

УДК 597.851: 619:616.995.1:636:612.017.11/12

ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОПУЛЯЦИЙ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК УРБАНИЗИРОВАННОЙ ТЕРРИТОРИИ

© 2014 Е.Б. Романова, В.Ю. Николаев

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород

Поступила 10.09.2014

Проанализированы изменения ряда иммунофизиологических параметров зеленых лягушек двух видов [озерная лягушка *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) и прудовая лягушка *P. lessonae* (Camerano, 1882)] в водоемах Нижегородской области разного генетического типа и водного баланса. Выявлены статистически значимые различия на видовом и популяционном уровнях. Особенности иммунного статуса изучаемых видов определяются их функциональным состоянием и спецификой среды обитания.

Ключевые слова: лейкоцитарная формула, иммуногематологические параметры, бесхвостые амфибии.

Исследование функций основных гомеостатических систем организма особенно значимо в условиях антропогенной трансформации среды. Удобными объектами для изучения этих систем являются зеленые лягушки – широко распространенные представители батрахофауны Поволжья. Комплекс зеленых лягушек представлен в Нижегородской области тремя видами [3, 9, 18]: лягушки озерная *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), прудовая *P. lessonae* (Camerano, 1882) и съедобная *P. kl. esculentus* (Linneus, 1758). Последний вид произошел вследствие гибридизации между озерной и прудовой лягушками. Между тремя видами существуют более или менее четкие различия во внешней морфологии и биотопической приуроченности [1, 2]. Бесхвостые амфибии характеризуются высокой экологической толерантностью и успешно используются как зооиндикаторы качества среды [5, 12-14]. Их уникальное положение на филогенетической лестнице, наличие всей совокупности предшественников лимфоидных и миелоидных органов млекопитающих [19] предопределяют интерес к изучению адаптивного потенциала и популяционного ответа видов в условиях разнообразия биотопов урбанизированной территории.

Целью работы являлась сравнительная оценка иммунофизиологического состояния популяций озерной и прудовой лягушек в Нижегородской области.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Места обитания амфибий в пределах крупного промышленного города (г. Нижний Новгород) согласно типизации городских ландшафтов [4] классифицируются как районы многоэтажной застройки с осваиваемыми территориями, пустырями, участками с открытыми почвами, малыми

водоемами с высоким уровнем загрязненности (II зона).

1-ый водоем – оз. Вторчермет (г. Н. Новгород, Канавинский район). Координаты: широта 56°18'44.48"N (56.312356), долгота 43°50'56.14"E (43.848929). Создано искусственно на месте перувлажненного понижения, представляет собой небольшой бессточный пруд. Озеро расположено в окружении городской застройки с плотным зеленым насаждением непосредственно у берегов. Качество воды озера по комплексу контролируемых показателей соответствовало III классу умеренно-загрязненных вод в поверхностном и IV классу загрязненных вод в придонном горизонте [6].

2-ой водоем – оз. Сормовской ТЭЦ (г. Н. Новгород, Сормовский район). Координаты: широта 56°21'9.88"N (56.352745), долгота 43°53'49.93"E (43.897204). Искусственного происхождения, расположено в пойме р. Волги. Площадь около 100 м². Находится под воздействием Сормовской ТЭЦ – осуществляется сброс теплой воды.

3-ий водоем – оз. Земснаряд (г. Н. Новгород, Автозаводский район). Координаты: широта 56°14'13.99"N (56.237219), долгота 43°50'53.46"E (43.848182). Озеро естественного происхождения, но его конфигурация изменена в результате выемки песка. Водоохранная зона расположена на второй надпойменной террасе р. Оки. Заполнение озера водой происходит за счет осадков, водообмена с грунтовым бассейном, притоком через ручей, впадающим в озеро в его северо-восточной части. Качество воды озера по комплексу контролируемых показателей соответствовало III классу умеренно загрязненных вод – как в поверхностном, так и в придонном горизонте [6].

4-ый водоем – оз. Парковое (г. Н. Новгород, Автозаводский район). Координаты: широта 56°20'30.48"N (56.3418), долгота 43°51'22.22"E (43.856171). Озеро искусственного происхождения, используется для рекреации. Водоохранная зона расположена на второй надпойменной террасе р. Оки. Озеро является бессточным, притоки в него также отсутствуют. Качество воды озера по

Романова Елена Борисовна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры экологии, romanova@bio.unn.ru; Николаев Вадим Юрьевич, аспирант, darhtiger@yandex.ru

комплексу контролируемых показателей соответствовало III классу умеренно загрязненных вод [6].

Еще два водоема, в которых отлавливались лягушки, находятся за пределами Нижнего Новгорода, в лесной зоне.

5-ый водоем – пруд д. Кудряшино (Нижегородская обл., Уренский район). Координаты: широта 57°22'47.8"N (57.379944), долгота 46°7'48.82"E (46.130229). Происхождение искусственное. В пруд впадают два ручья; из пруда вытекает речка Березовка, впадающая в р. Усту. Глубина водоема не больше 2 м, дно илистое. Питание пруда: снеговое, дождевое и от впадающих ручьев.

6-ой водоем – пруд с. Пергалеи (Нижегородская обл., Бутурлинский район). Координаты: широта 55°31'14.3"N (55.52064), долгота

44°45'43.9"E (44.762194). Происхождение искусственное. Максимальная глубина возле плотины – около 3 м. В настоящее время используется для водопоя крупного рогатого скота. Заполнение озера водой происходит за счет двух родников и осадков.

По генетическому типу выделили водоемы природного происхождения (оз. Земснаряд) и искусственного (остальные пять водоемов). По водному балансу исследованные водоемы можно разделить на проточные (оз. Земснаряд и пруд д. Кудряшино) и бессточные (оз. Сормовской ТЭЦ, оз. Вторчермет, оз. Парковое и пруд с. Пергалеи). В 2012-2013 гг. 77 прудовых лягушек отловлено в оз. Вторчермет, оз. Земснаряд и в пруду д. Кудряшино, 80 озерных лягушек – в пруду с. Пергалеи, оз. Сормовской ТЭЦ и оз. Парковом (таблица).

Таблица. Сведения о водоемах, в которых отловлены зеленые лягушки

№	Место отбора	Год исследования/число особей	Тип ландшафта	Генетический тип водоема	Характеристика водного баланса
Прудовая лягушка					
1	пруд д. Кудряшино (Нижегородская обл., Уренский р-н)	2013/20	лесная зона, 180 км от г. Н. Новгорода	искусственный	проточный
2	оз. Земснаряд (Н. Новгород, Автозаводский р-н)	2013/20	зона многоэтажной застройки	природный	проточный
3	оз. Вторчермет (Н. Новгород, Канавинский р-н)	2012/17	зона многоэтажной застройки	искусственный	бессточный
4		2013/20			
Озерная лягушка					
1	пруд с. Пергалеи (Нижегородская обл., Бутурлинский р-н)	2012/20	лесная зона, условный контроль, 100 км от г. Н. Новгорода	искусственный	бессточный
2	оз. Парковое (Н. Новгород, Автозаводский р-н)	2013/20	зона многоэтажной застройки	искусственный	бессточный
3	оз. Сормовской ТЭЦ (Н. Новгород, Сормовский р-н)	2012/20	зона многоэтажной застройки	искусственный	бессточный
4		2013/20			

Все работы с животными проводились в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» [11]. Массу тела амфибий определяли на технических весах с точностью до 0,02 г (ошибка измерения ±0,01). У обездвиженных животных выделяли тимус, селезенку и печень, брали кровь для приготовления мазков и получения сыворотки. Лимфоидные органы взвешивали на торсионных весах Waga Torsujna-WT с точностью до 0,1 мг (ошибка измерения ±0,03) и помещали в пробирки с охлажденной средой Хенкса (1 мл для тимуса, 2 мл для селезенки, 5 мл для печени). Индексы (отношение массы

органа к массе тела) тимуса, селезенки и печени вычисляли в промилле (‰) [8, 16]. На среде Хенкса готовили суспензию клеток лимфоидных органов, определяли количество ядросодержащих клеток в 1 мм³ и относительное содержание живых клеток в 20 мкл рабочего разведения суспензии [17].

Фагоцитарную активность лейкоцитов крови оценивали по способности поглощать клетки дрожжей [10]. Активность иммунной защиты на гуморальном уровне оценивали по содержанию иммунных комплексов в сыворотке крови лягушек, используя метод, основанный на селективной преципитации комплексов в растворе поли-

этиленгликоля [7], позволяющий выявить «крупные» (3,5%) и «мелкие» (7,0%) иммунные комплексы (ед. опт. плотности / 100 мл сыворотки).

Для проверки данных на соответствие нормальному распределению применяли критерии Колмогорова–Смирнова, Лиллиефорса, Шапиро–Уилка. Предварительный анализ показал, что первичные данные не соответствуют нормальному распределению, поэтому дальнейший статистический анализ проводили непараметрическими критериями Крускала–Уоллиса (H); Данна (Z); Спирмана (r) и дискриминантным анализом в пакете прикладных программ STATISTIKA 10.0. За величину статистической значимости принимали $p=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетический тип и качественная характеристика городских озер, расположенных в зоне многоэтажной застройки, отразились на показателях лейкоцитарного состава исследованных популяций. Анализ полученных иммуногематологических данных зеленых лягушек выявил статистически значимые различия на видовом и популяционном уровнях. Популяция прудовых лягушек природного оз. Земснаряд (надпойменное, проточное) по сравнению с популяцией искусственного оз. Вторчермет (надпойменное, бессточное) характеризовалась пониженным содержанием миелоцитов, юных, палочкоядерных нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов; более высоким уровнем фагоцитарной активности лейкоцитов и повышенным содержанием в крови иммунных комплексов. Кроме того, у популяции оз. Земснаряд по сравнению с популяцией оз. Вторчермет отмечено повышение жизнеспособности ядродержащих клеток лимфоидных органов: тимуса, селезенки и печени.

Сравнение лейкоцитарного состава периферической крови прудовых лягушек, обитающих в озерах городской территории, по сравнению с популяцией, обитающей за пределами городской черты (пруд д. Кудряшино), выявило увеличение доли нейтрофильных гранулоцитов, обусловленное возрастанием числа миелоцитов и сегментоядерных нейтрофилов. Также установлено снижение числа моноцитов, выполняющих фагоцитарную функцию, с $(4,35 \pm 0,47)\%$ до $(2,80 \pm 0,26)\%$ ($Z_{1-2} = 2,86$; $p=0,01$). Доля эозинофилов и базофилов крови у исследованных популяций прудовых лягушек не изменялась.

Морфофизиологический анализ лимфоидных органов выявил снижение количества ядродержащих клеток в тимусе у популяций амфибий оз. Земснаряд ($2,36 \pm 0,27$ тыс./мм³) и оз. Вторчермет ($2,81 \pm 0,18$ тыс./мм³) по сравнению с популяцией пруда д. Кудряшино – $(5,02 \pm 0,50)$ (рис. 1), что свидетельствовало об угнетении функций центрального органа иммунной системы. При этом

снижение клеточности тимуса сопровождалось снижением жизнеспособности тимоцитов. Изучение клеточности селезенки выявило повышенное количество кариоцитов у городских популяций прудовых лягушек. Так, количество кариоцитов в селезенке популяции оз. Вторчермет ($10,67 \pm 0,75$ тыс./мм³) превышало аналогичный показатель популяции пруда д. Кудряшино ($7,04 \pm 0,55$ тыс./мм³) в 1,5 раза. Отметим, что при этом выявлено снижение жизнеспособности кариоцитов до 67,63% у популяций бессточного оз. Вторчермет ($47,77 \pm 3,56$) по сравнению с популяцией проточного водоема, удаленного от городской среды ($70,63 \pm 4,66$).

Качество среды обитания популяций прудовых лягушек отражалось и в снижении численности ядродержащих клеток печени и их жизнеспособности. При этом количество гепатоцитов было статистически значимо меньше в городских популяциях прудовых лягушек оз. Земснаряд ($24,17 \pm 2,02$ тыс./мм³) и оз. Вторчермет ($20,36 \pm 1,60$ тыс./мм³) по сравнению с популяцией пруда лесной зоны ($27,75 \pm 1,25$ тыс./мм³). Жизнеспособность клеток печени популяции оз. Вторчермет ($39,15 \pm 3,47\%$) снижалась в 1,76 раза, по сравнению с условно контрольным водоемом ($69,17 \pm 4,04\%$). При оценке функционального состояния лейкоцитов крови зеленых лягушек были выявлены значимые отклонения уровня фагоцитарной активности между исследованными популяциями. Снижение фагоцитарной активности лейкоцитов отмечались у популяций озерных лягушек городских водоемов по сравнению с популяцией, находящейся за пределами городской черты (пруд с. Пергалей). По результатам двухлетних наблюдений функциональная активность фагоцитов озерных лягушек выборки из популяции оз. Сормовской ТЭЦ в 2013 г. ($23,90 \pm 1,56\%$) существенно снизилась по отношению с аналогичным показателем 2012 г. ($37,60 \pm 1,28\%$). Высокие показатели функциональной активности лейкоцитарных клеток ($41,45 \pm 1,73\%$) (рис. 2) и уровня иммунных комплексов в сыворотке крови выявлены у популяции прудовых лягушек, обитающей за пределами городской черты, в проточном водоеме. Наименьшим показателем фагоцитарной активности нейтрофилов характеризовалась популяция прудовых лягушек оз. Вторчермет ($27,20 \pm 1,50\%$) – искусственного, бессточного водоема, что свидетельствовало о напряженности иммунных реакций организма.

У озерных лягушек из искусственного водоема, находящегося под воздействием теплых вод, сбрасываемых Сормовской ТЭЦ (оз. Сормовской ТЭЦ) выявлено статистически значимое снижение доли нейтрофильных гранулоцитов ($U=58,5$; $p=0,00013$), за счет палочкоядерных и сегментоядерных форм, и увеличение доли базофильных гранулоцитов ($U=90,0$; $p=0,003$), по сравнению с

популяцией надпойменного, бессточного озера искусственного происхождения (оз. Парковое), что свидетельствовало об интоксикации организма. Среди агранулоцитов было выявлено увели-

чение числа лимфоцитов ($U=59,5$; $p=0,00015$) и снижение доли моноцитов ($U=54,5$; $p=0,00008$) по сравнению с популяцией лесной зоны (пруд с. Пергалей).

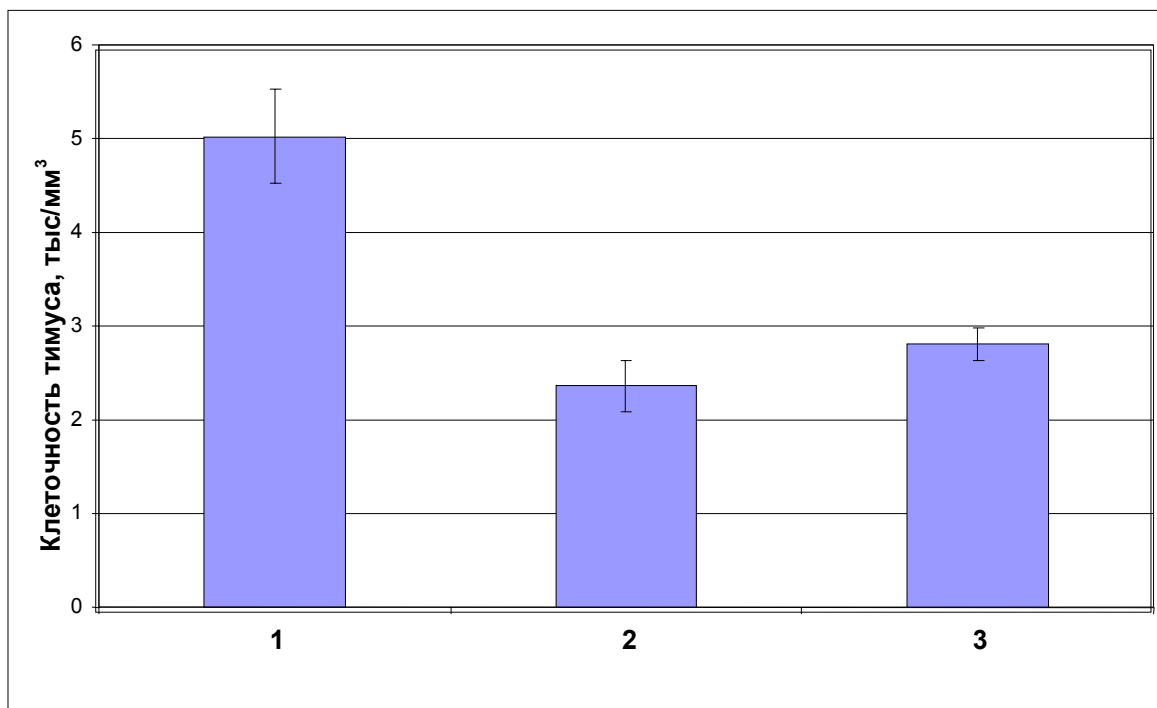


Рис. 1. Количество ядросодержащих клеток (тыс/мм³) в тимусе – центральном органе иммунитета прудовых лягушек: 1 – пруд д. Кудряшино, 2 – оз. Земснаряд 3 – оз. Вторчермет

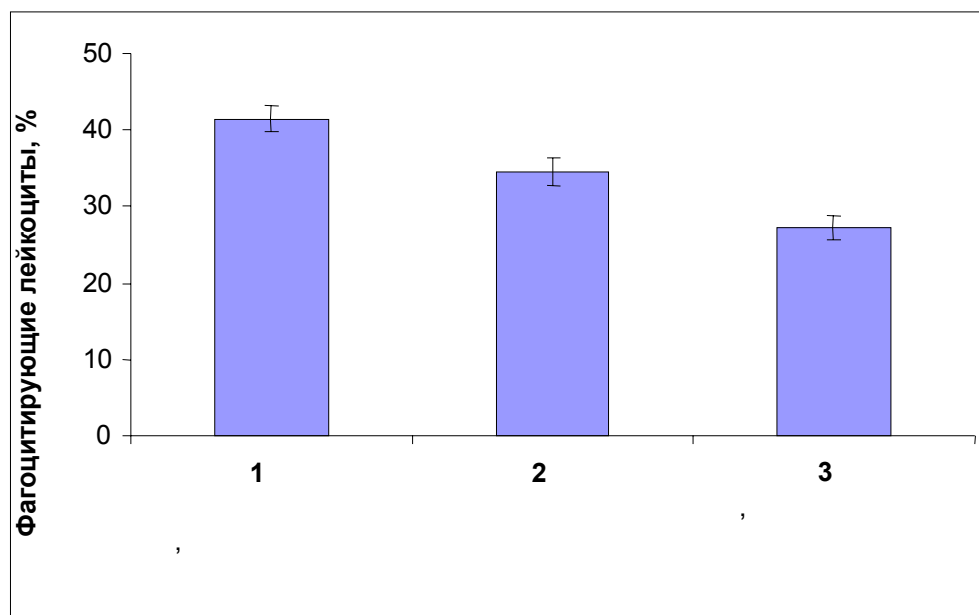


Рис. 2. Фагоцитарная активность лейкоцитов периферической крови прудовых лягушек: 1 – пруд д. Кудряшино, 2 – оз. Земснаряд 3 – оз. Вторчермет

Отметим более низкие значения миелоцитов ($3,10 \pm 0,30\%$; $U_{1-2}=3,31$; $p=0,0009$), характерные для популяции озерных лягушек (оз. Парковое) по сравнению с прудовыми (оз. Вторчермет). В

отношении остальных субпопуляций лейкоцитарных клеток на межвидовом уровне различий не выявлено. Морфофизиологические видовые особенности озерных лягушек (оз. Парковое) прояв-

лялись в снижении относительной массы лимфоидных органов: тимуса (в 1,7 раза) (рис. 3), печени (в 1,6 раза) и селезенки (в 1,5 раза).

Оценка иммунофизиологического статуса зеленых лягушек позволила получить набор показателей, требующих определенного обобщения. Одним из способов такого обобщения является дискриминантный анализ, позволяющий по совокупности всех показателей объекта классифицировать его, т.е. отнести к одной из нескольких групп (классов) оптимальным способом [15]. Важным показателем анализа является дискриминантная функция – линейная комбинация переменных, полученная в результате анализа, позволяющая объединять объекты в одну или несколько групп. При вычислении коэффициентов дискриминантных (канонических) функций были

получены данные, свидетельствующие о том, что функция 1 (Root 1) ответственна за 88,96% объясненной дисперсии, т.е. 88,96% всей дискриминирующей мощности определяется этой функцией, в то время как функция 2 (Root 2) определяет только 11,04% дискриминирующей мощности. Факторная структура показывает, что наибольшие корреляции с дискриминантной функцией 1 имеются у переменных, характеризующих наличие в крови иммунных комплексов, фагоцитарную активность, жизнеспособность клеток тимуса и печени. Наибольшие корреляции с дискриминантной функцией 2 – у переменных, характеризующих наличие в крови иммунных комплексов, точность тимуса и жизнеспособность клеток тимуса и печени.

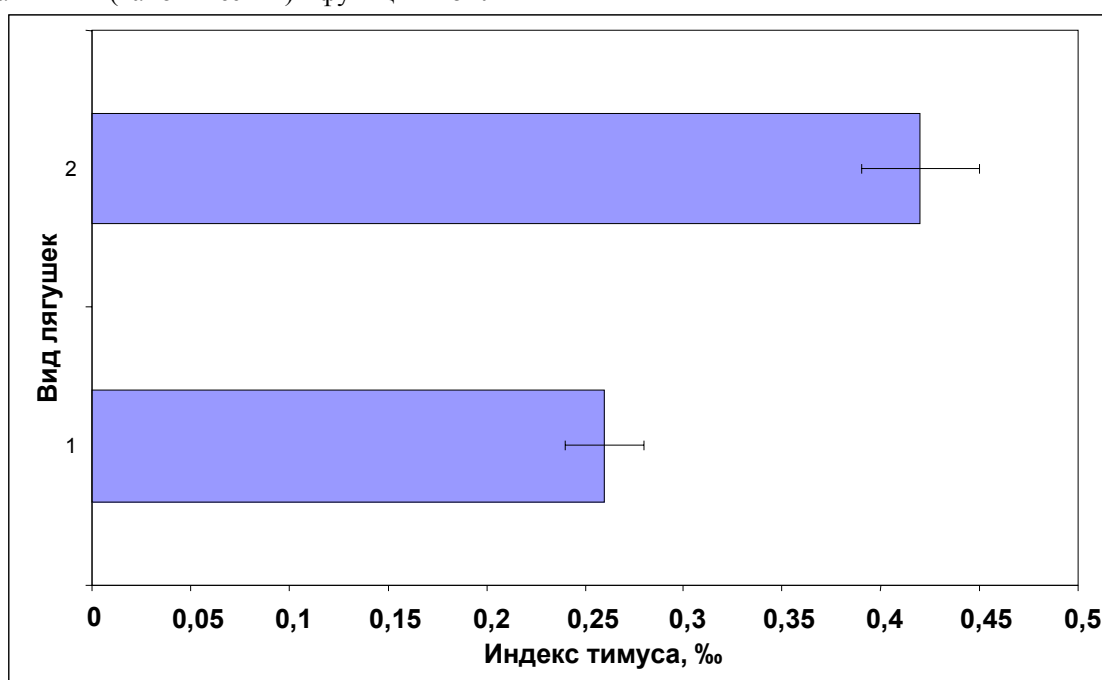


Рис. 3. Относительная масса тимуса (в %) озерных (1) и прудовых (2) лягушек

На рис. 4 представлена диаграмма рассеяния канонических значений для пар значений дискриминантных функций. Из рисунка видно: наблюдения (лягушки), принадлежащие к одной выборке, локализованы в определенных областях плоскости, при этом эллипсы рассеяния группы 1 (пруд д. Кудряшино) и группы 3 (оз. Вторчермет) не имеют площадей перекрывания между собой. Это свидетельствует о том, что группы 1 и 3 значительно различаются между собой по совокупности исследованных показателей. Эллипс рассеяния группы 2 (оз. Земснаряд) локализован в определенной области плоскости и при этом имеет незначительные области перекрывания с другими группами. Таким образом, на основе исследованных показателей с помощью дискриминантного анализа проведена классификация и подтверждено разбиение популяций прудовых лягу-

шек на отдельные категории, при этом более существенные различия иммунного статуса выявлены между популяциями искусственного проточного водоема и искусственного, но бессточного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлены видовые и популяционные особенности иммунофизиологических показателей популяций озерных и прудовых лягушек, населяющих водоемы Нижегородской области разного генетического типа и качественной характеристики. Видовые различия проявлялись в изменении морфофизиологических параметров лимфоидных органов: тимуса, печени и селезенки, слабо затрагивая лейкоцитарный профиль. Для особей обоих видов, обитающих в удаленных от городской черты водоемах, отмечены высокие показатели функ-

циональной активности лейкоцитов и уровня иммунных комплексов в сыворотке крови.

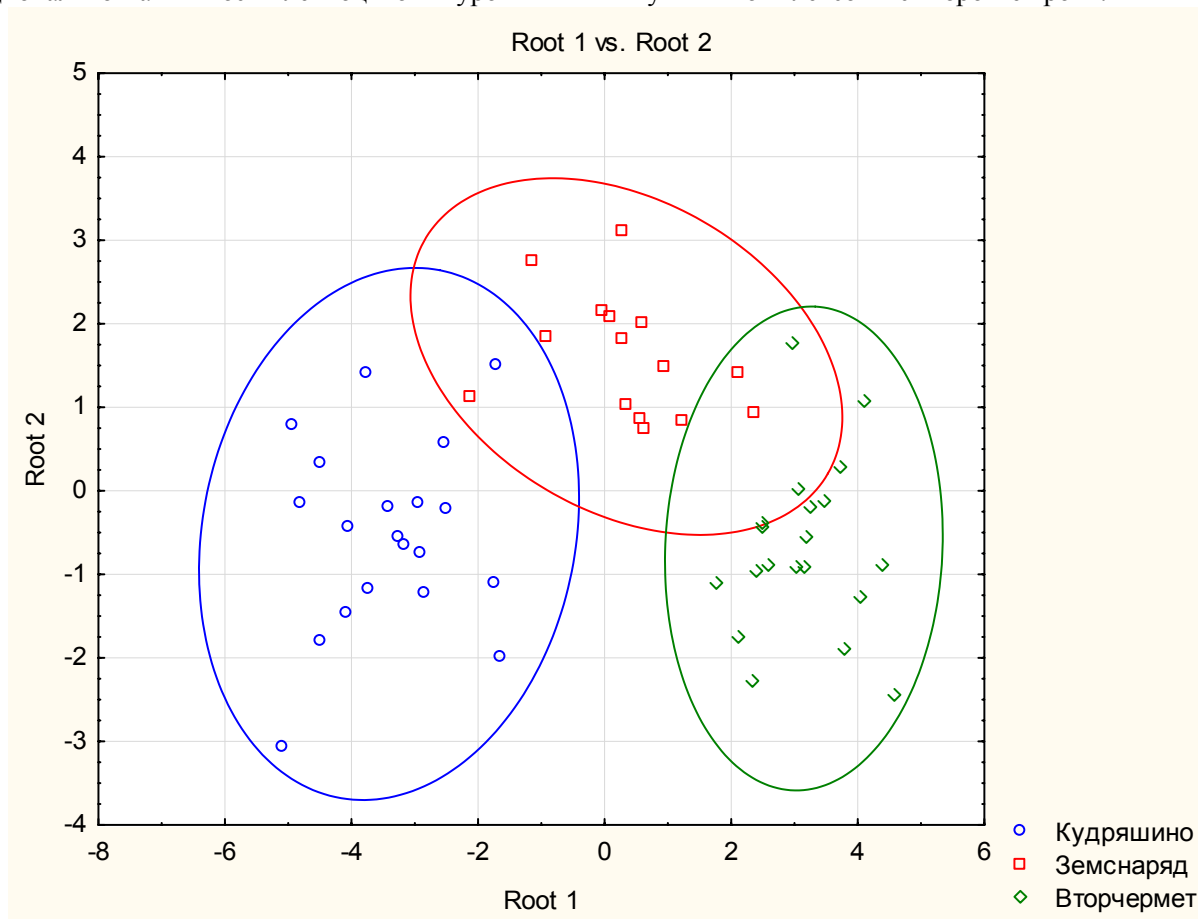


Рис. 4. Диаграмма рассеяния для канонических значений дискриминантных функций выборок из природных популяций прудовых лягушек (Root 1 – дискриминантная функция 1, Root 2 – дискриминантная функция 2)

Более разнообразен спектр популяционных отличий. Высокий уровень клеток миелоидного ряда у прудовых лягушек из оз. Вторчермет искусственного происхождения (надпойменное, бессточное) по сравнению с популяцией природного оз. Земснаряд (надпойменное, проточное) обуславливал высокий адаптивный потенциал особей вида и устойчивость к условиям урбанизации и загрязнения. Функциональные нарушения в работе иммунной системы у особей, обитающих в городских искусственных бессточных водоемах, проявлялись в снижении жизнеспособности ядродержащих клеток тимуса, селезенки, печени и низком уровне фагоцитарной активности лейкоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банников А.Г., Даревский И.С., Иценко В.Г., Рустамов А.К., Щербак Н.Н. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. М.: Просвещение, 1977. 414 с.
2. Борисовский А.Г., Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М. Распространение зеленых лягушек (комплекс *Rana esculenta*) в Удмуртии // Вестн. Удм. ун-та. Серия: Биология. 2001. № 5. С. 51-63.
3. Боркин Л.Я. Отряд Бесхвостые // Ананьева Н.Б., Боркин Л.Я., Даревский И.С., Орлов Н.Л. Земноводные и пресмыкающиеся. Энциклопедия природы России. М.: ABF, 1998. С. 19-174.
4. Вершинин В.Л. Распределение и видовой состав амфибий городской черты Свердловска // Информационные материалы Института экологии растений и животных. Свердловск, 1980. С. 5-6.
5. Вершинин В.Л. Гемопозз бесхвостых амфибий-специфика адаптиогенеза видов в современных экосистемах // Зоол. журн. 2004. Т. 83, № 11. С. 1367-1374.
6. Гелашвили Д.Б., Охалкин А.Г., Доронина А.И и др. Экологическое состояние водных объектов Нижнего Новгорода: монография./ Под ред. Д.Б. Гелашвили. Н. Новгород: ННГУ, 2005. 414 с.
7. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабораторное дело. 1981. № 8. С. 493-495.
8. Ивантер Э.Л. Адаптивные особенности мелких млекопитающих. Л.: Наука, 1985. 320 с.
9. Кузьмин С.Л. Земноводные бывшего СССР. М.: Т-во науч. изд. КМК, 1999. 298 с.
10. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. М.: Наука, 1990. 224 с.
11. Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных». [Электронный ресурс]: Разработан и опубликован в 1985 г. Советом междунар. науч. организаций. (Режим доступа: <http://www/bio/msu/ru/112/ad080012/htm>).

12. Пескова Т.Ю. Структура популяций земноводных как биоиндикатор антропогенного загрязнения среды. М.: Наука, 2002. 132 с.
13. Романова Е.Б. Мониторинг состояния иммунной системы зеленых лягушек рода *Rana* в условия антропогенной трансформации городской среды // Вестн. Нижегород. гос. ун-та им. Н.И. Лобачевского. 2010. № 1. С.131-134.
14. Силс Е.А. Сравнительный анализ гематологических показателей остромордой (*Rana arvalis*, Nilsson, 1842) и озерной (*Rana ridibunda*, Pallas, 1771) лягушек городских популяций // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. 2008. № 10 (92). С. 230-235.
15. Халафян А.А. Statistica 6: статистический анализ данных. М.: Бином, 2007. С. 199-212.
16. Шварц С.С., Смирнов В.С., Добринский Л.Н. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных. Свердловск: УФАН СССР, 1968. 388 с.
17. Экологический мониторинг. Методы биологического и физико-химического мониторинга. Часть VI / Под ред. Д.Б. Гелашвили. 2006 С. 307-327.
18. Borkin L.J., Litvinchuk S.N., Mannapova E.I., Pestov M.V., Rosanov J.M. The distribution of green frogs (*Rana esculenta complex*) in Nizhny Novgorod province, Central European Russia // Russian Journal of Herpetology. 2002. V. 9, No. 3. P. 195-208.
19. Cooper E.L. Immunity mechanisms // Physiology of the Amphibian. 1976. V. 3. P. 163-272.

IMMUNOPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE POPULATIONS OF GREEN FROGS IN URBAN TERRITORY

© 2014 E.B. Romanova, V.Yu. Nikolaev

Nizhny Novgorod's N.I. Lobachevsky University, Nizhny Novgorod

The changes in immunophysiological parameters of two species of green frogs [marsh frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) and pool frog *P. lessonae* (Camerano, 1882)], found in basins of the Nizhny Novgorod region with different genetic type and water balance were analysed. We have revealed statistically significant differences in species and population levels. It's shown that the features of the immune status of studied species are defined by their functional state and the specifics of the environment.

Key words: the leukocytic formula of blood, immunohematological parameters, tailless amphibians.