

Оригинальная статья

УДК 574.3.591

<https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-1-77-96>

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* И *P. LESSONAE* (AMPHIBIA: RANIDAE) АНТРОПОГЕННО-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

Е. Б. Романова ^{1✉}, С. А. Луконина ², Е. С. Рябинина ¹, В. Д. Плотникова ¹

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н. И. Лобачевского

Россия, 603950, г. Нижний Новгород, просп. Гагарина, д. 23

² Пензенский государственный университет

Россия, 440026, г. Пенза, ул. Красная, д. 40

Поступила в редакцию 23.05.2022 г., после доработки 12.07.2022 г., принята 14.07.2022 г.

Аннотация. Цель работы – оценка состояния популяций бесхвостых амфибий антропогенной территории по комплексу показателей иммунного гомеостаза организма. В работе использованы: лягушка озерная *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) и лягушка прудовая *P. lessonae* (Camerano, 1882) из природных популяций водных объектов г. Нижнего Новгорода. Приоритетные химические загрязнители водоемов определяли методом спектрофотометрии. Идентификация видов проводилась при помощи мультиплексной ПЦР тест-системы. Результаты идентификации верифицировались секвенированием митохондриального гена ND2 и фрагмента ядерного гена SAI. У всех собранных особей определяли число эритроцитов, лейкоцитов, лейкоцитарный профиль и уровень иммунных комплексов. Выявлено превышение норматива качества воды по содержанию тяжелых металлов для водоемов рыбохозяйственного назначения во всех водных объектах. Молекулярно-генетическая диагностика показала наличие в выборке озерных лягушек как «чистых» *P. ridibundus*, так и особей с интрогрессивной мтДНК азиатской формы озерной лягушки (*P. cf. bedriagae*). В выборке прудовых лягушек все изученные особи имели только видоспецифические маркеры мт- и яДНК *P. lessonae*. Озерные лягушки отличались от прудовых повышенным содержанием эритроцитов, нейтрофилов, базофилов, мелких иммунных комплексов и пониженным содержанием лимфоцитов. Выявленные изменения иммуногематологических показателей зеленых лягушек обуславливались комплексным генотоксичным воздействием загрязнителей водных объектов. Показано снижение индекса соотношения лимфоцитов / эозинофилов при повышении концентрации нитритов, повышение активности гуморальных иммунных реакций в условиях загрязнения водной среды сульфатами, возрастание доли незрелых лейкоцитарных клеток (миелоцитов) в крови лягушек при повышении концентрации в воде марганца и нитратов. В условиях среднего стресса, определяемого уровнем загряз-

✉ Для корреспонденции. Институт биологии и биомедицины Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского.

ORCID и e-mail адреса: Романова Елена Борисовна: <https://orcid.org/0000-0002-1925-7864>, romanova@ibbm.unn.ru; Луконина Светлана Александровна: <https://orcid.org/0000-0003-0400-9603>, lanochkal@yandex.ru; Рябинина Елена Сергеевна: <https://orcid.org/0000-0001-5544-2912>, ryabinina.e.s@yandex.ru; Плотникова Валерия Дмитриевна: <https://orcid.org/0000-0002-4305-7651>, psyche_medeas@mail.ru.

нения воды, регулирующие системы крови лягушек отражали стресс-индуцированную реакцию, более выраженную в организме озерных лягушек по сравнению с прудовыми.

Ключевые слова: амфибии, секвенирование, ПЦР, гидрохимия, иммунные комплексы, лейкоцитарная формула, иммуногематологические показатели

Для цитирования. Романова Е. Б., Луконина С. А., Рябинина Е. С., Плотникова В. Д. Эколого-физиологический анализ иммунных реакций *Pelophylax ridibundus* и *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae) антропогенно-трансформированных территорий // Поволжский экологический журнал. 2023. № 1. С. 77 – 96. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-1-77-96>

ВВЕДЕНИЕ

Выявление факторов и механизмов функционирования адаптивных реакций организмов в изменяющихся условиях среды на уровне видов является сутью аутоэкологических исследований. Такой подход необходим как для изучения разных популяций одного вида, так и экосистем, элементами которых являются виды. В адаптации организмов к условиям среды, возникающим при воздействии экстремальных факторов, в частности, загрязняющих химических веществ, непосредственно участвует система крови, обеспечивающая важнейшие гомеостатические функции организма. Амфибии представляют собой класс, который делает определенный прорыв в совершенствовании системы адаптивного иммунитета, обладают хорошо развитой нервной, иммунной, гематологической системами (Романова и др., 2014) и считаются хорошими биоиндикаторами загрязнения окружающей среды (Леонтьева, Семенов, 1997; Пескова, 2001, 2003; Вершинин, 2004, 2014; Вафис, Пескова, 2009; Силс, 2010; Минеева, Минеев, 2011; Вершинин и др., 2017; Coico et al., 2003; Peskova et al., 2019 и др.). Несмотря на обилие литературных данных по изучению гематологических показателей, практически отсутствуют исследования по сравнительному анализу адаптивных реакций системы крови и различий со стороны иммунной системы у разных видов амфибий, обитающих в близких и качественно различных условиях среды. Актуальность таких исследований определяется необходимостью изучения эколого-физиологических особенностей популяций в естественной среде, когда темпы антропогенных и климатических изменений требуют постоянной мобилизации адаптивных резервов организма, что позволяет видам выживать и расширять ареал на урбанизированных территориях.

Цель работы: оценка состояния популяций зеленых лягушек, обитающих на урбанизированной территории по комплексу показателей иммунного гомеостаза организма.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Лабораторные и полевые исследования проводили в течение полевого сезона 2021 г. 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 искусственных водоемов г. Нижнего Новгорода со значительной антропогенной нагрузкой: оз. Вторчермет (Канавинский район) 56°31'19.44" N, 43°84'88.89" E; оз. Силикатное (Сор-

мовский район) 56°37'09.12" N, 43°77'76.08" E и Нижегородской области: низинного болота Белкино (Борский район) 56°28'62.08" N, 44°54'80.75" E. Объем каждой выборки составлял 15 – 20 особей. Все работы проводились в соответствии с «Международными руководящими принципами для биомедицинских исследований на животных» (International Guiding..., 2012). В исследованных водоемах в прибрежной зоне были отобраны пробы воды, в которых с помощью спектрофотометра Nach DR-2800 (Nach Company, США) определены химические загрязнители: железо общее, марганец, медь, хром, нитрат-ионы (NO_3^-), нитрит-ионы (NO_2^-), свинец, никель, цинк, хлориды, сульфаты, сульфиды, нефтепродукты и водородный показатель (рН). Расчет удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ) проводили согласно нормативной документации (РД 52.24.643-2002). В расчете учитывали показатели, превышающие норматив качества воды для водоемов рыбохозяйственного назначения (ПДК_{рыб-хоз}) (Нормативы качества..., 2010).

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). 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.

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) (табл. 1). Режим амплификации состоял из 30 циклов: 30 с при 94°C, 30 с при 60 и 62°C (соответственно для SAI и COI) и 30 с 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*).

Для верификации результатов идентификации мультиплексной тест-системой проведено секвенирование гена ND2 мтДНК (1038 п.н.) у 12 экз. (30% выборки) и фрагмента гена SAI ядДНК (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'-ССА ТАС ААА ТГТ GCT ААG 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 с при 94°C, 30 с при 60°C для ND2 и 53°C для SAI-1, 60 с при 72°C, и конечная элонгация 5 мин при 72°C.

Таблица 1. Праймеры мультиплексной ПЦР-тест-системы идентификации видов зеленых лягушек (Ermakov et al., 2019)

Table 1. Primers of the multiplex PCR test system for the identification of green frog species (Ermakov et al., 2019)

Название / Primer	Позиция / Position	Последовательность (5'-3') / Sequence (5'-3')	Температура отжига, °C / Annealing temperature, °C	Длина продукта, п.н. / PCR product length, bp	Специфичность / Specificity
COIF-Pb	183-204	CTTGGAAATTGACTCGTGCCA	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 / All three species
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	GATACAAATGATACATTCACCT	61.0	210	<i>P. ridibundus</i>
SA1F-Pu	25-59	CCATACAAATGTGCTAAGTAGGTT	61.3	–	Все три вида / All three species

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 (рис. 1).

Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems) (Hitachi, Япония) с применением наборов BigDye® Terminator 3.1 (Applied Biosystems) и тех же праймеров, что использовались при амплификации.

Число эритроцитов, лейкоцитов (тыс. / мм³) и дифференцированный подсчет видов лейкоцитов (в %): нейтрофилов разной степени зрелости, базофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов, проводили общепринятым способом (Меньшиков и др., 1987). На основании лейкоцитарной формулы крови рассчитывали интегральные лейкоцитарные индексы (отн. ед.): кровно-клеточный показатель (ККП); реактивный ответ нейтрофилов (РОН); лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ); индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ); индекс

соотношения лимфоцитов и эозинофилов (ИСЛЭ); индекс соотношения нейтрофилов и эозинофилов (ИСНЭ); индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ); индекс ядерного сдвига нейтрофилов (ИЯСН) (Ткаченко, Дерхо, 2014; Sabagna et al., 2005).

Активность иммунной защиты на гуморальном уровне оценивали по содержанию иммунных комплексов в сыворотке крови лягушек, методом селективной преципитации в растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ), позволяющей выявить крупные (ПЭГ, 3.5%) и мелкие (ПЭГ, 7.0% иммунные комплексы. Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) при 200, 280, 350 и 450 нм. Число иммунных комплексов выражали в ед. опт. плотности / 100 мл сыворотки (Гриневиц, Алферов, 1981; Khokhlova et al., 2004).

Полученные первичные данные проверяли на нормальность распределения по критериям Шапиро – Уилка, Лиллиефорса, Колмогорова – Смирнова. Поскольку полученное значение p для данных критериев оказалось меньше принятого критического уровня ($\alpha < 0.05$), то нулевая гипотеза была отклонена и принята альтернативная гипотеза – распределение показателей считать отличающимся от нормального. Следовательно, дальнейший анализ данных проводили методами непараметрической статистики с расчетом критериев: Краскела – Уоллиса (H) (при сравнении нескольких независимых групп по одному признаку); Манна – Уитни (U) (при попарном сравнении групп). Для выявления отличий между группами объектов по совокупности показателей использовался многомерный дисперсионный анализ с использованием лямбды Уилкса (λ Wilks) в качестве критериальной статистики. Ввиду несоответствия первичных данных нормальному распределению, значимость отличий (p -значения) рассчитывалась путем рандомизации с использованием перестановочной процедуры (Шитиков, Розенберг, 2014). За величину уровня статистической значимости принимали $\alpha = 0.05$. С учетом вида распределения центральные тенденции и рассеяние изученных показателей описывали медианой (Me) и интерквартильным размахом (IQR) (значения 25-го и 75-го перцентилей).

Все расчеты проводили в среде R (R Core Team, 2020) с применением пакетов программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., USA) и Statistica 8 (StatSoft Inc., OK, USA).

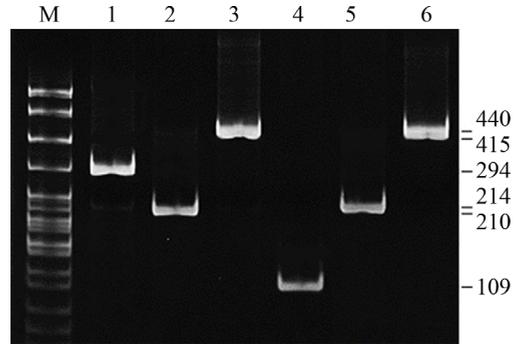


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов мультиплексной ПЦР-реакции генов COI мтДНК (лунки 1 – 3) и SAI-1 яДНК (лунки 4 – 6): 1, 4 – *Pelophylax lessonae*; 2, 5 – *P. ridibundus*; 3, 6 – *P. cf. bedriagae*; M – маркер длин нуклеотидных последовательностей pBR/HpaII. Справа приведены длины амплифицируемых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

Fig. 1. Electrophoregram of the products of multiplex PCR with species-specific primers for COI mtDNA (lanes 1–3) and SAI-1 nuDNA (lanes 4–6). Lanes in polyacrylamide gel: 1, 4 – *Pelophylax lessonae*; 2, 5 – *P. ridibundus*; 3, 6 – *P. cf. bedriagae*; M is the molecular length marker. Lengths of PCR products (in bp) are shown on the right side of the electrophoregram

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика абиотических условий обитания лягушек рода Pelophylax. По результатам гидрохимического анализа для каждого водоема согласно нормативной документации (РД 52.24.643-2002) был рассчитан удельный комбинаторный индекс загрязненности воды (УКИЗВ) и определен класс качества воды. В расчетах учитывали показатели, превышающие норматив качества воды для водоемов рыбохозяйственного назначения (ПДК_{рыб-хоз}) (Нормативы качества..., 2010), выбранный нами как наиболее жесткий из существующей нормативно-технической документации. Согласно полученным результатам в водных пробах оз. Силикатное с доминированием озерных лягушек выявлено превышение ПДК по марганцу (50 ПДК), меди (30 ПДК), хрому (2.5 ПДК), цинку (11 ПДК). Содержание других тяжелых металлов (Fe, Pb, Ni, Co) не превышало значение ПДК для водоемов рыбохозяйственного назначения. В высоких концентрациях содержались ионы гидросульфида (HS⁻). УКИЗВ 7.15, вода грязная, 4-й класс, разряд «б». Воды оз. Вторчермет, где доминировали прудовые лягушки, также характеризовались высоким уровнем загрязнения тяжелыми металлами. Установлено превышение ПДК по марганцу (30 ПДК), меди (60 ПДК), хрому (4.9 ПДК), цинку (4 ПДК), кобальту (1.6 ПДК). УКИЗВ – 4.4, вода грязная, 4-й класс, разряд «а». Экстремально

Таблица 2. Генетическая характеристика озерных лягушек оз. Силикатное (г. Нижний Новгород) с различными комбинациями генетических маркеров мтДНК /яДНК

Table 2. Genetic characteristics of lake frogs from the lake Silikatnoe (Nizhny Novgorod) with various combinations of mtDNA/nDNA genetic markers

Номер особи / Individual number	мтДНК / mtDNA	яДНК / nDNA
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>

грязная вода выявлена в бол. Белкино (5-й класс, УКИЗВ- 34.02) с превышением ПДК по железу (17.3 ПДК), марганцу (330 ПДК), меди (770 ПДК), хрому (12.05 ПДК), цинку (17 ПДК), никелю (4.1 ПДК) и кобальту (9 ПДК). Показателем сильного загрязнения вод болота являлось присутствие в высоких концентрациях соединений серы: ионов сульфида (S²⁻) и сульфатов (SO₄²⁻).

Видовая идентификация и генетическая структура популяций лягушек рода Pelophylax. 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 (табл. 2). Таким образом, выборка состоит из генетически «чистых» экземпляров *P. ridibundus* и особей, несущих чужерод-

ную (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.

В выборках прудовых лягушек оз. Вторчермет и бол. Белкино все изученные особи имели только видоспецифические маркеры *P. lessonae*, как митохондриальной, так и ядерной ДНК (рис. 2).

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 лягушка: 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

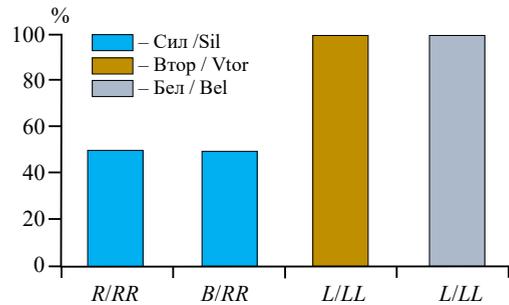


Рис. 2. Генетическая характеристика выборок зеленых лягушек (доля от общего числа в выборке): Сил – оз. Силикатное, Втор – оз. Вторчермет, Бел – бол. Белкино; R – *Pelophylax ridibundus*, B – *P. cf. bedriagae*, L – *P. lessonae*

Fig. 2. Genetic characterization of green frog samples (share of the total in the group): Sil – lake Silikatnoe, Vtor – lake Vtorchermet, Bel – Belkino swamp; R – *Pelophylax ridibundus*, B – *P. cf. bedriagae*, L – *P. lessonae*

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. 3), 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 (см. рис. 3).

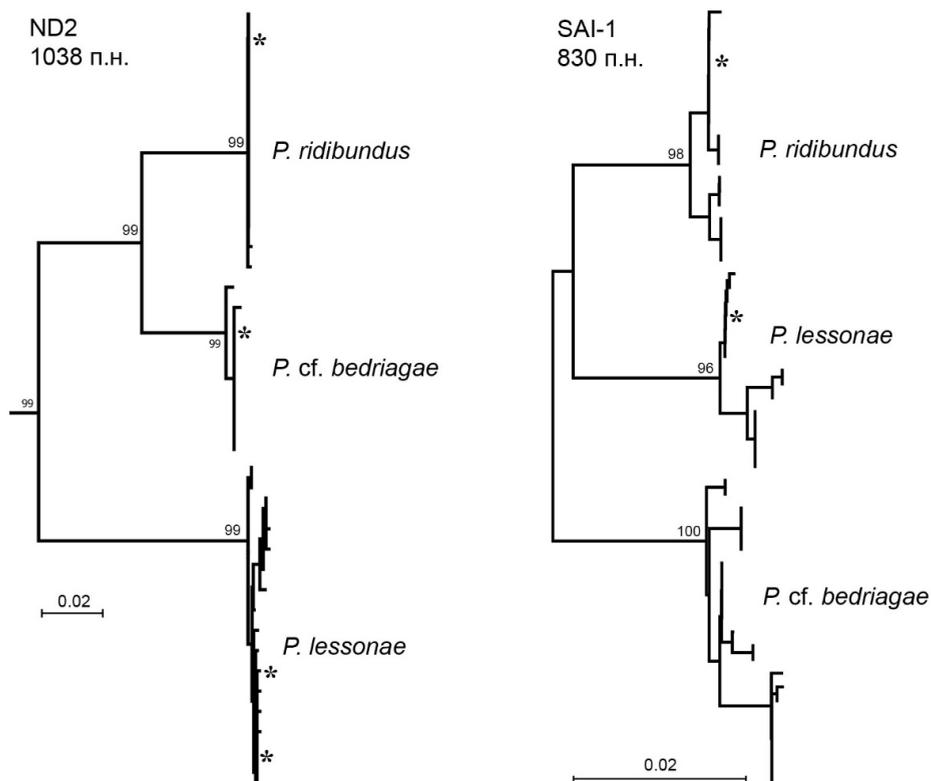


Рис. 3. Дендрограмма (NJ-метод), показывающая дифференциацию озерных (*P. ridibundus* и *P. cf. bedriagae*) и прудовой (*P. lessonae*) лягушек, по данным GenBank NCBI, и положение исследованных гаплотипов (*). Приведены бутстрэп-поддержки выше 90%. Внешняя группа не показана

Fig. 3. Dendrogram (NJ method) showing the differentiation of lake (*P. ridibundus* and *P. cf. bedriagae*) and pond (*P. lessonae*) frogs according to GenBank NCBI data and the position of the studied haplotypes (*). Bootstrap supports above 90% are given. No outgroup is shown

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ

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).

Оценка иммуногематологических показателей и состояние клеточных факторов иммунитета лягушек рода *Pelophylax*. Количественное содержание лейкоцитов у обобщенной выборки прудовых лягушек (Вторчермет, бол. Белкино) и озерных лягушек статистически значимо не различалось ($z = 1.78, p = 0.07$), однако выявлено значимое превышение содержания эритроцитов в периферической крови озерных лягушек ($z = 2.26, p = 0.02$) по сравнению с прудовыми. Анализ формулы крови прудовых лягушек оз. Вторчермет и бол. Белкино при попарном сравнении не выявил различий в лейкограммах, что позволило нам объединить результаты в общую группу и провести повторное сравнение лейкоцитарного состава крови озерных (оз. Силикатное) и прудовых лягушек (объединенная выборка) парным критерием Манна – Уитни.

В лейкоцитарной формуле крови озерных лягушек отметим повышенное (в 1.6 раза) содержание всех форм гранулоцитов по сравнению с прудовыми лягушками, кроме эозинофилов, доля которых в крови обоих видов была одинаковой ($z = 1.26, p = 0.81$). При этом содержание нейтрофильных гранулоцитов в крови озерных лягушек, за счет вклада клеток разной степени зрелости: юных, палочкоядерных и сегментоядерных, оказалось почти в 2 раза выше по сравнению с прудовыми лягушками (табл. 3).

Таблица 3. Показатели лейкоцитарной системы крови озерных и прудовых лягушек
Table 3. Parameters of the blood leukocyte system of lake and pond frogs

Показатель / Indicator	<i>Pelophylax ridibundus</i>		<i>Pelophylax lessonae</i>		Статистические показатели / Statistical indicators	
	Me	IQR	Me	IQR	U	p
1	2	3	4	5	6	7
Лейкоцитарная формула крови / WBC (white blood cells)						
Миелоциты, % / Myelocytes, %	2.50	4.00	2.50	2.50	229.50	0.81
Сумма нейтрофилов, % / Neutrophil sum, %	9.50	9.50	5.00	3.00	108.50	0.002
В том числе: / Including: Юные, % / Young neutrophils, %	4.00	3.00	2.50	2.00	133.00	0.012

Окончание табл. 3
Table 3. Continuation

1	2	3	4	5	6	7
Палочкоядерные, % / Stab neutrophils, %	1.00	1.50	1.00	0.10	132.00	0.011
Сегментоядерные, % / Segmented neutrophils, %	3.50	3.00	2.00	2.00	121.00	0.005
Базофилы, % / Basophils, %	7.00	7.00	2.50	3.50	130.00	0.009
Эозинофилы, % / Eosinophils, %	7.00	9.00	7.00	3.50	186.00	0.20
Моноциты, % / Monocytes, %	3.00	2.50	3.00	1.50	222.00	0.67
Лимфоциты, % / Lymphocytes, %	66.00	10.50	79.00	7.00	46.50	0.000005
Лейкоцитарные индексы / Integral leukocyte indices						
ККП, отн. ед. / Blood cell indicator, rel. un.	0.20	0.13	0.11	0.06	76.50	0.00012
РОН, отн. ед. / Reactive neutrophil response, rel. un.	0.008	0.03	0.004	0.006	153.50	0.042
ИЛГ, отн. ед. / Lymphocyte-granulocyte index, rel. un.	46.51	25.21	86.11	54.85	75.00	0.0001
ИСНЛ, отн. ед. / Index of the neutrophils and lymphocytes ratio, rel.un.	0.07	0.07	0.03	0.02	85.50	0.0002
ИСЛЭ, отн. ед. / Index of the lymphocytes and eosinophils ratio, rel. un.	9.16	9.29	11.64	8.36	160.00	0.06
ИСНЭ, отн. ед. / Index of the neutrophils and eosinophils ratio, rel. un.	0.62	1.53	0.50	0.69	196.50	0.31
ИСЛ, отн. ед. / Leukocyte shift index, rei.un.	0.38	0.14	0.17	0.08	39.00	0.000002
ИЯСН, отн. ед. / Neutrophil nuclear shift index, rel. un.	2.70	1.52	2.83	2.91	240.00	0.99

Примечание. *Me* – медиана, *IQR* – интерквартильный размах, *U* – критерий Манна – Уитни, *p* – уровень значимости; жирным шрифтом выделены значимые различия.

Note. *Me* – median, *IQR* – interquartile range, *U* – Mann–Whitney test, *p* – significance level; statistically significant differences are shown in bold.

Тенденция к росту количества нейтрофилов (повышение неспецифической защитной системы организма) в формуле крови озерных лягушек компенсировалась снижением доли лимфоцитов. Напротив, в лейкоцитарной формуле крови

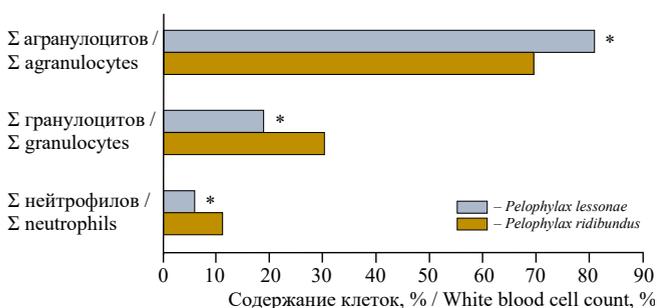


Рис. 4. Относительное содержание в крови озерных и прудовых лягушек лейкоцитарных клеток гранулоцитарного и агранулоцитарного рядов; * – статистически значимые различия

Fig. 4. Relative content of leukocyte cells of the granulocytic and agranulocytic series in the blood of lake and pond frogs; * – statistically significant differences

прудовых лягушек отмечено пониженное содержание гранулоцитов и повышенная доля агранулоцитов за счет увеличения числа лимфоцитов. Методом многомерного дисперсионного анализа (λ Wilks = 0.202, $F = 7.36$, $p = 0.000003$) выявлены значимые различия по лейкоцитарному профилю озерной и прудовой лягушки (рис. 4). При этом доля агранулоцитов в крови

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ

прудовых лягушек в 1.16 раза превышала аналогичный показатель озерных, а содержание гранулоцитов и нейтрофильных гранулоцитов оказалось меньше (см. рис. 4).

Степень развития иммунопатологических процессов в организме зеленых лягушек оценивали по концентрации и размеру циркулирующих иммунных комплексов. Уровень крупных иммунных комплексов (показатель активной сбалансированной работы иммунной системы) в крови озерных и прудовых лягушек был примерно одинаковым. Уровень мелких иммунных комплексов в крови озерных лягушек значимо превышал этот показатель у прудовых лягушек (табл. 4).

Таблица 4. Уровень иммунных комплексов в крови озерных и прудовых лягушек
Table 4. Level of the immune complexes in the blood of lake and pond frogs

Вид лягушек / Species of frog	280 нм / nm		350 нм / nm		450 нм / nm	
	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	<i>Me</i>	<i>IQR</i>
Содержание крупных иммунных комплексов, ед. опт / 100 мл / Content of large immune complexes, optical density un. /100 ml						
<i>Pelophylax ridibundus</i>	12.60	15.75	11.56	19.10	8.85	19.38
<i>Pelophylax lessonae</i>	9.36	12.30	12.63	16.50	10.26	15.22
Статистические показатели / Statistical indicators	$U = 0.63, p = 0.52$		$U = 0.72, p = 0.46$		$U = 0.47, p = 0.63$	
Содержание мелких иммунных комплексов, ед. опт / 100 мл / Content of small immune complexes, optical density un. /100 ml						
<i>Pelophylax ridibundus</i>	26.01	23.26	20.58	20.60	15.57	18.02
<i>Pelophylax lessonae</i>	11.24	13.30	12.16	14.40	11.48	12.40
Статистические показатели / Statistical indicator	$U = 2.76, p = 0.004$		$U = 2.47, p = 0.01$		$U = 1.81, p = 0.06$	
Коэффициент соотношения крупных/мелких иммунных комплексов, отн. ед. / Ratio of large/small immune complexes, rel. un.						
<i>Pelophylax ridibundus</i>	0.48	0.57	0.79	0.52	0.73	0.44
<i>Pelophylax lessonae</i>	0.81	0.42	0.88	0.35	0.88	0.34
Статистические показатели / Statistical indicators	$U = 2.78, p = 0.005$		$U = 0.92, p = 0.35$		$U = 1.96, p = 0.04$	

Примечание. *Me* – медиана, *IQR* – интерквартильный размах, *U* – критерий Манна – Уитни, *p* – уровень значимости.

Note. *Me* – median, *IQR* – interquartile range, *U* – Mann–Whitney test, *p* – significance level; statistically significant differences are shown in bold.

Установлено возрастание коэффициента соотношения крупных к мелким иммунным комплексам, свидетельствующее о повышении активности гуморальных иммунных реакций в условиях загрязнения водной среды сульфатами (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Иммунная система является критической мишенью для большинства ксенобиотиков и экстремальных экологических факторов. Характерной особенностью является и неодинаковая чувствительность отдельных ее звеньев к стрессовым факторам среды. Эти различия обусловлены высокой структурно-метаболической гетерогенностью иммунной системы организма и сложностью сетевых взаимодей-

ствий отдельных ее компонентов. Отметим также, что чувствительность иммунного ответа позволяет в ряде случаев выявить наличие патологических реакций в организме, когда никакими другими методами эти реакции выявить не удастся. В связи с этим дополнительную информацию о состоянии иммунного ответа зеленых лягушек могут дать интегральные индексы, которые отражают взаимоотношения между различными классами клеток лейкоцитарной формулы крови. Как известно, повышенное содержание нейтрофилов, снижение доли лимфоцитов и увеличение отношения доли нейтрофилов к лимфоцитам являются показателями острого стресса у позвоночных животных. Высокие значения индексов: ККП; ИСЛ, ИСНЛ для озерных лягушек по сравнению с выборками прудовых лягушек, обусловленные увеличением содержания нейтрофильных гранулоцитов всех форм зрелости и базофилов, а также снижением числа лимфоцитов, показывали, что регулирующие системы крови не имели выраженного лимфоцитарного профиля и отражали стресс-индуцированную реакцию лейкоцитов (Sabagna et al., 2005; Davis et al., 2008). По-видимому, специфика гидрохимических условий водной среды приводила в организме озерных лягушек к усилению продукции воспалительных медиаторов, обуславливающих пролиферацию, а впоследствии и миграцию лимфоцитов, что хорошо иллюстрировалось возрастанием реактивного ответа нейтрофилов (РОН) ($z = 2.02, p = 0.04$). Поддержание иммунологической реактивности организма озерных лягушек в условиях повышенного загрязнения среды определялось функциональной активностью нейтрофилов, что подтверждалось более низким показателем лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса (ИЛГ) ($z = 3.87, p = 0.0001$) по сравнению с прудовыми лягушками. Интегральный индекс ИЛГ можно рассматривать как показатель сбалансированности ответной реакции клеток крови на комплексное воздействие факторов внешней среды, снижение этого показателя на фоне повышения индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ) свидетельствовало о недостаточном ресурсе адаптационных механизмов организма озерных лягушек за счет отставания клеток лимфоцитарно-моноцитарного звена.

Таблица 5. Зависимость показателей гомеостаза зеленых лягушек от концентрации загрязнителей водной среды обитания

Table 5. Dependence of the indicators of homeostasis of green frogs on the concentration of pollutants in the aquatic environment

Показатели загрязнения / Chemical pollutants	Показатель / Indicator	Уравнение регрессии / Regression equation	r	R^2	p
Марганец / Manganese	Миелоциты, % / Myelocytes, %	$y = 3.07 + 0.25x$	0.99	1.00	0.0005
Нитраты (NO ₃ ⁻) / Nitrate (NO ₃ ⁻)	Миелоциты, % / Myelocytes, %	$y = 3.12 + 0.073x$	0.98	0.9987	0.03
Нитриты (NO ₂ ⁻) / Nitrite (NO ₂ ⁻)	ИСЛЭ, отн. ед. / Index of the lymphocytes and eosinophil, rel. un	$y = 16.38 - 106.23x$	-0.99	0.998	0.02
Сульфаты (SO ₄ ²⁻) / Sulfates (SO ₄ ²⁻)	Коэффициент соотношения иммунных комплексов, отн. ед. / Ratio of immune complexes, rel. un.	$y = -1.97 + 0.06x$	0.99	0.99	0.035

Примечание. r – коэффициент корреляции, R^2 – коэффициент детерминации, p – уровень значимости.

Note. r – correlation coefficient, R^2 – determination coefficient, p – significance level.

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ

Амфибии, так же как рептилии и птицы, характеризуются гетерогенностью по иммуноглобулинам. У амфибии обнаружены три класса легких цепей иммуноглобулинов: κ , λ и σ (Das et al., 2008) и описаны два изотипа иммуноглобулинов: высокомолекулярный: IgM и низкомолекулярный IgY. В отличие от IgM, IgY имеет длительный период действия, производится в большем количестве и обеспечивает большую защиту от инфекций (Warr et al., 1995). В модельных экспериментах со шпорцевыми лягушками показано, что антитела изотипа IgY, в высокой степени тимусзависимые, обнаруживались в клеточной культуре, только в условиях идентичности гаплотипов взаимодействующих клеток (Robert, Ohta, 2009). Относительно недавно у амфибий идентифицирован новый иммуноглобулин D (Ohta, Flajnik, 2006), который экспрессируется на поверхности зрелых В-клеток вместе с IgM и играет роль в модуляции развития гуморального иммунитета (Geisberger et al., 2006).

Показателем защиты организма и функциональной активности гуморального иммунного ответа является уровень циркулирующих иммунных комплексов. Повышенное содержание мелких иммунных комплексов свидетельствовало о дисбалансе в работе гуморальной защиты озерных лягушек, при этом не происходило полной нейтрализации АГ и нарушалось соотношение АГ–АТ. Одновременно наблюдалось повышение в крови доли воспалительных клеток: эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов и снижение числа лимфоцитов. Более низкие значения коэффициента соотношения крупных/мелких иммунных комплексов у озерных лягушек по сравнению с прудовыми свидетельствовали о пониженной активации лимфоцитов как эффекторного звена иммунного ответа.

Выявленные изменения иммуногематологических показателей зеленых лягушек обусловлены, по-видимому, комплексным гемотоксичным воздействием приоритетных загрязнителей водных объектов. Регрессионным анализом показано снижение индекса соотношения лимфоцитов/эозинофилов при повышении концентрации нитритов и возрастание содержания в крови лягушек доли незрелых лейкоцитарных клеток (миелоцитов) при повышении концентрации марганца и нитратов в водной среде обитания, что являлось одним из признаков кумулятивного токсикоза организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных данных показывает межвидовые различия видов зеленых лягушек в путях адаптации на уровне системы крови к комплексу гидрохимических условий среды, проявляющиеся в существенных специфических отклонениях функционирования иммунной системы организма. У озерных лягушек комплексное воздействие химических загрязнителей, техногенного происхождения в высоких концентрациях вызывало активизацию процесса эритропоэза и напряжение неспецифической защитной системы крови. Лейкоцитарная формула крови прудовых лягушек иллюстрировала развитие лейкомоидной реакции лимфатического типа, т.е. характеризовалась пониженным содержанием нейтрофильных гранулоцитов (в том числе юных форм) и повышенной долей лимфоцитов.

Процесс иммунологической перестройки в организме зеленых лягушек, обитающих в разных биотопических условиях, адекватно отражали и популяционные маркеры иммунного статуса (лейкоцитарные индексы): кровно-клеточный показатель (ККП), индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ), лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ), реактивный ответ нейтрофилов (РОН), индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ). Стабильность онтогенеза обеспечивалась разнонаправленными изменениями клеточных и гуморальных форм иммунного реагирования: у озерных лягушек, в большей степени, за счет усиления неспецифических реакций; у прудовых лягушек – за счет активного, адекватного и сбалансированного гуморального иммунного ответа.

Авторы выражают глубокую признательность и благодарность доценту кафедры зоологии и экологии Пензенского государственного университета кандидату биологических наук Ермакову Олегу Александровичу за организацию работ по молекулярному определению вида амфибий, ценные советы и конструктивные замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банников А. Г., Даревский В. Г., Ищенко А. К., Рустамов Н. Н., Щербак И. С. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. М. : Просвещение, 1977. 415 с.
- Вафис А. А., Пескова Т. Ю. Реакция крови озерной лягушки *Rana ridibunda* Pal. на воздействие сточных вод сахарных заводов // Вопросы современной науки и практики. Университет им. В. И. Вернадского. 2009. № 2 (16). С. 8 – 18.
- Вершинин В. Л. Гемопозз бесхвостых амфибий – специфика адаптационного генеза видов в современных экосистемах // Зоологический журнал. 2004. Т. 83, № 11. С. 1367 – 1374.
- Вершинин В. Л. Функциональные особенности популяций амфибий в градиенте урбанизации // Известия Самарского научного центра РАН. 2014 Т. 16, № 5 (1). С. 344 – 348.
- Вершинин В. Л., Буракова А. В., Вершинина С. Д. Сравнительный анализ паразитоценозов амфибий сем. Ranidae (Anura) в градиенте урбанизации // Экология. 2017. № 5. С. 385 – 395.
- Гриневич Ю. А., Алферов А. Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабораторное дело. 1981. № 8. С. 493 – 495.
- Иванов А. Ю. Молекулярно-генетические и экологические особенности распространения криптических форм озерной лягушки в восточной части ареала : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пенза, 2019. 22 с.
- Леонтьева О. А., Семенов Д. В. Земноводные как биоиндикаторы антропогенных изменений среды // Успехи современной биологии. 1997. Т. 117, вып. 6. С. 726 – 736.
- Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П., Андреева З. М., Анкирская А. С., Балаховский И. С., Белокриницкий Д. В., Воропаева С. Д., Гаранина Е. Н., Лукичева Т. И., Плетнева Н. Г., Смоляницкий А. Я. Лабораторные методы исследования в клинике М. : Медицина, 1987. 368 с.
- Минеева О. В., Минеев А. К. Нарушения лейкоцитарной формулы крови озёрной лягушки Саратовского водохранилища // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. 2011. № 2 (2). С. 94 – 97.
- Нормативы качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативы предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектах рыбохозяйственного значения (Приказ Федерального агентства по рыболовству от 18.01.2010 г. № 20). М., 2010. 90 с.

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ

- Пескова Т. Ю. Влияние антропогенных загрязнений среды на земноводных. Волгоград : Волгоградский государственный педагогический университет, 2001. 156 с.
- Пескова Т. Ю. Действие смесей солей тяжелых металлов на головастики бесхвостых земноводных // Известия Самарского научного центра РАН. 2003. № 1. С. 157 – 164.
РД 52.24.643-2002. Метод комплексной оценки степени загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям / Росгидромет. Ростов н/Д, 2002 56 с.
- Романова Е. Б., Николаев В. Ю., Гелаивили Д. Б. Экологические аспекты организации иммунной системы амфибий // Современная герпетология. 2014. Т. 14, вып. 3/4. С. 126 – 133.
- Силс Е. А. Популяционные особенности гематологических показателей периферической крови сеголеток *Rana ridibunda* Pall. в условиях урбанизации // Экология. 2010. № 2. С. 158 – 160.
- Ткаченко Е. А., Дерхо М. А. Лейкоцитарные индексы при экспериментальной кадмиевой интоксикации мышей // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2014. № 3 (47). С. 81 – 83.
- Шутиков В. К., Розенберг Г. С. Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. Тольятти : Кассандра, 2014. 314 с.
- Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Research. 1997. Vol. 25, iss. 22. P. 4692 – 4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Akin Peksen Ç. Molecular evolution and phylogeography of the Eastern Mediterranean water frog (*Pelophylax*) complex: PhD Thesis / School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University. Ankara, 2015. 342 p.
- Akin Ç., Can Bilgin C., Beerli P., Westaway R., Ohst T., Litvinchuk S. N., Uzzell T., Bilgin M., Hotz H., Guex G.-D., Plötner J. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic // Journal of Biogeography. 2010. Vol. 37, iss. 11. P. 2111 – 2124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02368.x>
- Cabagna M. C., Lajmanovich R. C., Stringhini G., Sanchez-Hernandez J. C., Peltzer P. M. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agro ecosystems of Santa Fe Province, Argentina // Applied Herpetology. 2005. Vol. 2. P. 373 – 380.
- Coico R., Sunshine G., Benjamini E. Immunology. A Short Course. Hoboken : Wiley-Liss Publ., 2003. 237 p.
- Das S., Nikolaidis N., Klein J., Nei M. Evolutionary redefinition of immunoglobulin light chain isotypes in tetrapods using molecular markers // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. Vol. 105. P. 16647 – 16652.
- Davis A. K., Maney D. L., Maerz J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists // Functional Ecology. 2008. Vol. 22, iss. 5. P. 760 – 772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
- Ermakov O., Ivanov A., Titov S., Svinin A., Litvinchuk S. N. New multiplex PCR method for identification of east European green frog species and their hybrids // Russian Journal of Herpetology. 2019. Vol. 26, № 6. P. 367 – 370. <https://doi.org/10.30906/1026-2296-2019-26-6-367-370>
- Geisberger R., Lamers M., Achatz G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD // Immunology. 2006. Vol. 118. P. 429 – 437.
- International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Geneva, Switzerland : Council for International Organization of Medical Sciences Publ., 2012. 4 p.
- Khokhlova I. S., Spinu M., Krasnov B. R., Degen A. A. Immune response to fleas in a wild desert rodent: Effect of parasite species, parasite burden, sex of host and host parasitological experience // Journal of Experimental Biology. 2004. Vol. 207. P. 2725 – 2733.

Litvinchuk S. N., Ivanov A. Yu., Lukonina S. A., Ermakov O. A. A record of alien *Pelophylax* species and widespread mitochondrial DNA transfer in Kaliningradskaya Oblast' (the Baltic coast, Russia) // *Bioinvasions Records*. 2020. Vol. 9, № 3. P. 599 – 617. <https://doi.org/10.3391/bir.2020.9.3.16>

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.

Ohta Y., Flajnik M. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103. P. 10723 – 10728.

Peskova T. Ju., Bachevskaya O. N., Plotnikov G. K. Hematological indices of the lake frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Ranidae, Anura) inhabiting reservoirs in the Northwestern Ciscaucasia with various pollution types. *Current Studies in Herpetology*, 2019, vol. 19, no. 1–2, pp. 40–45. <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2019-19-1-2-40-45>

Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Spolsky C., Ohst T., Litvinchuk S. N., Guex G.-D., Reyer H.-U., Hotz H. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: A case in western Palaearctic water frogs // *Journal of Evolutionary Biology*. 2008. Vol. 21, № 3. P. 668 – 681. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01527.x>

Plötner J., Köhler F., Uzzell T., Beerli P., Schreiber R., Guex G.-D., Hotz H. Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5 truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palaearctic water frogs (Neobatrachia) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009. Vol. 53, iss. 3. P. 784 – 791.

R Core Team. R : A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2020. Available at: <http://www.R-project.org> (accessed 17 December 2020).

Robert J., Ohta Y. Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus* // *Developmental Dynamics*. 2009. Vol. 238, iss. 6. P. 1249 – 1270.

Svinin A. O., Dedukh D. V., Borkin L. J., Ermakov O. A., Ivanov A. Yu., Litvinchuk J. S., Zamaletdinov R. I., Mikhaylova R. I., Trubyanov A. B., Skorinov D. V., Rosanov Yu. M., Litvinchuk S. N. Genetic structure, morphological variation, and gametogenic peculiarities in water frogs (*Pelophylax*) from northeastern European Russia // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2021. Vol. 59, iss. 3. P. 646 – 662. <https://doi.org/10.1111/jzs.12447>

Warr G. W., Magor K. E., Higgins D. A. IgY: Clues to the origins of modern antibodies // *Immunology Today*. 1995. Vol. 16. P. 392 – 398.

**Ecological and physiological analysis of immune reactions
of *Pelophylax ridibundus* and *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae)
in anthropogeneously transformed territories**

E. B. Romanova ^{1✉}, S. A. Lukonina ², E. S. Ryabinina ¹, V. D. Plotnikova ¹

¹Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod
23 Gagarin Avenue, Nizhni Novgorod 603950, Russia

²Penza State University
40 Krasnaya St., Penza 440026, Russia

Received: 23 May 2022 / revised: 12 July 2022 / accepted: 14 July 2022

Abstract. The purpose of the work is to assess the state of Anura populations living in an anthropogenic territory according to a set of indicators of the body's immune homeostasis. The objects of the study were *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) and *P. lessonae* (Camerano, 1882), living in the natural populations of reservoirs in Nizhny Novgorod. Priority chemical pollutants of the water bodies were determined by spectrophotometry. Species were identified using a multiplex PCR test system. The identification results were confirmed by sequencing of the mitochondrial ND2 gene and a fragment of the SAI protein. We counted the numbers of erythrocytes and leukocytes, determined the leukocyte profile and the level of immune complexes in all frogs. An excess of the water quality standard for the content of heavy metals was revealed in all the water bodies. Molecular genetic diagnostics showed the presence of both "pure" *P. ridibundus* and individuals with introgressive mtDNA of the Anatolian form of the lake frog (*P. cf. bedriagae*) in the sample of lake frogs. In the sample of pond frogs, all studied individuals had only species-specific mt- and nDNA markers of *P. lessonae*. *P. ridibundus* differed from *P. lessonae* by an increased content of erythrocytes, neutrophils, basophils, small immune complexes, and a reduced content of lymphocytes. The revealed changes in the immunohematological parameters of green frogs were caused by the complex henotoxic effect of pollutants in the water bodies. A decrease in the lymphocytes/eosinophils ratio index was shown with an increase in the concentration of nitrites, an increased activity of humoral immune responses in conditions of sulfate pollution of the aquatic environment, an increase in the proportion of myelocytes in the blood of frogs with an increased concentration of manganese and nitrates in water. Under conditions of environmental stress, the blood regulatory systems of frogs reflected a stress-induced reaction, which was more pronounced in the body of lake frogs compared to pond ones.

Keywords: amphibians, sequencing, PCR, hydrochemistry, immune complexes, WBC (white blood cells), immunohematological parameters

For citation: Romanova E. B., Lukonina S. A., Ryabinina E. S., Plotnikova V. D. Ecological and physiological analysis of immune reactions of *Pelophylax ridibundus* and *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae) in anthropogeneously transformed territories. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2023, no. 1, pp. 77–96 (in Russian). <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-1-77-96>

✉ *Corresponding author.* Department of Ecology of Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Russia.

ORCID and e-mail addresses: Elena B. Romanova: <https://orcid.org/0000-0002-1925-7864>, romanova@ibbm.unn.ru; Svetlana A. Lukonina: <https://orcid.org/0000-0003-0400-9603>, lanochkal@yandex.ru; Elena S. Ryabinina: <https://orcid.org/0000-0001-5544-2912>; ryabinina.e.s@yandex.ru; Valeria D. Plotnikova: <https://orcid.org/0000-0002-4305-7651>, psyche_medea@mail.ru.

REFERENCES

Bannikov A. G., Darevsky V. G., Ishchenko A. K., Rustamov N. N. Shcherbak I. S. *Opredelitel zemnovodnykh i presmykajushchikhsja fauny SSSR* [A Guide of Amphibians and Reptiles of Fauna of USSR]. Moscow, Prosveshchenie Publ., 1977. 415 p. (in Russian).

Vafis A. A., Peskova T. Yu. Blood change of lake frog (*Rana ridibunda*) influenced by sugar-beet mill sewage. *Problems of Contemporary Science and Practice. Vernadsky University*, 2009, no. 2 (16), pp. 8–18 (in Russian).

Vershinin V. L. Hemopoiesis of anurans – specific features of adaptogenesis in species in recent ecosystems. *Zoologicheskii zhurnal*, 2004, vol. 83, no. 11, pp. 1367–1374 (in Russian).

Vershinin V. L. Functional specific of amphibian populations in urbanistic gradient. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2014, vol. 16, no. 5 (1), pp. 344–348 (in Russian).

Vershinin V. L., Burakova A. V., Vershinina S. D. Comparative analysis of the parasitocenoses of amphibians from the family Ranidae (Anura) in the urbanization gradient. *Russian Journal of Ecology*, 2017, vol. 48, no. 5, pp. 466–475.

Grinevich Ju. A., Alferov A. N. Determination of immune complexes in the blood of cancer patients. *Laboratornoe delo*, 1981, no. 8, pp. 493–495 (in Russian).

Ivanov A. Ju. *Molecular Genetic and Ecological Features of Cryptic Forms of the Lake Frog in the Eastern Part of the Range*. Thesis Diss. Cand. Sci. (Biol.). Penza, 2019. 22 p. (in Russian).

Leontyeva O. A., Semenov D. V. Amphibians as bioindicators of anthropogenic change. *Uspekhi Sovremennoi Biologii*, 1997, vol. 117, no. 6, pp. 726–736 (in Russian).

Menshikov V. V., Delektorskaya, L. N., Zolotnitskaya R. P., Andreeva Z. M., Ankirskaya A. S., Balakhovsky I. S., Belokrinitzky D. V., Voropaeva S. D., Garanina E. N., Lukicheva T. I., Pletneva N. G., Smolyanitsky A. I. *Laboratornye metody issledovaniya v klinike* [Laboratory Methods of a Research in the Clinic]. Moscow, Meditsina Publ., 1987. 368 p. (in Russian).

Mineeva O. V., Mineev A. K. Disorders of blood leukocyte formula in the lake frog of the Saratov reservoir. *Vestnik Nizhegorodskogo Universiteta im. N. I. Lobachevskogo*, 2011, vol. 2, no. 2, pp. 94–97 (in Russian).

Standards of Quality of Water of Water Objects of Fishery Value, Including Standards of Threshold Limit Values of Harmful Substances in Waters Water Objects of Fishery Value (approved by the order of the Federal Fishery Agency on 18 January 2010, no. 20). Moscow, 2010. 90 p. (in Russian).

Peskova T. Yu. *Impact of Anthropogenic Environment Pollution on Amphibians*. Volgograd, Volgograd State Pedagogical University Publ., 2001. 156 p. (in Russian).

Peskova T. Yu. The influence of mixtures of heavy metal salts on tadpoles of anurans. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2003, no. 1, pp. 157–164 (in Russian).

RD 52.24.643-2002. *Metod kompleksnoi otsenki stepeni zagriaznennosti poverkhnostnykh vod po gidrokhimicheskim pokazateliam / Rosgidromet* [Method for a Comprehensive Assessment of the Degree of Pollution]. Rostov-on-Don, Rosgydromet Publ., 2002. 56 p. (in Russia)

Romanova E. B., Nikolaev V. Yu., Gelashvili D. B. Ecological aspects of the immune system of amphibians. *Current Studies in Herpetology*, 2014, vol. 14, iss 3–4, pp. 126–133 (in Russian).

Sils E. A. Population characteristics of hematological parameters of the peripheral blood of postmetamorphic *Rana ridibunda* Pall. in urbanized areas. *Russian Journal of Ecology*, 2010, vol. 41, no. 2, pp. 189–191.

Tkachenko Ye. A., Derkho M. A. Leukocytic indices in experimental cadmium intoxication of mice. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*, 2014, no. 3, pp. 81–83 (in Russian).

Shitikov V. K., Rozenberg G. S. *Randomizatsiya i butstrep: statisticheskij analiz v biologii i jekologii s ispol'zovaniem R*. [Randomization and Bootstrap: Statistical Analysis in Biology and Ecology Using R]. Togliatti, Kassandra Publ., 2014. 314 p. (in Russian).

Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 1997, vol. 25, iss. 22, pp. 4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>

Akin Peksen Ç. *Molecular evolution and phylogeography of the Eastern Mediterranean water frog (Pelophylax) complex*. PhD Thesis. Ankara, School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, 2015. 342 p.

Akin Ç., Can Bilgin C., Beerli P., Westaway R., Ohst T., Litvinchuk S. N., Uzzell T., Bilgin M., Hotz H., Guex G.-D., Plötner J. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *Journal of Biogeography*, 2010, vol. 37, iss. 11, pp. 2111–2124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02368.x>

Cabagna M. C., Lajmanovich R. C., Stringhini G., Sanchez-Hernandez J. C., Peltzer P. M. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agro ecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology*, 2005, vol. 2, pp. 373–380.

Coico R., Sunshine G., Benjamini E. *Immunology. A Short Course*. Hoboken, Wiley-Liss Publ., 2003. 237 p.

Das S., Nikolaidis N., Klein J., Nei M. Evolutionary redefinition of immunoglobulin light chain isotypes in tetrapods using molecular markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, pp. 16647–16652.

Davis A. K., Maney D. L., Maerz J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology*, 2008, vol. 22, iss. 5, pp. 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>

Ermakov O., Ivanov A., Titov S., Svinin A., Litvinchuk S. N. New multiplex PCR method for identification of east European green frog species and their hybrids. *Russian Journal of Herpetology*, 2019, vol. 26, no. 6, pp. 367–370. <https://doi.org/10.30906/1026-2296-2019-26-6-367-370>

Geisberger R., Lamers M., Achatz G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology*, 2006, vol. 118, pp. 429–437.

International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Geneva, Switzerland, Council for International Organization of Medical Sciences Publ., 2012. 4 p.

Khokhlova I. S., Spinu M., Krasnov B. R., Degen A. A. Immune response to fleas in a wild desert rodent: Effect of parasite species, parasite burden, sex of host and host parasitological experience. *Journal of Experimental Biology*, 2004, vol. 207, pp. 2725–2733.

Litvinchuk S. N., Ivanov A. Yu., Lukonina S. A., Ermakov O. A. A record of alien *Pelophylax* species and widespread mitochondrial DNA transfer in Kaliningradskaya Oblast' (the Baltic coast, Russia). *Bioinvasions Records*, 2020, vol. 9, no. 3, pp. 599–617. <https://doi.org/10.3391/bir.2020.9.3.16>

Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: P. W. Hochachka, T. P. Mommsen, eds. *Molecular Biology Frontiers, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. New York, Amsterdam, Elsevier Press, 1993, vol. 2, pp. 1–38.

Ohta Y., Flajnik M. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, pp. 10723–10728.

Peskova T. Ju., Bachevskaya O. N., Plotnikov G. K. Hematological indices of the lake frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Ranidae, Anura) inhabiting reservoirs in the Northwestern Ciscaucasia with various pollution types. *Current Studies in Herpetology*, 2019, vol. 19, no. 1–2, pp. 40–45. <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2019-19-1-2-40-45>

Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Spolsky C., Ohst T., Litvinchuk S. N., Guex G.-D., Reyer H.-U., Hotz H. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: A case in western Palearctic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology*, 2008, vol. 21, no. 3, pp. 668–681. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01527.x>

Plötner J., Köhler F., Uzzell T., Beerli P., Schreiber R., Guex G.-D., Hotz H. Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5 truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, vol. 53, iss. 3, pp. 784–791.

R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, 2020. Available at: <http://www.R-project.org> (accessed 17 December 2020).

Robert J., Ohta Y. Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. *Developmental Dynamics*, 2009, vol. 238, iss. 6, pp. 1249–1270.

Svinin A. O., Dedukh D. V., Borkin L. J., Ermakov O. A., Ivanov A. Yu., Litvinchuk J. S., Zamaletdinov R. I., Mikhaylova R. I., Trubyanov A. B., Skorinov D. V., Rosanov Yu. M., Litvinchuk S. N. Genetic structure, morphological variation, and gametogenic peculiarities in water frogs (*Pelophylax*) from northeastern European Russia. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2021, vol. 59, iss. 3, pp. 646–662. <https://doi.org/10.1111/jzs.12447>

Warr G. W., Magor K. E., Higgins D. A. IgY: Clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 1995, vol. 16, pp. 392–398.