзной короной кинетохора хроматиды (рисунок 1.1).

Патология митоза развивается при нарушении нормального течения митотического деления и приводит к возникновению клеток с несбалансированными кариотипами, следовательно, ведёт к развитию мутаций и хромосомных aberrаций. В нормальных тканях патология встречается в незначительных количествах. Условно различают патологию митоза функционального и органического типа. К функциональным нарушениям относят, например, гипореактивность вступающих в митоз

клеток – снижение реакции на физиологические регуляторы, определяющие интенсивность пролиферации нормальных клеток.

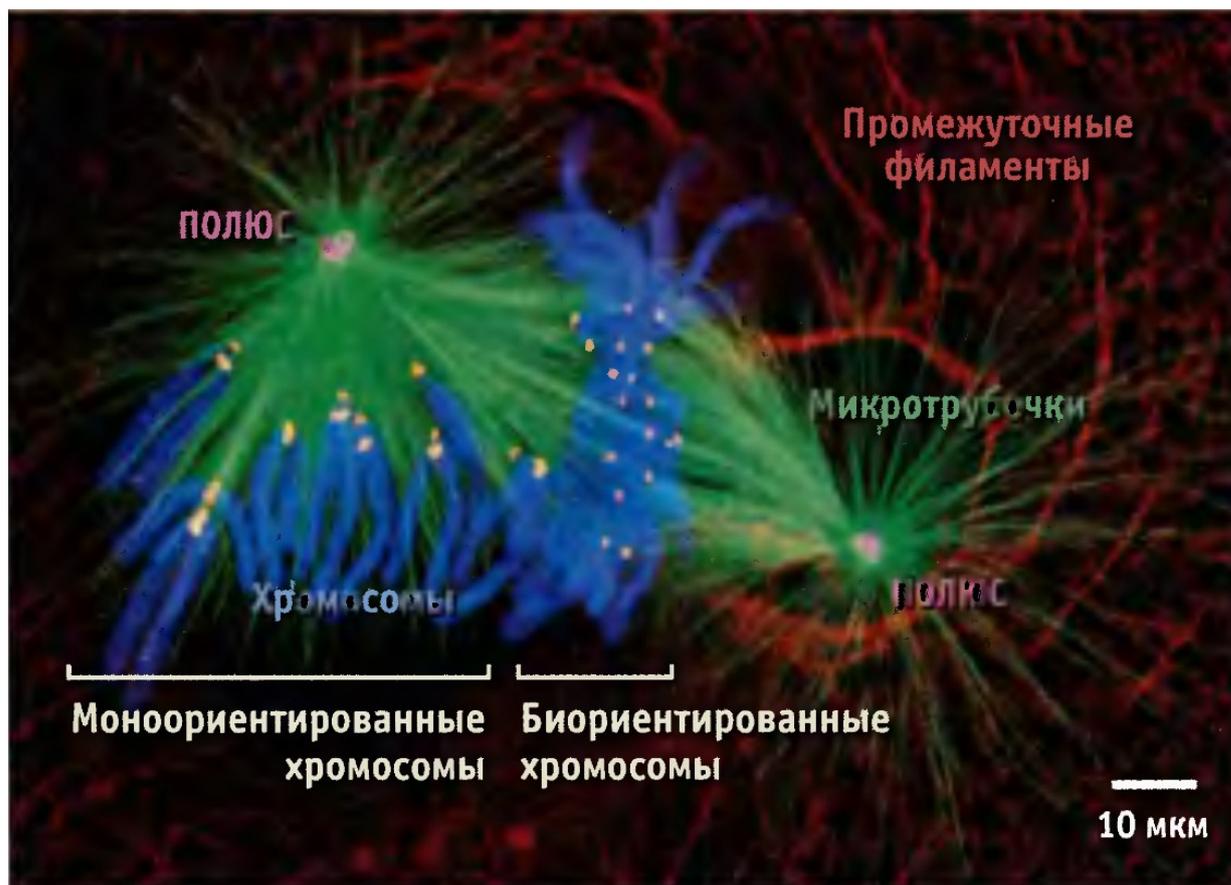


Рисунок 1.1. Метафаза митоза (Льюин и др., 2012)

Органические нарушения возникают при повреждении структур, участвующих в митотическом делении (хромосомы, митотический аппарат, клеточная поверхность), а также при нарушении процессов, связанных с данными структурами (репликация ДНК, образование веретена деления, движение хромосом, цитокinesis (Алов, 1972; Morgan, 2007).

На основании морфологических признаков и цитохимических нарушений митотического процесса выделяют основных группы патологии митоза, приводящие к индукции микроядер: патология, связанная с повреждением хромосом; патология, связанная с повреждением митотического аппарата; нарушение цитокinesis (Алов, 1972; Morgan, 2007).

Так, например, фрагментация хромосом возникает в результате воздействия на нормальные клетки ионизирующего излучения или мутагенов.

Фрагменты могут быть одиночными, парными и множественными. Те из них, которые лишены центромерного участка, не участвуют в метакинезе, и, соответственно, не расходятся к полюсам деления в анафазе. При массовой фрагментации хромосом (пульверизация) большинство фрагментов также беспорядочно рассеиваются в цитоплазме и не участвуют в метакинезе. В итоге часть фрагментов хромосом может попасть в одно из дочерних ядер, либо резорбироваться, либо образовать обособленное микроядро. Кроме того, отдельные фрагменты обладают способностью воссоединяться своими концами, причём подобные воссоединения носят случайный характер и приводят к хромосомным абберациям (Алов, 1972; Кривцова и др., 2021; Morgan, 2007).

Отставание хромосом в метакинезе и при расхождении к полюсам возникает при повреждении хромосом в области кинетохора. Поврежденные хромосомы пассивно «дрейфуют» в цитоплазме и в итоге либо разрушаются и элиминируются из клетки, либо случайным образом попадают в одно из дочерних ядер, либо образуют отдельное микроядро. Отстающая хроматида, не будучи включенной в ядро одной из дочерних клеток дает начало микроядру. На стадии телофазы эти фрагменты могут включаться в ядра дочерних клеток или образовывать одиночные, или множественные микроядра в цитоплазме. Отставание хромосом наблюдается в культурах ткани опухолевых клеток, а также в экспериментах, в ходе которых кинетохоры хромосом облучались пучком ультрафиолетовых лучей (Алов, 1972; Morgan, 2007).

Колхициновый митоз или к-митоз – одна из форм патологии митоза, связанная с повреждением митотического аппарата вследствие воздействия статмокинетических ядов (колхицина, колцемида, винбластина, винкристина, аценафтена, нокодазол, метанола и др.). В результате воздействия ядов митоз задерживается на стадии метафазы в связи с дезорганизацией различных компонентов митотического веретена деления: центриолей, микротрубочек, кинетохоров. Повреждения также затрагивают клеточное ядро, плазмалемму,

различные внутриклеточные органоиды (митохондрии, хлоропласты, аппарат Гольджи). Действие ядов усиливает спирализацию хромосом, что приводит к их укорочению и утолщению, возможному набуханию и слипанию хромосом. (Алов, 1972; Концевая, 2021). Как следствие, происходят хромосомные aberrации, образуются микроядра в результате фрагментации или отставания хромосом, развивается анеуплоидия – изменение кариотипа, при котором число хромосом в клетках не кратно гаплоидному набору (n) (Алов, 1972).

Образование микроядер из фрагментов хромосом происходит при перемещении aberrантных хроматиновых структур из ядра в цитоплазму. В зависимости от состава хроматина микроядра делятся на центромер-позитивные (C^+) и центромер-негативные (C^-) (Lindberg et al., 2008). Спонтанное образование микроядер происходит при некорректном выстраивании хромосом в метафазе, при запаздывании хромосом в расхождении и при дефектах формирования хромосомных мостиков на поздних стадиях митоза, также микроядра могут образоваться из микроядер, содержащихся в материнской клетке, из ядерных фрагментов, которые образуются при митозе, и из хромосом, вытолкнутых из ядра с последующим их включением в дочернюю клетку (Rao et al., 2008).

Показано, что микроядра могут образовываться в фазе синтеза ДНК из ядерных почек, а также когда клетка избавляется от избытка ДНК (избыточная амплификация, реверсия культур клеток опухоли путем экскреции онкогенов) (Ингель, 2006). Таким образом, микроядро – это свидетельство количественных изменений ДНК в живой клетке. Микроядра часто встречаются при различных заболеваниях, и в результате изменения условий существования организма. В различных исследованиях показано, что такие нарушения могут быть связаны с широким спектром факторов, начиная от воздействия тяжёлых металлов (Атоянц и др., 2012; Томилин и др., 2015; Крюков, 2018; Крюков, 2020; Крюков и др., 2023), действия ионизирующего излучения (Шмакова и др., 2006; Береснева и др., 2008; Васильев и др., 2009; Привалов, Панкратов, 2020), действия КВЧ-излучения (Крюков и др., 2022) и

заканчивая вирусными инфекциями (Трофимов, 2013; Мицура, Мельнов, 2014; Тагаев, 2017; Агафонова и др., 2022 и др.).

Дальнейшие преобразования микроядер в клетке. Выявляют несколько путей развития микроядра в клетке (King, 2008; Бродский, 2012). Во-первых, в клетке, содержащей микроядро, может произойти нарушение деления, клетка может переходить в апоптоз (рисунок 1.2 - А).

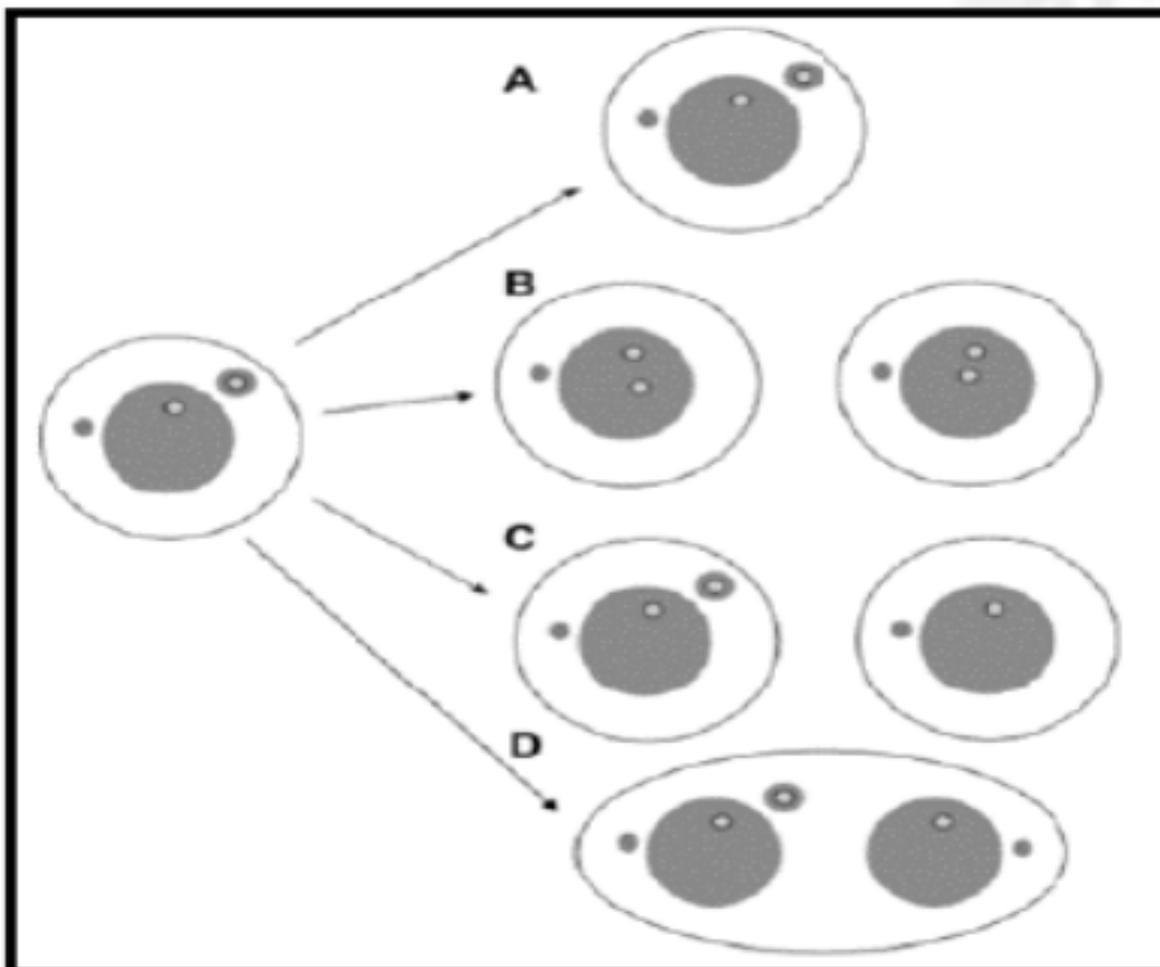


Рисунок 1.2. Потенциальная судьба клеток с микроядром (King, 2008)

А. Нарушение деления клетки или апоптоз; В. Нормальная репликация хромосом и образование диплоидных клеток; С. Нарушение сегрегации и репликации; D. Образование двуядерной клетки

Во-вторых, если при делении клетки происходит нормальная репликация и сегрегация хромосомы в микроядре, то в следующем митозе, могут образоваться две диплоидные клетки (рисунок 1.2 – В). В-третьих, если в микроядре происходит нарушение сегрегации и репликации, это может

привести к образованию одной дочерней клетки, которая содержит микроядро, и одной дочерней клетки без микроядра (рисунок 1.2 – С). В четвертых, если в микроядре происходит нормальная репликация, но нарушен процесс сегрегации, то в результате происходит ингибирование клеточного деления с образованием двуядерной клетки (рисунок 1.2 – D) (King, 2008).

Во многих исследованиях, показано, что хромосома в микроядре лимфоцита может подвергаться как множественным раундам репликации без расхождения (Leach, Jackson-Cook, 2004), так и реплицироваться неправильно, ввиду неисправности механизма репликации ДНК при изменении геометрии микроядра. Также клетка может вступить в следующий митоз с частично реплицированным микроядром (King, 2008).

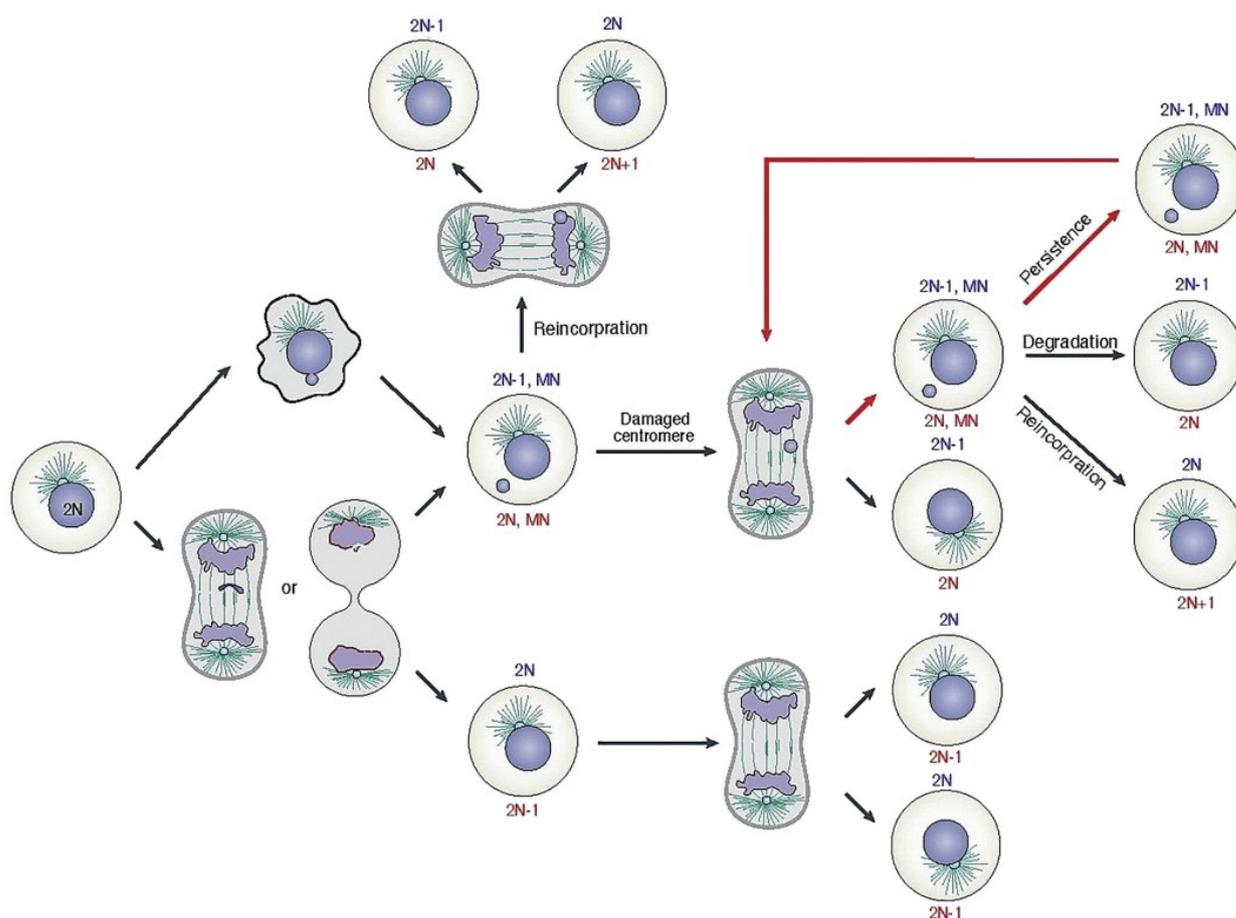


Рисунок. 1.3. Микроядра как причина и биомаркер анеуплоидии в основном ядре (Guo et al., 2019)

Известно, что если клетка с микроядром вступила в митоз, то она чаще образует клетки с дополнительными микроядрами, однако, возможно

формирование нормальных клеток без микроядер. Установлено, что наличие в клетке микроядер может указывать на развитие апоптоза (Kirsch-Volders et al., 1997).

Включение хромосомы в микроядро, часто приводит к необратимой потере способности собирать нормальный кинетохор (Guo X. et al., 2019; Кривцова и др., 2021). В результате такая хромосома не сегрегирует и вновь образует микроядро, которое включается в одну из дочерних клеток (рисунок 1.3).

Таким образом, индукция микроядер в клетке приводит к увеличению продолжительности интерфазы и кариокинеза в клетке, а также к увеличению числа патологических митозов и клеточной гибели, поэтому глубокое понимание происхождения и отслеживание судьбы хромосом в микроядрах, а также клеток, их содержащих, является важным направлением эколого-физиологических исследований.

1.2. Микроядерный тест – биомаркер генетической нестабильности и современный инструмент оценки интегрирующего эффекта антропогенных факторов

Микроядра в соматических клетках являются одним из важнейших маркеров генетической (хромосомной) нестабильности организма. Разработку микроядерного анализа обычно связывают с именем Шмидта (W. Schmid), хотя в 1973 г. J.A. Heddle и W. Schmid независимо друг от друга предложили микроядерный тест, основанный на учете микроядер в полихромных эритроцитах костного мозга. Первоначально он был разработан для эритроидных клеток костного мозга, а позже тест стал применяться для учета микроядер в различных клетках. Однако, в первые подсчёт микроядер в клетках как метод исследования мутагенных свойств факторов был использован британским радиобиологом Джоном Эвансом в 1959 г. при

изучении действия ионизирующей радиации на клетки кончиков корней вики посевной *Vicia sativa* (Evans et al., 1959).

К настоящему времени учет микроядер стал возможен в большинстве популяций делящихся клеток (Басыйров, Рахимов, 2005). Наиболее распространенным методом является учет микроядер в полихроматофильных эритроцитах. Это связано с тем, что полихроматофильные эритроциты легко распознаются, имеют короткий жизненный цикл и любое содержащееся в них микроядро является следствием хромосомных aberrаций в эритробластных клетках, возникших спонтанно или индуцированных исследуемыми агентами.

К преимуществам микроядерного теста следует отнести быстроту, независимо от исследования кариотипа вида, нередко содержащего большое число мелких плохо различимых хромосом, надежность, а также то, что тестирование можно проводить в тканях с низкой митотической активностью (Жулева, 2000). Микроядерный анализ проводят в безъядерных эритроцитах, в клетках эмбрионов, в сперматиде, ооцидах, что особенно важно при прогнозе возможных последствий для наследственности потомства. Новые возможности микроядерного теста открываются в связи с использованием меченных флюорохромами антител к кинетохору. Такой методический ход позволяет дифференцировать микроядра, включающие в себя ацентрические фрагменты (результат хромосомных aberrаций) и целые хромосомы, задерживающиеся на экваторе клетки в анафазе (результат изменений взаимодействий хромосом с веретеном деления) (Ковалева 2008).

Существуют предположения о недостатках микроядерного теста, связанные с тем, что микроядра формируются из ацентрических фрагментов и отставших хромосом. Клетки же, имеющие мосты, не учитываются с помощью этого теста. Некоторая часть клеток с хромосомными aberrациями, возникающими в анафазе, вероятно, погибает в процессе первого митоза. Главная проблема использования микроядерного теста заключается в отсутствии его унификации. В этой связи обширные популяционные исследования зависимости частоты встречаемости микроядер от возраста до

сих пор не позволили получить однозначные данные (Paul и др., 1987). Это обусловлено отсутствием общепринятого представления о пределах изменчивости спонтанно возникающих микроядер в группах одного и того же возраста. Очевидно также, что далеко не все типы хромосомных aberrаций сопровождаются образованием микроядер, поскольку не все связаны с появлением ацентрических фрагментов. Все сказанное хорошо согласуется с тем фактом, что в контроле (без воздействия генотоксинов) количество клеток с хромосомными aberrациями превышает количество клеток с микроядрами в 6–8 раз (Шмакова, 1998), т.е. микроядерный тест, также, как и хромосомные aberrации, позволяет выявлять только часть мутационного спектра, имеющегося в клеточных популяциях до и после воздействия генотоксинов. Следует отметить также, что результаты микроядерного теста в существенной степени могут зависеть от специфики клеточных популяций, в которых они рассматриваются (Колмакова и др., 2013), результаты зависят от пола и возраста особей, а также от физического состояния организма и эмоционального статуса (Ингель, 2006).

Подсчет имеет больше шансов на автоматизацию и по чувствительности не уступает метафазному анализу (Горовая, 2002), что является достоинством микроядерного теста и открывает перспективы для проведения популяционных исследований с его использованием (Афанасьева и др., 2004).

Микроядерный тест – одно из перспективных направлений в изучении влияния факторов окружающей среды на генетический аппарат клеток организма (Захидов, 2002; Ильин, 2006; Fournie et al., 2005; Godderis et al., 2006). Регистрация структурно-функциональных изменений, при которых в клетках выявляется наличие микроядер, представляет собой высокоинформативный и вместе с тем простой в техническом отношении метод (Жулева, Дубинин, 1994). На основании проведенных исследований Н.Н. Ильинских впервые показал, что не только радиация и химические вещества способны вызывать генетические изменения в клетках человека,

таким действием обладают и инфекционные агенты – вирусы, бактерии, простейшие и гельминты.

Микроядерный тест является общепринятым цитогенетическим методом оценки мутагенного действия агентов различной природы, позволяющий определить наличие или отсутствие цитогенотоксичности, а также мутагенности различных соединений (Водунон, 2008). Данный тест является простым и высокочувствительным цитогенетическим методом, позволяющий определить степень загрязнения окружающей среды, основываясь на изучении стрессового состояния организма (Захаров и др., 1996). Выявление микроядер в клетках широко используются при различного рода цитологических (Калаев и др., 2006) и гистологических исследованиях. Является информативным методом индикации влияния неблагоприятных факторов окружающей среды. С помощью этого метода проведено тестирование на мутагенную активность большого числа химических (Benites et al., 2006), физических и биологических агентов, тест применяется уже на первом этапе проверки потенциальных мутагенов и канцерогенов. Микроядерный тест с успехом используется в клинической практике для выявления и прогнозирования течения ряда заболеваний, а также при проведении экспериментальных исследований. В настоящее время микроядерный тест включен, как обязательный при токсикологических исследованиях в странах Европейского экономического сообщества и Японии (Колмакова и др., 2013). Сейчас микроядерный анализ используется для скрининга генотоксичности новых и многообещающих применений в биологии, медицине и нанотехнологиях. Например, генотоксические свойства углеродных нанотрубок, которые используются в электрических цепях, бумажных батареях, солнечных панелях, а также в медицине для лечения рака, могут вызывать образование микроядер в лимфоцитах (Cveticanin et al., 2010).

Долгое время микроядра считались побочными продуктами генетической нестабильности, удобным инструментом цитомного анализа (Surralles et al., 1992). Регистрация клеток, имеющих в своем составе

микроядра, является практически значимым и высоко информативным диагностическим показателем многих заболеваний, позволяющим с достаточной вероятностью прогнозировать их течение, и дающий возможность осуществлять контроль их коррекции (Widel et al., 1999; 2001). В настоящее время в литературе представлена достаточно обширная информация о морфологии и функциональной активности микроядер, судьбе микроядерных клеток. Показано, что присутствие микроядер в клетке приводит к увеличению продолжительности клеточного цикла (как интерфазы, так и митоза), а также к увеличению клеточной гибели и числа патологических митозов (Reimann et al., 2020). В настоящее время хорошо изучена функциональная активность микроядер. Показана способность микроядер к репликации (Киреев и др., 1988; Crasta et al., 2012; Okamoto et al., 2012) и репарации (Terradas et al., 2010), возможность сохранения и проявления транскрипционной активности (Luzhna et al., 2013). В ряде работ отражаются возможные варианты дальнейшего развития клеток с микроядрами. Показано, что при нормальном развитии для микроядерных клеток характерна остановка в клеточном цикле (Shall, de Murcia, 2000; Terradas et al., 2010; Apraiz et al., 2011) с последующей апоптотической гибелью (Shiheido et al., 2010), осуществляемые через активацию белка p53 (Чумаков, 2007; Wong, Stearns, 2005). С другой стороны, рядом авторов доказано сохранения жизнеспособности микроядерных клеток (Utani et al., 2007; Crasta et al., 2012; Sagona et al., 2014).

Появляется все больше работ, в которых показано, что образование микроядер может влиять на реорганизацию генома и увеличение разнообразия кариотипов в клеточной популяции (Zhang et al., 2015; Guo et al., 2019). Показано, что генетический материал может быть представлен интактными хромосомами или группами хромосом (Fenech et al., 2011), хромосомными фрагментами (Norppa, Falck, 2003), нехромосомными элементами: участками поврежденной ДНК (Asare et al., 2012) или амплифицированной ДНК (Shimizu et al., 2011; Utani et al., 2011). Многие исследователи описывают связь между

формированием микроядер и хромотриписом (Zhang et al., 2015; Terzoudi et al., 2015; Terradas et al., 2016). Хромотрипис представляет из себя массивные хромосомные перестройки, возникающие одновременно. Обычно хромотрипис касается одной хромосомы, которая должна быть изолирована от остального генома. Таким образом, хромосома, включённая в микроядро, удовлетворяет этому требованию (Terradas et al., 2016). Установлено, что микроядра имеют дефектную ядерную оболочку с обширными, нерепарируемыми участками в двойной мембране с областями, лишёнными ламины или конденсированного хроматина, и низким содержанием белков ядерных пор (Hatch et al., 2013; Кривцова и др., 2021). Репликация ДНК в микроядре неэффективна и происходит асинхронно с репликацией в ядре, примерно в 30% репликация в микроядре продолжается в постсинтетической фазе клеточного цикла G₂. При этом в ДНК микроядра в течение интерфазы накапливается большое количество повреждений (Terradas et al., 2009, 2016).

Следует отметить, что цитогенетический подход применяется для оценки состояния живых организмов и может служить косвенным показателем качества окружающей среды. Очевидно, что факторы различной природы могут приводить к нарушению цитогенетических характеристик, что ведет к нарушению цитогенетического гомеостаза популяции (Гилева, 1993). В настоящее время отмечается глобальное загрязнение окружающей среды техногенными продуктами, которые, обладая повышенной мутагенной активностью, несут в себе опасность воздействия на генетический аппарат живых существ. Микроядерный тест широко используется для скрининга и мониторинга мутагенов самой различной природы, включая и мутагенное воздействие окружающей среды на рыб, амфибий, рептилий и птиц (Жулева, Дубинин, 1994; Чубинишвили, 2001; Логинов, 2004; Ильин, 2006; Кармазин, Пескова, 2010; Крюков, 2023; Lahiri, Roy, 2000; Matson et al., 2005 и др.). Логинов (2004) выявил зависимость цитогенетической нестабильности и уровня средового стресса, оцениваемого по флуктуирующей асимметрии амфибий в некоторых биотопах Нижегородской области. При этом

максимальный уровень числа эритроцитов с микроядрами зафиксирован в популяциях бурых лягушек, подверженных наиболее сильному средовому стрессу. Lahiri, Roy (2000) установлен факт увеличения числа клеток с микроядрами в мокроте и буккальном эпителии лиц, проживающих в крупных городах. Не случайный характер таких результатов связан, в том числе, с непосредственным воздействием загрязненного воздуха на клетки респираторного тракта и ротовой полости. Увеличение числа клеток с микроядрами в крови амфибий отмечено под действием токсичных концентраций нефти (Кармазин, Пескова, 2010), полициклических ароматических углеводородов и ртути, а также хлорорганических пестицидов (Matson et al., 2005).

Появление микроядер может быть индуцировано действием радионуклидов, причем выявлено, что в различных типах клеток отмечается разная интенсивность формирования микроядер в ответ на воздействие радионуклидов (Voitovich, 2003). Некоторые авторы для проверки воды на наличие потенциальных мутагенов используют личинок шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* (Van Hummelen et al., 1989). Показано, что личинки *Pleurodeles waltl* являются хорошей моделью для выявления генотоксической активности в водной среде (Grinfeld et al., 1986).

Резюме. Подводя итог литературному обзору, можно заключить, что в эколого-генетическом мониторинге микроядерный тест используется для оценки мутагенного эффекта абиотических и антропогенных факторов среды. Микроядерным тестом проводят тестирование на мутагенную активность большого числа химических, физических и биологических агентов, способных влиять на генетический аппарат, оказывая онкогенный, тератогенный эффекты, снижающий жизнеспособность и продуктивность организмов. Метод применим для значительного числа биологических объектов и типов клеток и позволяет анализировать небольшие выборки. Формирование крупных микроядер является следствием патологии митотического деления

клеток, в процессе которого происходит отставание некоторых хромосом в метафазе и в анафазе. Причиной образования мелких ядер, являются структурные aberrации хромосом. Кроме этого, при апоптозе – запрограммированной гибели клеток, могут встречаться микроядра различного размера, что связано с фрагментацией ядра клетки, подверженной этому процессу. Регистрация структурно-функциональных изменений, при которых в клетках выявляется наличие микроядер, представляет собой высокоинформативный прогностический показатель и является характеристикой состояния организма. Цитогенетический подход с использованием микроядерного анализа имеет большие перспективы не только скрининга и мониторинга мутагенов самой различной природы, но и биомониторинга качества среды.

СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика районов и объектов исследования

Лабораторные и полевые исследования проводили в течение полевых сезонов 2016–2022 гг. на территории Нижегородской области. В работе были использованы зооиндикаторы: лягушка озерная *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) и лягушка прудовая *P. lessonae* (Camerano, 1882) из природных популяций 12 водных объектов территории г. Нижнего Новгорода и Нижегородской области. При выборе водных объектов старались проводить сбор амфибий в естественных и искусственных объектах в условиях химического загрязнения (участки реки, искусственные и природные озера, болота) на урбанизированной территории. За период исследований было собрано 391 озерных лягушек и 165 прудовых лягушек. Всего 556 особей. Во всех водных объектах, за исключением бол. Белкино_1, в течение всего периода наблюдений доминировали либо озерные, либо прудовые лягушки. В полевой сезон 2019 году в бол. Белкино_1 были собраны оба вида зеленых лягушек.

Краткая эколого-географическая характеристика водных объектов и объем собранного материала приведен в таблице (таблица 2.1).

Таблица 2.1

Объем собранного материала и краткая характеристика места обитания амфибий

Вид	Водный объект	Место расположения, координаты	Характеристика водосборной территории и водного объекта	Год	Кол-во
Озерные лягушки <i>P. ridibundus</i>	Оз. Нижнее Рустайское	Нижегородская обл., Семеновский р-н; с.ш. 56,21988, в.д. 43,534993), расположен рядом с ГПЗ «Керженский»	Естественный водоем, старица р. Керженец. Рядом расположен заповедник «Керженский». Антропогенная нагрузка слабая (рекреационное воздействие)	2016	15
	Бол. Круглое Дальнее	Нижегородская обл., Богородский р-н; с.ш. 56,024745, в.д. 43,356987	Естественный водоем, активно посещается грибниками. Расположен недалеко от с. Теряево. Является памятником	2016	15

			природы регионального значения.		
Оз. Жилново	Нижегородская обл., Кстовский р-н; с.ш. 56,212880; в.д.44,153741		Естественный пойменный водоем. Входит в цепь пойменных озер правобережья Волги, расположенных между г. Н. Новгородом и г. Кстово. Антропогенная нагрузка значительная (рекреационное и культурно-бытовое воздействие), часто посещается рыбаками.	2016	15
Оз. Березовское	Нижегородская обл., Богородский р-н; с.ш. 43,6229717, в.д.56,1469890		Озеро расположено районе около деревни Шумилово. Вокруг озера сосновый и березовый лес, есть травяной пляж, ближе к воде. Озеро часто посещается рыбаками, на расстоянии 500 метров находится автостоянка и жилые застройки.	2017	20
Уч. р. Кудьмы у п. Ветчак (далее - Уч. р. Кудьмы)	Нижегородская обл., Кстовский р-н; с.ш. 56,096735, в.д.44,314317		Антропогенная нагрузка значительная. Основные загрязнители поступают в реку от предприятий г. Богородска и нефтеперерабатывающего завода г. Кстово	2017	20
				2018	20
				2019	20
Оз. Силикатное	г, Н. Новгород, Сормовский р-н; с.ш. 56,370912, в.д.43,777608		Искусственный водоем (озеро-карьер) возле завода по производству железобетонных конструкций. Образован на месторождении кварцевого песка на месте болота. Водоем испытывает значительную антропогенную нагрузку: зона многоэтажной застройки, высокая рекреационная нагрузка, автотранспортное и хозяйственно-бытовое загрязнение.	2016	15
				2017	20
				2018	20
				2019	20
				2020	20
				2021	24
2022	16				
Торфокарьер Ситниковского орнитологического заказника (далее – торфокарьер)	Нижегородская обл., Борский р-н; с.ш. 56,43979, в.д.44,072462		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	2016	15
				2017	20
				2018	20
				2019	15

			восстановившихся после торфоразработок низинных и переходных болот. На территории ведутся выборочные рубки леса на дрова, охотничье хозяйство (осенняя охота), любительское рыболовство	2021	2
	Оз. Сортировочное	Г. Н. Новгород, Канавинский р-н; с.ш. 43,838322, в.д.56,28880	Образовано на месте болотного массива в результате мелиорации с целью обеспечения отвода грунтовых вод при строительстве городских кварталов. Проточное, окружено по большей части ивняком. С северо-восточной стороны от озера располагается Сортировочное кладбище. С южной стороны проходит ж/д магистраль. Является памятником природы регионального значения. Испытывает рекреационное и культурно-бытовое воздействие	2019	20
	Бол. Груздевское	Нижегородская область, Павловский район, 2022 г, с.ш. 56.118413, в.д.42.831962	Низинное болото, расположено в широколиственном лесу. Посещается крайне редко.	2022	15
	Бол. Белкино_1	Нижегородская обл., Борский р-н; с.ш. 56.286208, в.д.44.548075	Низинное болото, расположено рядом с частными огородами и садами. Посещается крайне редко.	2019	10
	Бол. Белкино_2	Нижегородская обл., Борский р-н; с.ш. 56.290883, в.д. 44.553365	Низинное болото, расположено рядом с частными огородами и садами. Посещается крайне редко.	2022	14
Всего озерных лягушек:					391
Прудовые лягушки <i>P. lessonae</i>	Бол. Белкино_1	Нижегородская обл., Борский р-н; с.ш. 56.286208, в.д.44.548075	Низинное болото, расположено рядом с частными огородами и садами. Посещается крайне редко.	2017	20
				2018	20
				2019	10
				2021	12
	Оз. Вторчермет	Г. Н. Новгород, Канавинский район; с.ш. 56.311944, в.д. 43.848889	Искусственный водоем. Образовалось в результате заполнения водой песчаного карьера и в настоящее время является памятником природы регионального значения. Антропогенная нагрузка значительная, находится в зоне многоэтажной застройки, испытывает влияние АО «Вторчермет». С северной стороны от озера на расстоянии 15 м проходит	2016	15
				2017	20
				2018	20
				2019	20
				2020	20
				2021	8

			шоссе с интенсивным движением.		
				<i>Всего прудовых лягушек:</i>	165
				<i>Итого, особей:</i>	556

Расположение исследованных водных объектов на карте Нижегородской области представлено на рисунок 2.1.

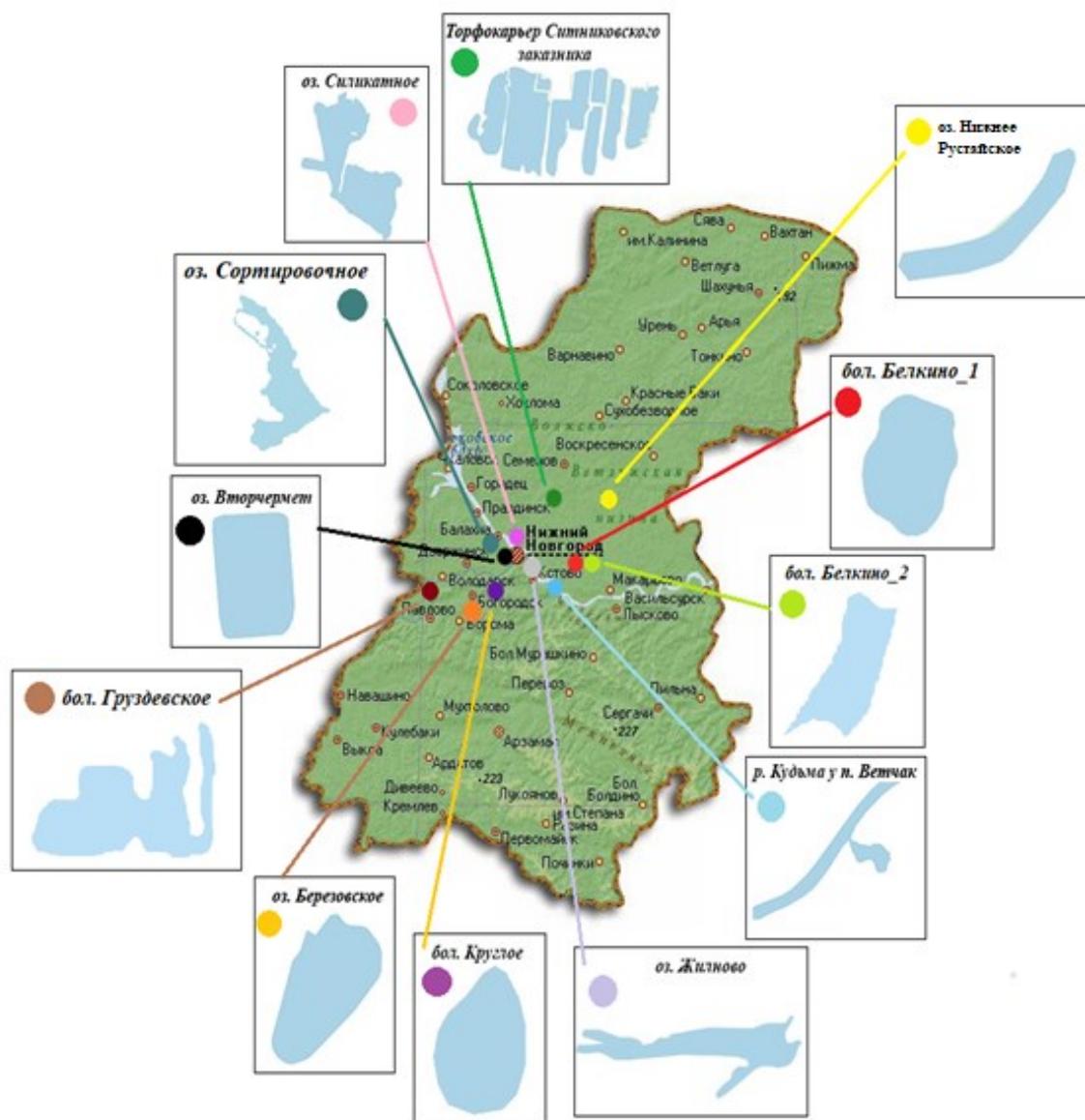


Рисунок 2.1. Ситуационный план. Расположение исследованных водных объектов на карте Нижегородской области

Примечание:

- – оз. Березовское (Нижегородская обл., Богородский р-н);
- – р. Кудьма у п. Ветчак (Нижегородская обл., Кстовский р-н);
- – оз. Силикатное (г. Н. Новгород, Сормовский р-н);
- – торфокарьер Ситниковского заказника (Нижегородская обл., Борский р-н);
- – оз. Нижнее Рустайское (Нижегородская обл., Семеновский р-н);

-  – болото Круглое Дальнее п. Теряево (Нижегородская обл., Богородский р-н);
-  – оз. Жилново, Артемовские луга (Нижегородская обл., Кстовский р-н);
-  – оз. Сортировочное (г. Н. Новгород, Канавинский р-н);
-  – болото п. Белкино_1 (Нижегородская обл., Борский р-н);
-  – оз. Вторчермет (г. Н.Новгород, Канавинский р-н);
-  – бол. п. Белкино_2 (Нижегородская обл., Борский р-н);
-  – бол. Груздевское (Нижегородская обл., Павловский р-н)

2.2. Гидрохимический анализ исследованных водных объектов

Одновременно, со сбором амфибий, были взяты пробы воды в соответствии с ГОСТом 31862-2012 для характеристики абиотических условий обитая. 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.

По результатам анализа был рассчитан удельного комбинаторного индекса загрязненности воды УКИЗВ (РД 52.24.643-2002) по формуле:

$$S'_j = \frac{S_j}{N_j},$$

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.

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 (ПДК_{рыб-хоз}) (Приказ

МинСельхоз РФ №552 от 13.12.2016 г.). Результаты гидрохимического анализа водных объектов представлены в приложении 1.

2.3. Видовая идентификация зеленых лягушек рода *Pelophylax*

Первичная 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; Таращук, 1985; Борисовский и др., 2000; Коцержинская, 2000). Поскольку точная идентификация зеленых лягушек затруднена из-за их морфологического сходства, в лаборатории молекулярной экологии и систематики животных при кафедре зоологии и экологии Пензенского государственного университета была проведена молекулярно-генетическая идентификация видов под руководством доцента кандидата биологических наук 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 (Ermakov et al., 2019) (таблица 2.2). Режим амплификации состоял из 30 циклов: 30 сек при 94°C, 30 сек при 60 и 62°C (для SA1 и COI, соответственно), и 30 сек при 72°C. Метод, основанный на разнице длин видоспецифичных амплифицируемых фрагментов, позволяет надежно определять все виды комплекса европейских

зеленых лягушек, включая гибридных особей, а также выявлять криптические формы озерной лягушки – «западную» (собственно *P. ridibundus*) и «восточную» (анатолийскую лягушку, *P. cf. bedriagae*).

Таблица 2.2

Праймеры мультиплексной ПЦР–тест системы идентификации видов зеленых лягушек (Ermakov et al., 2019)

Название	Позиция	Последовательность (5'-3')	Температура отжига, °С	Длина продукта, п.н.	Специфичность
COIF-Pb	183-204	CTTTGGAAATTGACTCGTGCCA	63.8	440	<i>P. cf. bedriagae</i>
COIF-Pl	329-349	GAAGTGTGTACCCCCACTAG	63.7	294	<i>P. lessonae</i>
COIF-Pr	409-429	GCTGGGGTTTCATCAATTCTG	61.8	214	<i>P. ridibundus</i>
COIR-Pu	624-601	CCTGCRGGATCAAAAAATGTTGT	63.6	-	Все три вида
SA1R-Pb	450-429	TTGTTCCCTATACTAAGGTCAC	59.3	415	<i>P. cf. bedriagae</i>
SA1R-Pl	140-119	TACCGTACCGATATTTGTATGC	60.2	109	<i>P. lessonae</i>
SA1R-Pr	245-221	GATACAAATGATACATCCCACCT	61.0	210	<i>P. ridibundus</i>
SA1F-Pu	25-59	CCATACAAATGTGCTAAGTAGGTT	61.3	-	Все три вида

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). Ген ND2 амплифицировали с использованием универсального праймера ND2L1 5'-AAG CTT TTG GGC CCA TAC CCC-3' (Meyer, 1993) и специфичного для зеленых лягушек праймера ND2H1 5'-GCA AGT CCT ACA GAA ACT GAA G-3' (Litvinchuk et al., 2020). Фрагмент ядерного гена SAI амплифицировали с помощью пары праймеров SA-F 5'-CCA TAC AAA TGT GCT AAG TAG GTT-3' и SA-R 5'-CGG TAA GGG GAC ATA ATT CA-3' (Plötner et al., 2008; Akin et al., 2010). Режим амплификации состоял из начальной денатурации 5 мин при 94°C, затем 32 цикла: 30 сек при 94°C, 30 сек при 60°C для ND2 и 53°C для SAI-1, 60 сек при 72°C, и конечная элонгация 5 мин при 72 °С.

Каждая реакционная смесь для ПЦР (25 мкл) содержала 50–100 нг ДНК, 1 мкМ смеси праймеров, 0.2 мМ dNTPs, 1.5 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10× ПЦР буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 8.3, 50 мМ KCl и 2 единицы полимеразы *Taq* (Thermo Scientific)).

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 (рисунок 2.2).

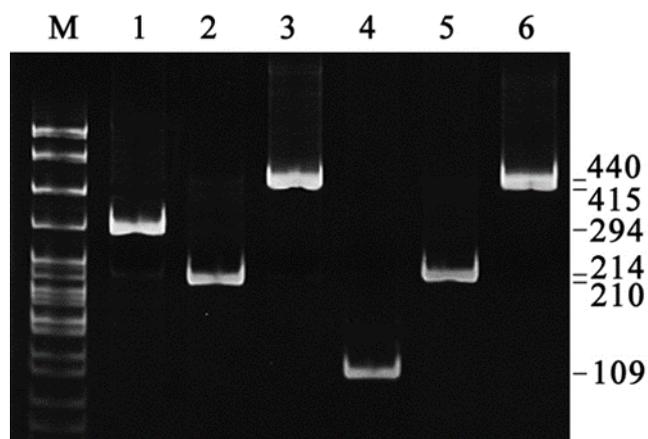


Рисунок 2.2. Электрофореграмма продуктов мультиплексной ПЦР-реакции генов COI мтДНК (лунки 1–3) и SAI-1 яДНК (лунки 4–6). 1, 4 – *Pelophylax lessonae*; 2, 5 – *P. ridibundus*; 3, 6 – *P. cf. bedriagae*. М – маркер длин нуклеотидных последовательностей pBR/HpaII. Справа приведены длины амплифицируемых фрагментов (п.н.)

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).

Ход работы: к 8 мл крови добавляли 100 мкл 10% уксусной кислоты. Перед подсчетом суспензию ресуспендировали 2–3 раза и заполняли подготовленную камеру Горяева. Известно, что эритроциты лягушек имеют удлиненную форму, четкие контуры, и при добавлении уксусной кислоты не разрушаются. Преломляющие свет, окруженные ореолом округлые клетки с

размытыми нечеткими очертаниями подсчитывали как лейкоциты. Подсчет проводили в 20 больших квадратах по диагонали всей камеры Горяева, визуально дифференцируя клетки крови.

Общее количество лейкоцитов (мм^3) подсчитывали по формуле:

$$X = \frac{a \times 4000 \times 10}{320}$$

где, X – общее количество лейкоцитов, а- число сосчитанных клеток, 4000 – объем камеры, 10 – разведение, 320 – количество малых квадратов.

Общее количество эритроцитов (мм^3) подсчитывали по формуле:

$$X = \frac{a \times 4000 \times 10}{80}$$

где, X – общее количество эритроцитов, а- число сосчитанных клеток, 4000 – объем камеры, 10 – разведение, 80 – количество малых квадратов.

2.5. Микроядерный тест

Микроядра в основном образуются из хромосомного материала, лишённого центромеры в процессе образования аберраций хромосом и, следовательно, отставшего на стадии анафазы от общего числа расходящихся хромосом. В ходе митоза этот материал попадает лишь в одну из дочерних клеток и формирует одно или несколько мелких ядер, которые называют микроядрами. В основном микроядра состоят из ацентрических фрагментов хромосом, но могут быть образованы и целой хромосомой в результате нерасхождения, вызванного дефектом веретена деления. Костный мозг бесхвостых амфибий является важным органом кроветворной системы, осуществляющий гемопоэз и характеризуется постоянной высокой эритропоэтической активностью, поэтому при цитогенетическом анализе особую актуальность приобретает сравнительный учет хромосомных

нарушений в молодых, полихроматофильных клетках костного мозга и зрелых нормохроматофильных эритроцитах периферической крови.

Для приготовления препаратов у лягушки кровь брали с помощью инсулинового шприца из сердца. Костный мозг получали сразу же после забоя амфибий вымывали из бедренной кости 0,8%-ным холодным раствором цитрата натрия в центрифужную пробирку (до 2 мл) (Тодоров, 1968). Приготовление и окраска мазков крови и костного мозга осуществлялась по стандартной методике (Меньшиков и др., 1987; Гематология... , 2004). Сухие препараты окрашивали раствором краской Романовского-Гимзы (МиниМед), приготовленной на фосфатном буфере (соотношение 1:50), выдерживают 20 минут, затем смывали водой и высушивали на воздухе. Учет эритроцитов с микроядрами проводили под микроскопом при увеличении $\times 1500$ с иммерсионной системой с помощью электронного лабораторного счетчика С-5М. Для каждой особи просматривали по 2 препарата, анализируя по 1000 эритроцитов на препарат. Полученные результаты выражали в промилле (‰).

При дифференцировке микроядер используются разные критерии, что определяет разнообразие выделенных форм и типов (Жулева, Дубинин, 1994; Крюков, 2023 и др.). В полихроматофильных клетках костного мозга (рисунок 2.3) и зрелых нормохроматофильных эритроцитов крови (рисунок 2.4) однозначно дифференцируется четыре вида микроядер: 1. Оформленные (а) – хорошо оформлены, располагающиеся на некотором удалении от ядра и не связаны 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 (мкм^2) по формуле

эллипса: $S = \pi ab$, где: a – большая полуось эллипса, b – малая полуось эллипса, $\pi = 3.14$.

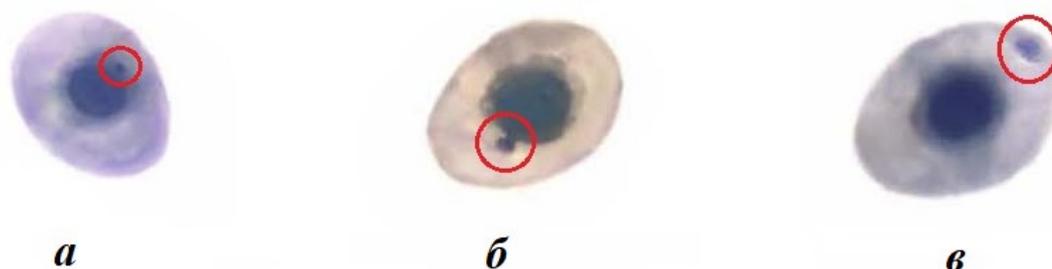


Рисунок 2.3. Виды микроядер в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) костного мозга зеленых лягушек (микроскоп Meiji Techno, ув. x1500, иммерсия):
а – оформленные; б – прикрепленные; в – разрыхленные



Рисунок 2.4. Виды микроядер в нормохроматофильных 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 (‰) (Шварц и др., 1954; Ивантер, 1985). Массу тела амфибий определяли на технических весах с точностью до 0,02 г (ошибка измерения $\pm 0,01$). У обездвиженных животных выделяли тимус, селезенку и печень. Затем органы взвешивали на торсионных весах Waga Torsyjna–WT с точностью до 0,1 мг (ошибка измерения $\pm 0,03$) и

помещали в пробирки с охлажденной средой Хенкса (1 мл для тимуса; 2 мл для селезенки; 5 мл для печени).

2.7. Определение содержания металлов в тканях зеленых лягушек

Металлы (Al, Mn, Sr, Cu, Cr, Fe, Zn) 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» (ННГУ им. Н.И. Лобачевского), в тканях и органах объектов исследования. Обездвиженных лягушек умерщвляли методом декапитации для взятия образцов органов и тканей: кожи, мышц, костей, селезенки, печени, сердца, крови, гонад. При подготовке проб для анализа использовали микроволновую систему пробоподготовки МС-6. Правильность определения металлов контролировалась периодическим анализом стандартных образцов, а возможное загрязнение проб в ходе анализа – регулярным определением холостых проб. По результатам анализа 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) (Реброва, 2006). При выборе метода

статистической обработки была проведена проверка полученного массива данных на соответствие закону нормальности. Если условие нормальности не выполняется, то непараметрические критерии дают больше шансов выявить реально существующие различия (Гланц, 1998).

Предварительная проверка данных на соответствие нормальному распределению по критериям Шапиро – Уилка, Лиллиефорса, Андерсона-Дарлинга, показала, что выборки не подчиняются нормальному распределению. С учетом вида распределения 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), коэффициента ранговой корреляции Спирмена (ρ) и гамма-корреляцией (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 ($\lambda Wilks$) 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 водных объектов 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 $\alpha = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

В 12 водных объектах Нижегородской области в период с 2016 по 2022 годы был проведен комплексный гидрохимический анализ (см. Приложение 1), позволивший выделить характерные загрязняющие вещества: медь, железо общее, марганец, цинк, никель, цинк, хром, свинец, кобальт, нитритный и аммонийный азот, соединения серы, нефтепродукты, превышающие норматив качества воды для водоемов рыбохозяйственного назначения ($ПДК_{\text{рыб-хоз}}$) (Приказ МинСельхоз РФ №552 от 13.12.2016 г.). Норматив качества воды водных объектов рыбохозяйственного назначения был выбран нами как наиболее жесткий из существующей нормативно-технической документации. На основе данных гидрохимического анализа был рассчитан удельный комбинаторный индекс загрязненности воды УКИЗВ (РД 52.24.643–2002) и определен класс качества воды. При расчете УКИЗВ руководствовались свободным перечнем № 3, включающим ингредиенты, которые важны при проведении отдельных научно-исследовательских работ или решении производственных задач. Отметим, что в большинстве водных объектов (за исключением оз. Нижнее Рустайское_2016, II класс качества воды и торфокарьера_2016, III класс качества воды) по значению УКИЗВ воды относились к IV (грязная) и V (экстремально грязная вода) классам качества (таблица 3.1).

В отдельных водных объектах гидрохимический анализ и отлов зеленых лягушек проводили в течение длительного времени. При этом на участке р. Кудьмы с 2017 по 2019 гг. воды оставались экстремально грязными. В торфокарьере Ситниковского заказника (с 2016 по 2021 гг.) и оз. Силикатное (с 2016 по 2021 гг.), где осуществлялся сбор озерных лягушек качество воды

ухудшилось. В оз. Вторчермет с доминированием прудовых лягушек с 2016 г. по 2019 г. наблюдалось ухудшение с IV (грязная, разряд «а») класса до V (экстремально грязная) класса качества воды, в 2020 и 2021 годах воды вновь соответствовали IV классу (рисунок 3.1.)

Таблица 3.1

Результаты гидрохимического анализа исследуемых водных объектов Нижегородской области

Водоем	Год	УКИЗВ, отн.ед.	Класс качества воды
Оз. Нижнее Рустайское	2016	1.13	II, слабо загрязненная
Бол. Круглое Дальнее	2016	4.87	IV, грязная, разряд «а»
Оз. Жилново	2016	4.45	IV, грязная, разряд «а»
Оз. Березовское	2017	8.8	IV, очень грязная, разряд «в»
Уч. р. Кудьмы	2017	55.98	V, экстремально грязная
	2018	66.1	V, экстремально грязная
	2019	28.63	V, экстремально грязная
Торфокарьер	2016	2.06	III, загрязненная, разряд «а»
	2017	9.5	IV, очень грязная, разряд «в»
	2018	6.4	IV, грязная, разряд «б»
	2019	17.53	V, экстремально грязная
	2021	19,2	V, экстремально грязная
Оз. Силикатное	2016	4.87	IV, грязная, разряд «а»
	2017	7.2	IV, грязная, разряд «б»
	2018	7.2	IV, грязная, разряд «б»
	2019	5.99	IV, грязная, разряд «а»
	2020	5.1	IV, грязная, разряд «а»
	2021	7.15	IV, грязная, разряд «б»
Оз. Вторчермет	2022	8.82	IV, очень грязная, разряд «в»
	2016	4.51	IV, грязная, разряд «а»
	2017	9.1	IV, очень грязная, разряд «в»
	2018	6.6	IV, грязная, разряд «б»
	2019	19.34	V, экстремально грязная
	2020	5.59	IV, грязная, разряд «а»
Бол. Белкино_1	2021	4.4	IV, грязная, разряд «а»
	2017	12.1	V, экстремально грязная
	2018	12.5	V, экстремально грязная
	2019	11.73	V, экстремально грязная
Оз. Сортировочное	2021	34.02	V, экстремально грязная
Оз. Сортировочное	2019	8.46	IV, очень грязная, разряд «г»
Бол. Белкино_2	2022	11.03	V, экстремально грязная
Бол. Груздевское	2022	10.36	IV, очень грязная, разряд «г»



Рисунок 3.1. Изменение индекса УКИЗВ в период с 2016 по 2021г. в водных объектах: торфокарьер и оз. Вторчермет

Для стандартизации вклада различных загрязнителей в результаты дальнейшего анализа в качестве исходных данных были использованы частные оценочные коэффициенты, которые рассчитываются в ходе оценки УКИЗВ и учитывают кратность превышения $ПДК_{рыб-хоз}$ 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 $\log(x+1)$. Единица добавлена для того, чтобы избежать появления бесконечных значений при логарифмировании нулевых частных коэффициентов.

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 метод силуэтов, согласно которому были выделены пять групп/кластеров (А, Б, В, Г, Д), в каждой из которых содержались водные объекты с близкими показателями химического загрязнения среды (рисунок 3.2; таблица 3.2).

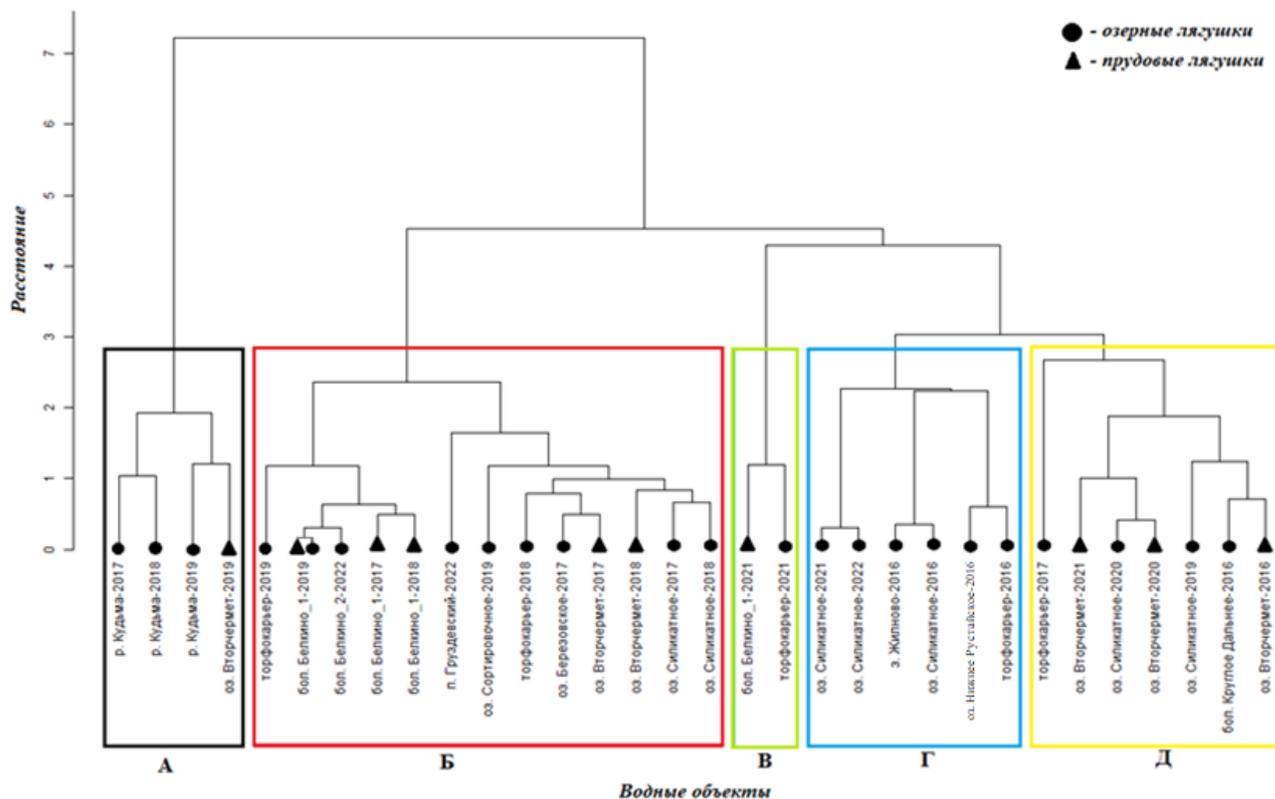


Рисунок 3.2. Дендрограмма иерархической кластеризации водных объектов Нижегородской области на основе гидрохимического состава. По оси отложено расстояние объединения

Статистический анализ отличий между группами объектов по совокупности гидрохимических показателей проведен методом многомерного дисперсионного анализа с использованием лямбды Уилкса в качестве критериальной статистики. Ввиду несоответствия первичных данных нормальному распределению, значимость отличий (р-значение) рассчитывалась путем рандомизации с использованием перестановочной процедуры (Шитиков, Розенберг, 2014). Проведенный анализ ($\lambda_{\text{Wilks}} = 0.0001$, $F=14.34$, $df = 36$, $p < 0.001$) выявил статистически значимые различия между выделенными группами водоемов. Для выделенных кластеров приоритетными загрязнителями являлись: ионы меди, марганца, хрома, цинка, кобальт, железо, никель, соединения серы в концентрациях, превышающих ПДК_{рыб-хоз} (табл. 3.2) и значимо различающиеся в отдельных кластерах (таблица 3.3).

Распределение водных объектов Нижегородской области по кластерам на основе гидрохимического состава

Кластер	Водные объекты	УКИЗВ, отн. ед. / Класс качества воды	Загрязнение отдельными веществами		
			Средняя концентра- ция, мг/л	Степень превыше- ния ПДК _{рыб-хоз} , раз	Класс опасно- сти*
А	Уч. р. Кудьмы _2017_2018_2019 Оз. Вторчермет_2019	42.30 / V, экстремаль- но грязная	Cu ⁺² – 4.74	4740	3
			Mn ⁺² –1.25	125	3
			S ²⁻ – 0.04	8	4
			Zn ⁺² -0.06	6	3
			Co – 0.06	6	2
			Ni ⁺² – 0.058	5	3
			Fe _{общее} – 0.2	2.2	4
			Cr – 0.06	2	3
Б	Торфокарьер _2018_2019 Бол. Белкино_1_2017_2018_ 2019 Бол. Белкино_2_2022 Оз. Силикатное_2017_2018 Бол. Груздевское_2022 Оз. Сортировочное_2019 Оз. Березовское_2017 Оз. Вторчермет_2017_2018	9.10 / IV, очень грязная, разряд «г»	Cu ⁺² -0.17	170	3
			Mn ⁺² –1.20	120	3
			S ²⁻ – 0.11	22	4
			Cr – 0.08	8	3
			Fe _{общее} – 0.6	6.3	4
			Zn ⁺² -0.06	6	3
			Co – 0.06	6	2
			Ni ⁺² – 0.06	6	3
			Pb – 0.01	1.6	2
			В	Бол. Белкино_1_2021 Торфокарьер_2021	26.61 / V, экстремаль- но грязная
Cu ⁺² – 0.6	600	3			
Mn ⁺² - 2.75	270	3			
Fe _{общее} – 1.56	15.6	4			
Cr – 0.2	10	3			
Zn ⁺² - 0.09	9	3			
Co – 0.08	8	2			
Г	Оз. Силикатное_2016_2021 _2022	4.66 / IV, грязная, разряд «а»	S ²⁻ –3.50	700	4
			Cu ⁺² – 0.03	30	3
			Cr – 0.06	6	3

	Оз. Жилново_2016. Оз. Нижнее Рустайское_2016 Торфокарьер_2016		Fe _{общее} – 0.22	2.2	4
			Mn ⁺² – 0.01	1.5	3
Д	Оз. Силикатное _2019_2020 Торфокарьер_2017 Оз. Вторчермет_2016_2020 _2021 Бол. Круглое Дальнее_2016	5.10 / IV, грязная, разряд «а»	Mn ⁺² – 0.30	30	3
			Cu ⁺² – 0.018	18	3
			Zn ⁺² - 0.05	5	3
			Cr – 0.05	5	3
			Fe _{общее} – 0.10	1	4
			Co – 0.01	1	2
			Pb – 0.005	1	2

Примечание: В природных условиях сера встречается в двух валентных состояниях - S(II), образующего сульфид-анионы S²⁻, и атома S(VI), который входит в сульфатную анионную группу SO₄. Вследствие этого миграция серы в земной коре определяется степенью её окисленности: восстановительная среда способствует образованию сульфидных минералов, окислительные условия - возникновению сульфатных минералов.

* Класс опасности согласно СанПиН 2.1.4.1074-01 «Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды. Централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества»

Таблица 3.3

**Медиана и интерквартильный размах концентраций (мг/л)
химических веществ, различающихся в выделенных кластерах**

Кластер		Марганец	Медь	Сульфид-анионы	УКИЗВ
А	<i>Me</i>	1.250	4.740	0.04	42.305
	<i>IQR</i>	0.957	4.930	2.74	37.055
Б	<i>Me</i>	1.200	0.175	0.11	9.100
	<i>IQR</i>	1.000	0.230	15.49	4.530
В	<i>Me</i>	2.750	0.605	18.00	26.610
	<i>IQR</i>	1.100	0.330	14.00	14.820
Г	<i>Me</i>	0.015	0.035	3.50	4.660
	<i>IQR</i>	0.499	0.018	1.00	5.090
Д	<i>Me</i>	0.300	0.018	0.001	5.100
	<i>IQR</i>	0.400	0.058	4.40	1.480
Критерий Краскела-Уоллиса, <i>H</i>		<i>H</i> =15.16, <i>p</i> =0.0044	<i>H</i> =22.09, <i>p</i> =0.002	<i>H</i> =13.40, <i>p</i> =0.0094	<i>H</i> =22.73, <i>p</i> =0,0001
Критерий Данна, <i>D</i>		<i>D</i> _{А-Г} =2.85, <i>p</i> =0.04 <i>D</i> _{Б-Г} =2.92, <i>p</i> =0.034 <i>D</i> _{В-Г} =3.057, <i>p</i> =0.022	<i>D</i> _{А-Г} =3.42, <i>p</i> =0.006 <i>D</i> _{А-Д} =3.96, <i>p</i> =0.0007	<i>D</i> _{В-Д} =3.047, <i>p</i> =0.023	<i>D</i> _{А-Г} =3.72, <i>p</i> =0.0019 <i>D</i> _{А-Д} =3.60, <i>p</i> =0.003

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

Самыми загрязненными, согласно УКИЗВ, являлись кластер А и кластер В, включающие экстремально загрязненные водные объекты V класса качества воды; наименее загрязненными – кластеры Г, Д, Б (рисунок 3.3).

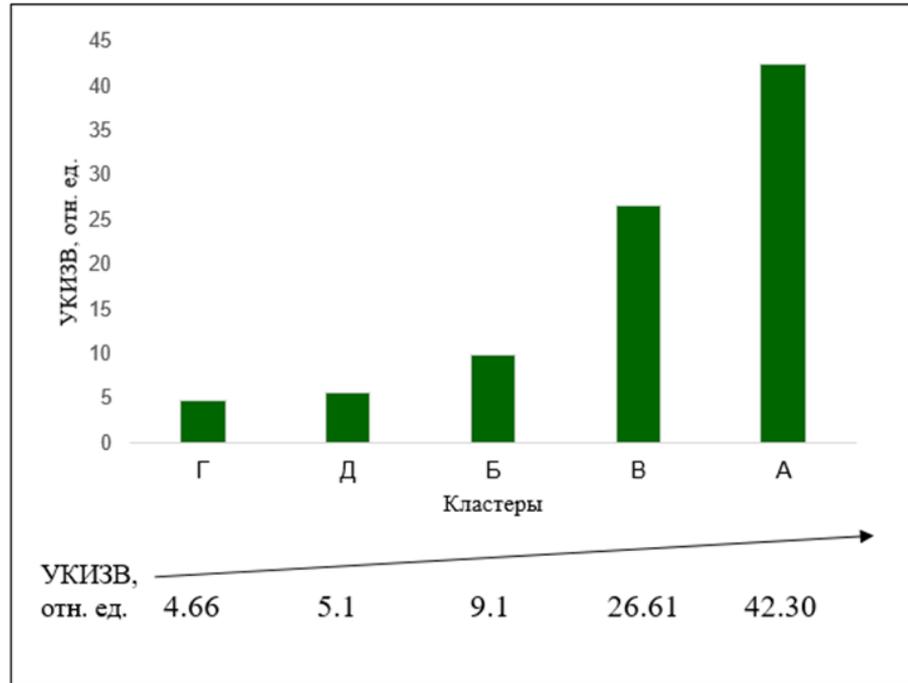


Рисунок 3.3. Распределение групп водных объектов по удельному комбинаторному индексу загрязненности воды (УКИЗВ)
Г – УКИЗВ = 4.66; Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; В – УКИЗВ = 26.61; А – УКИЗВ = 42.30

С помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена ($p < 0.05$) выявлена сильная положительная взаимосвязь между УКИЗВ и концентрациями в воде марганца ($\rho=0.83$) и меди ($\rho=0.79$). Так, по содержанию в водах ионов марганца наиболее загрязненным оказался кластер В. Средняя концентрация марганца ($Me = 2.75$, $IQR = 1.10$) в этих водоемах превышала $ПДК_{рыб-хоз}$ 220–330 раз (рисунок 3.4).

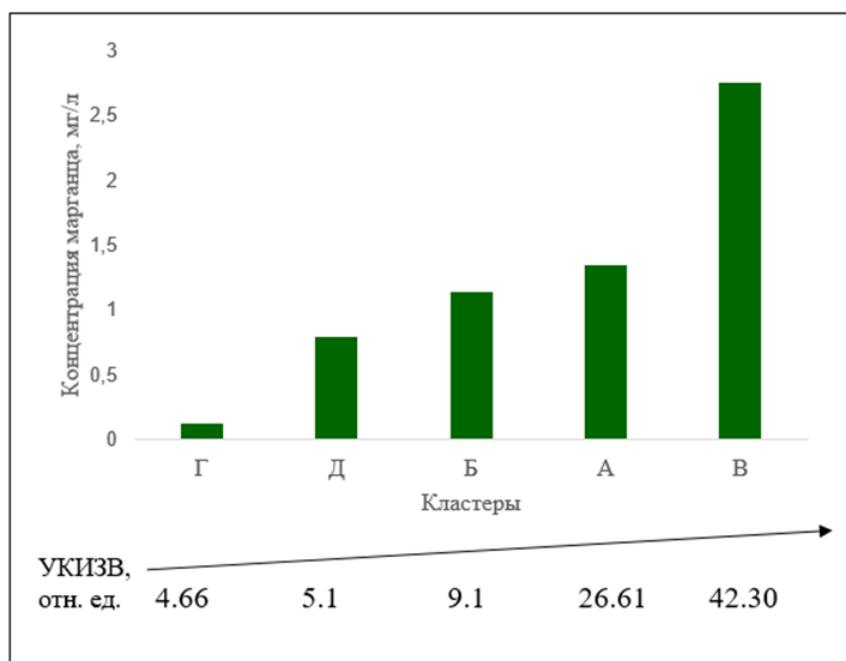


Рисунок 3.4. Распределение групп водных объектов по загрязнению ионами марганца
 Г – УКИЗВ = 4.66; Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А – УКИЗВ = 42.30; В – УКИЗВ = 26.61

Содержание ионов меди во всех водных объектах было существенно выше ПДК_{рыб-хоз} (0.001 мг/л), особенно выделялся по этому показателю кластер А (рисунок 3.5).

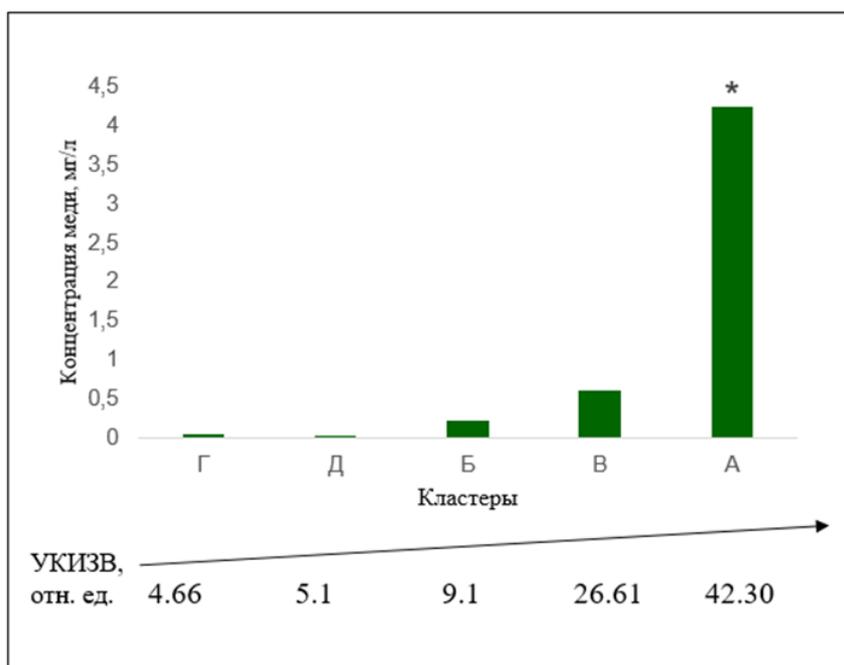


Рисунок 3.5. Распределение групп водных объектов по загрязнению ионами меди
 Г – УКИЗВ = 4.66; Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; В – УКИЗВ = 26.61; А – УКИЗВ = 42.30

Содержание соединений серы особенно высоким было в водных объектах кластеров В и Г (рисунок 3.6).

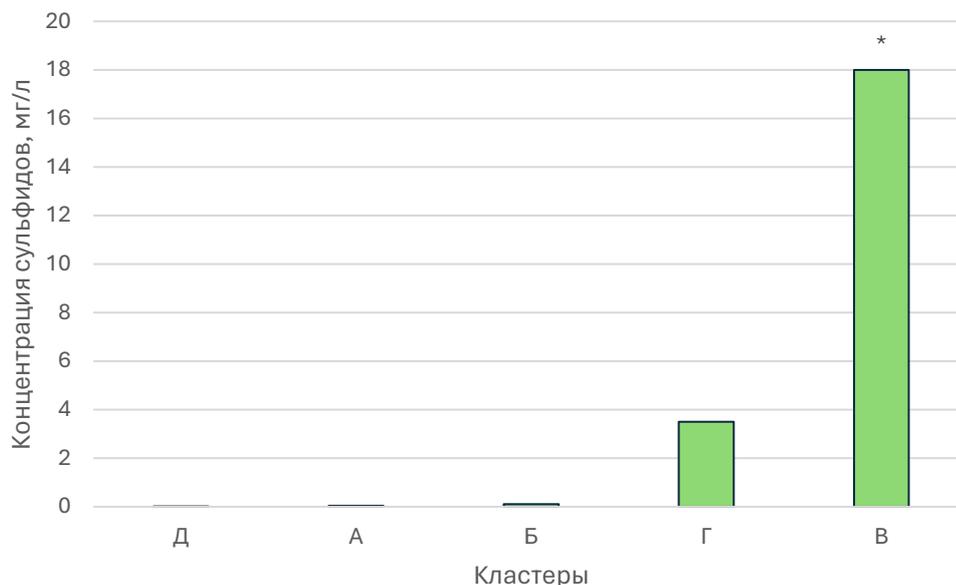


Рисунок 3.6. Распределение групп водных объектов по загрязнению сульфидами
Д – УКИЗВ = 5.10; А – УКИЗВ = 42.30; Б – УКИЗВ = 9.10; Г – УКИЗВ = 4.66; В –
УКИЗВ = 26.61

Умеренная положительная корреляция между УКИЗВ и содержанием кобальта ($\rho=0.74$), хлоридов ($\rho=0.64$), никеля ($\rho=0.60$), свинца ($\rho=0.49$), цинка ($\rho=0.48$), сульфидов ($\rho=0.43$) и железа ($\rho=0.37$).

Для выявления закономерностей группирования изученных водных объектов был применен метод главных координат, который позволяет получить координаты объектов в осях максимальной вариации (аналогично методу главных компонент). В результате была построена ординационная диаграмма в пространстве двух первых главных координат, куда были спроецированы векторы, соответствующие исходным переменным (рисунок 3.7). Кластеры выделены с применением выпуклой оболочки.

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. Напомним, что 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. Таким образом, озерные лягушки присутствовали на всем диапазоне УКИЗВ. Прудовые лягушки встречались в водных объектах с УКИЗВ более 5.0.

Таблица 3.4

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
<i>p</i> - уровень значимости при сравнении долей	<0.001	0.004	0.001	0.003

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

классу, экстремально грязная) оцениваемого по УКИЗВ, представительство видов зеленых лягушек менялось. Сравнение относительных частот распределения озерных и прудовых лягушек выявило преобладание озерных лягушек и иллюстрировало более широкий диапазон толерантности озерных по сравнению с прудовыми в градиенте УКИЗВ водных объектов урбанизированной территории (таблица 3.4).

Шелфорд (Shelford, 1913a, b) ввел в экологию понятие «экологической толерантности», как способности организма существовать в определённом градиенте условий среды. Гидрохимическая среда обитания амфибий урбанизированной территории, с одной стороны, медленно и неуклонно изменяется на протяжении поколений соответствующих видов, а, с другой стороны, она предъявляет организму разнообразные требования, меняющиеся в короткие отрезки онтогенеза. Каждый вид специфичен по экологическим возможностям адаптации; двух идентичных видов не существует (Раменский, 1924), следовательно, подгонка функций организма к состоянию средовых факторов и его существование в условиях динамичной среды обеспечивалась разнообразием конкретных форм адаптации у разных видов. Известно, что зеленые лягушки, обитающие симпатрично (в перекрывающихся ареалах) и синтопично (в одном и том же водоеме) достаточно хорошо различаются по своей биотопической приуроченности (Berger, 1967; Лада, 1995; Боркин, 1998; Кузьмин, 1999), что, в основном, связано с особенностями их зимовок. Экологическая индивидуальность видов в перекрывающихся экологических нишах проявляется, по всей видимости, и в их адаптивной способности к комплексному экстремальному загрязнению водной среды. Озерные лягушки встречаются во всем диапазоне УКИЗВ, следовательно, способны существовать в более разнообразных гидрохимических условиях среды и выдерживать ее значительные изменения, по сравнению с прудовыми. В кластер Г входили четыре водных объекта (оз. Силикатное, оз. Жилново, оз. Рустай, торфокарьер Ситниковского заказника) Нижегородской области, группирующиеся по гидрохимическому составу, в которых в разные годы

встречались только озерные лягушки (*P. ridibundus*, Pallas, 1771) (в сумме 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.

Проведенный сравнительный анализ встречаемости зеленых лягушек в водных объектах урбанизированной территории Нижегородской области, группирующихся по гидрохимическим условиям и различающихся видом среднего стресса, определяемым уровнем загрязнения среды, позволяет сформулировать положение, выносимое на защиту:

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.

На основе распределения водных объектов по кластерам и в соответствии с поставленными задачами в последующих главах предполагается выяснить, имеются ли количественные и/или качественные различия в толерантности озерных и прудовых лягушек к химическому загрязнению? Для ответа на этот вопрос в следующих главах работы, проведен детальней сравнительный учет гематологических (общее содержание в крови лейкоцитов и эритроцитов); морфофизиологических (индексы органов) и цитогенетических (учет микроядер в молодых, полихроматофильных клетках костного мозга и зрелых нормохроматофильных эритроцитах крови) показателей озерных и прудовых лягушек, обитающих отдельно в водных объектах Нижегородской области, группирующихся по гидрохимическому составу. Следует обратить внимание, что в водном объекте (бол. Белкино_1), входящего в кластер Б в 2019 году прудовые и озерные лягушки обитали совместно. Интерес к изучению систематически близких видов животных, обитающих синтопично, связан со специфичностью межвидовых отношений,

статических популяционных показателей, особенностями трофических связей, репродуктивного поведения. Мы предполагаем, что синтопия заставляет виды приспосабливаться к комплексу специфических экологических условий, используя набор универсальных эффекторных клеток, взаимовлияние которых поддерживает стабильность генома организма и проведем сравнительный анализ цитогенетического статуса озерных и прудовых лягушек в условиях совместного обитания.

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

В последние годы сформировалось четкое представление о зеленых лягушках, как сложном комплексе криптических видов и эволюционных видов с присутствием диплоидных и полиплоидных форм (Боркин и др., 2004; Ivanov et al., 2019). Слабые морфологические различия близких видов амфибий при значительной генетической дифференциации делают их удобными объектами для молекулярно-генетических исследований. Первичная 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; Таращук, 1985; Борисовский и др., 2000; Коцержинская, 2000). Отметим, что успешным методом видовой идентификации в случае полиплоидного видообразования у амфибий (*Pelodytes punctatus*) является анализ кариотипа, поскольку у триплоидов в отличие от родительских форм в составе кариотипа 39 хромосом. Кроме того, у гибридных форм высокая частота встречаемости анеуплоидных клеток, имеющих количество хромосом, не кратное гаплоидному набору (Верегина и др., 2014).

Поскольку точная идентификация зеленых лягушек затруднена из-за их морфологического сходства и для уточнения видовой принадлежности в лаборатории молекулярной экологии и систематики животных при кафедре зоологии и экологии Пензенского государственного университета было проведено молекулярно-генетическое определение видов под руководством к.б.н., доцента О.А. Ермакова.

Видовая идентификация и генетическая структура популяций лягушек рода *Pelodytes*. Озерные лягушки. В выборке озерных лягушек оз. Силикатное (20 особей) результаты мультиплексного типирования маркера мтДНК показали равное соотношение гаплотипов «восточной» и «западной» формы озерной лягушки. Исследование маркера яДНК выявило наличие

только аллелей «западной» формы (таблица 4.1). Таким образом, выборка состоит из генетически «чистых» экземпляров *P. ridibundus* и особей, несущих чужеродную (интрогрессивную) мтДНК азиатской озерной лягушки *P. cf. bedriagae*. Отметим, что по данным А. Ю. Иванова (2019) на долю особей, содержащих интрогрессивную комбинацию маркеров мт- и яДНК приходится около трети озерных лягушек, обитающих в восточной части ареала вида.

Таблица 4.1

Генетическая характеристика озерных лягушек оз. Силикатное (г. Нижний Новгород) с различными комбинациями генетических маркеров мтДНК /яДНК

Номер особи	мтДНК	яДНК
1	<i>P. cf. bedriagae</i>	<i>P. ridibundus</i>
2	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. ridibundus</i>
3	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. ridibundus</i>
4	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. ridibundus</i>
5	<i>P. cf. bedriagae</i>	<i>P. ridibundus</i>
6	<i>P. cf. bedriagae</i>	<i>P. ridibundus</i>
7	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. ridibundus</i>
8	<i>P. cf. bedriagae</i>	<i>P. ridibundus</i>
9	<i>P. cf. bedriagae</i>	<i>P. ridibundus</i>
10	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. ridibundus</i>
11	<i>P. cf. bedriagae</i>	<i>P. ridibundus</i>
12	<i>P. cf. bedriagae</i>	<i>P. ridibundus</i>
13	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. ridibundus</i>
14	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. ridibundus</i>
15	<i>P. cf. bedriagae</i>	<i>P. ridibundus</i>
16	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. ridibundus</i>
17	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. ridibundus</i>
18	<i>P. cf. bedriagae</i>	<i>P. ridibundus</i>
19	<i>P. cf. bedriagae</i>	<i>P. ridibundus</i>
20	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. ridibundus</i>

В выборках прудовых лягушек оз. Вторчермет и бол. Белкино все изученные особи имели только видоспецифические маркеры *P. lessonae*, как митохондриальной, так и ядерной ДНК (рисунок 4.1).

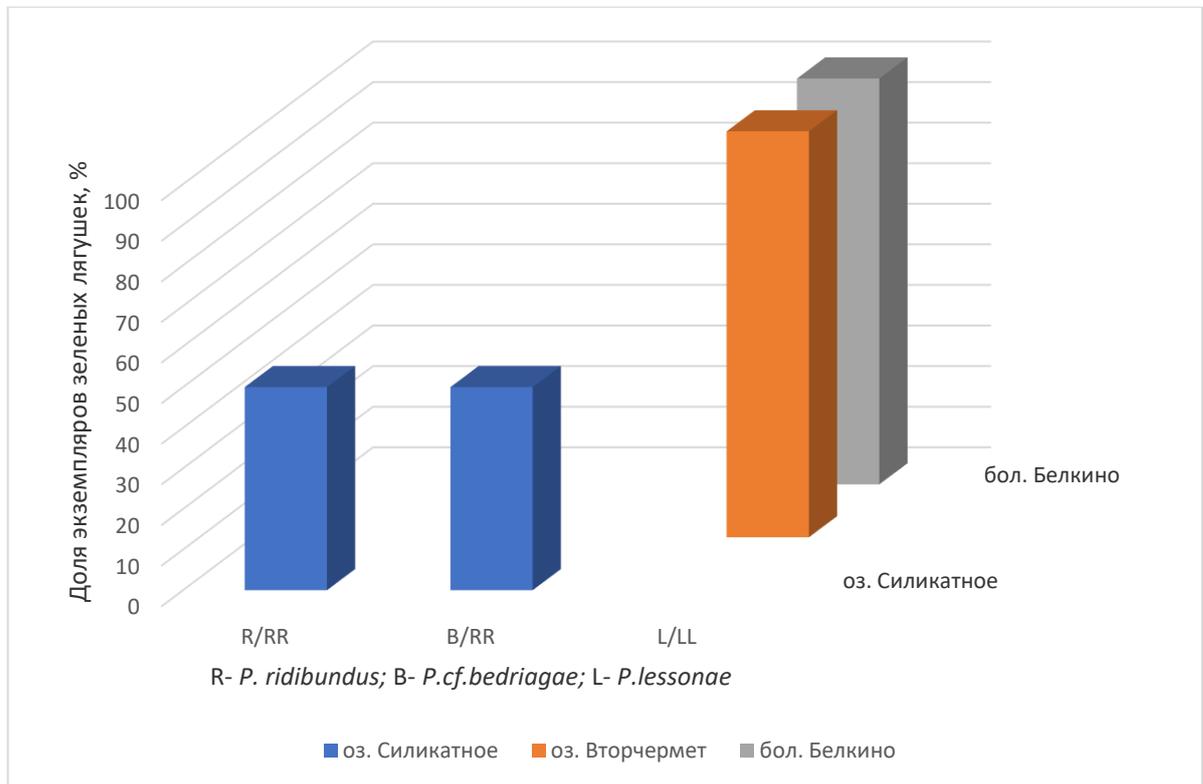


Рисунок 4.1. Генетическая характеристика выборок зеленых лягушек (Доля от общего числа в выборке)

Секвенирование митохондриального маркера (ген ND2) у 6 экз. озерных лягушек двух митохондриальных линий – «западной» (3 экз.) и «восточной» (3 экз.) – полностью подтвердило данные мультиплексного типирования. Все гаплотипы «западной» формы (озерная лягушка: 2,3,4, оз. Силикатное) оказались идентичны и соответствовали варианту R17 (Plötner et al., 2008). Этот вариант является наиболее распространенным у озерных лягушек и отмечен в странах Центральной Европы, в Болгарии, Латвии, Польше, Румынии, Сербии, Словакии, Украине, Франции, России (Калининградская, Московская, Свердловская, Саратовская, Тульская, Воронежская, Рязанская, Нижегородская, Ульяновская области, Ставропольский край, Калмыкия, Марий Эл) (Plötner et al., 2008; Litvinchuk et al., 2020; Svinin et al., 2021).

Гаплотипы «восточной» формы (озерная лягушки: 1.5.6, оз. Силикатное) также были идентичными и относились к гаплотипу ранее выявленному у озерных лягушек во многих регионах европейской части России: Куйбышевская, Астраханская, Волгоградская, Ульяновская, Нижегородская,

Рязанская области, Башкирия, Мордовия, Марий Эл, Татарстан, а также отмеченному в западном Казахстане и на северо-востоке Турции (Akin et al., 2010; Litvinchuk et al., 2020; Svinin et al., 2021).

Секвенирование ядерного маркера (SAI-1) трех экземпляров озерных лягушек показало его специфичность для «западной» формы. Первичная последовательность изученных нами экземпляров тождественна гаплотипу, обнаруженному у озерных лягушек Черноморского побережья Кавказа, Крыма, Астраханской, Волгоградской, Калужской, Куйбышевской, Саратовской, Челябинской области, Марий Эл, Татарстана, а также Украины и Западного Казахстана.

Прудовые лягушки. Определена первичная последовательность ND2 у шести экземпляров прудовых лягушек из двух локалитетов (оз. Вторчермет и бол. Белкино). Обнаружено два гаплотипа, один из которых, найденный у 4 экземпляров (оз. Вторчермет № 2, 3 бол. Белкино № 1, 2), соответствовал варианту L2 – широко распространенному митохондриальному гаплотипу прудовых лягушек (рис. 4.2), встречающемуся от юго-восточной Европы до Центральной Европы и Скандинавии (Plötner et al., 2008). На территории России такие же гаплотипы отмечены в Марий Эл, Мордовии, Ульяновской, Московской, Калужской и Рязанской областях (Litvinchuk et al., 2020; Svinin et al., 2021). Другой гаплотип, отличающийся на одну замену от L2 и обнаруженный у двух экземпляров (Вторчермет № 1, бол. Белкино № 2), являлся уникальным, поскольку мы не обнаружили идентичных гаплотипов в базе GenBank NCBI (рисунок 4.2).

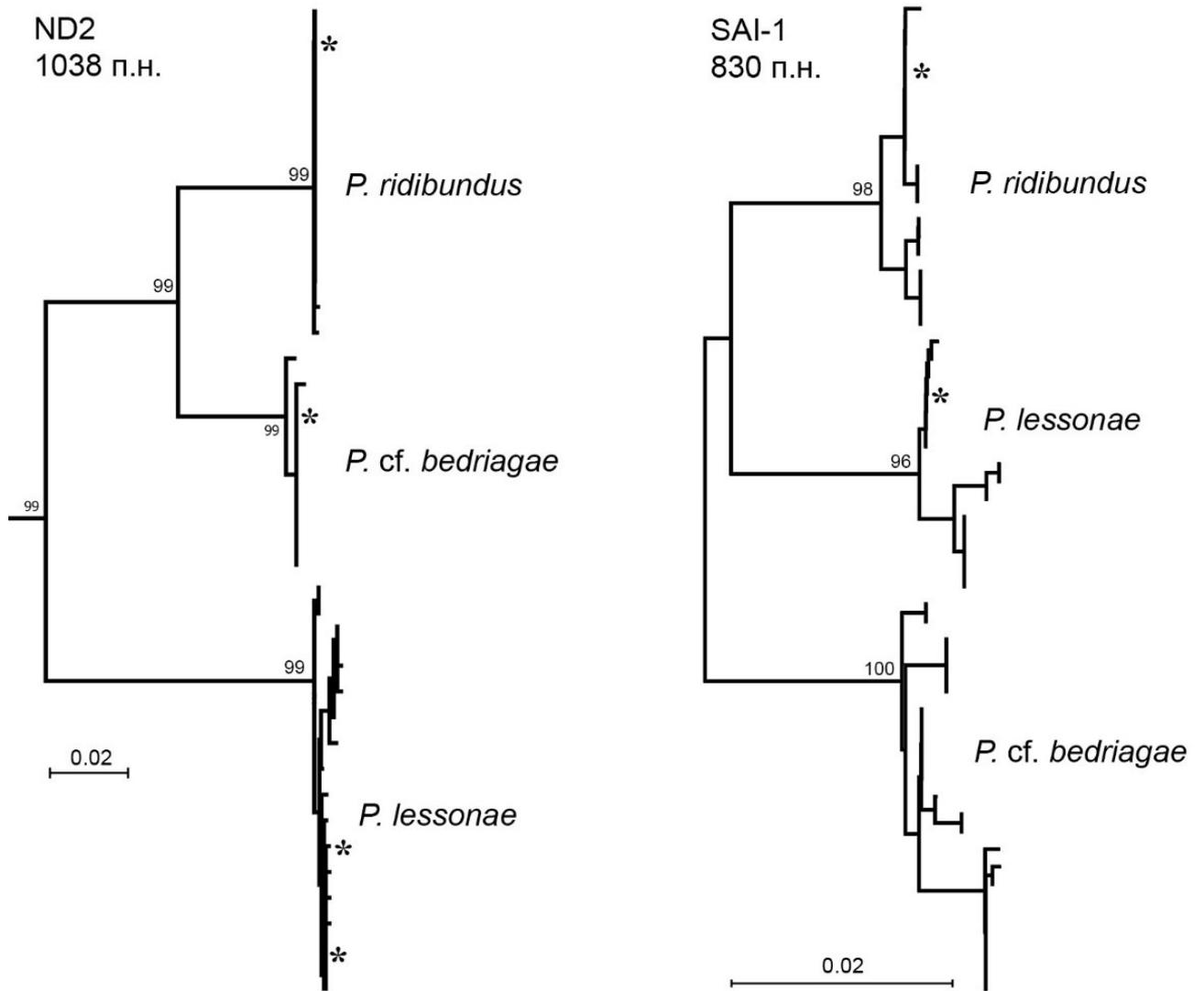


Рисунок 4.2. Дендрограмма (NJ-метод) показывающая дифференциацию озерных (*P. ridibundus* и *P. cf. bedriagae*) и прудовой (*P. lessonae*) лягушек по данным GenBank NCBI и положение исследованных гаплотипов (*). Приведены бутстрэп-поддержки выше 90%. Внешняя группа не показана

Структура ядерного маркера (ген SAI) прудовой лягушки характеризуется делецией повтора *RanaCR1* размером более 500 п.н. (Akin, 2015). У всех шести секвенированных экземпляров (Вторчермет № 1, 2, 3; бол. Белкино № 1, 2, 11) обнаружена эта делеция, что подтверждает видовую идентификацию, полученную методом мультипраймерной ПЦР-реакции.

Таким образом, молекулярно-генетический анализ выборки зеленых лягушек Нижегородской области показал, что озерная лягушка представлена двумя генетическими дифференцированными криптическими формами «западной» (*P. ridibundus*) и «восточной» (анатолийской лягушкой *P. cf.*

bedriagae). В исследованной выборке озерных лягушек (оз. Силикатное) соотношение генетически «чистых» *P. ridibundus* (R/RR) и особей с интрогрессивной мтДНК *P. cf. bedriagae* (B/RR) оказалось равным 1:1. У прудовой лягушки все экземпляры оказались генетически «чистыми» *P. lessonae* с видоспецифическими маркерами (L/LL).

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 маркерами.

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

Абсолютное содержание в крови эритроцитов и лейкоцитов (общее количество клеток, содержащиеся в объеме крови, тыс /мм³) являются интегральными показателями, отражающими активность процессов кроветворения и функционирование иммунной системы, поскольку интенсивность ее работы, а также антигенные чужеродные вещества, изменяющиеся физиологические процессы в организме, оказывают влияние на клеточный состав крови. Настоящая глава диссертации посвящена анализу гематологических показателей озерных и прудовых лягушек, обитающих в водных объектах Нижегородской области, группирующихся по гидрохимическому составу.

Озерные лягушки. При изучении количественных гематологических показателей выборок из популяций озерных лягушек, обитающих в водных

Таблица 5.1

Содержание лейкоцитов и эритроцитов (тыс/мм³) в периферической крови озерных лягушек водных объектов Нижегородской области

УКИЗВ	Кластер	Среднее число лейкоцитов, тыс/мм ³		Среднее число эритроцитов, тыс/мм ³	
		<i>Me</i>	<i>IQR</i>	<i>Me</i>	<i>IQR</i>
4.66	Г	18.0	22.0	230.0	102.0
5.10	Д	20.0	20.0	179.0	139.0
9.10	Б	15.0	13.5	169.0	145.0
31.3	А+В	15.0	10.0	137.0	107.0
Критерий Краскела-Уолиса (H), критерий Данна (D)		H=25.07, p<0.001 D _{А+В-Г} =4.28, p<0.001 D _{Б-Г} =4.26, p<0.001		H=53.74, p<0.001 D _{А+В-Г} =6.56, p<0.001 D _{А+В-Д} =3.68, p=0.001 D _{Б-Г} =5.86, p<0.001 D _{Г-Д} =2.84, p=0.026	

Примечание: *Me* – медиана; *IQR* – интерквартильный размах. В таблице представлены статистически значимые показатели кр. Данна (p < 0.05)

объектах, сгруппированных по гидрохимическому составу, выявлены значимые различия по содержанию в периферической крови лейкоцитов ($N=25.07$, $p<0.001$) и эритроцитов ($N=53.74$, $p<0.001$) (таблица 5.1).

По общему 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 общему содержанию в крови эритроцитов различия между выборками были более существенными, выявлены значимые различия между выборками кластера Г и особями всех остальных кластеров ($N=53.74$, $p<0.001$) (таблица 5.1). Показано, что в условиях ухудшения качества водной среды обитания, оцениваемого по УКИЗВ, суммарное содержание лейкоцитов и эритроцитов в крови озерных лягушек снижалось (рисунок 5.1).

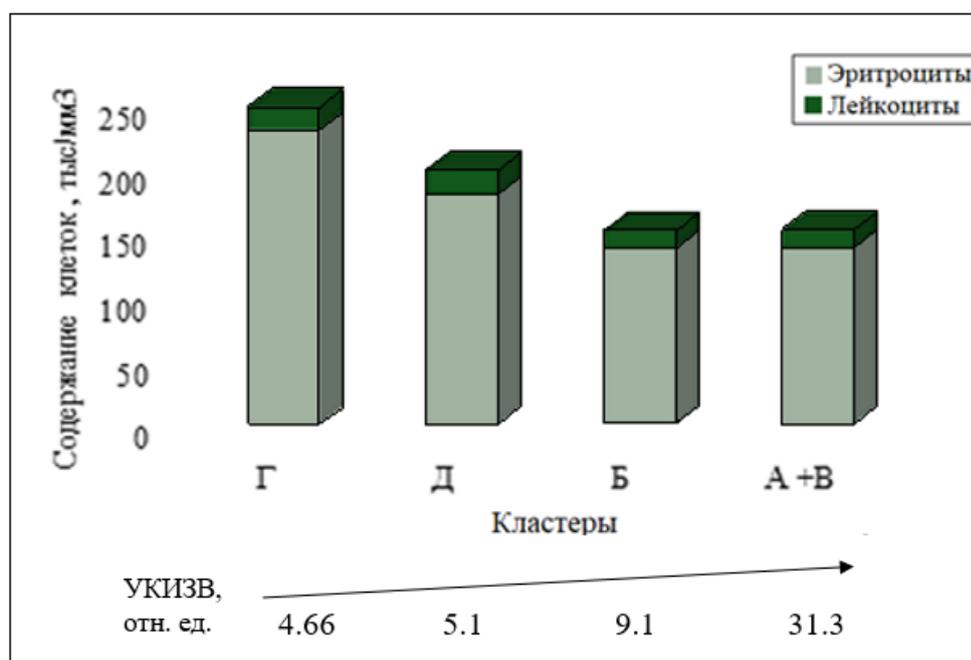


Рисунок 5.1. Изменение количества лейкоцитов и эритроцитов в периферической крови озерных лягушек в градиенте химического загрязнения среды, определенного по УКИЗВ
Г – УКИЗВ = 4.66; Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А+В – УКИЗВ = 31.3.

Стрелка показывает направление градиента УКИЗВ. Значимые различия по критерию Данна, D. Содержание лейкоцитов: $D_{А+В-Г}=4.28$, $p<0.001$; $D_{Б-Г}=4.26$, $p<0.001$.
Содержание эритроцитов: $D_{А+В-Г}=6.56$, $p<0.001$; $D_{А+В-Д}=3.68$, $p=0.001$; $D_{Б-Г}=5.86$, $p<0.001$;
 $D_{Г-Д}=2.84$, $p=0.026$

Прудовые лягушки. В градиенте ухудшения гидрохимических условий среды содержание в крови прудовых лягушек лейкоцитов и эритроцитов изменялось волнообразно: количество лейкоцитов оставалось высоким в условиях грязных вод (кластер Д, УКИЗВ=5.10) и в экстремально грязных условиях (кластер В, УКИЗВ=26.61). Наиболее низкое содержание в крови лейкоцитов и эритроцитов отмечено у прудовых лягушек кластера Б (УКИЗВ=9.10). Выявлены значимые различия в количестве лейкоцитов периферической крови ($H=69.62$, $p=0.04$) между кластерами А и В ($D=2.99$, $p=0.016$), А и Д ($D=4.09$, $p<0.001$), Б и В ($D=4.32$, $p<0.001$), Б и Д ($D=7.70$, $p<0.001$) (таблица 5.2, рисунок 5.2).

Таблица 5.2

Содержание лейкоцитов и эритроцитов (тыс/мм³) в периферической крови прудовых лягушек водных объектов Нижегородской области

УКИЗВ	Кластер	Среднее число лейкоцитов, тыс/мм ³		Среднее число эритроцитов, тыс/мм ³	
		<i>Me</i>	<i>IQR</i>	<i>Me</i>	<i>IQR</i>
5.10	Д	35.0	26.0	196.0	128.0
9.10	Б	16.0	10.0	131.0	122.0
26.61	В	45.78	17.3	386.0	164.0
42.3	А	20.0	12.0	202.9	174.0
Критерий Краскела-Уолиса (H), критерий Данна (D)		$H=69.62$, $p<0.001$ $D_{A-B}=2.99$, $p=0.016$ $D_{A-D}=4.09$, $p<0.001$ $D_{B-B}=4.32$, $p<0.001$ $D_{B-D}=7.70$, $p<0.001$		$H=20.54$, $p<0.001$ $D_{B-B}=3.18$, $p=0.008$ $D_{B-D}=3.70$, $p=0.001$	

Примечание: *Me* – медиана; *IQR* – интерквартильный размах. В таблице представлены статистически значимые показатели кр. Данна ($p < 0.05$)

В экстремальных условиях водной среды (кластер В) и в крови прудовых лягушек отмечено повышенное содержание эритроцитов, по сравнению с особями, обитающими в очень грязненной воде (кластер Б, IV класс, очень грязная, разряд «г»). Отметим, что в гидрохимических условиях среды, оцениваемых по УКИЗВ и соответствующих грязной воде (кластер Д, IV

класс, грязная), содержание в крови прудовых лягушек тоже было повышенным по сравнению с особями кластера Б (таблица 5.2).

В градиенте ухудшения гидрохимических условий среды содержание в крови прудовых лягушек лейкоцитов и эритроцитов изменялось волнообразно: вначале снижалось (кластер Б), а в экстремальных условиях водной среды (кластеры А и В) значительно повышалось (рисунок 5.2).

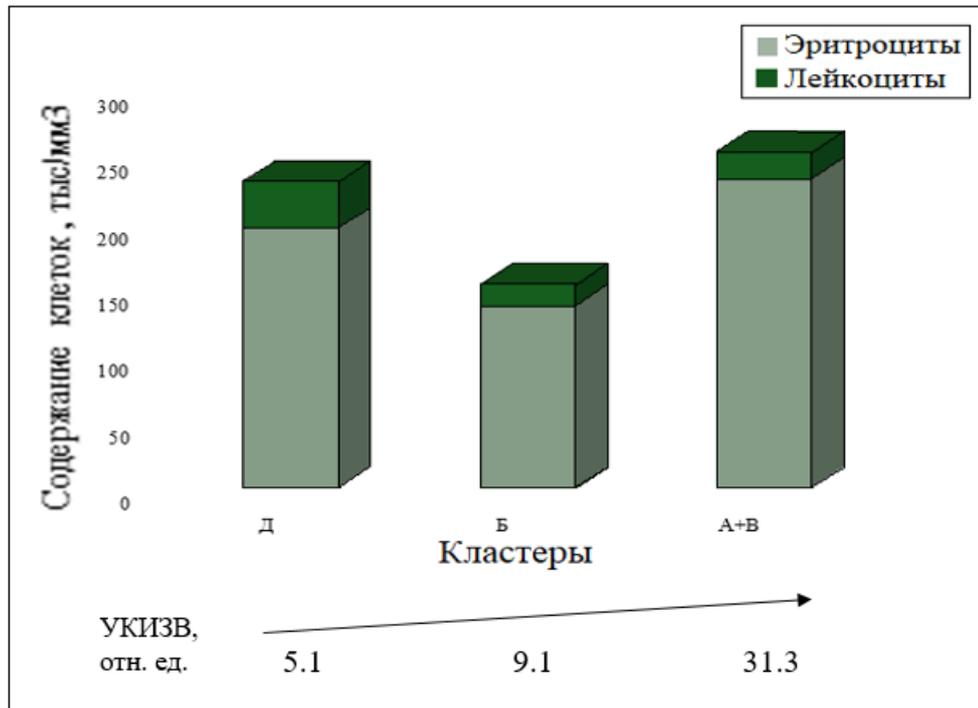


Рисунок 5.2. Изменение количества лейкоцитов и эритроцитов в периферической крови прудовых лягушек в градиенте химического загрязнения среды, определенного по УКИЗВ
Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А+В – УКИЗВ = 31.3.

Стрелка показывает направление градиента УКИЗВ. Значимые различия по критерию Данна, D. Содержание лейкоцитов: $D_{А-В}=2.99$, $p=0.016$; $D_{А-Д}=4.09$, $p<0.001$; $D_{Б-В}=4.32$, $p<0.001$; $D_{Б-Д}=7.70$, $p<0.001$.

Содержание эритроцитов: $D_{Б-В}=3.18$, $p=0.008$; $D_{Б-Д}=3.70$, $p=0.001$

Межвидовую изменчивость гематологических показателей оценивали при анализе выборок, обитающих в сходных условиях среды (А, Б, Д кластеры) (таблица 5.3).

Установлено, что в водных объектах с экстремальным загрязнением водной среды (кластеры А и В) содержание лейкоцитов (рисунок 5.3) и эритроцитов (рисунок 5.4) в крови прудовых лягушек было выше по сравнению с озерными.

Содержание лейкоцитов и эритроцитов (тыс/мм³) в периферической крови зеленых лягушек, обитающих в сходных гидрохимических условиях

Кластер	Вид	Показатель	Среднее число лейкоцитов по выборке, тыс/мм ³	Среднее число эритроцитов по выборке, тыс/мм ³
А+В	<i>P. ridibundus</i>	Me	15.0	137.0
		IQR	10.0	107.0
	<i>P. lessonae</i>	Me	20.5	233.9
		IQR	26.9	244.0
Критерий Манна-Уитни (U)			U=3.35, p<0.001	U=2.19, p<0.001
Б	<i>P. ridibundus</i>	Me	15.0	169.0
		IQR	13.5	145.0
	<i>P. lessonae</i>	Me	16.0	131.0
		IQR	10.0	122.0
Критерий Манна-Уитни (U)			U=0.28, p=0.77	U=2.75, p=0.005
Д	<i>P. ridibundus</i>	Me	20.0	179.0
		IQR	20.0	139.0
	<i>P. lessonae</i>	Me	35.0	196.0
		IQR	26.0	128.0
Критерий Манна-Уитни (U)			U=5.86, p<0.001	U=1.15, p=0.24

Примечание: Me – медиана; IQR – интерквартильный размах

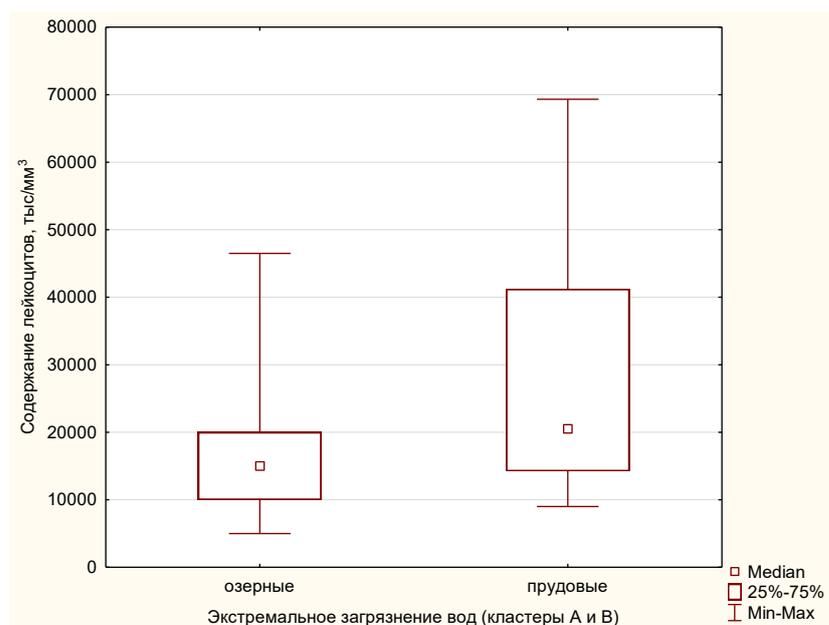


Рисунок 5.3. Межвидовые различия по содержанию лейкоцитарных клеток в крови озерных и прудовых лягушек, обитающих в экстремальных условиях водных объектов

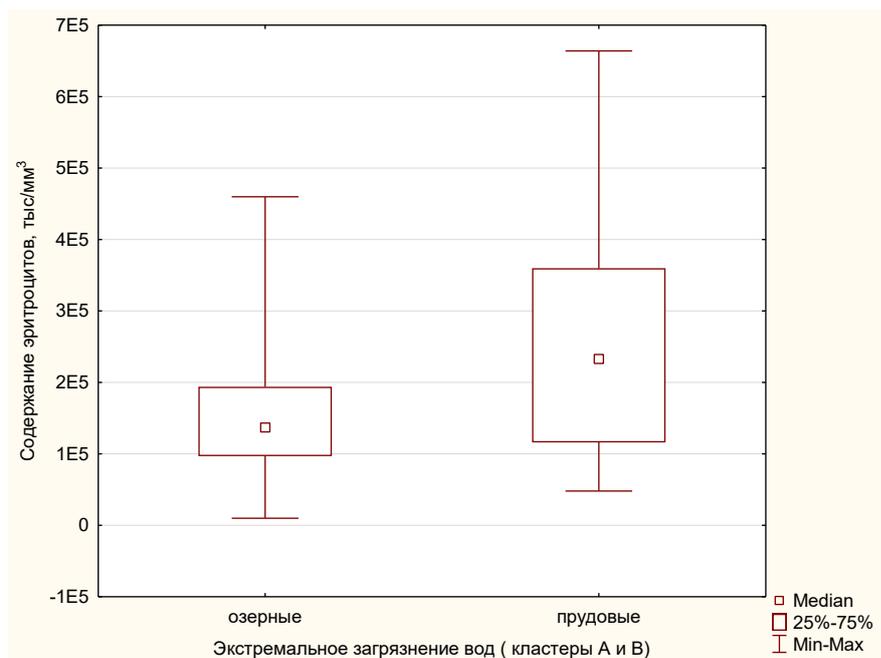


Рисунок 5.4. Межвидовые различия по содержанию эритроцитов в крови озерных и прудовых лягушек, обитающих в экстремально загрязненных условиях водных объектов

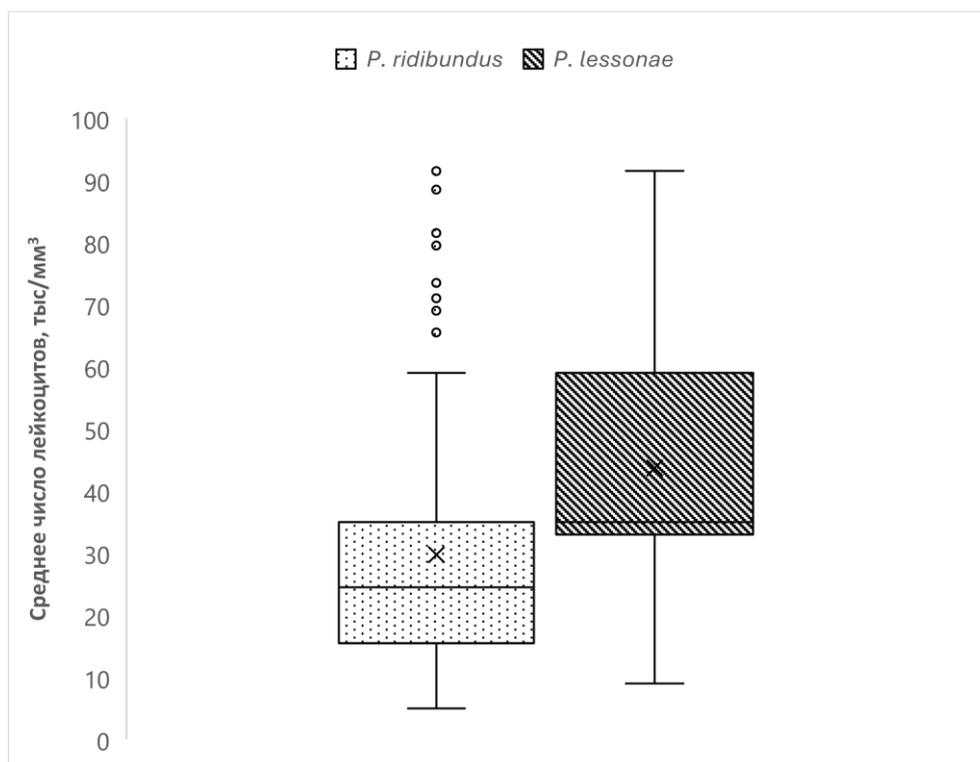


Рисунок 5.5. Содержание лейкоцитов в крови озерных и прудовых лягушек, обитающих в водных объектах, группирующихся по гидрохимическому составу в кластере Д

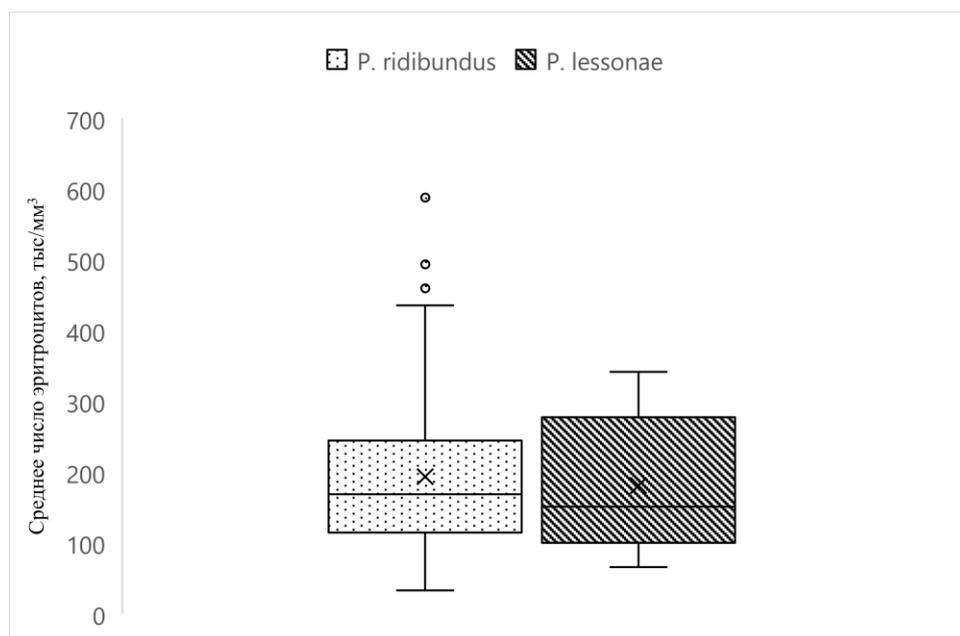


Рисунок 5.6. Содержание эритроцитов в крови озерных и прудовых лягушек, обитающих в водных объектах, группирующихся по гидрохимическому составу в кластере Б

Повышенным оказалось содержание лейкоцитов в крови прудовых лягушек и в условиях кластера Д (УКИЗВ= 5.1) (рисунок 5.5). У озерных особей, обитающих, в водных объектах кластера Б (УКИЗВ=9.1, IV класс, очень грязная, разряд «Г») с высоким загрязнением ионами марганца, меди, цинка, выявлено повышенное содержание в крови эритроцитов ($U=2.75$, $p=0.005$) по сравнению с прудовыми (рисунок 5.6). Отметим, что в условиях синтопии (в водном водной объекте, бол. Белкино_1_2019) межвидовых различий в гематологических показателях не выявлено (таблица 5.4).

Таблица 5.4

Содержание лейкоцитов и эритроцитов (тыс/мм³) в периферической крови зеленых лягушек в условиях синтопического обитания

Вид	Среднее число лейкоцитов, тыс/мм ³		Среднее число эритроцитов, тыс/мм ³	
	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	<i>Me</i>	<i>IQR</i>
Озерные лягушки (10 особей)	24.5	11.5	263.0	110.0
Прудовые лягушки (10 особей)	21.5	11.5	201.0	70.0
Критерий Манна-Уитни (U)	U=41.0, p=0.64		U=31.5, p=1.36	

Коэффициентом гамма корреляции выявлена взаимосвязь изменения гематологических показателей в крови зеленых лягушек с показателями загрязнения водной среды. Установлена отрицательная корреляция количественных гематологических показателей озерных лягушек с ионами цинка (-0.377, $p=0.02$), кобальта (-0.437, $p=0.009$), никеля (-0.480, $p=0.003$), показывающая, что с повышением содержания в поверхностных водах водных объектов тяжелых металлов в организме озерных лягушек наблюдалось снижение процессов лейкопоза. Также выявлена взаимосвязь угнетения у озерных лягушек эритропоза с повышенным содержанием в воде нитратов (-0.619, $p=0.033$). (таблица 5.5).

Таблица 5.5

Анализ взаимосвязи общего содержания клеток крови зеленых лягушек с гидрохимическими показателями среды обитания

Сравниваемые пары		Коэффициент гамма-корреляции, γ	p - уровень значимости
Гематологический показатель, тыс/мм ³	Частный оценочный коэффициент, учитывающий кратность превышения ПДКрыб-хоз химического вещества		
<i>Озерные лягушки</i>			
Число лейкоцитов	цинк	-0.377	0.020
	кобальт	-0.437	0.009
	никель	-0.480	0.003
Число эритроцитов	нитраты	-0.619	0.039
<i>Прудовые лягушки</i>			
Число эритроцитов	никель	-0.668	0.034
	свинец	-0.726	0.010
Число лейкоцитов	свинец	-0.851	0.001
	никель	-0.863	0.001

Выявлена взаимосвязь снижения в крови прудовых лягушек общего количества эритроцитов и лейкоцитов от содержания в водных объектах

тяжелых металлов (свинца и никеля). Полученные результаты свидетельствовали об угнетении процессов лейко- и эритропоэза в организме прудовых лягушек в условиях комплексного загрязнения и повышенным содержанием в поверхностных водах тяжелых металлов (никеля, свинца).

Проведенный анализ гематологических показателей прудовых и озерных лягушек позволяет нам сформулировать следующее положение, выносимое на защиту: **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.**

Таким образом, по градиенту ухудшения качества водной среды обитания, оцениваемого по УКИЗВ, в крови озерных лягушек выявлено снижение числа лейкоцитов и эритроцитов, коррелирующее с повышенным содержанием в поверхностных водах ионов кобальта, никеля и нитратов. В градиенте ухудшения гидрохимических условий среды содержание в крови прудовых лягушек лейкоцитов и эритроцитов изменялось волнообразно. Установлено снижение числа лейкоцитов в условиях экстремального загрязнения среды у обоих видов лягушек, при этом содержание клеток в крови прудовых было значимо выше, 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*

Исследование влияния абиотических факторов на живые организмы в современных условиях с целью оценки устойчивости и адаптации организмов к внешним воздействиям – одна из важнейших задач экологической физиологии. У амфибий, постоянно обитающих в загрязненной водной среде, выявляются разнообразные адаптивные изменения, проявляющиеся, в том числе и на уровне крови, ключевой гомеостатической структуры организма (Чернышова, Старостин, 1994; Пескова, 2004; Силс, 2008; Davis et al., 2008; и др.). Адаптивные реакции системы крови амфибий протекают неодинаково не только в различных систематических группах, но и у близких видов (Вершинин, 2004). В связи с этим, исследования цитогенетических показателей имеют не только практическую значимость, связанную с оценкой качества среды путём биоиндикации, но и способствуют получению характеристик популяционного гомеостаза, обеспечивающего выживание и существование животных в условиях антропогенного средового стресса.

Перспективным направлением, в изучении влияния факторов окружающей среды на генетический аппарат клеток организма, является цитогенетический анализ (микроядерный тест). Анализ основан на особенности клеток пролиферирующей (в первую очередь эритроцитов разной степени созревания) ткани под воздействием мутагенов образовывать особые ядерные структуры, которые называются микроядрами (Жулева, Дубинин, 1994; Захаров и др., 1996; Логинов, 2004; Манских, 2006; Кузина, 2010; Luzhna et al., 2013; Mansi et al., 2014 и др.). Микроядра образуются в процессе клеточных делений из отстающих ацентрических фрагментов, возникших в результате структурных нарушений (аббераций) хромосом и не попавшими во вновь формирующееся ядро при делении клеток (так называемый кластогенный эффект). Кроме того, они могут образовываться из хромосом, задерживающихся в анафазе на экваторе клетки (анеугенный эффект). 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), разные характеристики хромосомных нарушений, изменчивости генома и взаимосвязь их с факторами окружающей среды до сих пор остаются несистематизированными.

Костный мозг бесхвостых амфибий является важным органом кроветворной системы, осуществляющий гемопоэз, доля незрелых эритроцитов в нем постоянно выше, чем в других участках гемопоэтической системы (Акуленко, 2008). В связи с постоянной высокой эритропоэтической активностью этой ткани при цитогенетическом анализе особую актуальность приобретает сравнительный учет хромосомных нарушений в молодых клетках костного мозга и зрелых эритроцитах периферической крови.

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 Нижегородской области, группирующихся по гидрохимическому составу.

6.1. Анализ видов микроядер в нормохроматофильных эритроцитах (НХЭ)

Озерные лягушки. В эритроцитах крови (НХЭ) озерных лягушек всех водных объектов, сгруппированных в кластеры, наиболее часто встречались прикрепленные микроядра. Доля разрыхленных, оформленных и палочковидных была значительно меньше. Так, например, в экстремальных гидрохимических условиях (кластеры Аи В) в НХЭ преобладали микроядра прикрепленного вида, клетки с палочковидными ядрами не встречались, а количество эритроцитов с оформленными (0.074 %) и разрыхленными (0.35%) микроядрами было незначительным. Следует отметить, что в сравнительно более благоприятных, но загрязненных условиях водной среды

у озерных лягушек (кластер Г) относительно равномерно встречались НХЭ с оформленными, палочковидными и разрыхленными микроядрами, напротив, доля клеток с микроядрами прикрепленного вида оказалась небольшой по сравнению с выборками озерных лягушек других кластеров (таблица 6.1).

Таблица 6.1.

Доля нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами (%) в крови озерных лягушек водных объектов Нижегородской области

Кластер/Число просмотренных эритроцитов	Число клеток с микроядрами, шт /Доля микроядер, %				
	а	б	в	г	Все микроядра
А+В / 121 000	9/0.074	1827/15.09	43/0.35	0/0	1879/15.52
Б / 257 000	27/0.10	5392/20.98	186/0.72	2/0.007	5602/21.79
Г/160 000	83/0.52	773/4.83	150/0.94	100/0.62	1105/6.90
Д / 130 000	26/0.2	2438/18.75	120/0.92	18/0.14	2601/20.01
<i>Статистические показатели:</i>					
z, p_{A+B-B}	$z=0.9$ $p = 0.37$	$z=12.32$ $p<0.001$	$z=4.29$ $p=0.000018$	$z=0.97$ $p = 0.33$	$z=12.91$ $p<0.001$
z, p_{A+B-G}	$z=6.44$ $p<0.001$	$z=28.14$ $p<0.001$	$z=5.83$ $p<0.001$	$z=8.69$ $p<0.001$	$z=22.08$ $p<0.001$
z, p_{A+B-D}	$z=2.66$ $p = 0.0078$	$z=7.07$ $p<0.001$	$z=5.57$ $p<0.001$	$z=4.09$ $p=0.00004$	$z=8.46$ $p<0.001$
z, p_{B-G}	$z=7.99$ $p <0.001$	$z=42.02$ $p<0.001$	$z=2.36$ $p = 0.018$	$z=12.39$ $p<0.001$	$z=37.17$ $p<0.001$
z, p_{B-D}	$z= 2.38$ $p =0.017$	$z=4.64$ $p=0.000003$	$z=2.08$ $p = 0.037$	$z=5.34$ $p<0.001$	$z=3.65$ $p=0.00026$
z, p_{G-D}	$z= 4.40$ $p=0.00001$	$z=35.26$ $p<0.001$	$z=0.12$ $p = 0.9$	$z=6.46$ $p<0.001$	$z=31.23$ $p<0.001$

Примечание: а- оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в- разрыхленные микроядра; г– палочковидные микроядра; z – критерий сравнения долей; p – уровень значимости, с учетом поправки Холма $p=0.008$

Суммарное содержание в крови озерных лягушек кластера Г эритроцитов с микроядрами всех видов оказалось статистически значимо меньше, по сравнению с аналогичным показателем особей других кластеров. Отметим при этом, что в условиях ухудшения качества водной среды, оцениваемого по УКИЗВ, в крови озерных лягушек на фоне возрастания суммарного количество клеток с микроядрами увеличивалась доля нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами прикрепленного вида (рисунок 6.1).

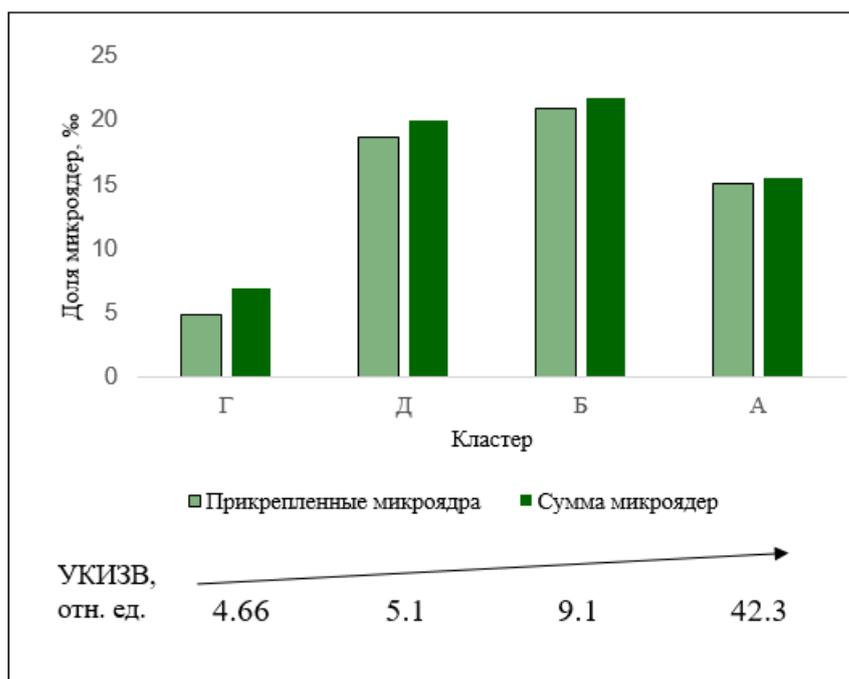


Рисунок 6.1. Возрастание доли эритроцитов с микроядрами в крови озерных лягушек при ухудшения гидрохимических условий среды обитания
Г – УКИЗВ = 4.66; Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А – УКИЗВ = 42.30

Наиболее крупными были в НХЭ разрыхленные микроядра, их площадь почти в 3–5 раз превышала площадь прикрепленных. Площадь оформленных и палочковидных была сопоставима (таблица 6.2).

Таблица 6.2

Усредненные показатели площади микроядер (мкм²) в эритроцитах озерных лягушек урбанизированной территории

Статистические показатели	Средняя площадь микроядер (мкм ²)			
	а	б	в	г
<i>M</i>	3.06	1.48	6.99	3.80
<i>m</i>	0.34	0.03	0.32	0.79
<i>H, p</i>	H=620.22, p<0.001			
<i>D, p</i>	D_{а-б}=5.07, p<0.001; D_{а-г}=0.56, p=1.00; D_{а-в}=3.10, p=0.01; D_{б-г}=3.18, p=0.008; D_{б-г}=24.19, p<0.001; D₃₋₄=0.98, p=1.00			

Примечание: а – оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в – разрыхленные микроядра; г – палочковидные микроядра; М – среднее арифметическая, m – ошибка среднего арифметического, D – критерий Дана, p – уровень значимости

Прудовые лягушки. В эритроцитах крови (НХЭ) прудовых лягушек, также, как и в эритроцитах крови озерных лягушек наиболее часто

встречались прикрепленные микроядра. Доля разрыхленных, оформленных и палочковидных была значительно меньше (таблица 6.3).

Таблица 6.3.

Доля нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами (%) в крови прудовых лягушек водных объектов Нижегородской области

Кластер/Число просмотренных эритроцитов	Число клеток с микроядрами, шт /Доля микроядер, ‰				
	а	б	в	г	Все микроядра
А+В / 51 000	20/0.39	1232/24.16	48/0.94	6/0.12	1306/25.61
Б / 178 000	22/0.12	1797/10.09	186/1.04	5/0.03	2024/11.37
Д / 58 000	43/0.74	540/9.31	49/0.84	31/0.53	663/11.43
Статистические показатели:					
z, p_{A+B-B}	$z=3.95$ $p=0.000078$	$z=24.51$ $p<0.001$	$z=0.64$ $p=0.52$	$z=2.57$ $p=0.010$	$z=23.67$ $p<0.001$
z, p_{A+B-D}	$z=2.39$ $p=0.017$	$z=19.33$ $p<0.001$	$z=0.53$ $p=0.59$	$z=3.72$ $p=0.00019$	$z=17.53$ $p<0.001$
z, p_{B-D}	$z=7.78$ $p<0.001$	$z=1.65$ $p=0.09$	$z=1.32$ $p=0.18$	$z=8.57$ $p<0.001$	$z=0.11$ $p=0.91$

Примечание: а- оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в- разрыхленные микроядра; г– палочковидные микроядра; z – критерий сравнения долей; p – уровень значимости, с учетом поправки Холма $p=0.016$

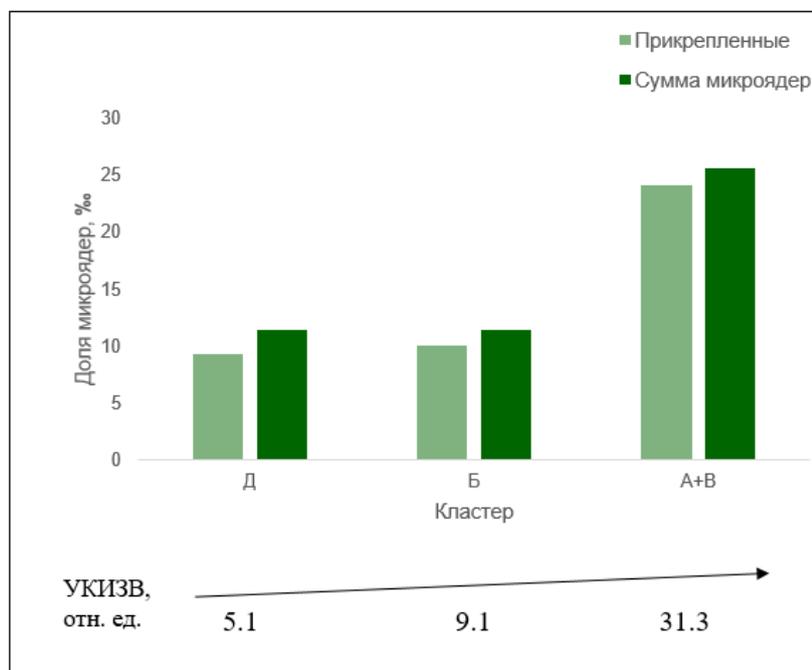


Рисунок 6.2. Доля эритроцитов с микроядрами в крови прудовых лягушек при ухудшения гидрохимических условий среды обитания
Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А+В – УКИЗВ = 31.3

Высокое содержание НХЭ с микроядрами в экстремально загрязненных кластерах обуславливалось возрастанием доли эритроцитов с микроядрами прикрепленного вида, доля которых была в 2.39 раза и 2.59 по сравнению с особями кластера Б и Д. соответственно (рисунок 6.2).

Отметим, что сумма НХЭ с микроядрами ($z = 14.16$, $p < 0.001$), а также доли отдельных видов микроядер (оформленные – $z = 4.63$, $p = 0.00004$; прикрепленные – $z = 12.98$, $p < 0.001$; палочковидные – $z = 3.77$, $p = 0.00016$; разрыхленные – $z = 4.82$, $p = 0.000001$) в эритроцитах прудовых лягушек в экстремально загрязненных условиях водной среды (кластер А) были значимо выше, чем у озерных (рисунок 6.3). Межвидовые различия в показателях цитогенетического гомеостаза отмечены и в менее загрязненных условиях водной среды: прудовые лягушки характеризовались менее высоким содержанием микроядер прикрепленного вида и повышенной долей микроядер оформленного ($z = 6.07$, $p < 0.001$, кластер Д), палочковидного ($z = 4.91$, $p = 0.000001$, кластер Д) и разрыхленного ($z = 3.56$, $p = 0.0003$, кластер Б) видов (таблица 6.4).

Таблица 6.4.

Доля нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами (%) в крови зеленых лягушек водных объектов Нижегородской области

Кластер/Число просмотренных эритроцитов	Вид	Число клеток с микроядрами, шт /Доля микроядер, %				
		а	б	в	г	Все микроядра
А+В / 121 000	<i>озерные</i>	9/0.074	1827/15.09	43/0.35	0/0	1879/15.52
А+В / 51 000	<i>прудовые</i>	20/0.39	1232/24.16	48/0.94	6/0.12	1306/25.61
Критерий z, p		$z = 4.63,$ $p = 0.000004$	$z = 12.98,$ $p < 0.001$	$z = 4.82,$ $p = 0.000001$	$z = 3.77,$ $p = 0.00016$	$z = 14.16,$ $p < 0.001$
Б / 257 000	<i>озерные</i>	27/0.10	5392/20.98	186/0.72	2/0.007	5602/21.79
Б / 178 000	<i>прудовые</i>	22/0.12	1797/10.09	186/1.04	5/0.03	2024/11.37
Критерий z, p		$z = 0.56,$ $p = 0.57$	$z = 27.68,$ $p < 0.001$	$z = 3.56,$ $p = 0.00037$	$z = 1.64,$ $p = 0.1$	$z = 25.76,$ $p < 0.001$
Д / 130 000	<i>озерные</i>	26/0.2	2438/18.75	120/0.92	18/0.14	2601/20.01
Д / 58 000	<i>прудовые</i>	43/0.74	540/9.31	49/0.84	31/0.53	663/11.43
Критерий z, p		$z = 6.07,$ $p < 0.001$	$z = 15.14,$ $p < 0.001$	$z = 0.52,$ $p = 0.60$	$z = 4.91,$ $p = 0.000001$	$z = 13.15,$ $p < 0.001$

Примечание: а- оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в- разрыхленные микроядра; г – палочковидные микроядра; z – критерий сравнения долей; p – уровень значимости, $p = 0.05$

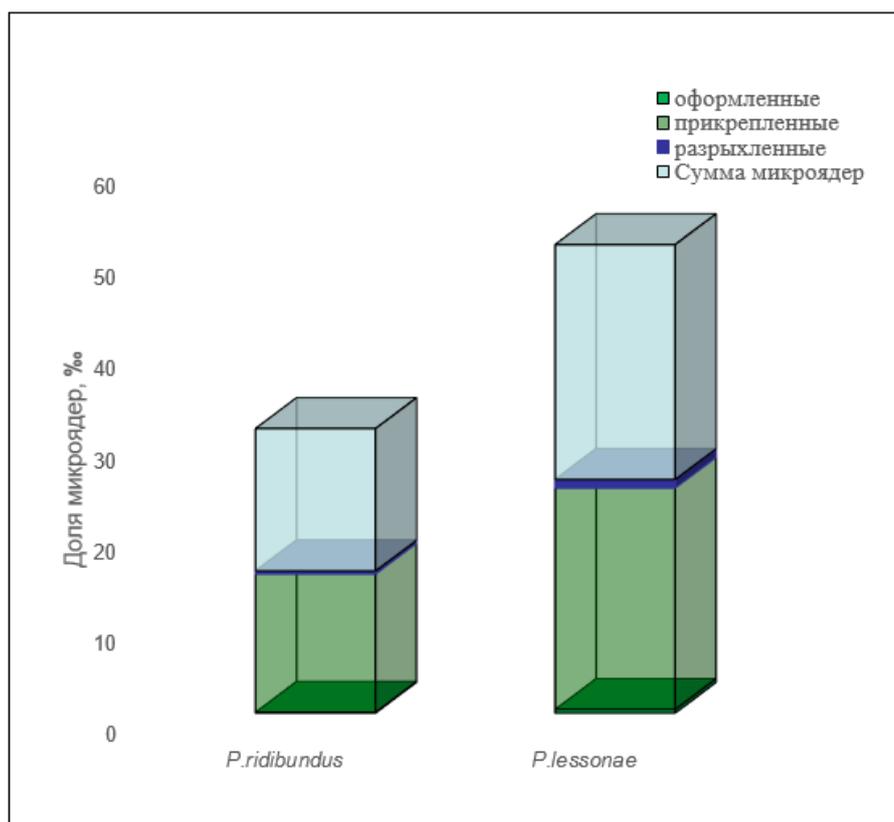


Рисунок 6.3. Межвидовые различия по содержанию микрорядер в крови озерных и прудовых лягушек в экстремальных гидрохимических условиях среды

В условиях синтопического обитания (бол. Белкино_2019, входящее в кластер Б с УКИЗВ=9.10, IV класс качества воды, очень грязная, разряд «г») в периферической крови межвидовых различий по содержанию микрорядер не выявлено (таблица 6.5).

Таблица 6.5.

Доля нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами (%) в периферической крови зеленых лягушек в условиях синтопического обитания

Вид	Число клеток с микроядрами, шт /Доля микрорядер, ‰				
	а	б	в	г	Все микроядра
Озерные лягушки (10 особей) / 20 000	3/0.15	647/32.35	6/0.3	0/0	656/32.8
Прудовые лягушки (10 особей) / 20 000	3/0.15	711/35.55	5/0.25	0/0	719/35.95
Критерий z	z=0, p=1.0	z=1.76, p=0.078	z =0.3, p=0.76	z=0, p=1.0	z =1.72, p=0.08

Примечание: а- оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в- разрыхленные микроядра; г – палочковидные микроядра; z – критерий сравнения долей; p – уровень значимости, p=0.05

Содержание микроядер оформленного, прикрепленного, палочковидного и разрыхленного видов в зрелых эритроцитах крови, а также суммарная доля микроядер в НХЭ озерных и прудовых лягушек была сопоставимой. Известно, что виды микроядер формируются при разных нарушениях генетического материала (Migliore et al., 1997; Кривцова и др., 2021; Крюков, 2023). Так, прикрепленные микроядра, включающие в себя ацентрические фрагменты, являются результатом хромосомных aberrаций; оформленные микроядра, представленные целыми хромосомами, задерживающимися на экваторе клетки за счет дефектов веретена деления. Исходя из данных литературы и собственных результатов, можно полагать, что у зеленых лягушек исследованных выборок доля клеток с хромосомными aberrациями превышала количество клеток с вариантами анеуплоидии, возникающей в результате изменений взаимодействия хромосом с веретеном деления. Индукция хромосомных aberrаций, как один из показателей дестабилизации кариотипа, свидетельствовала об активации соматического мутагенеза и мутагенном воздействии факторов окружающей среды, более выраженном в популяциях, обитающих в условиях более высокого комплексного гидрохимического загрязнения среды обитания.

Таким образом, в условиях более высокого загрязнения водной среды обитания в крови зеленых лягушек обоих видов наблюдались изменения цитогенетического гомеостаза организма, проявляющееся появлением эритроцитов с микроядрами, формирующимися, в первую очередь, за счет ацентрических фрагментов хромосом в результате хромосомных aberrаций. 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)

Озерные лягушки. Суммарное содержание микроядер в незрелых эритроцитах костного мозга возросло в градиенте ухудшения гидрохимических условий среды в основном за счет вклада оформленных и разрыхленных видов, доля которых увеличивалась в 1,96 раза и 10,9 раза, соответственно, по сравнению с показателями особей наименее загрязненного кластера Д (таблица 6.6, рисунок 6.4).

Таблица 6.6.

Доля полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (%) в крови озерных лягушек водных объектов Нижегородской области

Кластер/Число просмотренных эритроцитов	Число клеток с микроядрами, шт /Доля микроядер, ‰				
	а	б	в	г	Все микроядра
А / 120 000	540/4.5	1240/10.33	210/1.75	0/0	1990/16.58
Б / 257 000	434/1.68	2646/10.29	160/0.62	20/0.08	3260/12.68
Д / 122 000	280/2.29	1110/9.09	20/0.16	0/0	1410/11.55
<i>Статистические показатели:</i>					
z, p_{A-B}	$z = 15.83,$ $p < 0.001$	$z = 0.11,$ $p = 0.91$	$z = 10.29,$ $p < 0.001$	$z = 3.05,$ $p = 0.002$	$z = 9.51,$ $p < 0.001$
z, p_{A-D}	$z = 9.33,$ $p < 0.001$	$z = 3.09,$ $p = 0.002$	$z = 12.66,$ $p < 0.001$	$z = 0.0,$ $p = 1.0$	$z = 10.50,$ $p < 0.001$
z, p_{B-D}	$z = 4.02,$ $p = 0.000058$	$z = 3.47,$ $p = 0.0005$	$z = 6.05,$ $p < 0.001$	$z = 3.08,$ $p = 0.002$	$z = 2.93,$ $p = 0.003$

Примечание: а - оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в - разрыхленные микроядра; г – палочковидные микроядра; z – критерий сравнения долей; p – уровень значимости, с учетом поправки Холма $p = 0.016$

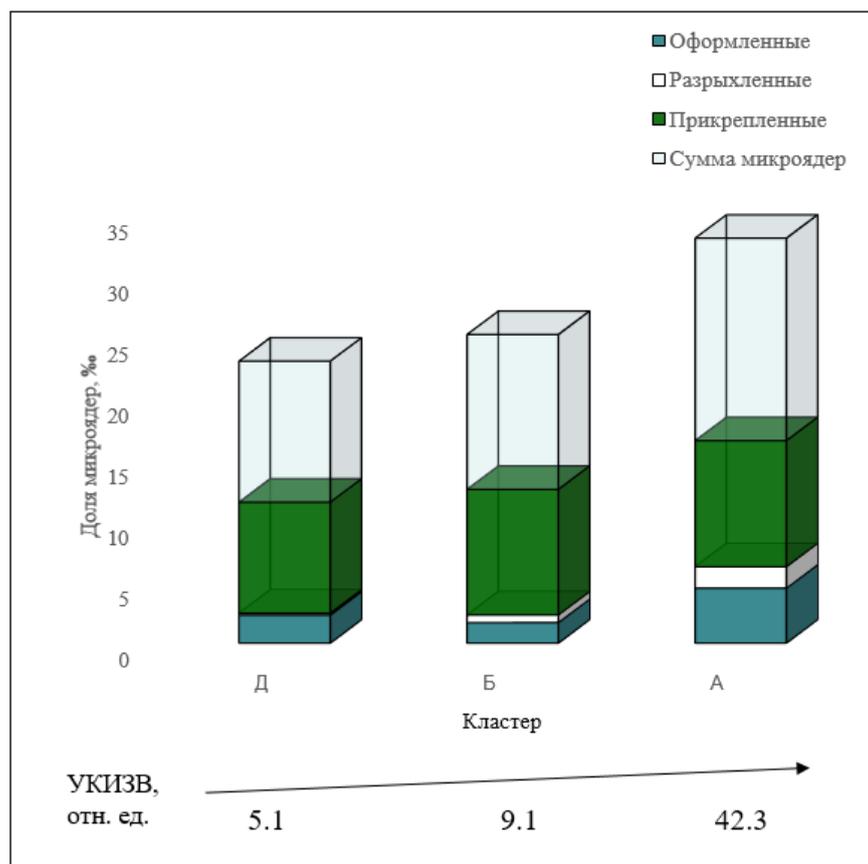


Рисунок 6.4. Распределение ПХЭ с микроядрами в костном мозге озерных лягушек в разных гидрохимических условиях среды
Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А – УКИЗВ = 42.30

Прудовые лягушки. Соотношение видов микроядер в эритроцитах костного мозга прудовых лягушек различалось в зависимости от уровня загрязненности водной среды.

Таблица 6.7.

Доля полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (%) в крови прудовых лягушек водных объектов Нижегородской области

Кластер/Число просмотренных эритроцитов	Число клеток с микроядрами, шт /Доля микроядер, %				
	а	б	в	г	Все микроядра
А / 39 000	49/1.25	522/13.38	7/0.17	0/0	578/14.82
Б / 165 000	429/2.6	541/3.27	120/0.72	0/0	1090/6.61
Статистические показатели:					
z, p_{A-B}	$z=4.93,$ $p=0.000001$	$z=24.92, p<0.001$	$z=3.9,$ $p=0.000096$	$z=0, p=1.0$	$z=16.2,$ $p<0.001$

Примечание: а- оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в- разрыхленные микроядра; г – палочковидные микроядра; z – критерий сравнения долей; p – уровень значимости, p=0.05

У лягушек менее загрязненного кластера Б преобладала доля оформленных ($z = 4.93$, $p = 0.000001$) и разрыхленных ($z = 3.9$, $p = 0.000009$) микроядер по сравнению с особями кластера А, у которых значимым вкладом в общую сумму вносили микроядра прикрепленного ($z = 243.92$, $p < 0.001$) вида (таблица 6.7, рисунок 6.5).

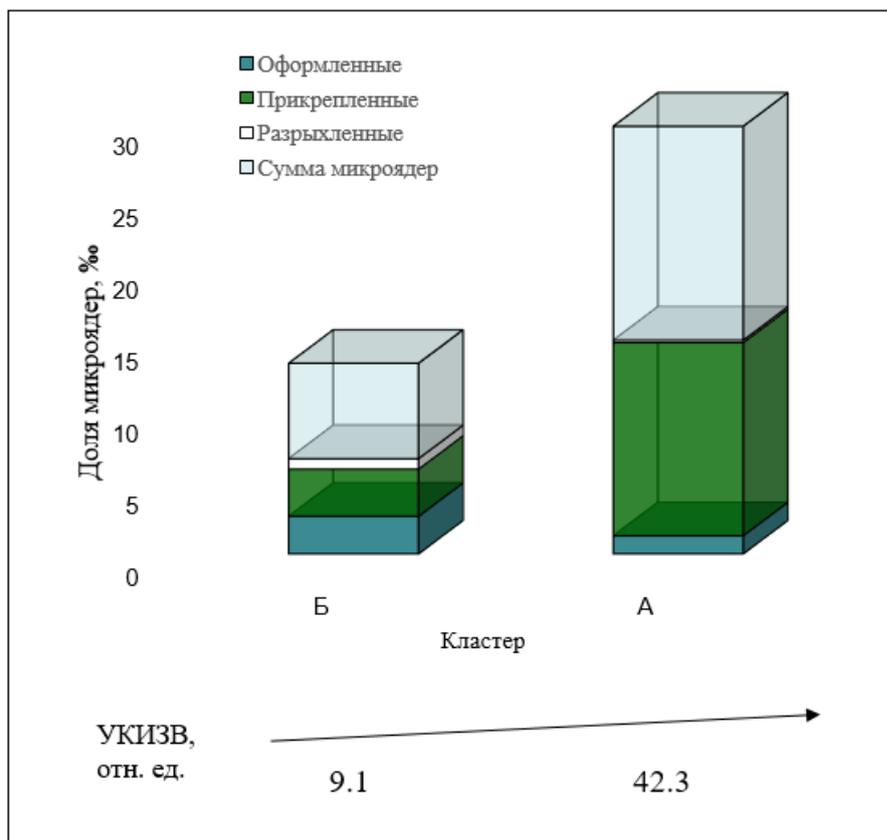


Рисунок 6.5. Распределение ПХЭ с микроядрами в костном мозге прудовых лягушек в разных гидрохимических условиях среды
Б – УКИЗВ = 9.10; А – УКИЗВ = 42.30

Отметим, что 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. Межвидовые различия в показателях цитогенетического гомеостаза отмечены и в менее загрязненных условиях водной среды (кластер Б): озерные лягушки характеризовались более высоким

содержанием микроядер прикрепленного вида ($z = 25.69$, $p < 0.001$) и повышенной долей палочковидных микроядер ($z = 3.58$, $p = 0.00034$). Доля оформленных ($z = 6.39$, $p < 0.001$) оказалась выше у прудовых лягушек (таблица 6.8).

Таблица 6.8.

Доля полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (‰) в крови зеленых лягушек водных объектов Нижегородской области

Кластер/Число просмотренных эритроцитов	Вид	Число клеток с микроядрами, шт /Доля микроядер, ‰				
		а	б	в	г	Все микроядра
А/ 120 000	<i>озерные</i>	540/4.5	1240/10.33	210/1.75	0/0	1990/16.58
А / 39 000	<i>прудовые</i>	49/1.25	522/13.38	7/0.17	0/0	578/14.82
Критерий z		z =9.16, p<0.001	z =5.0, p=0.000001	z =7.29, p<0.001	z =0.0, p=1.0	z =2.39, p=0.016
Б / 257 000	<i>озерные</i>	434/1.68	2646/10.29	160/0.62	20/0.08	3260/12.68
Б / 165 000	<i>прудовые</i>	429/2.6	541/3.27	120/0.72	0/0	1090/6.61
Критерий z		z =6.39, p<0.001	z =25.69, p<0.001	z =1.28, p=0.2	z =3.58, p=0.00034	z =19.07, p<0.001

Примечание: а- оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в - разрыхленные микроядра; г – палочковидные микроядра; z – критерий сравнения долей; p – уровень значимости, $p=0.05$

В условиях синтопического обитания (в одном водоеме - бол. Белкино_2019) содержание микроядер в ПХЭ прудовых лягушек было выше ($z = 5.29$, $p < 0.001$) по сравнению с озерными озерных лягушек (10.00‰) за счет повышенного содержания микроядер прикрепленного вида, составляющих 92-94 % от всех типов микроядер. Доли остальных видов микроядер у обоих видов при синтопии не различались (таблица 6.9).

Таким образом, при ухудшении гидрохимических условий среды обитания в незрелых эритроцитарных клетках костного мозга обоих видов зеленых лягушек выявлены признаки генетической нестабильности, оцениваемые по возрастанию доли клеток с микроядрами, в первую очередь прикрепленного и оформленного видов, формирующихся, по всей видимости, в результате многочисленных нарушений, происходящих в ходе митотического цикла. У озерных лягушек в экстремальных условиях среды в ПХЭ преобладали оформленные и разрыхленные микроядра, образующиеся

вследствие отставания отдельных хромосом, вокруг которых в телофазе формируется ядерная оболочка, параллельно образованию оболочки вокруг основных дочерних ядер, в отличие от прудовых лягушек, у которых в ПХЭ преобладали прикрепленные микроядра, формирующиеся за счет фрагментации генетического материала.

Таблица 6.9

Доля полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (‰) в периферической крови зеленых лягушек в условиях синтопического обитания

Вид	Число клеток с микроядрами, шт /Доля микроядер, ‰				
	а	б	в	г	Все микроядра
Озерные лягушки (10 особей) / 20 000	14/0.7	186/9.3	0/0	0/0	200/10
Прудовые лягушки (10 особей) / 20 000	19/0.95	301/15.05	0/0	0/0	320/16.0
Критерий Манна-Уитни (U)	$z=0.87,$ $p=1.0$	$z=5.24,$ $p<0.001$	$z=0.3,$ $p=0.76$	$z=0.0,$ $p=1.0$	$z=5.29,$ $p<0.001$

Примечание: а- оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в - разрыхленные микроядра; г – палочковидные микроядра; z – критерий сравнения долей; p – уровень значимости, $p=0.05$

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

Сравнительный учет хромосомных нарушений в молодых клетках костного мозга и зрелых эритроцитах периферической крови показал, что соотношение микроядер в ПХЭ и НХЭ обуславливалось спецификой

гидрохимических условий среды и видовой принадлежностью особей. Доля оформленных микроядер в клетках костного мозга обоих видов лягушек оказалось больше, чем в НХЭ крови. У *озерных лягушек* (кластер А) суммарное содержание клеток с микроядрами в крови и костном мозге не различалось. В ПХЭ костного мозга, кроме оформленных микроядер, более значительной оказалась доля разрыхленных ($z = 10.57$, $p < 0.001$). При этом доля прикрепленных была меньше ($z = 10.43$, $p < 0.001$) по сравнению с содержанием этих видов микроядер в НХЭ (таблица 6.10).

Таблица 6.10.

Доля полихроматофильных и нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами (%) в крови озерных лягушек водных объектов Нижегородской области

Кластер/Число просмотренных эритроцитов	Вид эритроцитов	Число клеток с микроядрами, шт / Доля микроядер, %				
		а	б	в	г	Все микроядра
А / 120 000	ПХЭ	540/4.5	1240/10.33	210/1.75	0/0	1990/16.58
А+В / 121 000	НХЭ	9/0.074	1827/15.09	43/0.35	0/0	1879/15.52
Критерий z		$z = 22.78$, $p < 0.001$	$z = 10.43$, $p < 0.001$	$z = 10.57$, $p < 0.001$	$z = 0.0$, $p = 1.0$	$z = 2.05$, $p = 0.04$
Б / 257 000	ПХЭ	434/1.68	2646/10.29	160/0.62	20/0.08	3260/12.68
Б / 257 000	НХЭ	27/0.10	5392/20.98	186/0.72	2/0.007	5602/21.79
Критерий z		$z = 18.96$, $p < 0.001$	$z = 30.87$, $p < 0.001$	$z = 1.39$, $p = 0.16$	$z = 3.83$, $p = 0.000128$	$z = 25.09$, $p < 0.001$
Д / 122 000	ПХЭ	280/2.29	1110/9.09	20/0.16	0/0	1410/11.55
Д / 130 000	НХЭ	26/0.2	2438/18.75	120/0.92	18/0.14	2601/20.01
Критерий z		$z = 15.09$, $p < 0.001$	$z = 20.55$, $p < 0.001$	$z = 8.08$, $p < 0.001$	$z = 4.11$, $p = 0.00004$	$z = 16.93$, $p < 0.001$

Примечание: а - оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в - разрыхленные микроядра; г – палочковидные микроядра; z – критерий сравнения долей; p – уровень значимости

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 меньше по сравнению с НХЭ (рисунок 6.6).

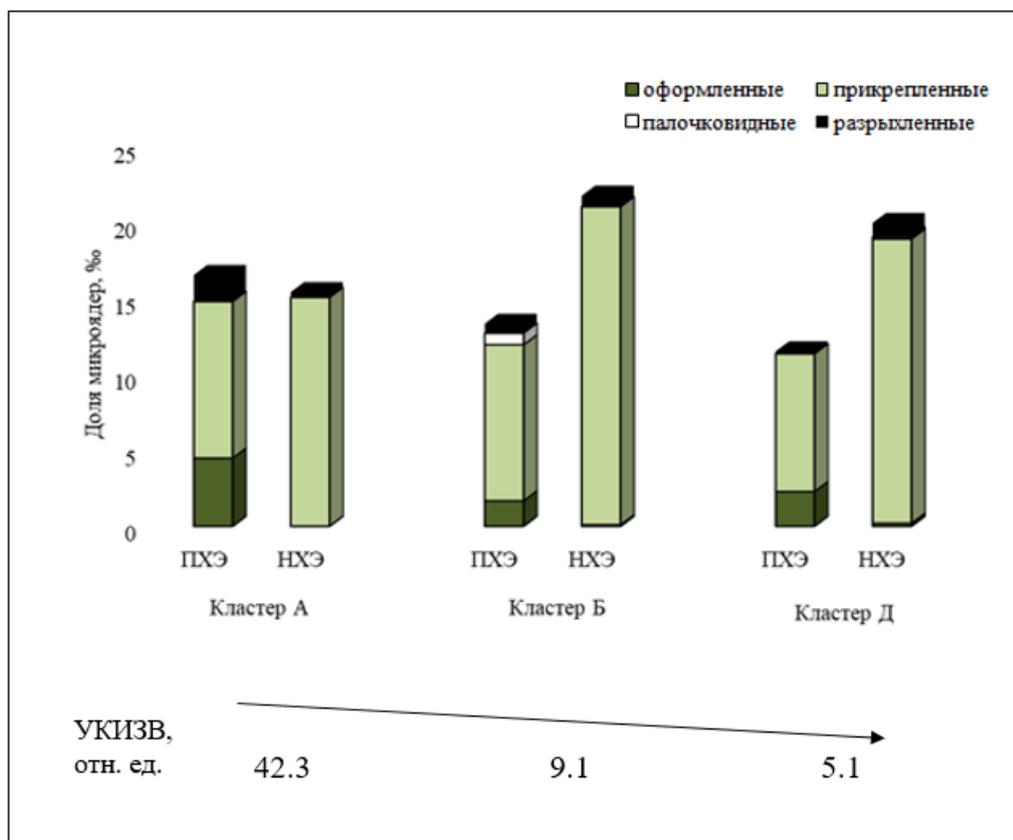


Рисунок 6.6. Соотношение видов микроядер в эритроцитах крови и костного мозга озерных лягушек в разных условиях среды
 Кластер А – УКИЗВ = 42.30; Б – УКИЗВ = 9.10; Д – УКИЗВ = 5.10. Стрелка показывает направление градиента УКИЗВ. ПХЭ – полихроматофильные эритроциты; НХЭ – нормохроматофильные эритроциты

Таблица 6.11.

Доля полихроматофильных и нормохроматофильных эритроцитов с микроядрами (%) в крови прудовых лягушек водных объектов Нижегородской области

Кластер/Число просмотренных эритроцитов	Вид эритроцитов	Число клеток с микроядрами, шт / Доля микроядер, %				
		а	б	в	г	Все микроядра
А / 39 000	ПХЭ	49/1.25	522/13.38	7/0.17	0/0	578/14.82
А+В / 51 000	НХЭ	20/0.39	1232/24.16	48/0.94	6/0.12	1306/25.61
Критерий z		z =4.64, p=0.000003	z =11.58, p<0.001	z =4.58, p=0.000005	z =2.14, p=0.032	z =11.20, p<0.001
Б / 165 000	ПХЭ	429/2.6	541/3.27	120/0.72	0/0	1090/6.61
Б / 178 000	НХЭ	22/0.12	1797/10.09	186/1.04	5/0.03	2024/11.37
Критерий z		z =19.99, p<0.001	z =24.24, p<0.001	z =3.11, p=0.0019	z =2.15, p=0.031	z =14.69, p<0.001

Примечание: а- оформленные микроядра; б – прикрепленные микроядра; в - разрыхленные микроядра; г – палочковидные микроядра; z – критерий сравнения долей; p – уровень значимости, p=0.05

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 (таблица 6.11). 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 6.7).

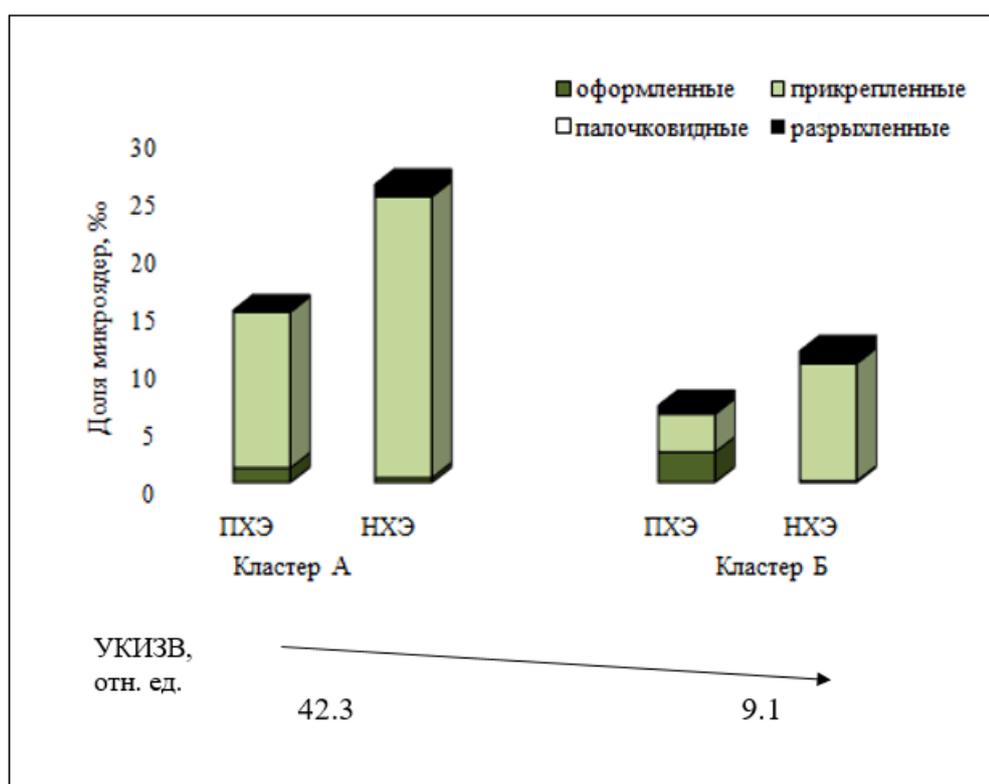


Рисунок 6.7. Соотношение видов микроядер в эритроцитах крови и костного мозга прудовых лягушек в разных условиях среды
Кластер А – УКИЗВ = 42.30; Б – УКИЗВ = 9.10. Стрелка показывает направление градиента УКИЗВ. ПХЭ – полихроматофильные эритроциты; НХЭ – нормохроматофильные эритроциты

Таким образом, в костном мозге и периферической крови двух видов зеленых лягушек водных объектах урбанизированной территории наблюдалось возрастание доли клеток с микроядрами, что свидетельствовало о мутагенном влиянии гидрохимических загрязнителей. Дифференцированный учет микроядер позволил выявить преобладание в ПХЭ

и НХЭ зеленых лягушек эритроцитов с прикрепленными микроядра, включающими в себя ацентрические фрагменты, что является результатом хромосомных aberrаций. Доля клеток с разрыхленными, оформленными и палочковидными микроядрами была значительно меньше. Следует отметить повышенное содержание в ПХЭ оформленных микроядер, включающих целые хромосомы, задерживающиеся на экваторе клетки в анафазе и возникающие в результате изменений взаимодействия хромосом с микротрубочками ахроматического веретена деления, по сравнению с НХЭ. 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

Анализ содержания микроядер в крови и костном мозге двух видов зеленых лягушек свидетельствует о неоднозначности воздействия химических загрязнителей водной среды на генетическую стабильность организма. Возрастание доли микроядер в клетках системы крови зеленых 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. Отметим, что прудовые лягушки характеризовались более выраженной генетической нестабильностью, по сравнению с озерными, что проявлялось в зависимости широкого спектра ядерных нарушений в НХЭ в ходе клеточного цикла от большинства химических загрязнителей, включая нефтепродукты, кобальт, никель, свинец, цинк, марганец, сульфиды. Ранговым коэффициентом

корреляции Спирмена с учетом поправки Бонферрони выявлена взаимосвязь увеличения частоты ядерных аномалий в эритроцитах озерных (таблица 6.12) и прудовых (таблица 6.13) лягушек с содержанием в поверхностных водах сульфатных и нитратных ионов. Присутствие тяжелых металлов (Fe, Mn) обуславливало снижение доли оформленных микроядер в клетках костного мозга обоих видов, что подтверждалась анализом уравнений регрессии.

Таблица 6.12

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

Показатель	Химические загрязнители	Коэффициент корреляции, ρ	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

Прудовые лягушки характеризовались более выраженной генетической нестабильностью, по сравнению с озерными, что проявлялось в зависимости широкого спектра ядерных нарушений в НХЭ в ходе клеточного цикла от большинства химических загрязнителей, включая нефтепродукты, кобальт, никель, свинец, цинк, марганец, сульфиды (таблица 6.13).

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).

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

Показатель	Химические загрязнители	Коэффициент корреляции, ρ	p -значение*
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
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

Выявленная взаимосвязь возрастания видов микроядер от специфических гидрохимических условий среды, позволяет полагать, что точкой воздействия химических загрязнителей могут быть разные процессы,

во-первых, задержка процесса митоза на стадии метафазы в связи с дезорганизацией различных компонентов митотического веретена деления (центросомы, микротрубочек ахроматического веретена, кинетохоров). Во-вторых, повреждения, затрагивающие клеточное ядро, плазмалемму, различные внутриклеточные органеллы (митохондрии, комплекс Гольджи). В-третьих, усиление спирализации хромосом, что приводит к их укорочению и утолщению. Следствием этих воздействий является возникновение хромосомных aberrаций, образование микроядер в результате фрагментации или отставания хромосом, с последующим изменением кариотипа в результате анеуплоидии. Полагаем, что дальнейшее изучение на молекулярном уровне возрастание генетической нестабильности организмов приведет к более глубокому пониманию механизмов цитогенетического гомеостаза, обеспечивающих выживание и сохранение видов в условиях нарастающей антропогенной нагрузки.

Полученные результаты и проведенный анализ позволил сформулировать положение, выносимое на защиту: **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).**

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

Клетки, участвующие в поддержание гомеостаза организма, для наиболее эффективного функционирования действуют в составе специализированных тканей и органов, образующих вместе лимфоидную систему. От степени согласованной работы лимфоидных органов и их клеток зависит быстрота и качество иммунного ответа на ксенобиотики и генетическая стабильность организма, поскольку в лимфоидных органах происходит созревание иммунных клеток, поступающих впоследствии в периферическую кровь. У амфибий лимфоидная и кроветворная системы объединяют в единый лимфо-миелоидный комплекс, в котором органы и ткани тесно связаны между собой сетью кровеносных и лимфатических сосудов, обеспечивающей обмен клеточными элементами. Функциональное назначение комплекса – обеспечение кроветворения (миелопоэза) и формирование клеток иммунной системы (лимфопоэза). Среди органов и тканей комплекса имеются лимфоидные образования, в которых происходит только лимфопоэз (тимус, лимфатические узлы, лимфоидная ткань кишечника) и «смешанные» образования, где представлен как лимфо-, так и миелопоэз (костный мозг, селезенка) (Галактионов, 2005).

Настоящая глава диссертации посвящена оценке индексов органов (печени, почек, сердца, селезенки, гонад, тимуса) озерных и прудовых лягушек, 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 7.1). Индекс тимуса не изменялся. Отметим, что в специфических условиях кластера Б

индекс печени и сердца озерных лягушек превышал аналогичный показатель особей, обитающих в менее загрязненной водной среде (таблица 7.1).

Таблица 7.1

Интегральные индексы органов (Me/IQR) озерных лягушек водных объектов Нижегородской области, группирующихся в кластерах сходного гидрохимического состава

Показатель	Кластер Г	Кластер Д	Кластер Б	Кластер А
Индекс печени, ‰	24.32 / 6.26 n=44	21.52 / 7.63 n=20	27.96 / 14.30 n=70	23.51 / 6.71 n=20
$\chi^2 = 11.11, p=0.011$				
H = 10.35, p = 0.015				
D _{Б-Д} =2.92, p=0.02				
Индекс почек, ‰	3.51 / 1.42 n=44	1.42 / 1.08 n=20	0.96 / 4.02 n=70	1.36 / 0.44 n=20
$\chi^2 = 58.60, p < 0.001$				
H = 35.23, p < 0.001				
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 сердца, ‰	2.75 / 0.97 n=44	2.84 / 0.82 n=20	3.08 / 0.48 n=70	2.77 / 0.65 n=20
$\chi^2 = 12.78, p = 0.0051$				
H = 11.99, p = 0.0074				
D _{Г-Б} =2.98, p=0.017				
Индекс селезенки, ‰	1.34 / 1.099 n=44	3.83 / 1.34 n=20	3.61 / 3.78 n=70	3.55 / 1.41 n=20
$\chi^2 = 32.28, p < 0.001$				
H = 24.40, p < 0.001				
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, ‰	14.63 / 9.75 n=44	5.40 / 5.74 n=20	8.73 / 14.09 n=70	5.67 / 10.44 n=20
$\chi^2 = 19.51, p = 0.0002$				
H = 16.30, p = 0.001				
D _{Г-А} =3.06, p=0.012; D _{Г-Д} =3.43, p=0.0035				
Индекс тимуса, ‰	0.06 / 0.08 n=44	0.02 / 0.12 n=20	0.10 / 0.15 n=70	0.08 / 0.07 n=20
$\chi^2 = 5.32, p = 0.14$				
H = 7.50, p = 0.06				

Примечание: Me – медиана; IQR – интерквартильный размах; χ^2 – медианный тест; H – критерий Краскела-Уоллеса; D – критерий Данна. В таблице представлены только значимые критерии D.

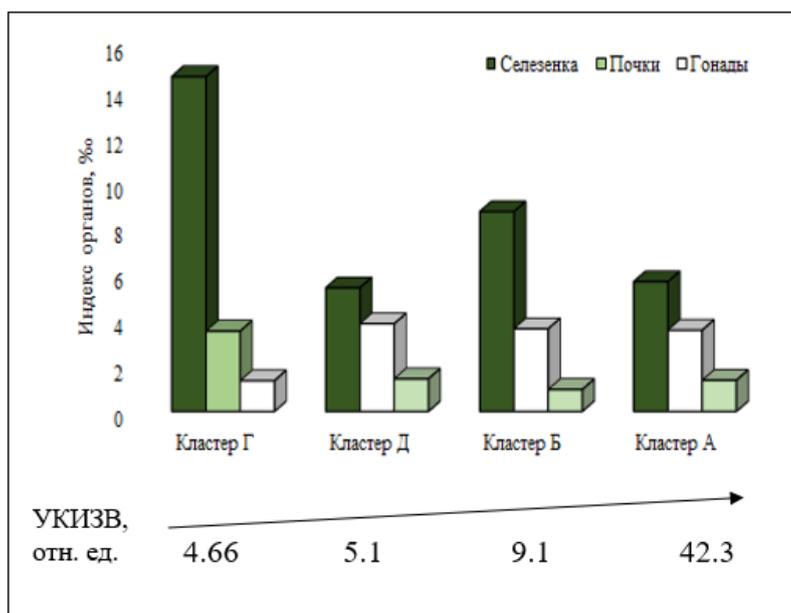


Рисунок 7.1. Изменение индексов органов озерных лягушек в градиенте ухудшения условий водной среды обитания

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: $D_{Г-А}=3.06$, $p=0.012$; $D_{Г-Д}=3.43$, $p=0.0035$

Относительная масса селезенки лягушек возрастала при интенсивном загрязнении среды обитания. Увеличение индекса селезенки могло указывать на более интенсивное протекание процессов кроветворения и/или иммунологических реакций, вызванное негативным воздействием окружающей среды.

Таблица 7.2

Анализ взаимосвязи морфофизиологических параметров озерных 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

Для озерных лягушек ранговым коэффициентом корреляции Спирмена установлена взаимосвязь изменения морфофизиологических показателей от содержания в водной среде обитания никеля, хрома и ионов серы (таблица 7.2).

Прудовые лягушки. Изменений в показателях индексов печени, сердца, гонад у прудовых лягушек по градиенту ухудшения среды не выявлено.

Таблица 7.3

Интегральные индексы органов (Me/IQR) прудовых лягушек водных объектов Нижегородской области, группирующихся в кластерах сходного гидрохимического состава

Показатель	Кластер Д	Кластер Б	Кластер А
Индекс печени, ‰	38.82 / 24.29 n=28	27.19 / 7.17 n=10	32.03 / 7.41 n=20
$\chi^2 = 3.08, p=0.21$			
$H = 2.98, p = 0.22$			
Индекс почек, ‰	5.38 / 1.47 n=28	0.84 / 0.53 n=10	0.95 / 0.80 n=20
$\chi^2 = 54.20, p < 0.001$			
$H = 42.48, p < 0.001$			
$D_{Д-А}=5.47, p < 0.001; D_{Д-Б}=5.15, p=0.000001$			
Индекс сердца, ‰	3.51 / 0.79 n=28	3.36 / 0.92 n=10	3.18 / 1.06 n=20
$\chi^2 = 3.08, p = 0.21$			
$H = 0.49, p = 0.78$			
Индекс селезенки, ‰	1.04 / 1.24 n=28	5.34 / 1.65 n=10	5.95 / 2.47 n=20
$\chi^2 = 46.74, p < 0.001$			
$H = 42.04, p < 0.001$			
$D_{Д-А}=6.14, p < 0.001; D_{Д-Б}=3.97, p=0.0002$			
Индекс гонад, ‰	9.20 / 24.95 n=28	6.30 / 8.56 n=10	8.14 / 19.42 n=20
$\chi^2 = 0.60, p = 0.74$			
$H = 0.84, p = 0.65$			
Индекс тимуса, ‰	0.19 / 0.23 n=28	0.09 / 0.09 n=10	0.07 / 0.05 n=9
$\chi^2 = 10.59, p = 0.005$			
$H = 19.08, p = 0.0001$			
$D_{Д-А}=3.84, p = 0.0003; D_{Д-Б}=2.93, p=0.0085$			

Примечание: Me – медиана; IQR – интерквартильный размах; χ^2 – медианный тест; H – критерий Краскела-Уоллеса; D – критерий Данна. В таблице представлены только значимые критерии D.

При этом 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 (таблица 7.3, рисунок 7.2).

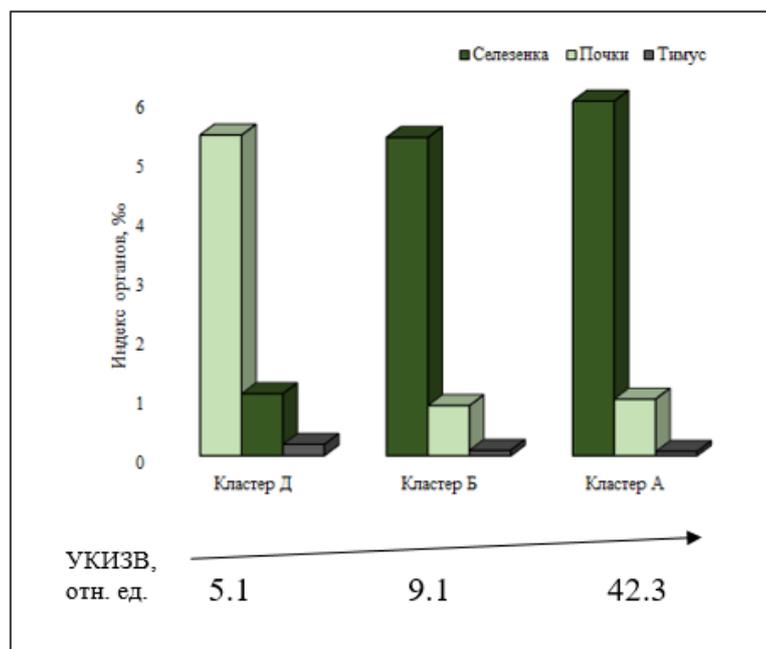


Рисунок 7.2. Изменение индексов органов прудовых лягушек в градиенте ухудшения условий водной среды обитания

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: $D_{Д-А}=3.84$, $p = 0.0003$; $D_{Д-Б}=2.93$, $p=0.0085$

Известно, что биохимические аномалии окружающей среды могут приводить к существенным изменениям индексов внутренних органов в ту или иную сторону, в зависимости от микроэлементного фона среды (Шварц, 1954). Известно, что собственно возрастные изменения тимуса характеризуются уменьшением его размеров по мере увеличения возраста животных, при этом на возрастные изменения накладываются еще сезонная его изменчивость (Шварц, 1968) и чувствительность к воздействию как физических (облучение), так и химических факторов (Миллер, Дукор, 1967). Хорошо известно, что при достижении половой зрелости (в возрасте двух-трех лет) тимус зеленых лягушек инволюционирует (Robert et al., 1994), однако наблюдаемое

прогрессивное снижение его массы у прудовых лягушек в кластерах Б и А, указывало на наличие негативного воздействия гидрохимической среды на организм.

Увеличение индекса тимуса в условиях средового стресса, могло быть связано с увеличением общего количества тимоцитов за счет интенсификации работы иммунной системы в ответ на стимулирующее воздействие внешних факторов и комплекса химических веществ, обнаруженных в водных объектах.

Межвидовые различия в морфофизиологических параметрах двух видов амфибий отмечены во всех кластерах. У прудовых лягушек в экстремальных условиях среды (кластер А) индексы печени, сердца, селезенки были выше, а индекс почек – ниже по сравнению с озерными лягушками. В условиях кластера Б отмечено пониженное значение индекса почек и повышенное значение индекса селезенки; в условиях кластера Д – повышенное значение индексов печени, почек, сердца, тимуса и пониженное значение индекса селезенки (таблица 7.4).

Таблица 7.4

**Сравнительный анализ морфофизиологических параметров
зеленых лягушек водных объектов Нижегородской области,
группирующихся в кластерах сходного гидрохимического состава**

Кластер	Вид лягушек	Индексы органов, сумма рангов					
		печень	почки	сердце	селезенка	гонады	тимус
Кластер А	озерные	291.0	490.0	323.0	228.0	362.0	333.0
	прудовые	529.0	330.0	497.0	592.0	458.0	102.0
Статистические показатели		U=3.20, p=0.001	U=2.15, p=0.003	U=2.33, p=0.019	U=4.90, p=0.000001	U=1.28, p=0.19	U=1.53, p=0.12
Кластер Б	озерные	2821.0	2976.0	2762.0	2649.0	2866.0	2872.0
	прудовые	419.0	264.0	478.0	591.0	374.0	368.0
Статистические показатели		U=0.19, p=0.84	U=2.04, p=0.04	U=1.05, p=0.29	U=2.69, p=0.0069	U=0.44, p=0.65	U=0.53, p=0.59
Кластер Д	озерные	345.0	243.0	394.0	726.0	409.0	292.0
	прудовые	831.0	933.0	782.0	450.0	767.0	884.0
Статистические показатели		U=3.02, p=0.002	U=5.15, p<0.001	U=1.99, p=0.048	U=4.92, p=0.000001	U=1.68, p=0.09	U=4.13, p=0.00003

Примечание: U- критерий Манна Уитни, p- уровень значимости

Отметим, что межвидовые различия у амфибий двух видов по индексам почек и селезенки, выявленные в трех кластерах, были разнонаправленными. Так, индекс почек у озерных лягушек был выше значений прудовых в кластерах А и Б и ниже в кластере Д. Индекс селезенки превышал аналогичный показатель прудовых кластера Д, однако в более загрязненной водной среде (кластеры А и Б) был ниже, чем у прудовых лягушек (рисунок 7.3).

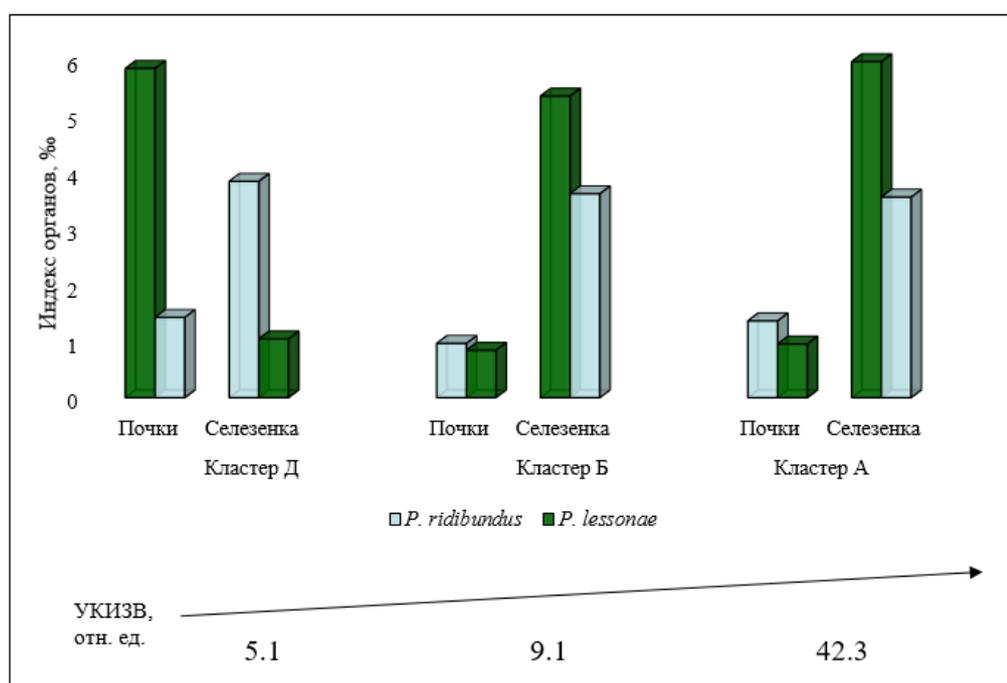


Рисунок 7.3. Межвидовые различия по индексам почек и селезенки у зеленых лягушек в разных гидрохимических условиях среды
Д – УКИЗВ = 5.10; Б – УКИЗВ = 9.10; А – УКИЗВ = 42.30

Для прудовых лягушек ранговым коэффициентом корреляции Спирмена выявлена взаимосвязь изменения морфофизиологических параметров зеленых лягушек с содержанием отдельных загрязнителей в водной среде обитания (таблица 7.5).

Анализ взаимосвязи морфофизиологических параметров прудовых лягушек с гидрохимическими показателями водных объектов

Сравниваемые пары	<i>ρ</i>-коэффициент	<i>p</i> – значение
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 тяжелых металлов тканями и органами зеленых лягушек рода *Pelophylax*

Водные объекты Нижнего Новгорода – крупного промышленного центра Европейской части России характеризуется интенсивной антропогенной нагрузкой, проявляющейся, прежде всего, в увеличении степени загрязнения химическими соединениями техногенного происхождения (Гелашвили и др., 2008). Среди загрязняющих веществ по масштабам загрязнения и воздействию на живые организмы особое место занимают тяжелые металлы, имеющие плотность более 5 г/см³ или атомную массу более 50 единиц (Гелашвили и др., 2016). Ряд металлов (Mn, Ni, Cu, Cr, Co, V, Zn, Fe) относится к числу эссенциальных (жизненно необходимых), индивидуальная потребность в них невелика. Однако высокая аккумуляция этих элементов в организме приводит к тяжелым нарушениям метаболизма и развитию патологий (Гелашвили и др., 2016), в том числе и цитогенетическим аномалиям в соматических клетках млекопитающих (Ковалева, 2008). В городских водных объектах амфибии являются хищными животными, занимают верхние трофические уровни (консументы 2–3 порядка) и часто являются последним звеном в аккумуляции тяжелых металлов. Появляется все больше работ, посвященных использованию бесхвостых амфибий в качестве индикаторов накопления токсичных микроэлементов (кадмия, свинца, ртути) (Зарипова, 2009; Северцова и др., 2013; Banks et al., 2017; Комов и др., 2017 и др.). Представители бесхвостых амфибий озерная (*P. ridibundus* Pallas, 1771) и прудовая (*P. lessonae* Camerano, 1882) лягушки ведут околоводный и придонный образ жизни и накапливают тяжелые металлы диффузно через кожу, при дыхании и алиментарным путем – с водными объектами питания (Лакин, 1980; 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), поведенческие реакции (Wright et al., 2005), нарушение работы эндокринной и иммунной систем (Blaustein, Kiesecker, 2002). Химических загрязнителей водной среды способны влиять и на интенсивность гемопоэза гидробионтов. Как известно, тяжелые металлы входят в состав ферментов, и повышение их концентрации в крови ведет к токсическому ингибированию важных процессов метаболизма, обуславливающих, митотическое деление клеток (Крюков и др., 2016). Так, при воздействии соединений железа возможно нарушение пролиферативного ответа лимфоцитов (Cardier et al., 1997) и угнетение антиоксидантной системы организма. В результате токсического действия цинка в крови снижается число лимфоцитов и ослабляется лимфоцитарная реакция (Denduluri et al., 1997). Под воздействием свинца угнетается гемопоэтическая функция костного мозга, усиливается гибель клеток (Спиридонов, Содбоев, 2000), при воздействии меди снижается жизнеспособность лейкоцитов и подавляется фагоцитарная активность клеток (Baginski, 1988). Известно, что марганец является политропным ядом, поражающим сердечно-сосудистую систему, вызывает мутагенный эффект, снижает антимикробную защиту организма и иммунный ответ. Эксперименты по выявлению токсического действия марганца на индукцию микроядер в эритроцитах крыс показали, что высокие концентрации хлористого марганца при внутрибрюшинном введении вызывали значимое увеличение степени повреждения ядерной ДНК и частоты встречаемости микроядер в клетках периферической крови (Томилин и др., 2012). Отрицательная корреляция между степенью повреждения ДНК и содержанием ионов марганца в крови демонстрирует, по мнению авторов, защитное действие марганца в невысоких концентрациях за счет увеличения антиоксидантной защиты клеток (Oberlay, 2005; Day, Kariya, 2005).

Несмотря на имеющиеся сведения еще недостаточно информации о способности тяжелых металлов к биоконцентрированию и передаче по трофическим цепям, также фрагментарны данные о содержании и

распределении металлов в организме близкородственных видов амфибий, имеющих различную биотопическую приуроченность.

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

Напомним, что согласно проведенной ординации водных объектов Нижегородской области оз. Силикатное_2019 относится к кластеру Д (УКИЗВ =5.10, IV класс качества воды, грязная, разряд «а»). В течение всего периода наблюдений (с 2016 по 2022 гг.) в озере встречались только озерные лягушки *P. ridibundus*. В водных пробах выявлено превышение ПДК по меди (8.7 ПДК) и цинку (1.5 ПДК). Содержание других тяжелых металлов (Fe, Mn, Cr, Al, Sr) не превышало значение ПДК для водоемов рыбохозяйственного назначения. Воды оз. Вторчермет_2019, входящего в состав кластера А (УКИЗВ =42.30, V класс качества воды, экстремально грязная) где встречались прудовые лягушки, отличались более высоким уровнем загрязнения тяжелыми металлами. Установлено превышение ПДК по железу (3.25 ПДК), марганцу (112.6 ПДК), меди (19 ПДК), цинку (1.5 ПДК), стронцию (1.585 ПДК).

В тканях и органах прудовых и озерных лягушек выявлена разная аккумуляция металлов. Печень лягушек являлась органом концентратором для железа, где его содержание в несколько раз превышало концентрацию в костях, гонадах, мышцах, сердце ($N=39.46$, $p < 0.001$) (рисунок 8.1). Печень, как известно, связана с метаболизмом железа в организме и является органом его естественного депонирования. Клетками, аккумулирующими соединения железа, являются меланинсодержащие макрофаги или купферовы клетки печени (Barni et al., 2002).

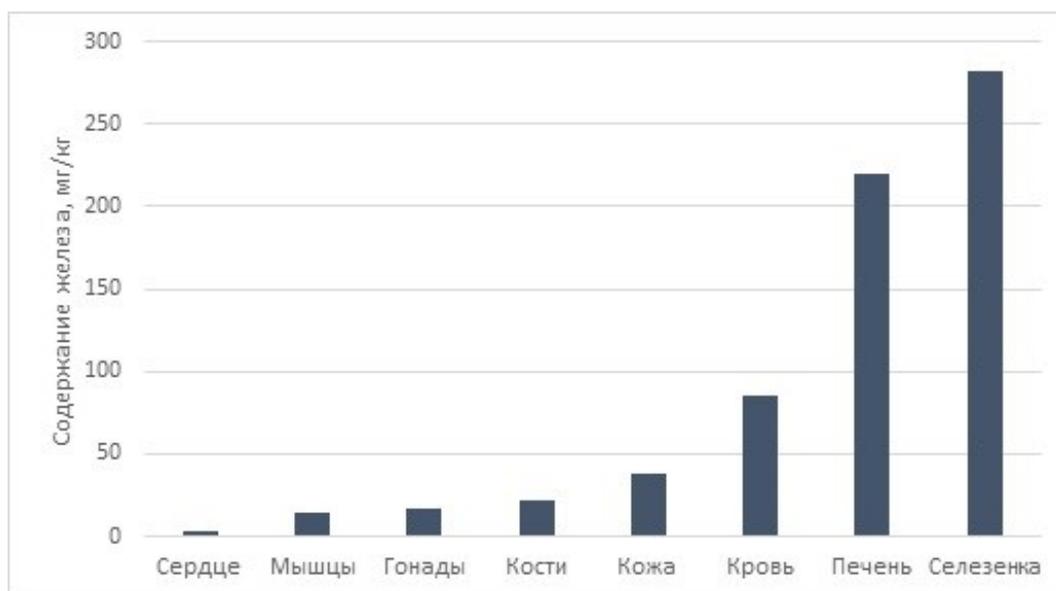


Рисунок 8.1. Содержание железа в тканях и органах прудовых лягушек

Так, у прудовых лягушек концентрация железа в селезенке превышала его накопление в сердце в 78.13 раза ($D=4.31$, $p<0.001$), в мышцах – в 19.5 раза ($D=3.93$, $p=0.002$), в гонадах – в 17.19 раза ($D=3.16$, $p=0.043$), в костях – в 12.63 раза ($D=3.29$, $p=0.027$). Высокое содержание железа в селезенке, печени (прудовые лягушки), а также, в крови, печени, сердце (озерные лягушки), могло быть обусловлено участием этого металла в молекулах гемоглобина, цитохромов и др., необходимых для обеспечения процессов энергетического обмена и кроветворения.

В условиях более высокого загрязнения водного объекта тяжелыми металлами, у прудовых лягушек алюминий предпочтительно накапливался в селезенке, где его концентрация, по сравнению с другими изученными тканями, была максимальной (медиана 27.98 мг/кг, интерквартильный размах 15.67 мкг/кг). Хром имел высокий коэффициент биологического поглощения (КБП) и обнаруживался в сопоставимых концентрациях ($N=12.04$, $p=0.09$) во всех исследованных органах и тканях. Марганец в тканях и органах прудовых лягушек накапливался в слабой степени, за исключением сердечной мышцы (медиана 73.42 мг/кг, интерквартильный размах 35.74 мкг/кг), где его содержание соответствовало коэффициенту биологического поглощения (КПБ)=65.20. Цинк содержался во всех органах, в большей степени

накапливаясь в костях (медиана 138.24 мг/кг, интерквартильный размах 57.11 мк/кг) и коже (медиана 112.97 мг/кг, интерквартильный размах 81.19 мк/кг). Аккумуляция стронция в организме прудовых лягушек была избирательной, в основном, металл локализовался в костях, где его валовое содержание (медиана 126.51 мг/кг, интерквартильный размах 54.62 мк/кг) было максимальным по сравнению с другими тканями и органами ($H=45.58$, $p<0.001$).

Озерные лягушки характеризовались высоким значением коэффициента для хрома, цинка, марганца и меди в печени, сердце и гонадах. В ретикулярной ткани селезенки в высоких концентрациях содержались металлы: хром, марганец, медь, цинк, алюминий. Высокие значения КБП в крови озерных лягушек установлены для железа, алюминия, цинка, меди; в мышцах – для железа, цинка и алюминия. Динамика накопления меди, стронция, цинка органами и тканями озерных лягушек в целом была схожей с прудовыми лягушками. У обоих видов амфибий медь накапливалась в более высоких концентрациях в гемопозитических тканях, выполняющих функции кровообращения (сердце, печень, селезенка). Напротив, в составе опорно-двигательной системы медь содержалась в невысоких концентрациях (рисунок 8.2).

Непараметрическими критериями: ANOVA по Крускалу-Уоллису, медианному критерию, критерию χ^2 , показаны межвидовые различия в поглощении и распределении металлов в тканях и органах озерных и прудовых лягушек. В организме прудовых лягушек выявлено более высокое валовое содержание хрома (медиана 8.93 мг/кг, интерквартильный размах 3.97 мг/кг) по сравнению с озерными лягушками (медиана 3.52 мг/кг, интерквартильный размах 12.26 мг/кг) ($\chi^2=6.69$, $p=0.009$; $H=4.94$, $p=0.02$). Зависимости между уровнем аккумуляции хрома в организме и его содержанием в водной среде не обнаружено, поскольку концентрация хрома в водных объектах была сопоставимой (0.005–0.007 мг/л) и не превышала значение ПДК_{рыб-хоз}.

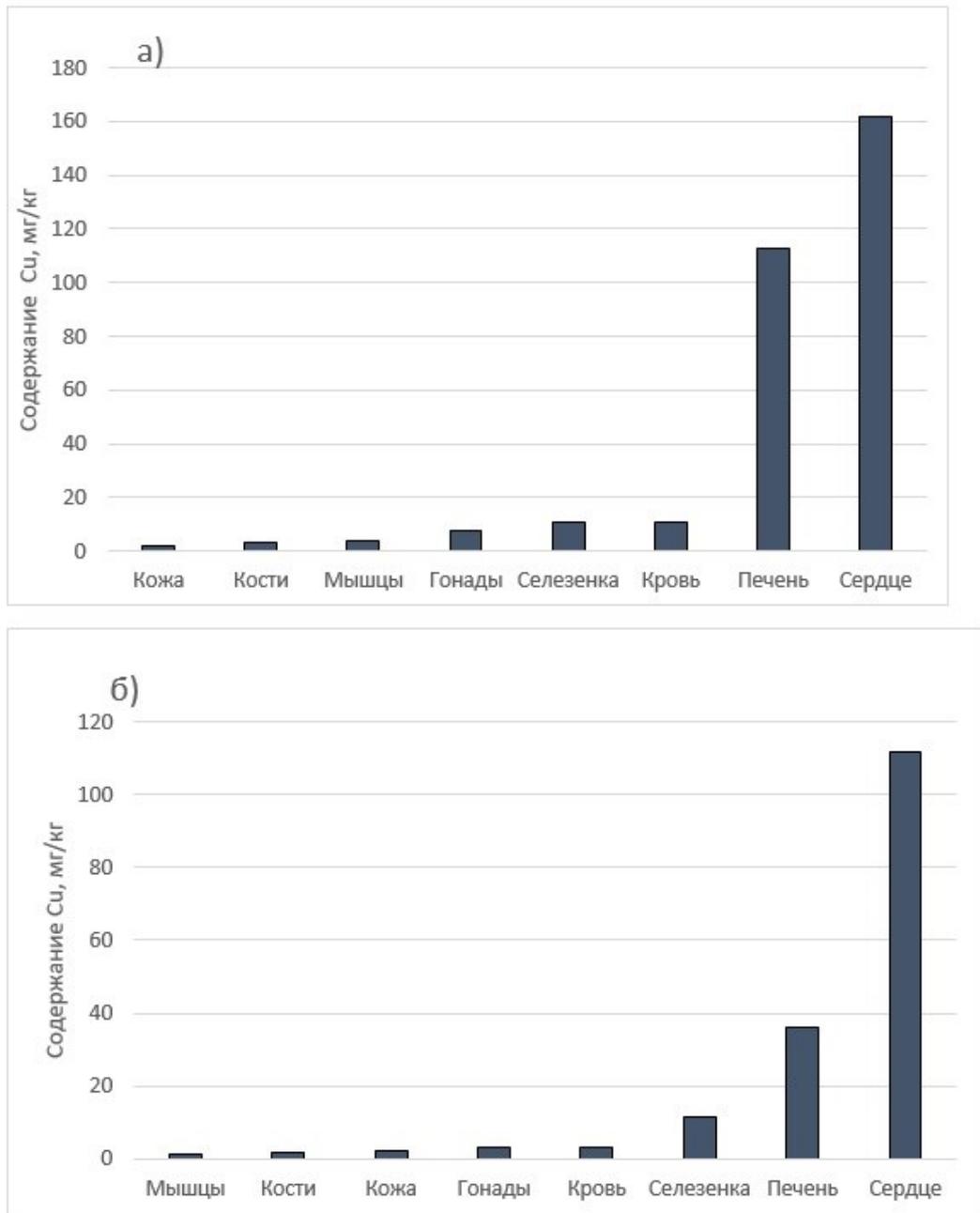


Рисунок 8.2. Содержание меди в органах и тканях озерных (а) и прудовых (б) лягушек

Выявленное различие в количественном содержании хрома в организме биотопически различающихся близкородственных видов может быть объяснено разной интенсивностью обменных процессов и характером питания. В отношении валового содержания других тяжелых металлов в организмах прудовых и озерных лягушек значимых различий между видами не выявлено. Отметим, что водоеме повышенного загрязнения (оз. Вторчермет) у прудовых лягушек отмечено уменьшение значения

коэффициентов накопления (Кн), рассчитанных по валовому содержанию концентрации металлов в организме, относительно приоритетных загрязнителей водной среды: марганца, меди, железа, стронция. Этот факт свидетельствует о способности бесхвостых амфибий не допускать чрезмерного накопления микроэлементов в организме, что является адаптацией к существованию в экстремальных гидрохимических условиях среды.

Выраженные различия между прудовыми и озерными лягушками установлены в распределении металлов в тканях и органах. В организме прудовых лягушек распределение металлов по органам и тканям было неравномерным. Количество значимо различающихся сравниваемых пар органов внутри выборки прудовых (17 пар) было существенно больше (таблица 8.1), чем у озерных (6 пар) лягушек (таблица 8.2).

Таблица 8.1

Результаты сравнения содержания металлов в органах и тканях прудовых лягушек

Металл	Сравниваемые пары органов	Критерий Данна, <i>D</i>	<i>p</i> - значение
Марганец	кровь-кости	3.83	0.01
	мышцы-кости	4.23	0.0027
	сердце-мышцы	3.88	0.01
Медь	кости-сердце	4.26	0.002
	кости-печень	3.83	0.01
	сердце-мышцы	4.63	0.0004
	печень-мышцы	4.21	0.003
Цинк	кожа-кровь	4.24	0.002
	кости-кровь	4.23	0.0027
	сердце-кожа	4.11	0.004
	сердце-кости	4.11	0.004
Стронций	кости-гонады	4.01	0.007
	печень-кожа	3.87	0.012
	печень-кости	5.17	<0.001
	мышцы-кожа	3.87	0.012
	мышцы-кости	5.17	<0.001
Алюминий	селезенка-кровь	3.71	0.025
Железо	печень-кости	3.59	0.03
	печень-сердце	4.61	0.0004
	селезенка-сердце	4.45	0.0008
	мышцы-печень	4.19	0.003
	мышцы-селезенка	4.04	0.005

Совпадающих между видами пар было три: марганец (мышцы-кости); медь (печень-мышцы); стронций (печень-кости), подтверждающие высокое накопление в организме бесхвостых амфибий в костной ткани – Mn и Sr, в печени – Cu.

Таблица 8.2

Результаты сравнения содержания металлов в органах и тканях озерных лягушек

Металл	Сравниваемые пары органов	Критерий Данна, D	p – значение
Марганец	мышцы- кости	3.74	0.02
Медь	кожа-печень	3.67	0.02
	печень-мышцы	3.95	0.009
Хром	мышцы-селезенка	3.63	0.03
Цинк	мышцы-кости	4.14	0.004
Стронций	печень-кости	3.94	0.009
	мышцы-кости	3.59	0.039

Видовые особенности установлены по содержанию марганца, меди, цинка и стронция в органах и тканях бесхвостых амфибий (таблица 8.3).

Таблица 8.3

Результаты сравнения содержания металлов в органах и тканях между разными видами

Металл	Сравниваемые органы		Критерий Данна	p – значение
	прудовые	озерные		
Марганец	мышцы	кости	3.62	0.03
	кости	мышцы	4.27	0.002
	сердце	мышцы	3.96	0.009
Медь	сердце	кожа	3.69	0.02
	кости	печень	4.15	0.003
	сердце	мышцы	4.00	0.007
	печень	мышцы	3.61	0.03
	мышцы	печень	4.49	0.0008
Цинк	кровь	кости	3.60	0.37
	кожа	мышцы	4.75	0.0002
	кости	мышцы	4.75	0.0002
Стронций	кости	печень	4.40	0.001
	печень	кости	4.46	0.0009
	кости	мышцы	4.06	0.005
	мышцы	кости	4.46	0.0009
Железо	печень	мышцы	4.38	0.001
	селезенка	мышцы	4.24	0.002

Количественное содержание марганца в костной ткани значительно превышало его концентрацию в мышцах у обоих видов амфибий. Содержание тяжелых металлов в организме бесхвостых амфибий можно представить в виде ранжированных рядов.

Прудовые лягушки. Для Mn: сердце, кости> кожа, гонады> печень> кровь, селезенка, мышцы. Для Cu: сердце, печень> селезенка> гонады, кровь, кожа> мышцы, кости. Для Zn: кости, кожа> печень, селезенка> мышцы, гонады, кровь, сердце. Для Sr: кости> кожа, сердце, селезенка> кровь> печень, мышцы, гонады. Для Fe: печень, селезенка> кровь> кожа, кости, мышцы, гонады.

Озерные лягушки. Для Mn: селезенка, кости> кожа> печень> кровь, сердце, гонады, мышцы. Для Cu: печень> кровь> сердце, селезенка, гонады> кожа, кости, мышцы. Для Zn: кости> кожа, селезенка, гонады, сердце> печень> кровь> мышцы. Для Sr: кости> кожа, сердце, селезенка> кровь> печень, мышцы, гонады. Для Fe: кровь, печень> сердце, кости> гонады, кожа, мышцы.

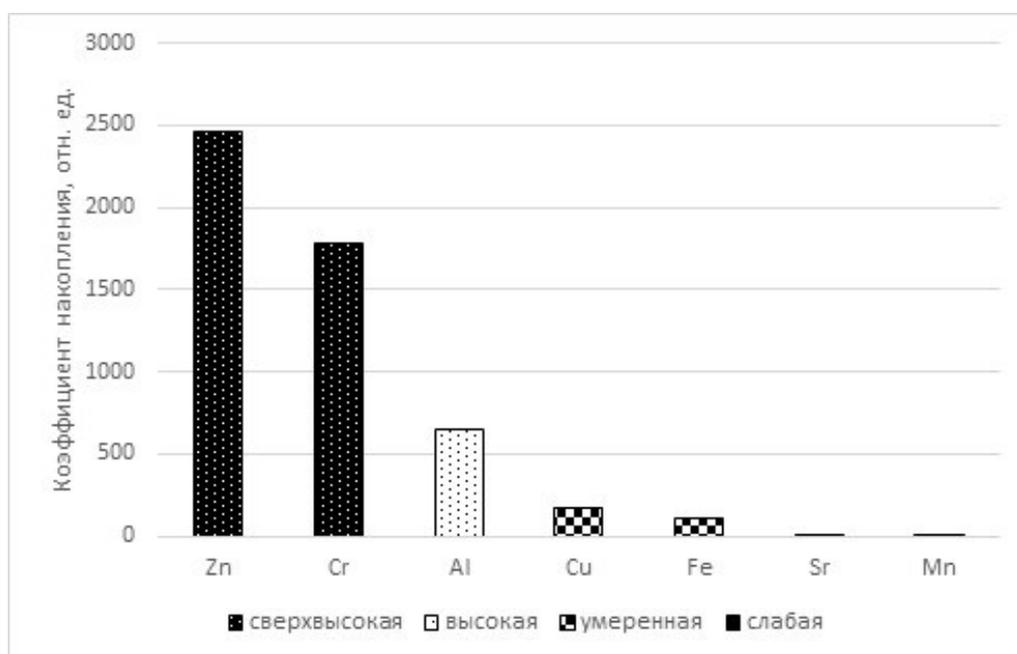


Рисунок 8.3. Аккумуляция металлов в организме прудовых лягушек

Кумулятивные свойства металлов были определены по установленным коэффициентам накопления (Кн). Видовые закономерности накопления

металлов из воды представлены по убыванию в виде следующих рядов активности: прудовые лягушки: Zn, Cr > Al > Cu, Fe > Sr, Mn (рисунок 8.3); озерные лягушки: Fe, Zn > Mn, Cu, Cr, Al > Sr (рисунок 8.4).

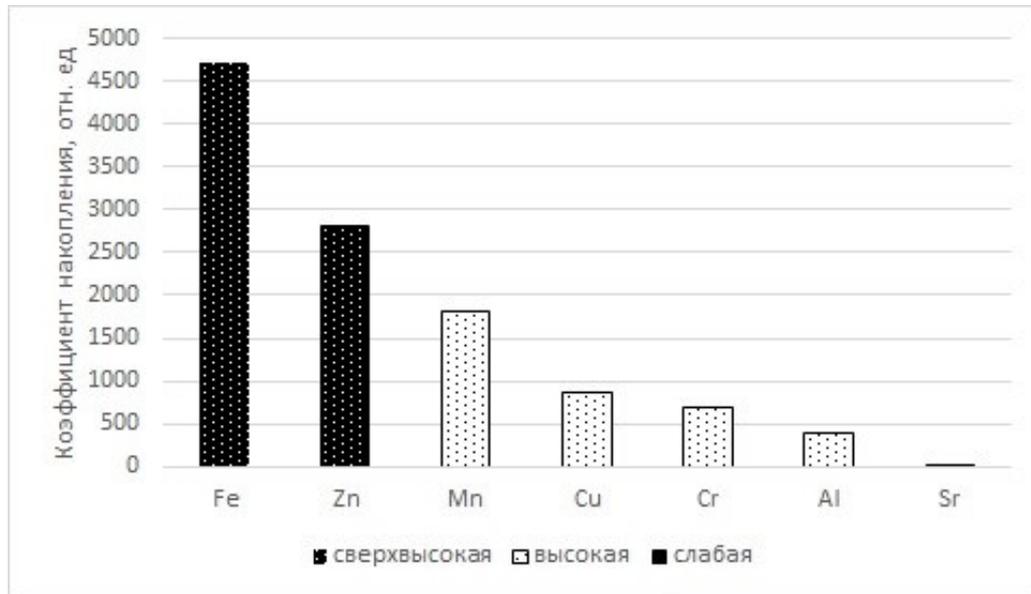


Рисунок 8.4. Аккумуляция металлов в организме озерных лягушек

Высокую степень накопления в организме прудовых лягушек имели цинк и хром. Алюминий характеризовался высокой степенью накопления, медь и железо умеренной; стронций и марганец – слабой степенью кумуляции. Для озерных лягушек выявлена высокая степень накопления в организме железа и цинка. Марганец, медь, хром и алюминий характеризовались высокой степенью накопления, стронций – слабой степенью кумуляции. Высокие коэффициенты накопления обусловлены, по всей видимости, содержанием в исследованных водных объектах в биодоступной форме цинка, железа, меди (гидрокарбонатные формы, гидроксокомплексы), хрома (хромат анионы), марганца (серноокислые, хлористые и азотнокислые соли). Выявленные межвидовые различия могут быть связаны с особенностями сред обитания близкородственных видов, с присутствием в их рационе питания наземных объектов (Файзулин и др., 2013), с разной интенсивностью метаболизма.

Из литературы известно, что, попадая в организм, металлы практически не подвергаются каким-либо существенным превращениям, включаются в биохимический цикл и крайне медленно покидают его (Лобанова, 2008; Моисеенко, 2008; Kaszor-Kami et al., 2020). Находясь в тканях и органах в виде комплекса с белками, аминокислотами и другими биологически активными соединениями металлы способны вызывать нарушение функций, отравление или гибель организма. Степень токсического воздействия зависит от природы металла, концентрации и комплексообразующей способности. Концентрированные растворы солей металлов, обладая вяжуще-прижигающим действием, нарушают функции органов дыхания. В слабых разведениях, проникая в организм, они нарушают проницаемость биологических мембран, снижают содержание растворимых протеинов, связываются с сульфгидрильными и аминогруппами белков и вызывают тем самым угнетение активности ферментов.

В ряде работ показан высокий уровень адаптации озерных лягушек к техногенному загрязнению, обусловленному поступлением в водные объекты тяжелых металлов с отходами предприятий металлургической, машиностроительной, горнодобывающей и уранодобывающей промышленности (Мисюра, Сподарец, Марченковская, 2004; Мисюра и др., 2008; Мисюра, Марченковская, Чернышенко, 2008). Анализ реакций метаболизма показал, что выживанию амфибий в этих условиях способствует изменение уровня белково-липидного и углеводного обмена. В органах и тканях озерных лягушек установлено увеличение количества белков и отдельных фракций липидов (фосфолипидов и холестерина), увеличение содержания в печени ферментов микросомальной фракции (в том числе цитохрома P450), обеспечивающих функции детоксикации организма в условиях загрязнения (Ковалев, 1972; Мисюра, Сподарец, Марченковская, 2004). Изменения метаболизма сопровождалось и увеличением индекса органов (печени, селезенки, почек, легких и сердца), что свидетельствовало об интенсификации их деятельности при воздействии различного типа токсикантов

(Марченковская, 2005). С учетом возможности разных путей поступления металлов в организм бесхвостых амфибий представлялось интересным проследить взаимосвязь между накоплением тяжелых металлов в органах от их содержания в других тканях.

Таблица 8.4

Зависимость накопления металлов в коже и мышцах амфибий от других органов

Металл	Уравнение регрессии	<i>r</i>	<i>R</i> ²	<i>p</i>
Хром	$y=0.6096+0.6513 \cdot x$ (кожа-мышцы)	0.87	0.75	0.0025
Марганец	$y=10.44+3.1352 \cdot x$ (кожа-кости)	0.85	0.73	0.0007
Цинк	$y=24.94+0.3952 \cdot x$ (мышцы-печень)	0.61	0.37	0.034
Алюминий	$y=0.722+0.9136 \cdot x$ (кожа-мышцы)	0.71	0.50	0.0096
Стронций	$y=0.0049+0.0333 \cdot x$ (кожа-печень)	0.71	0.50	0.014

Примечание: *r* – коэффициент корреляции; *R*²– коэффициент детерминации; *p* – уровень значимости

Методом регрессионного анализа установлена зависимость накопления металлов в мышцах от органов, контактирующих с водной внешней средой (кожей) и пищеварительной системой (печенью) (таблица 8.4).

Приоритетное поступление хрома, марганца, алюминия и стронция происходило из водной среды через кожу (перкутанный путь). Активное накопление цинка происходило преимущественно через желудочно-кишечный тракт (энтеральный путь), что подтверждалось высокими значениями КБП цинка для печени прудовых (КБП = 2724.4) и озерных (КБП = 2268.18) лягушек. Уравнение регрессии для стронция показывает, что чем больше металла поступает через кожу, тем выше его концентрация в печени. Установленные у бесхвостых амфибий невысокие значения КБП стронция печенью свидетельствуют о его активном выведении из организма. По всей видимости, тяжелые металлы, содержащиеся в белковых объектах питания и водной среде бесхвостых амфибий накапливались в печени и за счет

активности ферментов детоксикации микросом печени осуществлялось общее снижение содержания металлов в организме, их перераспределение между тканями и органами или выведение.

Гамма-коэффициентом ранговой корреляции выявлена статистически значимая взаимосвязь между цитогенетическими показателями, индексами органов и биоаккумуляцией металлов в тканях и органах амфибий. Показаны положительные ассоциации суммарного содержания в крови эритроцитов с микроядрами с накоплением ионов алюминия в селезенке ($\gamma = 0.34$, $p = 0.005$); марганца в сердце ($\gamma = 0.25$, $p = 0.027$) и в костях ($\gamma = 0.23$, $p = 0.042$), стронция в коже ($\gamma = 0.23$, $p = 0.049$) прудовых лягушек. Умеренная положительная связь установлена между количественным содержанием в крови лейкоцитов и накоплением ионов алюминия в селезенке ($\gamma = 0.29$, $p = 0.02$), марганца в сердце ($\gamma = 0.28$, $p = 0.018$) и костях ($\gamma = 0.27$, $p = 0.018$) прудовых лягушек. Для озерных лягушек корреляционной взаимосвязи биоаккумуляции тяжелых металлов в тканях и органах с количественным содержанием клеток в периферической крови не установлено.

Направление и сила статистической связи видов микроядер в эритроцитах крови с содержанием в органах и тканях тяжелых металлов определялось как химической природой металла, так и местом его локализации в организме озерных и прудовых лягушек (таблица 8.5).

Накопление металлов в организме амфибий оказывало существенное влияние на морфофизиологические показатели, оцениваемые по индексах органов и тканей зеленых лягушек. Изменение значений индексов органов (гонады, тимус) прудовых лягушек коррелировало с содержанием в органах организма марганца, стронция, цинка и меди). Более выраженная корреляционная взаимосвязь накопления тяжелых металлов с морфофизиологическими параметрами амфибий установлена для озерных лягушек, индексы органов (печень, почки, сердце) которых коррелировали с содержанием в тканях/органах ионов марганца, стронция, цинка и хрома (таблица 8.6).

Таблица 8.5

Анализ взаимосвязи цитогенетических показателей с биоаккумуляцией тяжелых металлов в органах и тканях амфибий

Сравниваемые пары		γ	p -значение*
Доля вида микроядер в клетках	Металл / орган (ткань)		
<i>Pelophylax ridibundus – озерные лягушки</i>			
Оформленные	Cr / гонады	0.79	0.01
	Zn / кости	-0.79	0.01
	Sr / кости	-0.79	0.01
Разрыхленные	Mn / кровь	-0.99	0.02
<i>Pelophylax lessonae – прудовые лягушки</i>			
Оформленные	Cu / кровь	0.53	0.05
Палочковидные	Zn / печень	0.99	0.05
	Zn / мышцы	0.99	0.05
	Cu / кожа	0.99	0.05
	Cu / гонады	0.99	0.05
	Разрыхленные	Sr / мышцы	-0.33
Разрыхленные	Mn / кости	-0.35	0.01
	Cu / мышцы	-0.45	0.01
	Оформленные	Mn / сердце	-0.54
Палочковидные	Cu / кровь	-0.99	0.05
	Mn / кровь	-0.99	0.05

* – с учетом поправки Бонферрони

Таблица 8.6

Анализ взаимосвязи индексов органов с биоаккумуляцией тяжелых металлов в органах и тканях амфибий

Сравниваемые пары		γ	p -значение*
Индекс органа	Металл / орган (ткань)		
<i>Pelophylax ridibundus – озерные лягушки</i>			
Сердце	Zn / кости	0.47	0.05
	Sr / кости, печень	0.48	0.05
Печень	Mn / гонады	0.52	0.04
	Sr / гонады	0.52	0.04
Почки	Zn / сердце	0.50	0.04
Почки	Cr / сердце	-0.47	0.05
	Zn / печень	-0.47	0.05
Сердце	Cr / гонады	-0.48	0.05
<i>Pelophylax lessonae – прудовые лягушки</i>			
Гонады	Mn / сердце	0.36	0.03
	Sr / кожа	0.35	0.03
Тимус	Zn / кожа	-0.41	0.02
	Cu / кости	-0.48	0.05

* – с учетом поправки Бонферрони

Полученные результаты свидетельствуют, во-первых, о высокой степени аккумуляции тяжелых металлов в организме бесхвостых амфибий, определяемой гидрохимическими условиями водной среды и биодоступностью металлов; и, во-вторых, о влиянии аккумуляции металлов в органах и тканях амфибий на цитогенетический гомеостаз и морфофизиологические параметры организма. Поступая в водоемы, тяжелые металлы включаются в круговорот веществ и подвергаются различным превращениям. В зависимости от условий среды (рН, окислительно-восстановительного потенциала, наличия лигандов) ионы металлов существуют в разных степенях окисления, входят в состав разнообразных неорганических соединений, образуют металлорганические комплексы, адсорбируются донными осадками. Токсическое действие большинства металлов на организм обусловлено их ионами. Тяжелые металлы обладают способностью к кумуляции, которая проявляется или в постепенном накапливании в организме ионов металлов (прямая или материальная кумуляция) и передаче в возрастающих количествах по трофической цепи, или в суммировании их вредного влияния (функциональная кумуляция).

Проведенный анализ позволяет сформулировать положение, выносимое на защиту: **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.**

Таким образом, атомно эмиссионным методом обнаружены в высоких концентрациях металлы в селезенке (хром), костях (цинк, стронций), печени (медь) озерных лягушек. У прудовых лягушек высокие коэффициенты биологического поглощения тяжелых металлов выявлены для марганца, стронция, цинка (костная ткань), железа (печень, селезенка), меди (сердце). Кумулятивные свойства тяжелых металлов определяли по установленным коэффициентам накопления (Кн). Видовые закономерности накопления

тяжелых 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 хрома, марганца, алюминия и стронция из водной среды в организм происходило через кожу. Активное накопление цинка происходило преимущественно через пищу, что подтверждалось высокими значениями коэффициента биологического поглощения цинка для печени прудовых и озерных лягушек. Методом регрессионного анализа установлена зависимость накопления тяжелых металлов в мышцах от органов и тканей, контактирующих с водной внешней средой (кожа) и пищеварительной системой (печень). Полученные результаты свидетельствуют о высокой степени аккумуляции тяжелых металлов в организме бесхвостых амфибий, определяемой условиями водной среды и биодоступностью металлов. Выявлена корреляционная взаимосвязь между цитогенетическими и морфофизиологическими показателями гомеостаза и биоаккумуляцией тяжелых металлов в тканях и органах в амфибий.

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).

Таблица

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
<i>Гематологические показатели</i>		
Содержание лейкоцитов (тыс/мм ³)	снижение	снижение
Содержание эритроцитов (тыс/мм ³)	снижение	повышение
<i>Цитогенетические показатели</i>		
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
<i>Морфофизиологические показатели</i>		
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 лимфо-миелоидный 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров, К. М. Гематология / К.М. Абдулкадыров. – М.: Эксмо. – 2004. – 928 с.
2. Агафонова, Е. В. Особенности структуры и функции эпителиальных клеток верхних дыхательных путей у реконвалесцентов COVID-19 / Е. В. Агафонова, И. Д. Решетникова, Ю. А. Тюрин // Материалы XIV Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского. – 2022. – С. 6 – 7
3. Акуленко, Н. М. Сезонная динамика эритропоэза и его топографическое распределение у лягушки озерной / Н. М. Акуленко // Вестник Запорожского национального университета. – 2008. – № 2. – С. 5–10.
4. Алов, И. А. Цитофизиология и патология митоза / И. А. Алов. – М.: «Медицина». — 1972. — 264 с.
5. Атоянц, А. Л. Изучение загрязненности почв г. Еревана тяжелыми металлами с применением системы почва–растение / А. Л. Атоянц, Э. А. Агаджанян, Р. Э. Авалян, А. С. Варжапетян, Л. В. Саакян, А. К. Сагателян, Р. М. Арутюнян // Ученые записки ЕГУ. Химия и биология. – 2012. – №3. – С. 57 – 61.
6. Афанасьева, Е. С. Изменчивость и динамика частоты микроядер участников трансатлантического перехода VII Украинской антарктической экспедиции / Е. С. Афанасьева, В. Ф. Безруков // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 37–43.
7. 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.
8. Басыйров, А. М. Особенности микроядерного анализа эритроцитов крови в популяции сизого голубя в г. Казани / А. М. Басыйров, И. И. Рахимов // Вестник Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета. – 2005. – №7. – С. 119 – 125.

9. Береснева, О. Ю. Экспериментальное исследование влияния тизоля и дерината на индукцию микроядер в костном мозге крыс, подвергавшихся воздействию ионизирующего излучения / О. Ю. Береснева, Д. Ю. Гребнев, В. В. Базарный // Уральский медицинский журнал. – 2008. – Т. 51, № 11. – С. 85 – 87.
10. Борисовский, А. Г. Морфометрическая характеристика зеленых лягушек (комплекс *Rana esculenta*) в Удмуртии / А. Г. Борисовский, Л. Я. Боркин, С. Н. Литвинчук, Ю. М. Розанов // Вестник Удмуртского университета. – 2000. – № 5. – С. 70 – 75.
11. Боркин, Л. Я. Некоторые аспекты морфологической изменчивости, полиморфизма окраски, роста, структуры популяции и суточной активности *Rana lessonae* на северной границе ареала / Л. Я. Боркин, Н. Д. Тихенко // Ананьева Н. Б. и Боркин Л. Я. (ред.). Экология и систематика амфибий и рептилий. Ленинград. – 1979. – С. 18 – 54.
12. Боркин, Л. Я. О криптических видах (на примере амфибий) / Л. Я. Боркин, С. Н. Литвинчук, Ю. М. Розанов, Д. В. Скоринов // Зоол. журн. – 2004. – Т. 83, № 8. – С. 936 – 960.
13. Боркин, Л. Я. Отряд Бесхвостые / Н. Б. Ананьева, Л. Я. Боркин, И. С. Даревский, Н. Л. Орлов // Земноводные и пресмыкающиеся. Энциклопедия природы России. – 1998. – С. 19 – 174.
14. Бродский, И. Б. Микроядра как маркёры хромосомных изменений клеток. Обзор. / И. Б. Бродский, С. А. Брянцева, А. М. Ковалёва и др. // Журн. фундаментальной медицины и биологии. – 2012. – № 1. – С. 4 – 9.
15. Васильев, С. А. Анеугенный эффект ионизирующего излучения в соматических клетках млекопитающих и человека / С. А. Васильев, В. А. Тимошевский, И. Н. Лебедев // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 12. – С. 1589 – 1599.
16. Верегина, А. О. Сравнение устойчивости сперматогенеза у гемиклонального межвидового гибрида *Pelophylax esculentus* и родительского вида *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura) / А. О. Верегина, О. В. Бирюк, Д.

А. Шабанов // Труды украинского герпетологического общества. – 2014. – № 5. – С. 20 – 28.

17. Вершинин, В. Л. Гемопоз бесхвостых амфибий – специфика адаптациогенеза видов в современных экосистемах / В. Л. Вершинин // Зоологический журнал. – 2004. – Т. 83, № 11. – С. 1367 – 1374.

18. Водунон, А. С. Цитогенетические изменения в эритроцитах больных атопической бронхиальной астмой / А. С. Водунон, Н. А. Пономарева, З. И. Абрамова // Ученые записки казанского государственного университета. – 2008. – Т. 150, № 2. – С. 101 – 105.

19. Воробьев, А. И. Руководство по гематологии / А. И. Воробьев, Ю. И. Лорие. – М.: Медицина. – 1985. – Т. 2. – 448 с.

20. Врончинский, К. К. Применение пестицидов и охрана окружающей среды / К. К. Врончинский, В. Н. Маковский. Киев: В. школа. – 1979. – 208 с.

21. 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: Изд-во ННГУ – 2016. – 702 с.

22. Гелашвили, Д. Б. Экологическое состояние водных объектов Нижнего Новгорода. / Д. Б. Гелашвили, А. Г. Охапкин, А. И. Доронина // Нижний Новгород, – 2008. – 414 с.

23. Гольдберг, Д. И. Справочник по гематологии. / Д. И. Гольдберг, Е. Д. Гольдберг, Томск. – 1980. – 266 с.

24. Горовая, А. И. Использование цитогенетического тестирования для оценки экологической ситуации и эффективности оздоровления детей и взрослых природными адаптогенами / А. И. Горовая, И. И. Климкина // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 5. – С. 21–25.

25. Гилева, Э. А. Изменчивость частоты хромосомных нарушений, индуцированных антропогенными поллютантами, у домашней мыши из

Гиссарской долины / Э. А. Гилева, Н. Л. Косарева, Н. М. Любашевский, М. Ф. Бахтиярова // Экология. – 1993. – № 1. – С. 62–70.

26. Гланц, С. Медико-биологическая статистика. / С. Гланц. – М.: Практика. – 1998. – 459 с.

27. Жулева, Л. Ю. 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.

28. Жулева, Л. Ю. Повреждение хромосомного аппарата соматических клеток человека при воздействии диоксина / Л. Ю. Жулева // Автореферат дисс. канд. биол. наук. М. – 2000. – 21 с.

29. Зарипова, Ф. Ф. Характеристика состояния популяции озерной лягушки *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Anura, Amphibia) в Республике Башкортостан по олиморфизму рисунка окраски спины / Ф. Ф. Зарипова, Г. Р. Юмагулова, А. И. Файзулин // Изв. Самар. НЦ РАН. – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 78 – 82.

30. Захаров, В. М. Методология оценки здоровья Среды. Последствия Чернобыльской катастрофы / В. М. Захаров, Е. Ю. Крысанов, А. В. Пронин // Здоровье Среды. – 1996. – С. 22 – 31.

31. Захидов, С. Т. Карнозин как фактор, модифицирующий частоту встречаемости генетически аномальных половых клеток в семенниках ускоренно стареющих мышей SAM / С. Т. Захидов, А. В. Гопко, М. Л. Селянова, Л. Ю. Михалева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, №7 – С. 89 – 92.

32. Ивантер, Э. В. Адаптивные особенности мелких млекопитающих / Э. В. Ивантер, Т. В. Ивантер, И. Л. Туманов // Л.: Наука. – 1985. – 320с.

33. Ильин, Д. А. Аспекты формирования микроядер / Д. А. Ильин // Сборник науч. тр. Естествознание и гуманизм. Новосибирск, 2006. – Т. 3, Вып. 3. – С. 43 – 65.

34. Ингель, Ф. И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях

цитокинетического блока. Часть 1. Пролиферация клеток / Ф. И. Ингель // Экологическая генетика. – 2006. – Т. 4, №3. – С. 7 – 19.

35. Калаев, В. Н. Частота встречаемости клеток с микроядрами в плоском эпителии, полученном из соскобов с шейки матки женщин детородного возраста при различных физиологических состояниях, в норме и при воспалении / В. Н. Калаев, А. К. Буторина, О. Л. Кудрявцева // Естествознание и гуманизм. – 2006. – Т. 3, № 2. – С. 22 – 23.

36. Кармазин, А. П. Использование гематологических показателей озерной лягушки *Rana ridibunda* (Pallas, 1771) для определения зоны токсического действия нефти / А. П. Кармазин, Т. Ю. Пескова // Современная герпетология. – 2010. – Т. 10. – С. 3 – 7.

37. Квасов, И. Д. Внутрядерные структуры, содержащие факторы созревания РНК, в ранних вителлогенных ооцитах травяной лягушки / И. Д. Квасов, В. Н. Парфенов, А. Г. Цветков // Цитология. – 2000. – Т. 42, № 6. – С. 536 – 549.

38. Киреев, И. И. Ультраструктура митотических хромосом клеток СПЭВ при их обратимой искусственной деконденсации *in vivo* / И. И. Киреев, О.В. Зацепина, В.Ю. Поляков, Ю.С. Ченцов // Цитология. – 1988. – Т. 30, № 8. – С. 926 – 932.

39. Кисурина-Евгеньева, О.П. Биогенез микроядер. Обзор. / О. П. Кисурина-Евгеньева, О. И. Сулягина, Г. Е. Онищенко. // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 5. – С. 612 – 624.

40. Ковалева, О. А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих / О. А. Ковалева // Цитология и генетика. – 2008. – Т.42, № 1. – С. 58–72.

41. Ковалев, И. Е. Введение в иммунофармакологию / И. Е. Ковалев, П. В. Сергеев. Казань : Изд-во Казан. ун-та. – 1972. – 143 с.

42. Колмакова, Т. С. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей: метод. рекомендации / Т. С.

Колмакова, С. Н. Белик, Е. В. Моргуль, А. В. Севрюков. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ. – 2013. – 31 с.

43. Комов, В. Т. Ртуть в абиотических и биотических компонентах водных и наземных экосистем поселка городского типа на берегу Рыбинского водохранилища / В. Т. Комов, В. А. Гремячих, Ю. Г. Удоденко, Е. В. Щедрова, М. Е. Елизаров // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы. Труды ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН. – 2017. – Т.77, №80. – С. 34 – 56.

44. Концевая, И. И. Эффект антибиотиков разных химических групп на генотоксичность в *Allium* тесте / И. И. Концевая // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины. – 2021. – Т. 3, № 126. – С. 33 – 38.

45. Коцержинская, И. М. Применение метода комплексного вариационного анализа для идентификации лягушек *Rana esculenta complex* / И. М. Коцержинская // Современная герпетология. – 2000. – № 1. – С. 71– 72.

46. Кривцова, Е. К. Цитомный анализ: современный универсальный инструмент медико-биологических и эколого-гигиенических исследований (обзор литературы). Часть 1. / Е. К. Кривцова, Ф. И. Ингель, Л. В. Ахальцева // Гигиена и санитария. – 2021. – Т. 100, №10. – С. 1151 – 1156.

47. Крюков, В. И. Индукция микроядер в эритроцитах карпа ионами шестивалентного хрома / В. И. Крюков, А. Л. Климов, Н. В. Красова // Инновационная наука. – 2016. – №9. – С. 379.

48. Крюков, В. И. Ионы хрома (VI) индуцируют микроядра и ядерные аномалии в эритроцитах амфибий / В. И. Крюков, С. А. Жучков, Т. Н. Лазарева // Принципы экологии. – 2023. – № 1. – С. 58 – 66.

49. Крюков, В. И. Влияние КВЧ-излучения на частоту микроядер и ядерных аномалий в эритроцитах личинок амфибий / В. И. Крюков, С. А. Жучков, Т. Н. Лазарева, О. С. Киреева, Н. Н. Поповичева // Вестник КамчатГТУ. – 2023. – №63. – С. 101 – 112.

50. Крюков, В. И. Ионы меди индуцируют микроядра в эритроцитах карпа / В. И. Крюков // Биология в сельском хозяйстве. – 2018. – №1 (18). – С. 3 – 9.
51. Крюков, В. И. Анализ микроядер и ядерных аномалий в эритроцитах рыб, амфибий, рептилий и птиц: критерии выявления и типирования / В. И. Крюков. – Красноярск: научно инновационный центр. – 2023. – 94 с.
52. Крюков, В. И. Индукция микроядер в эритроцитах рыб водными вытяжками из ванадий содержащих промтоходов, захороненных на территории орловской городской свалки ТБО / В. И. Крюков, Н. В. Лактюшина, А. О. Беляева // Биология в сельском хозяйстве. – 2020. – №2 (27). – С. 2 – 12.
53. Кузина, Т. В. Изменение структуры ядра эритроцитов периферической крови промысловых рыб Волго-Каспийского канала / Т. В. Кузина // Вестник МГОУ. Сер. Естественные науки. – 2010. – № 2. – С. 50 – 57.
54. Кузина, Т. В. Изменения структуры ядра эритроцитов периферической крови промысловых рыб волго-каспийского канала / Т. В. Кузина // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». Раздел I. Биология. – 2011. – №2. – С. 50 – 57.
55. Кузьмин, С. Л. Земноводные бывшего СССР. – 1-е изд. / С. Л. Кузьмин. – М.: Т-во науч. изд. КМК. – 1999. – 298 с.
56. Лада, Г. А. Среднеевропейские зеленые лягушки (гибридогенный комплекс *Rana esculenta*): введение в проблему / Г. А. Лада // Флора и фауна Черноземья. Тамбов, 1995. – С. 88 – 109.
57. Лобанова, Т. М. Особенности накопления тяжелых металлов промысловыми видами рыб / Т. М. Лобанова // Вестн. КГУ им. Н.А. Некрасова. – 2008. – Т. 14, № 1. – С. 18 – 21.
58. Логинов, В. В. Фенотипическая изменчивость и цитогенетические характеристики природных популяций зеленых и бурых лягушек, обитающих

на антропогенно-трансформированных и заповедных территориях. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Н. Новгород, 2004. – 24 с.

59. Льюин, Б. Гены / Б. Льюин. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2012. – 896 с.

60. Манских, В. Н. К вопросу о механизмах образования микроядер в соматических клетках бесхвостых амфибий в норме и при действии N-нитрозометилкарбамида / В. Н. Манских // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 2. – С. 217 – 220.

61. Манских, В. Н. Пути гибели клеток и их биологическое значение. Цитология / В.Н. Манских // СПб.: Наука. – 2007. – Т.49, №11. – С. 909 – 915.

62. Марченковская, А. А. Влияние урбанизации на морфофизиологические показатели некоторых видов земноводных / А.А. Марченковская// Экология фундаментальная и прикладная. Проблемы урбанизации: материалы междунар. науч.-практ. конф. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та. – 2005. – С. 215 – 217.

63. Меньшиков, В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская, Р. П. Золотницкая, З. М. Андреева, А. С. Анкирская, И. С. Балаховский, Д. В. Белокриницкий, С. Д. Воропаева, Е. Н. Гаранина, Т. И. Лукичева, Н. Г. Плетнева, А. Я. Смоляницкий. М. : Медицина, 1987. – 368 с.

64. Миллер, Дж. Биология тимуса / Дж. Миллер, П. Дукор. – Пер. с нем. – М.: Мир, – 1967. – 128 с.

65. Мисюра, А. Н. Сравнительная характеристика содержания биогенных элементов в органах и тканях озерной лягушки из водоемов в местах поступления отходов уранодобывающей промышленности и Днепровско-Орельского заповедника / А. Н. Мисюра, А. А. Марченковская, Д. А. Сподарец // Тез. докл. 1-й Междун. научно-практ. конф. «Биоэлементы», Оренбург, 1719 июня 2004 г. Вестник Оренбург. гос. ун-та. 2004. – № 4. – С. 62 – 63.

66. Мисюра А. Н. Использование бесхвостых амфибий в системе биомониторинга для оценки влияния отходов предприятий по переработке урановой руды на зооценоз / А. Н. Мисюра, С. В. Чернышенко, А. А. Марченковская, И. Н. Залипуха // Вестник Днепропетровского государственного университета –2007. –Т.15, № 1. – С. 102 – 106.

67. Мицура, В. М. Мутагенный потенциал вируса гепатита С / В. М. Мицура, С.Б. Мельнов // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2014. – Т. 3, №47. – С. 49 – 52.

68. Моисеенко, Т. И. Водная токсикология: теоретические принципы и практическое предложение / Т. И. Моисеенко // Водные ресурсы. –2008. –Т. 35, № 5. – С. 554 – 565.

69. Перельман, А. И. Геохимия ландшафта: Учеб. пособие для студентов геогр. и экол. специальностей вузов / А. И. Перельман, Н. С. Касимов. – Москва: Астрей-2000, 1982. – 610 с.

70. Пескова, Т. Ю. Адаптационная изменчивость земноводных в антропогенно загрязненной среде. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Тольятти. – 2004. – 36 с.

71. Привалов, М. П. Влияние дозы ионизирующего излучения на частоту встречаемости различных ядерных аномалий в эритроцитах рыб *Danio rerio* / М. П. Привалов, А. А. Панкратов // Материалы всероссийского научного форума студентов с международным участием «Студенческая наука - 2020». – 2020. – Т. 3. – С. 423 – 424.

72. Приказ Министерства сельского хозяйства РФ №552 от 13.12.2016 Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения (с изменениями на 22 августа 2023 года). [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/420389120> (дата обращения 28.01.2024).

73. Приказ Федерального агентства по рыболовству №695 от 04.08.2009 Об утверждении Методических указаний по разработке нормативов

качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения (с изменениями на 22 декабря 2016 года). [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/902172637> (дата обращения 28.01.2024).

74. Прошин, С. Н. Нарушения морфологии интерфазных ядер в клеточных популяциях животных при оценке на геном дестабилизирующих факторов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук . СПб.; Пушкин: ВНИИГРЖ, 2007. – 33 с.

75. Раменский, Л. Г. Основные закономерности растительного покрова / Л. Г. Раменский // Вестник опытного дела – 1924. Воронеж, 1924. – 37 с.

76. Романова, Е. Б. Оценка состояния популяций зеленых лягушек рода *Rana* по комплексу показателей гомеостаза / Е. Б. Романова, О. В. Волкова, М. И. Тихонова // Вестник Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского. – 2011. — №2. – С. 119 – 124.

77. РД 52.24.643-2002 Метод комплексной оценки степени загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям [Электронный ресурс]. – URL: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293831/4293831806.htm> (дата обращения 28.01.2024).

78. СанПиН 2.1.4.1074-01 «Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды. Централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества» [Электронный ресурс]. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/901798042> (дата обращения 28.01.2024).

79. Тагаев, А. В. Анализ изменений клеток буккального эпителия и эритроцитов крови у больных клещевым энцефалитом / А. В. Тагаев // МНСК-2017: Медицина. – 2017. – С. 26.

80. Томилин, Н. В. Исследование генотоксического действия марганца и кадмия в лейкоцитах периферической крови белых крыс. / Н. В. Томилин, А.

Н. Петров, О. А. Филько, А. В. Храброва, Н. Е. Соловьева, Г. В. Рутковский, Р. К. Глушков, Н. Д. Соловьев // Химическая и биологическая безопасность. МБА. М., 2012. – С. 8 – 14.

81. Трофимов, О. В. Цитологические, генетические и протеомные изменения в крови крупного рогатого скота, инфицированного вирусом лейкоза: Автореф. дис... канд. биол. наук / О. В. Трофимов. – Тюмень, 2013. – 148 с.

82. Северцова, Е. А. Постэмбриональное развитие бесхвостых амфибий при захламлении водоемов металлсодержащими конструкциями (имитационные эксперименты) / Е. А. Северцова, Д. Р. Агильон Гуттиеррес // Зоологический журнал. – 2013. – Т.92. №6. – С. 707 – 717.

83. Северцова, Е. А. Спектрохимический и гистохимический анализ тканей головастиков травяной лягушки и серой жабы, развивающихся в условиях имитации загрязнения свинцом и железом / Е. А. Северцова, А. И. Никифорова, Д. Р. Агильон Гуттиеррес // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. – 2013. – № 4. – С. 27 – 32.

84. Силс, Е. А. Сравнительный анализ гематологических показателей остромордой (*Rana arvalis*, Nilsson, 1842) и озерной (*Rana ridibunda*, Pallas 1771) лягушек городских популяций / Е. А. Силс // Вестн. Оренбург. ун-та. – 2008. – Т.92, № 10. – С 230 – 235.

85. Спиридонов, М. Б. Изменения кислотной резистентности эритроцитов при длительном раздельном и сочетанном воздействии на организм малых доз инкорпорированного ^{137}Cs и ионов свинца / М. Б. Спиридонов, Ц. Ц. Содбоев // Вопросы ветеринарии и ветеринарной биологии: Сб. науч. тр./ Моск. гос. акад. вет. мед. и биотехн. им. К. И. Скрябина. – 2000. – С. 119 – 123.

86. Таращук, С. Л. К методам определения европейских зеленых лягушек *Rana esculenta* (Amphibia, Ranidae) / С. Л. Таращук // Вестник зоологии – 1985. – № 3. – С. 83 – 85.

87. Тодоров, Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. / Й. Тодоров. София: Медицина, 1968. – 1065 с.
88. Томилин, Н. В. Оценка степени повреждения ядерной ДНК в клетках периферической крови людей профессионально связанных с действием тяжелых металлов / Н. В. Томилин, А. Н. Петров, О. А. Филько, А. В. Храброва, Н. Е. Соловьева, Т. М. Иванова, Г. В. Шестова, К. В. Сизова, Г. В. Рутковский, Р. К. Глушков, А. А. Иваненко, Н. Д. Соловьев // Medline.ru. Российский Биомедицинский Журнал. – 2015. – Т. 16. – С. 383 – 392.
89. Файзулин, А. И. Амфибии Самарской области / А. И. Файзулин, Н. В. Чихляев, А. Е. Кузовенко // Тольятти: ООО «Кассандра». – 2013. – 140 с.
90. Чередниченко, О. Г. Атлас хромосомных, ядерных и клеточных аномалий у основных тест-объектов / О. Г. Чередниченко – Алматы: «Казак университети», – 2020. – 464 с.
91. Чернышова, Э. В. Периферическая кровь лягушек рода *Rana* как тест-система для оценки загрязнения окружающей среды / Э. В. Чернышова, В. И. Старостнин // Известия РАН. Серия биология. – 1994. – №4. – С. 656 – 660.
92. Чубинишвили, А. Т. Оценка стабильности развития и цитогенетического гомеостаза в популяциях европейских зеленых лягушек (комплекс *Rana esculenta*) в естественных и антропогенных условиях. / А. Т. Чубинишвили // Онтогенез. – 2001. – Т. 32, № 6. – С. 434 – 439.
93. Чумаков, П. М. Белок р53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П.М. Чумаков // Успехи биологической химии. – 2007. – Т.47. – С. 3 – 52.
94. Шварц, С. С. Влияние микроэлементов на животных в естественных условиях рудного поля / С. С. Шварц // Труды биогеохимической лаборатории АН СССР. – 1954. – Т.10. – С. 76 – 81.
95. Шварц, С. С. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных / С. С. Шварц, В. С. Смирнов, Л. Н. Добринский. – Свердловск, 1968. – 387 с.

96. Шитиков, В. К. Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. / В. К. Шитиков, Г. С. Розенберг // Тольятти: Кассандра. – 2014. – 314 с.
97. Шмакова, Н. Л. Действие малых доз облучения на клетки китайского хомячка / Н. Л. Шмакова, Т. А. Фадеева, Е. А. Красавин // Радиационная биология. – 1998. – Т. 38, Вып. 6. – С. 841 – 847.
98. Шмакова, Н. Л. Индукция хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах периферической крови человека при низкой дозе облучения / Н. Л. Шмакова, Е. А. Насонова, Е. А. Красавин, О. В. Комова, Л. А. Мельникова, Т. А. Фадеева. *Radiats Biol Radioecol.* – 2006. – Т.46, № 4. – С. 480 – 487.
99. Якимов, В. Н. Основы анализа биомедицинских и экологических данных в среде R. Часть 1. / В. Н. Якимов // Учебное пособие. – Н. Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2019. – 97 с.
100. Якимов, В. Н. Основы анализа биомедицинских и экологических данных в среде R. Часть 2. / В. Н. Якимов // Учебное пособие. – Н. Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2019. – 168 с.
101. Aljanabi, S. M. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques / S. M. Aljanabi, I. Martinez // *Nucleic Acids Research.* – 1997. – Vol. 25. – P. 4692 – 4693.
102. Akin, Ç. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic / Ç. Akin, C. Can Bilgin, P. Beerli, R. Westaway, T. Ohst, S.N. Litvinchuk, T. Uzzell, M. Bilgin, H. Hotz, G.-D. Guex, J. Plötner // *J. Biogeography.* – 2010. – Vol. 37, №11. – P. 2111 – 2124.
103. Araldi R. P. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review / R. P. Araldi, T. Correa de Melo, T. B. Mendes et al. // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2015. – Vol. 72. – P. 74 – 82.
104. Apraiz, A. Cell-Centric View of Apoptosis and Apoptotic Cell Death-Inducing Antitumoral Strategies / A. Apraiz, M. Boyano, A. Asumendi // *Cancers (Basel).* – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 1042 – 1080.

105. Asare, N. Cytotoxic potential of silver nanoparticles / N. Asare, C. Instanes, W. J. Sandberg, M. Refsnes, P. Schwarze, M. Kruszewski, G. Brunborg // *Toxicology*. – 2012. – Vol. 291 – P. 65 – 72.
106. Baginski, B. Effect of mercuric-chloride on microbicidal activities of human polymorphonuclear leukocytes / B. Baginski // *Toxicology*. – 1988. – Vol. 50, № 3. – P. 247 – 256.
107. Banks, M. S. Mercury Bioaccumulation Ingreen Frog (*Rana clamitans*) and Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Tadpoles from Acadia National Park, Maine, USA / M. S. Banks, J. Crocker, B. Connery, A. Amirbahman // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2007. – Vol. 26, № 1. – P. 118 – 125.
108. Barni, S. Mechanisms of Changes to the Liver Pigmentary Component During the Annual Cycle (Activity and Hibernation) of *Rana esculenta* L. / S. Barni, V. Bertone, A. Frascini, F. Bernini, C. Fenoglio // *J. Anatomy*. – 2002. – Vol. 200, № 2. – P. 185 – 194.
109. Benites, C. I. Micronucleus test on gas station attendants / C. I. Benites, L. L. Amado, R. A. Vianna, Mda G. Martino-Roth // *Genet. Mol. Res.* – 2006. – Vol. 5, № 1. – P. 45 – 54.
110. Berger, L. Embrional and larval development of F1 generation green frog different combinations / L. Berger // *Acta zool. Cracov.* – 1967. – Vol. 12, № 7. – P. 123 – 160.
111. Blaustein, A. R. Complexity in Conservation: Lessons from the Global Decline of Amphibian Populations / A. R. Blaustein, J. M. Kiesecker // *Ecology Letters*. – 2002. – Vol. 5, № 4. – P. 597 – 608.
112. Blaustein, A. R. Ultraviolet Radiation, Toxic Chemicals and Amphibian Population Declines / A. R. Blaustein, J. M. Romanic, J. M. Kiesecker, A. C. Yatch // *Diversity and Distributions*. – 2003. – Vol. 9, № 2. – P. 123 – 140.
113. Blaustein, A. R. Complexity in Conservation: Lessons from the Global Decline of Amphibian Populations / A. R. Blaustein, J. M. Kiesecker // *Ecology Letters*. – 2002. – Vol. 5, № 4. – P. 597 – 608.

114. Blaustein, A. R. Ultraviolet Radiation, Toxic Chemicals and Amphibian Population Declines / A. R. Blaustein, J. M. Romanic, J. M. Kiesecker, A. C. Yatch // *Diversity and Distributions*. – 2003. – Vol. 9, № 2. – P. 123 – 140.
115. Cardier, J. E. lymphocytes subsets in experimental iron overload / J. E. Cardier, E. Romano, A. Soyano // *Immunopharmacol. and Immunotoxicol.* – 1997. – Vol. 19, № 1. – P.75 – 87.
116. Cimini, D. Aneuploidy: the matter of bad connections. / D. Cimini, F. Degrossi // *Trends in Cell Biology*. – 2005. – Vol. 15, № 8. – P. 442 – 451.
117. Crasta, K. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis / K. Crasta, N. Ganem, R. Dagher, A. Lantermann, E. Ivanova, Y. Pan, L. Nezi, A. Protopopov, D. Chowdhury, D. Pellman // *Nature*. – 2012. – Vol. 482, № 7383. – P. 53 – 58.
118. Crawshaw, G. Anurans (Anura, Salienta): Frogs, Toads / G. rawshaw // *Zoo and Wild Animal Medicine* / eds. M. E. Fowler, R. E. Miller. Saint Louis: Saunders, 2003. – 782 p.
119. Cveticanin, J. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells / J. Cveticanin, G. Joksic, A. Leskovac, S. Petrovic, A.V. Sobot, O. Neskovic // *Nanotechnology*. – 2010. – Vol. 21, № 1. – 015102.
120. 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, № 5. – P. 760 – 772.
121. Day, B. J. A novel class of cytochrome P450 reductase redox cyclers: cationic manganoporphyrins / B. J. Day, C. A. Kariya // *Toxicol. Sci.* – 2005. – Vol. 85, № 1 – P. 713 – 719.
122. Denduluri, S. Effect of zinc administration on immune responses in mice / S. Denduluri, M. Langdon, R. K. Chandra. // *J. Trace Elem. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 10, № 3 – P. 155 – 162.
123. Ermakov, O. New multiplex PCR method for identification of east European green frog species and their hybrids / O. Ermakov, A. Ivanov, S. Titov, A.

Svinin, S.N. Litvinchuk // *Russian Journal of Herpetology*. – 2019. – Vol. 26, № 6. – P. 367 – 370.

124. Evans, H. J. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei / H. J. Evans, G. J. Neary, F. S. Williamson // *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* – 1959. – Vol.1. – P. 216 – 229.

125. Fagbenro, O.S. Experimental modeling of the acute toxicity and cytogenotoxic fate of composite mixtures of chromate, copper and arsenate oxides associated with CCA preservative using *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). / O.S. Fagbenro, C.G. Alimba, A.A. Bakare. // *Environ. Anal. Health Toxicol.* –2019. – V.343. – 16 p.

126. Fenech, M. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells / M. Fenech, M. Kirsch-Volders, A.T. Natarajan, J. Surralles, J.W. Crott, J. Parry, H. Norppa, D.A. Eastmond, J.D. Tucker, P. Thomas // *Mutagenesis*. – 2011. – Vol.26. – P. 125 – 132.

127. Fournier, M. Immunotoxicology of amphibians / M. Fournier, J. Robert, H. Salo, C. Dautremepuits, P. Brousseau // *Applied herpetology*. – 2005. – №2. – P. 297 – 309.

128. Godderis, L. Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation / L. Godderis, P. Aka, R. Mateuca, M. Kirsch-Volders, D. Lison, H. Veulemans // *Toxicology*. – 2006. – Vol. 219, № 3. – P.220 – 229.

129. Grinfeld, S. Micronuclei in red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* after treatment with benzo(a) pyrene: dependence on dose, length of exposure, posttreatment time, and uptake of the drug. / S. Grinfeld, A. Jaylet, R. Siboulet, P. Deparis, I. Chouroulinkov // *Environ Mutagen.* –1986. – Vol. 8, № 1. – P. 41 – 51.

130. Guo, H. Gene duplication and genetic innovation in cereal genomes. / H. Guo, Y. Jiao, X. Tan, X. Wang, X. Huang, H. Jin, A. H. Paterson // *Genome Res.* – 2019. – Vol. 29, № 2. – P. 261 – 269.
131. Hatch, E. M. Catastrophic nuclear envelope collapse in cancer cell micronuclei / E. M. Hatch, A. H. Fischer, T. J. Deerinck, M. W. Hetzer // *Cell.* – 2013. – Vol. 154. – P. 47 – 60.
132. Hayashi, M. The micronucleus test – most widely used in vivo genotoxicity test. Review. / Makoto Hayashi // *Genes and Environment.* – 2016. – Vol. 38, № 18 – 6 p.
133. Hummelen, V. The micronucleus test in *Xenopus*: a new and simple «in vivo» technique for detection of mutagens in fresh water / Van Hummelen, C. Zoll, J. Paulussen, M. Kirsch-Volders, A. Jaylet. // *Mutagenesis.* – 1989. – Vol. 4, № 1. – P. 12 – 16.
134. Ivanov, A. Y. The first record of natural transfer of mitochondrial DNA from *Pelophylax cf. bedriagae* into *P. lessonae* (Amphibia, anura) / A. Y. Ivanov, A. B. Ruchin, A. I. Fayzulin, I. V. Chikhlyayev, S. N. Litvinchuk, A. A. Kirillov, A. O. Svinin, O. A. Ermakov // *Nature Conservation Research.* – 2019. – Vol. 4, № 2. – P. 125 – 128.
135. Jepson, L. *Medicina de Animal Exóticos* / L. Jepson Philadelphia: Elsevier, 2011. – 592 p.
136. Jolly, J. Sur l'evolution des globules rouges dans le sang des embryons de mammiferes. / J. Jolly, C. R. Seans // *Soc. Biol. (Paris).* – 1905. – Vol. 58 – P. 593 – 595.
137. Kaczor-Kami, M. Multidirectional Changes in Parameters Related to Sulfur Metabolism in Frog Tissues Exposed to Heavy Metal-Related Stress / M. Kaczor-Kami, P. Sura, M. Wrobel // *Biomolecules.* – 2020. – Vol. 10, № 4. – P. 574.
138. King, R. W. When $2+2=5$: The origins and fates of aneuploid and tetraploid cells. / R.W. King // *Biochimica et biophysica acta.* – 2008. – Vol. 1786, № 1. – P. 4 – 14.

139. Kirsch-Volders, M. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction / M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari et al. // *Mutation Research*. – 1997. – Vol. 392, № 1-2. – P. 19 – 302.
140. Koh-ichi, U. Generation of Micronuclei during Interphase by Coupling between Cytoplasmic Membrane Blebbing and Nuclear Budding / U. Koh-ichi, O. Atsushi, S. Noriaki // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – P. 11
141. Lahiri, R. Air pollution in Calcutta elicits adverse pulmonary reaction in children / R. Lahiri, T. Lahiri, S. Roy, C. Basu, S. Ganguly, M.R. Ray, P. Lahiri // *Indian. J. Med. Res.* – 2000. – Vol. 112. – P. 21 – 26.
142. Lindberg, H. K. Characterization of chromosomes and chromosomal fragments in human lymphocyte micronuclei by telomeric and centromeric FISH / H. K. Lindberg, G. K. Falck, H. Järventaus et al. // *Mutagenesis*. – 2008. – Vol. 23, № 5. – P. 371 – 375.
143. Litvinchuk, S. N. A record of alien *Pelophylax* species and widespread mitochondrial DNA transfer in Kaliningradskaya Oblast' (the Baltic coast, Russia) / S. N. Litvinchuk, A. Yu. Ivanov, S. A. Lukonina, O. A. Ermakov // *Bioinvasions Records*. 2020. – Vol. 9, № 3. – P. 599 – 617.
144. Luzhna, L. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond / L. Luzhna, P. Kathiria, O. Kovalchuk // *Front. Genet.* – 2013. – Vol. 4, № 131. – P. 1 – 17.
145. Mansi, A. Micronuclei assay of exfoliated oral mucosal cells: review / A. Mansi, J.D. Sunitha, D. Geetanshu, S.R. Neelakshi // *Annals of Dental Specialty*. – 2014. – Vol. 2. – P. 47 – 50.
146. Matson, C. W. Patterns of genotoxicity and contaminant exposure: Evidence of genomic instability in the marsh frogs (*Rana ridibunda*) of Sumgayit, Azerbaijan / C. W. Matson, G. M. Palatnikov, T. J. McDonald, R. L. Autenrieth, K. C. Donnelly, T. A. Anderson, J. E. Canas, A. Islamzadeh, J. W. Bickham // *Environment Toxicology and Chemistry*. – 2005. – Vol. 24, № 8. – P. 2055 – 2064.

147. Meyer, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes // *Molecular Biology Frontiers, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* / eds. P. W. Hochachka, T. P. Mommsen. New York; Amsterdam: Elsevier Press, 1993. Vol. 2. – P. 1 – 38.
148. Morgan, D. O. The cell cycle: principles of control / D. O. Morgan // *New science press*. – 2007. – 297 p.
149. Migliore, L. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by adriamicin and vincristine a comparison between micronucleus and chromosomal aberration assays / L. Migliore, R. Barale, D. Bulluomini // *Toxicol. In vitro*. – 1997. – Vol. 1, № 2. – P. 247 – 254.
150. Norppa, H. What do human micronuclei contain? / H. Norppa, G. Falck // *Mutagenesis*. – 2003. – Vol. 18, № 3. – P. 221-233.
151. Oberlay, L. W. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression / L. W. Oberlay // *Biomed. Pharmacother.* – 2005. – Vol. 59, № 4. – P. – 143– 148.
152. Okamoto, A. DNA replication occurs in all lamina positive micronuclei, but never in lamina negative micronuclei / A. Okamoto, K. Utani, N. Shimizu // *Mutagenesis*. – 2012. – Vol. 27, № 3. – P. 323 – 327.
153. Paul, P. W. A search for radiosensitive mouse mutants by use of the micronucleus technique / P. W. Paul // *Mutat. Res.* – 1987. – Vol. 91. – P. 163 – 169.
154. Reimann, H. Long-term fate of etoposide-induced micronuclei and micronucleated cells in HeLa-H2B-GFP cells / H. Reimann, H. Stopper, H. Hintzsche // *Arch. Toxicol.* – 2020. – Vol. 94, № 10. – P. 3556 – 3561.
155. Plötner, J. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: A case in western Palearctic 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.
156. Rao, X. Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: direct evidence from long-term live cell imaging / X. Rao, Y. Zhang, Q. Yi,

H. Hou, B. Xu, L. Chu, Y. Huang, W. Zhang, M. Fenech, Q. Shi // *Mutat. Res.* – 2008. – Vol. 646. – P. 41 – 49.

157. Robert, J. Lymphoid tumors of *Xenopus laevis* with different capacities for growth in larvae and adults / J. Robert, C. Du Guet, L. Pasguer // *Devel. Immunol.* – 1994. – №3. – P.297 – 307.

158. Rowe, C. L. Elevated Maintenance Costs in an Anuran (*Rana catesbeiana*) Exposed to a Mixture of Trace Elements During the Embryonic and Early Larval Periods / C. L. Rowe, O. M. Kinney, R. D. Nagle, J. D. Congdon // *Physiological Zoology.* – 1998. – Vol. 71, № 3. – P. 27 – 35.

159. Rowe, C. L. Failed Recruitment of Southern Toads (*Bufo terrestris*) in a Trace Element-Contaminated Breeding habitat: Direct and Indirect Effects that may Lead to a Local Population Sink / C. L. Rowe, W. A. Hopkins, V. R. Coffman // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* – 2001. – Vol. 40, № 3. – P. 399 – 405.

160. Sagona, A. P. Association of CHMP4B and autophagy with micronuclei: implications for cataract formation / A. P. Sagona, I. P. Nezis, H. Stenmark // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 8. – P. 1 – 10.

161. Shall, S. Poly (ADP-ribose) polymerase-1: What have we learned from the deficient mouse model? / S. Shall, G. de Murcia // *Mutat. Res.* – 2000. – Vol. 460, № 1. – P. 1 – 15.

162. Shelford, V. E. *Animal communities in temperate America* / V. E. Shelford. – Chicago: Univ. Chicago Press. – 1913. – 368 p.

163. Shelford, V. E. The reaction of certain animals to gradients of evaporating power and air. A study in experimental ecology / V. E. Shelford // *Biol. Bull.* – 1913. – Vol. 25, № 2. – P. 79 – 120.

164. Shiheido, H. An anilinoquinazoline Derivative Inhibits Tumor Growth through Interaction with hCAP-G2, a Subunit of CondensinII / H. Shiheido, Y. Naito, H. Kimura, H. Genma, H. Takashima, M. Tokunaga, T. Ono, T. Hirano, W. Du, T. Yamada, N. Doi, S. Iijima, Y. Hattori, H. Yanagawa // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 9. – e44889.

165. Shimizu, N. Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements / N. Shimizu // *Mutagenesis*. – 2011. – Vol. 26 – P. 119 – 123.
166. Shimizu, N. Nuclear waste disposal. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. / N. Shimizu, N. Itoh, H. Utiyama et al. // *Journal of Cell Biology*. – 1998. – Vol. 140. – P. 1307 – 1320.
167. Sommer, S. Micronucleus assay: the state of art, and future directions / S. Sommer, I. Buraczewska, M. Kruszewski // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 1, № 4. – P. 1534 – 1552.
168. Sparling, D. Effects of Lead-Contaminated Sediment on *Rana sphenocephala* Tadpoles / D.W. Sparling, S. Krest, M. Ortiz-Santaliestra // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2006. – Vol. 51, № 3. – P. 458 – 466.
169. Surralles, J. A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes / J. Surralles, E. Carbonelly, R. Marcos, F. Degrassi, A. Antoccia, C. Tanzarella // *Mutagenesis*. – 1992. – Vol. 7. – P. 407 – 507.
170. Svinin, A. O. Genetic structure, morphological variation, and gametogenic peculiarities in water frogs (*Pelophylax*) from northeastern European Russia / A. O. Svinin, D. V. Dedukh, L. J. Borkin, O. A. Ermakov, A. Yu. Ivanov, J. S. Litvinchuk, R. I. Zamaletdinov, R. I. Mikhaylova, A. B. Trubyanov, D. V. Skorinov, Yu. M. Rosanov, S. N. Litvinchuk // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. – 2021. – Vol. 59, № 3. – P. 646 – 662.
171. Terradas, M. DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response / M. Terradas, M. Martin, L. Tusell, A. Genesca // *DNA Repair*. – 2009. – Vol. 8, № 10. – P. 1225 – 1234.
172. Terradas, M. Impaired nuclear functions in micronuclei results in genome instability and chromothripsis. / M. Terradas, M. Martin, A. Genesca // *Arch. Toxicol.* – 2016. – Vol. 90, № 11. – P. 2657 – 2667.

173. Terradas, M. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? / M. Terradas, M. Martin, L. Tusell, A. Genesca // *Mutat. Res.* – 2010. – Vol. 705. – P. 60 – 67.

174. Terzoudi, G. I. Stress induced by premature chromatin condensation triggers chromosome shattering and chromothripsis at DNA sites still replicating in micronuclei or multinucleate cells when primary nuclei enter mitosis / G. I. Terzoudi, M. Karakosta, A. Pantelias, V. I. Hatzi, I. Karachristou, G. Pantelias // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* – 2015. – Vol. 793. – P. 185 – 198.

175. Utani, K. Micronuclei bearing acentric extrachromosomal chromatin are transcriptionally competent and may perturb the cancer cell phenotype / K. Utani, J.K. Kawamoto, N. Shimizu // *Mol. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 5, № 7. – P. 695-704.

176. Utani, K. Generation of micronuclei during interphase by coupling between cytoplasmic membrane blebbing and nuclear budding / K. Utani, A. Okamoto, N. Shimizu // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 11. – P. 1 – 12.

177. Voitovich, A. M. The level of aberrant cells in various tissues of bank vole depending on doses and radionuclide balance in organism / A. M. Voitovich, V. Y. Afonin, E. V. Krupnova, V. D. Trusova, E. S. Dromashko // *Tsitol. Genet.* 2003. – Vol. 37, № 4. – P. 10 – 15.

178. Widel, M. Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma; the updated analysis. / M. Widel, Z. Kolosza, S. Jedrus, B. Lukaszczyk, K. Raczek-Zwierzycka, A. Swierniak // *Int J Radiat Biol.* – 2001. – Vol. 77, № 5. – P. 631 – 636.

179. Widel, M. The increment of micronucleus frequency in cervical carcinoma during irradiation in vivo and its prognostic value for tumour radiocurability / M. Widel, S. Jedrus, S. Owczarek, M. Konopacka, B. Lubecka, Z. Kolosza // *Br. J. Cancer.* – 1999. – Vol. 80, № 10. – P. 1599 – 607.

180. Wong, T. Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure / T. Wong, C. Stearns // *BMC Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6, № 1. – P. 6.

181. Woznicki, P. The level of DNA damage and the frequency of micronuclei in haemolymph of freshwater mussels *Anodonta woodiana* exposed to benzo(a)pyrene / P. Woznicki, R. Lewandowska, P. Brzuzan // *Acta toxicol.* – 2004. – Vol. 12, № 1. – P. 41– 45.

182. Wright, K. M. Anfibios / K.M. Wright, X. Valls Badia // *Atlas de Medicina, Terapéutica y Patología de Animals Exóticos* / eds. R. Aguilar, S. M. Hernandez-Divers, S. J. Hernandez-Divers. Buenos Aires: Intermedica, 2005. – 480 p.

183. Zhang, C. Z. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei / C. Z. Zhang, A. Spektor, H. Cornils, J. M. Francis, E. K. Jackson, S. Liu, M. Meyerson, D. Pellman // *Nature.* – 2015. – Vol. 522. – P. 179 – 184.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

**Характеристика качества воды озера Нижнее Рустайское
(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
3	Медь	0,001	1	-	0,001	-
4	Свинец	<0,002	0,03	-	0,006	-
5	Никель	<0,006	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1	-	0,01	-
7	Хром	0,008	0,05	-	0,02	-
8	Нитраты	20	45	-	40	-
9	Нитриты	0,03	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	110	350	-	300	-
11	Сульфаты	21	500	-	100	-
12	Нефтепродукты	0,03	0,3	-	0,05	-
13	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

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	Превыше-ние	ПДК	Превышение
			(мг/л)	(раз)	(мг/л)	(раз)
1	Железо	0,1	0,3	-	0,1	-
2	Марганец	0,2	0,1	2	0,01	20
3	Медь	0,018	1	-	0,001	18
4	Свинец	0,003	0,03	-	0,006	-
5	Никель	<0,002	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1	-	0,01	-
7	Хром	0,07	0,05	1,4	0,02	3,5
8	Нитраты	24	45	-	40	-
9	Нитриты	0,012	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	205	350	-	300	-
11	Сульфаты	37	500	-	100	-
12	Нефтепродукты	2,5	0,3	8,3	0,05	50
13	Водородный показатель (ед. рН)	8	-	-	-	-

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	-	0,001	182
4	Свинец	<0,002	0,03	-	0,006	-
5	Никель	<0,006	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1	-	0,01	-
7	Хром	0,079	0,05	1,58	0,02	3,95
8	Нитраты	26	45	-	40	-
9	Нитриты	0,017	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	255	350	-	300	-
11	Сульфаты	101	500	-	100	-
12	Нефтепродукты	2	0,3	6,6	0,05	40
13	Водородный показатель (ед. рН)	7	-	-	-	-

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

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

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

№	Показатели загрязнения	Концентра- ция (мг/л)	Величина ПДК			
			Водоемы хозяйственно- питьевого и культурно- бытового пользования		Водоемы рыбохозяйственных целей	
			ПДК	Превышен ие	ПДК	Превыше ние
			(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
3	Медь	6,4	1	6,4	0,001	6400
4	Хром	0,071	0,05	1,42	0,02	3,55
5	Нитраты	79	45	1,75	40	1,98
6	Нитриты	0,0295	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	445	350	1,27	300	1,48
8	Сульфаты	71	500	-	100	-
9	Сульфиды	11	Отсутс твие	11	Отсутств ие	11
10	Нефтепродукты	0,21	0,3	-	0,05	4,2
	Водородный показатель (ед. рН)	7	-	-	-	-

**Характеристика качества воды уч. реки Кудьма у п. Ветчак
(Нижегородская обл., Кстовский р-н, 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	0.26	0,3	-	0,1	2.6
2	Марганец	1.45	0,1	14.5	0,01	145
3	Медь	7.04	1	7.04	0,001	7040
4	Хром	0.022	0,05	-	0,02	1.1
5	Нитраты	0.6	45	-	40	-
6	Нитриты	0.0045	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	107	500	-	100	-
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	-	0.01	6
12	Свинец	0.015	0,01	1.5	0.006	2.5
	Водородный показатель (ед. рН)	7	-	-	-	-

**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	0,01	70
3	Медь	2,44	1	2.44	0,001	2440
4	Хром	0,0355	0,05	-	0,02	1.575
5	Нитраты	2,05	45	-	40	-
6	Нитриты	0,0315	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	61,25	500	-	100	-
8	Сульфиды	0,01	0.05	-	0.005	2
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	-	0.01	4.5
12	Свинец	0,009	0,01	-	0.006	1.5
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

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
2	Марганец	0,001	0,1	-	0,01	-
3	Медь	0,09	1	-	0,001	90
4	Свинец	<0,002	0,03	-	0,006	-
5	Никель	<0,002	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1	-	0,01	-
7	Хром	0,089	0,05	1,78	0,02	4,45
8	Нитраты	26	45	-	40	-
9	Нитриты	0,006	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	155	350	-	300	-
11	Сульфаты	27	500	-	100	-
12	Нефтепродукты	1,13	0,3	3,7	0,05	22,6
13	Водородный показатель (ед. рН)	7	-	-	-	-

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	0,1	6
2	Марганец	0,3	0,1	3	0,01	30
3	Медь	0,02	1	-	0,001	20
4	Хром	0,027	0,05	-	0,02	1,35
5	Нитраты	50	45	1,1	40	1,25
6	Нитриты	0,005	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	300	350	-	300	-
8	Сульфаты	39	500	-	100	-
9	Сульфиды	15	Отсутствие	15	Отсутствие	15
10	Нефтепродукты	0,128	0,3	-	0,05	2,56
	Водородный показатель (ед. рН)	7	-	-	-	-

Характеристика качества воды озера Силикатное (г. Нижний Новгород, Сормовский район, 2018 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	0.14	0,3	-	0,1	1.4
2	Марганец	0.45	0,1	4.5	0,01	45
3	Медь	0.055	1	-	0,001	55
4	Хром	0.019	0,05	-	0,02	-
5	Нитраты	5.325	45	-	40	-
6	Нитриты	0.0057	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	39.75	500	-	100	-
8	Сульфиды	0.015	0.05	-	0.005	3
9	Никель	0.034	0,02	1.71	0.01	3.4
10	Кобальт	0.04	0,1	-	0.01	4
11	Цинк	0.038	1	-	0.01	3.8
12	Свинец	0.012	0,01	1.2	0.006	2
	Водородный показатель (ед. рН)	7	-	-	-	-

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	0,01	30
3	Медь	0,0255	1	-	0,001	25.5
4	Хром	0,0495	0,05	-	0,02	2.475
5	Нитраты	1,95	45	-	40	-
6	Нитриты	0,0045	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	82	500	-	100	-
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	-	0.01	7.9
12	Свинец	0,007	0,01	-	0.006	1.16
	Водородный показатель (ед. рН)	7,5	-	-	-	-

Характеристика качества воды озера Силикатное (г. Нижний Новгород, Сормовский район, 2020 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	0,025	0,3	-	0,1	-
2	Марганец	0,3	0,1	3	0,01	30
3	Медь	0,0155	1	-	0,001	15,5
4	Хром	0,0405	0,05	-	0,02	2,025
5	Нитраты	0,022	45	-	40	-
6	Нитриты	1,95	3,3	-	0,08	24,375
7	Сульфаты	36	500	-	100	-
8	Сульфиды	0,001	0.05	-	0.005	-
9	Цинк	0,39	1	-	0.01	39
10	Свинец	0,009	0,01	-	0.006	1,5
11	Никель	0,003	0,02	-	0.01	-
12	Кобальт	0,00155	0,1	-	0.01	-
	Водородный показатель (ед. рН)	5	-		-	

Характеристика качества воды озера Силикатное (г. Нижний Новгород, Сормовский район, 2021 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	0,01	0,3	-	0,1	-
2	Марганец	0,5	0,1	5	0,01	50
3	Медь	0,03	1	-	0,001	30
4	Хром	0,05	0,05	-	0,02	2,5
5	Нитраты	0,7	45	-	40	-
6	Нитриты	0,02	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	42	500	-	100	-
8	Сульфиды	3	0.05	60	0.005	600
9	Цинк	0,11	1	0,11	0.01	11
10	Свинец	0,004	0,01	-	0.006	-
11	Никель	0	0,02	-	0.01	-
12	Кобальт	0,003	0,1	-	0.01	-
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-		-	

Характеристика качества воды озера Силикатное (г. Нижний Новгород, Сормовский район, 2022 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	0,05	0,3	-	0,1	-
2	Марганец	0,2	0,1	2	0,01	20
3	Медь	0,04	1	-	0,001	40
4	Хром	0,041	0,05	-	0,02	2,05
5	Нитраты	0,5	45	-	40	-
6	Нитриты	0,005	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	40	500	-	100	-
8	Сульфиды	4	0.05	80	0.005	800
9	Цинк	0,08	1	-	0.01	8
10	Никель	0,002	0,02	-	0.01	-
11	Кобальт	0,007	0,1	-	0.01	-
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-		-	

**Характеристика качества воды торфокарьера Ситниковского заказника
(Нижегородская обл., Борский р-н, 2016 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	1,83	0,3	6,1	0,1	18,3
2	Марганец	0,01	0,1	-	0,01	-
3	Медь	0,001	1	-	0,001	-
4	Свинец	0,004	0,03	-	0,006	-
5	Никель	0,007	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1	-	0,01	-
7	Хром	0,189	0,05	-	0,02	-
8	Нитраты	22	45	-	40	-
9	Нитриты	0,046	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	100	350	-	300	-
11	Сульфаты	16	500	-	100	-
12	Нефтепродукты	0,3	0,3	-	0,05	6
13	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

**Характеристика качества воды торфокарьера Ситниковского заказника
(Нижегородская обл., Борский 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	1,4	0,3	4,7	0,1	14
2	Марганец	3,75	0,1	37,5	0,01	375
3	Медь	0,00095	1	-	0,001	-
4	Хром	0,004	0,05	-	0,02	-
5	Нитраты	21,5	45	-	40	-
6	Нитриты	0,075	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	155	350	-	300	-
8	Сульфаты	44	500	-	100	
9	Сульфиды	22,5	Отсутствие	22,5	Отсутствие	22,5
10	Нефтепродукты	0,131	0,3	-	0,05	2,62
	Водородный показатель (ед. рН)	5,5	-	-	-	-

**Характеристика качества воды торфокарьера Ситниковского заказника
(Нижегородская обл., Борский р-н, 2018 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	0.155	0,3	-	0,1	1.55
2	Марганец	0.29	0,1	2.9	0,01	29
3	Медь	0.17	1	-	0,001	170
4	Хром	0.056	0,05	1.12	0,02	2.8
5	Нитраты	0.61	45	-	40	-
6	Нитриты	0.01	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	25.5	500	-	100	-
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	-	0.01	27
12	Свинец	0.001	0,01	-	0.006	
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

**Характеристика качества воды торфокарьера Ситниковского заказника
(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	1,615	0,3	5.383	0,1	16.15
2	Марганец	3,05	0,1	30.5	0,01	305
3	Медь	0,505	1	-	0,001	505
4	Хром	0,2175	0,05	4.35	0,02	10.875
5	Нитраты	3,5	45	-	40	-
6	Нитриты	0,051	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	25	500	-	100	-
8	Сульфиды	0,03	0.05	-	0.005	6
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	3.04	0.01	304
12	Свинец	0,008	0,01	-	0.006	1.33
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

**Характеристика качества воды торфокарьера Ситниковского заказника
(Нижегородская обл., Борский р-н, 2021 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	1,37	0,3	4,56	0,1	13,7
2	Марганец	2,2	0,1	22	0,01	220
3	Медь	0,44	1	-	0,001	440
4	Хром	0,164	0,05	3,28	0,02	8,2
5	Нитраты	12,4	45	-	40	-
6	Нитриты	0,031	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	931	500	1,862	100	9,31
8	Сульфиды	11	0.05	220	0.005	2200
9	Цинк	0,02	1	-	0.01	2
10	Свинец	0,004	0,01	-	0.006	-
11	Никель	0,018	0,02	-	0.01	1,8
12	Кобальт	0,087	0,1	-	0.01	-
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

**Характеристика качества воды оз. Сортировочное (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	0,885	0,3	2.95	0,1	8.85
2	Марганец	0,7	0,1	7	0,01	70
3	Медь	0,185	1	0.185	0,001	185
4	Хром	0,118	0,05	2.36	0,02	5.9
5	Нитраты	1	45	-	40	-
6	Нитриты	0,011	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	32,5	500	-	100	-
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	-	0.01	-
12	Свинец	0,0845	0,01	8.45	0.006	14.083
	Водородный показатель (ед. рН)	5	-	-	-	-

Характеристика качества воды болота у п. Белкино_1 (Нижегородская обл., Борский 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	0,635	0,3	2,12	0,1	6,35
2	Марганец	2,4	0,1	24	0,01	240
3	Медь	0,175	1	-	0,001	175
4	Хром	0,0895	0,05	1,79	0,02	4,48
5	Нитраты	11,85	45	-	40	-
6	Нитриты	0,0105	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	202,5	350	-	300	-
8	Сульфаты	5	500	-	100	-
9	Сульфиды	10,1	Отсутствие	10,1	Отсутствие	10,1
10	Нефтепродукты	0,15	0,3	-	0,05	3
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

Характеристика качества воды болота у п. Белкино_1 (Нижегородская обл., Борский р-н, 2018 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	2.12	0,3	7.1	0,1	21
2	Марганец	1.85	0,1	18.5	0,01	185
3	Медь	0.37	1	-	0,001	370
4	Хром	0.086	0,05	1.72	0,02	4.3
5	Нитраты	3.9	45	-	40	-
6	Нитриты	0.026	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	8.5	500	-	100	-
8	Сульфиды	0.02	0.05	-	0.005	4
9	Никель	0.07	0,02	3.5	0.01	7
10	Кобальт	0.079	0,1	0.79	0.01	7.9
11	Цинк	0.02	1	-	0.01	2
12	Свинец	NA	0.01	-	0.006	-
	Водородный показатель (ед. рН)	7	-	-	-	-

Характеристика качества воды болота у п. Белкино_1 (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	0,01	140
3	Медь	0,325	1	-	0,001	325
4	Хром	0,1215	0,05	2.43	0,02	6.075
5	Нитраты	1,7	45	-	40	-
6	Нитриты	0,018	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	0,008	500	-	100	-
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	-	0.01	60
12	Свинец	0,005	0.01	-	0.006	-
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

Характеристика качества воды болота у п. Белкино_1 (Нижегородская обл., Борский р-н, 2021 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	1,75	0,3	5,83	0,1	17,3
2	Марганец	3,3	0,1	33	0,01	330
3	Медь	0,77	1	-	0,001	770
4	Хром	0,241	0,05	4,82	0,02	12,05
5	Нитраты	10,7	45	-	40	-
6	Нитриты	0,05	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	44	500	-	100	-
8	Сульфиды	25	0.05	500	0.005	5000
9	Цинк	0,17	1	0,17	0.01	17
10	Свинец	0,003	0,01	-	0.006	-
11	Никель	0,041	0,02	2,05	0.01	4,1
12	Кобальт	0,09	0,1	-	0.01	9
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

Характеристика качества воды болота у п. Белкино_2 (Нижегородская обл., Борский р-н, 2022 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	1,53	0,3	5.1	0,1	15.3
2	Марганец	1,2	0,1	12	0,01	120
3	Медь	0,31	1	-	0,001	310
4	Хром	0,104	0,05	2,08	0,02	5,2
5	Нитраты	1,3	45	-	40	-
6	Нитриты	0,014	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	0,002	500	-	100	-
8	Сульфиды	0,113	0.05	2,26	0.005	22,6
9	Цинк	0,5	1	-	0.01	50
10	Никель	0,0623	0,02	3,115	0.01	6,23
11	Кобальт	0,064	0,1	-	0.01	6.4
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

**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
2	Марганец	0,1	0,1	-	0,01	10
3	Медь	0,002	1	-	0,001	2
4	Свинец	<0,002	0,03	-	0,006	-
5	Никель	0,008	0,1	-	0,01	-
6	Цинк	<0,002	1	-	0,01	-
7	Хром	0,05	0,05	-	0,02	2,5
8	Нитраты	12	45	-	40	-
9	Нитриты	0,006	3,3	-	0,08	-
10	Хлориды	130	350	-	300	-
11	Сульфаты	22	500	-	100	-
12	Нефтепродукты	0,95	0,3	3,16	0,05	19
13	Водородный показатель (ед. рН)	7	-	-	-	-

**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	0,01	40
3	Медь	0,13	1	0,13	0,001	130
4	Хром	0,05	0,05	-	0,02	2,5
5	Нитраты	0,425	45	-	40	-
6	Нитриты	0,0105	3,3	-	0,08	-
7	Хлориды	312,5	350	-	300	-
8	Сульфаты	48,5	500	-	100	-
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	-	-	-	-

**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
3	Медь	0.095	1	-	0,001	95
4	Хром	0.06	0,05	1.2	0,02	3
5	Нитраты	0.75	45	-	40	-
6	Нитриты	0.005	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	80	500	-	100	-
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	-	0.01	5
12	Свинец	0.0365	0,01	3.65	0.006	6.08
	Водородный показатель (ед. рН)	7	-	-	-	-

**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	1.14	0,001	1140
4	Хром	0,0525	0,05	1.05	0,02	2.625
5	Нитраты	1,4	45	-	40	-
6	Нитриты	0,0935	3,3	-	0,08	1.16875
7	Сульфаты	92,5	500	-	100	-
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	-	0.01	14
12	Свинец	0,006	0,01	-	0.006	-
	Водородный показатель (ед. рН)	9	-	-	-	-

**Характеристика качества воды озера Вторчермет (г. Н. Новгород,
Канавинский р-н, 2020 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	0,6	0,1	6	0,01	60
3	Медь	0,09	1	-	0,001	90
4	Хром	0,067	0,05	1,34	0,02	3,35
5	Нитраты	0,007	45	-	40	-
6	Нитриты	0,825	3,3	-	0,08	10,3125
7	Сульфаты	48	500	-	100	-
8	Сульфиды	0,001	0.05	-	0.005	-
9	Цинк	0,37	1	-	0.01	37
10	Свинец	0,005	0,01	-	0.006	-
11	Никель	0,001	0,02	-	0.01	-
12	Кобальт	0,007	0,1	-	0.01	-
	Водородный показатель (ед. рН)	8	-	-	-	-

**Характеристика качества воды озера Вторчермет (г. Н. Новгород,
Канавинский р-н, 2021 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	0,09	0,3	-	0,1	-
2	Марганец	0,3	0,1	3	0,01	30
3	Медь	0,06	1	-	0,001	60
4	Хром	0,098	0,05	1,96	0,02	4,9
5	Нитраты	0,6	45	-	40	-
6	Нитриты	0,005	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	84	500	-	100	-
8	Сульфиды	0	0.05	-	0.005	-
9	Цинк	0,04	1	-	0.01	4
10	Свинец	0,005	0,01	-	0.006	-
11	Никель	0,002	0,02	-	0.01	-
12	Кобальт	0,016	0,1	-	0.01	1,6
	Водородный показатель (ед. рН)	6	-	-	-	-

Характеристика качества воды бол. Груздевское (Нижегородская область, Павловский р-н, 2022 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	0,79	0,3	2,63	0,1	7,9
2	Марганец	1,3	0,1	13	0,01	130
3	Медь	0,41	1	-	0,001	410
4	Хром	0,145	0,05	2,9	0,02	7,3
5	Нитраты	3,5	45	-	40	-
6	Нитриты	0,026	3,3	-	0,08	-
7	Сульфаты	739	500	1,48	100	7,39
8	Сульфиды	0,37	0.05	20	0.005	74
9	Цинк	0,01	1	-	0.01	-
10	Никель	0,027	0,02	1,35	0.01	2,7
11	Кобальт	0,063	0,1	-	0.01	6,3
	Водородный показатель (ед. рН)	6,5	-	-	-	-