

# ОЦЕНКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЯ АМФИБИОНТОВ ФАУНЫ УРАЛА *SALAMANDRELLA KEYSERLINGII* (CAUDATA, AMPHIBIA)

Л. А. Ковальчук<sup>1,\*</sup> , Л. В. Черная<sup>1</sup> , В. А. Мищенко<sup>1</sup> , Д. Л. Берзин<sup>1</sup> , Н. В. Микшевич<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Институт экологии растений и животных УрО РАН, Россия

\*e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

<sup>2</sup>Уральский государственный педагогический университет, Россия

Поступила: 26.05.2022. Исправлена: 30.08.2022. Принята к опубликованию: 02.09.2022.

Впервые представлены результаты исследований гематологических и биохимических параметров охраняемого вида фауны Среднего Урала, *Salamandrella keyserlingii* (Caudata, Amphibia). В качестве объектов исследования использованы весенние и летние особи самцов *S. keyserlingii* ( $n = 30$ ), обитающие на особо охраняемой природной территории «Калиновский лесной парк» Свердловской области (Россия) в городской агломерации г. Екатеринбурга. Лейкоцитарный состав крови *S. keyserlingii* представлен гранулоцитами (нейтрофилы: юные, палочкоядерные, сегментоядерные; базофилы, эозинофилы) и агранулоцитами (моноциты и лимфоциты). Периферическая кровь амфибионтов характеризуется преобладанием агранулоцитов, обеспечивающих иммунный надзор и избирательную реактивность организма (адаптивный иммунитет) как в весенний (55.7%), так и летний (60.3%) сезоны ( $p < 0.001$ ). Содержание гранулоцитов, обеспечивающих неспецифическую срочную защиту организма от инфекций и токсических воздействий, находится у самцов в диапазоне 39.3–44.4%. В весенний и летний периоды лейкоцитарная формула периферической крови хвостатых амфибий имеет высокий лимфоидный профиль (52.4–56.7%). Отмечена сезонная изменчивость интегрального лейкоцитарного индекса (ИСЛ) *S. keyserlingii*: 0.80 весной и 0.65 летом. Впервые дана характеристика полного спектра свободных аминокислот (заменимые и незаменимые) в плазме крови *S. keyserlingii* с позиции их участия в процессах иммуномодуляции и формирования адаптивных реакций, обеспечивающих выживание и эврибионтность вида в широком температурном диапазоне. Аминокислотный фонд плазмы крови амфибий представлен 17 аминокислотами (АК): аланин, серин, треонин, лизин, лейцин, валин, глицин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, гистидин, метионин, пролин, фенилаланин, цистин, тирозин, изолейцин. Анализ метаболических групп АК в плазме крови *S. keyserlingii* показывает высокое процентное содержание гликогенных (82.1%) и незаменимых (53.4%) АК. Высокое содержание АК в крови указывает на их востребованность в процессах синтеза белка, активное участие, как в иммунных процессах, так и в процессах детоксикации и формирования адаптивных реакций в летний период роста и развития амфибий. Полученные результаты исследований гематологических и биохимических показателей крови *S. keyserlingii* существенно расширяют понимание механизмов адаптации амфибионтов, что имеет несомненный теоретический интерес и прикладное значение при разработке природоохранных мероприятий в системе мониторинга природных и искусственных водных экосистем.

**Ключевые слова:** аминокислоты, лимфоциты, периферическая кровь, сибирский углозуб, хвостатые амфибии

## Введение

Сокращение численности популяций амфибионтов происходит во всех регионах мира, что сопровождается общим снижением глобального биоразнообразия, которое многие исследователи оценивают как массовое вымирание (Global Amphibian Assessment, 2004; Hussain & Pandit, 2012). Международный союз охраны природы (МСОП) указывает на катастрофическое исчезновение хвостатых и бесхвостых амфибий, что усугубляет кризис популяционной устойчивости гидробионтов различных пресноводных экосистем. В отчете Красного списка МСОП с 2017–2020 гг. включены дополнительно 10% видов амфибий, находящихся под угрозой исчезновения (IUCN, 2020). Среди всех классов

позвоночных животных до трети (32%) видов земноводных находятся под угрозой исчезновения, а почти 42% известных видов амфибий испытывают сокращение численности их популяций (Stuart et al., 2004; Whittaker et al., 2013).

На жизнеспособность популяций амфибий влияют многочисленные природные факторы, включая изменение климата (Pounds et al., 2006; Li et al., 2013), потерю и фрагментацию среды обитания под усиливающимся техногенным прессом (Gallant et al., 2007; Strayer & Dudgeon, 2010), инфекционные и эпидемические заболевания, вызванные, в том числе глобальным потеплением (Bosch & Martínez-Solano, 2006; Alford et al., 2007; Rohr et al., 2008). Сокращение природных популяций и численности амфибий

происходит при массовом и неконтролируемом, в том числе браконьерском вылове их с целью контрабанды (Ляпустин, 2008; Ляпустин, Фоменко, 2010). Амфибии, будучи индикаторными видами, могут служить моделью для понимания процессов сокращения видового разнообразия и численности популяций (Ananjeva et al., 2015), поскольку образуют жизненно важные звенья во многих трофических сетях. В некоторых экосистемах они формируют основную биомассу позвоночных или занимают промежуточное положение в пищевых цепочках. Водные личиночные амфибии от травоядных до всеядных (большинство Anura) или плотоядных (Caudata и Apoda) служат пищей для широкого спектра позвоночных и беспозвоночных хищников. Учитывая важную роль амфибий в экосистемах, сокращение их численности или вымирание может иметь значительные последствия и для других видов животных.

Одним из ярких представителей видов-амфибионтов в пресноводных экосистемах Урала является *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870 (Caudata, Amphibia), который встречается во всех климатогеографических природных зонах Урала. На Среднем Урале вид имеет охраняемый статус (Красная книга Свердловской области, 2018), внесен в приложение III к Бернской конвенции. Этот представитель хвостатых земноводных (категория 4) классифицируется как малочисленный вид, подлежащий охране в заповедниках «Висимский», «Денежкин Камень» и на особо охраняемых природных территориях (ООПТ) Урала. Согласно нормативным и природоохранным документам министерства природных ресурсов и экологии Свердловской области, отлов *S. keyserlingii* в коллекционных и коммерческих целях запрещен.

В последнее десятилетие наблюдается увеличение объема исследований, направленных на изучение многочисленных и разнообразных факторов, связанных с сокращением численности амфибионтов. Хотя во многих областях здесь достигнут значительный прогресс, проблемы остаются. Представители первых наземных позвоночных, а именно хвостатые амфибии рода *Salamandrella* являются объектом активных экологических исследований (Большаков, Вершинин, 2005; Куранова, Фокина, 2008; Змева, 2009; Вершинин, 2014; Berman et al., 2016; Соломонов и др., 2018; Ярцев, Евсеева, 2018; Булахова и др., 2021). Тем не менее, некоторые вопросы остаются не охваченными. Так, *S.*

*keyserlingii* – вид, обладающий высокой экологической пластичностью и гомеостатическими возможностями, остается наименее исследованным в отношении метаболического обеспечения срочной адаптации земноводных к постоянно изменяющимся условиям среды (Berman et al., 2016). *Salamandrella keyserlingii* обитает повсеместно в поймах рек и озер в экосистемах целых континентов. Взрослые животные всю жизнь проводят на суше в прибрежной полосе нерестовых водоемов, за исключением короткого периода размножения. Расселение происходит как благодаря сезонным изменениям гидрологического режима водоемов, так и активным путем. При этом *S. keyserlingii* заселяют мелководные прибрежные участки водоемов. Длительного пребывания на солнце не переносят и при температуре в тени около +27°C погибают. Хвостатые амфибии, как в период водной фазы, так и в наземную фазу жизненного цикла отличаются способностью потреблять в пищу не только наиболее массовые виды наземных беспозвоночных, но и водных. Это позволяет особям этого вида переключаться на питание гидробионтами в условиях дефицита наземных форм добычи. Как типично лесной вид, плохо переносит трансформацию мест обитания под воздействием антропогенных факторов (Литвинов и др., 2010). Его численность в лесопарковой зоне пригорода г. Екатеринбурга за последние 40 лет снизилась более чем в 16 раз (Vershinin et al., 2015). Исследователи отмечают резистентность *S. keyserlingii* к экстремально отрицательным температурам (от -35°C до -37.5°C) (Берман и др., 1984). Авторы отмечают адаптивную стратегию длительного пребывания *S. keyserlingii* в условиях низко отрицательных температур, несомненно, поддерживающую как стабильное выживание амфибионтов, так и успешное расширение их ареала в холодном регионе Палеарктики (Куницын, 2009; Alfimov & Berman, 2010; Berman et al., 2016; Соломонов и др., 2018; Булахова и др., 2021).

Для понимания эволюции и экологии геротермных животных важно изучение существующих в природе физиологических и биохимических механизмов, способствующих получению характеристик популяционного гомеостаза, обеспечивающего выживание и существование животных в условиях антропогенного средового стресса. В процессе эволюции сформирована достаточно совершенная система крови у первых наземных позвоночных, амфибий и рептилий, позволяющая оценить функ-

циональное состояние организма как в норме, так и при действии экстремальных биотических и абиотических факторов среды (Cooper et al., 1985; Coico et al., 2003; Fournier et al., 2005; Davis et al., 2008; Zimmerman et al., 2010; Николаев, Романова, 2016; Романова и др., 2018). Амфибии делают определенный прорыв в совершенствовании системы адаптивного иммунитета, что связано с их переходом от водного образа жизни к наземному и необходимостью иметь защиту от новых чужеродных агентов окружающей среды. Известно, что в адаптации организма к условиям среды непосредственно участвует иммунная система, являющаяся ключевой гомеостатической структурой наряду с нервной и эндокринной системами организма (Хаитов, 2013). Следует отметить, что роль иммунной системы с защитными или цензорными функциями в регуляции физиологических процессов у представителей герпетофауны практически не исследована.

Одним из наиболее информативных и адекватных биохимических показателей физиологического состояния животных и их адаптивных возможностей является уровень аминокислотного обмена в тканях (Wu, 2009; Гараева и др., 2009; Karanova, 2011; Каранова, 2020). Регуляторная роль свободных аминокислот (АК) показана в формировании адаптивной стратегии животных, обеспечивающая устойчивость популяционного гомеостаза в условиях как водного, так и наземного микроклимата (Chernaya et al., 2016; Kovalchuk et al., 2018a,b, 2021a,c).

Для оценки их экологической безопасности и создания условий для устойчивого развития требуются непрерывные и надежные технологии диагностики физиологического состояния животных и среды их обитания. Эколого-физиологические исследования *S. keyserlingii* позволяют не только оценить степень адаптивного потенциала животных, но и составить возможный сценарий преобразования структуры сообществ и популяций в условиях дестабилизированной среды Уральского региона.

Целью исследования была оценка гематологических и биохимических параметров представителя хвостатых амфибий Урала *S. keyserlingii*, обитающего на ООПТ «Калиновский лесной парк» Свердловской области (Россия).

### Материал и методы

В качестве объектов исследования использованы половозрелые самцы *S. keyser-*

*lingii*, отловленные в последней декаде июля 2019 г. ( $n = 14$ ) и в первой декаде мая 2020 г. ( $n = 16$ ) на ООПТ «Калиновский лесной парк» (56.89611° N, 60.65333° E) Свердловской области в городской агломерации г. Екатеринбурга (Россия). Климат района исследования континентальный с продолжительной холодной зимой и сравнительно теплым коротким летом. В период отлова животных температура в нерестовом водоеме (Калиновский пруд) составляла весной +11°C, летом +17°C при средне-суточной температуре воздуха +15°C и +23°C, соответственно. Для изучения лейкоцитарной формулы использовали 20 особей *S. keyserlingii* (9 особей летом 2019 г., 11 особей весной 2020 г.), содержание гемоглобина и особенности аминокислотного спектра плазмы крови исследовали у самцов, отловленных в июле 2019 г. ( $n = 10$ ).

Отлов *S. keyserlingii* проводился как с помощью гидробиологического сачка (нерестовый водоем), так и вручную (наземные укрытия прибрежной зоны). Животных без признаков заболеваний доставляли в лабораторию в отдельных контейнерах с влажным мхом в день отлова и сразу проводили камеральную обработку. Отлов и содержание животных в лаборатории осуществляли в соответствии с правилами по защите животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Council of Europe, 1986; Yarri, 2005).

Исследуемых особей *S. keyserlingii* ( $n = 30$ ) взвешивали на электронных весах Shimadzu BL-2200H (Japan) с точностью  $\pm 0.01$  г и измеряли штангенциркулем. Масса тела амфибий из весенней выборки составила  $5.88 \pm 0.57$  г при средней длине тела  $6.16 \pm 0.16$  см; для летней экспериментальной группы животных эти морфометрические параметры составили  $5.85 \pm 0.66$  г и  $5.59 \pm 0.30$  см, соответственно. Согласно литературным данным, размеры тела взрослых особей *S. keyserlingii* составляют 5.8–7.6 см (Кузьмин, 2012; Воробьева, 1994). Учитывая, что *S. keyserlingii* имеет небольшие максимальные размеры тела, а половой диморфизм в окраске не выражен, репродуктивный статус и пол экспериментальных животных определяли по размерам гонад при вскрытии: у половозрелых самцов длина семенников составляет 1.1–1.2 см (Воробьева, 1994).

Забор цельной крови объемом 0.4–0.5 мл проводили из сердца с помощью одноканальной автоматической пипетки (Ленпипет БЛЭК, 20–200 мкл) в охлажденные вакуумтайнеры «Век-

ton Dickinson BP», обработанные антикоагулянтом КЗ-EDTA 15%, объемом 4.5 мл. От одной особи забирали в среднем 0.4–0.5 мл цельной крови и получали после центрифугирования 0.2 мл плазмы.

Показатели периферической крови животных определяли с помощью гематологического анализатора «BC-5800» (Mindray, China). Лейкоцитарную формулу подсчитывали (на 100 лейкоцитов) в мазках крови в трех повторностях, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Для приготовления препарата мазок крови на предметном стекле фиксировали 95% этиловым спиртом в течение 30 мин. Фиксированный препарат окрашивали разбавленным раствором краски Романовского-Гимзы (разведение 1 : 9) в течение 45 мин. Готовый препарат промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре (от +21°C до +23°C).

На основании лейкоцитарной формулы рассчитан интегральный лейкоцитарный индекс (ИСЛ – соотношение гранулоцитов и агранулоцитов в относительных единицах). ИСЛ позволяет оценить физиологическое состояние исследуемых особей и их адаптивный потенциал (Coico et al., 2003; Минеева, Минеев, 2014; Romanova et al., 2019; Kovalchuk et al., 2021b).

Содержание свободных АК в плазме крови животных определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на анализаторе Agilent 1260 Infinity II (Germany). Подготовку образцов проводили по стандартной методике (James, 1987). Кровь центрифугировали при 8000 оборотов/мин. в течение 15 мин., 0°C в рефрижераторной ультрацентрифуге К-23 D. После окончания центрифугирования плазму аспирировали в полиэтиленовую пробирку, где проводили ее депротенинизацию: к 0.2 мл супернатанта (плазмы) добавляли 0.1 мл 30% сульфосалициловой кислоты. Вторично центрифугировали содержимое пробирки при 10 000 оборотов/мин. в течение 30 мин., 0°C. Супернатант (400  $\mu$ л), подготовленный для проведения анализа, наносили на колонку хроматографа.

Разделение смеси АК производилось с помощью колонки на основе носителя С18, привитого на высокочистую силикагелевую основу. Погрешность прибора составляет 1–5% от измеряемой величины. Хроматограф укомплектован многоволновым детектором и оснащен аналитической колонкой с обращенной фазой Agilent ZORBAX Eclipse AAA 4.6  $\times$  150 мм 3.5- $\mu$ Сi. Применялось градиентное элюирование двумя

элюентами. В качестве первого элюента использовался фосфатный буфер на основе Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> концентрацией 0.5 М, а в качестве второго элюента была использована смесь ацетонитрил : метанол : вода в соотношении 45 : 45 : 10. Скорость элюирования – 2 мл/мин., температура колонки поддерживалась на 40°C. Перед началом измерений проводилась калибровка хроматографа стандартом АК производства компании Agilent Technologies. В калибровке были использованы следующие АК: аспарагиновая, глутаминовая, серин, гистидин, глицин, треонин, аргинин, аланин, тирозин, цистин, валин, метионин, фенилаланин, изолейцин, лейцин, лизин, пролин.

Для каждого исследуемого образца на хроматограмме прописан весь спектр АК. Концентрации свободных АК представлены в мкмоль/л и в процентах (%) от суммарного содержания. Рассчитаны суммарные концентрации следующих метаболических групп: заменимые АК (ЗАК), незаменимые АК (НАК), соотношение незаменимых АК к заменимым ( $K_{\text{НАК/ЗАК}}$ ), гликогенные АК (ГТАК), АК с разветвленной углеродной цепью АК (валин, изолейцин, лейцин) (АКРУЦ), ароматические АК (тирозин, фенилаланин) (АПАК), серосодержащие АК (метионин, цистеин) (ССАК). Выполнен анализ 85 аминокислотных проб.

Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ Statistica v. 10.0 (StatSoft Inc., USA). Рассчитывали среднее арифметическое и ошибку среднего бутстреп-распределения ( $\bar{X}_{\text{boot}} \pm SE_{\text{boot}}$ ), доверительный интервал бутстреп-распределения (95% CI<sub>boot</sub>). Независимые группы сравнивались с помощью дисперсионного анализа с перестановочным тестом (Permutation ANOVA;  $p = \Pr(|F_{\text{ran}}| \geq F_{\text{obs}})$ ), последующие (post-hoc) межгрупповые сравнения проведены с помощью критерия Тьюки с перестановочным тестом (Permutation Tukey's) (Шитиков, Розенберг, 2014). Метод главных компонент (РСА) реализован посредством статистической среды R v. 3.1.2 (R Core Team, 2020) с использованием пакетов vegan (Oksanen et al., 2020) и ade4 (Chessel et al., 2004; Dray et al., 2022).

### Результаты и обсуждение

Исследования периферической крови амфибионтов в летний период показали содержание гемоглобина (Hb) у *S. keyserlingii* среднеуральской популяции:  $59.8 \pm 3.3$  г/л. Показатели содержания гемоглобина соответствуют значениям, приведенным в работах отечественных

исследователей (Силс, 2008; Вафис, Пескова, 2009; Vershinin & Vershinina, 2013).

Необходимо отметить, что у *S. keyserlingii*, как и у всех позвоночных, лейкоцитарные клетки периферической крови ответственны за проявление реакций как естественного иммунитета, так и приобретенного иммунного ответа. В состав лейкоцитарной формулы входят лимфоциты, как одна из наиболее объемных групп иммунокомпетентных клеток. Лейкоцитарный состав крови *S. keyserlingii* представлен двумя группами клеток: гранулоцитами (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), определяющими реакции врожденного иммунитета, и агранулоцитами (моноциты, лимфоциты), ответственными за реакции адаптивного иммунного ответа (Coico et al., 2003; Хаитов, 2013). В весенний и летний периоды в периферической крови хвостатых амфибий отмечается повышенное содержание лимфоцитов (52.4–56.7%), обеспечивающее значительную эффективность клеточного иммунитета ( $p = 0.001$ ) (табл. 1).

Лимфоциты, как основа гуморального иммунитета, ограничивают распространение инфекций, участвуя в адекватном иммунологическом ответе организма. Показаны значимые сезонные различия *S. keyserlingii* по содержанию гранулоцитов и агранулоцитов, отражающих взаи-

мосвязь эффекторных механизмов иммунной системы животных. Периферическая кровь характеризуется преобладанием агранулоцитов, обеспечивающих иммунный надзор и избирательную реактивность организма (адаптивный иммунитет) в весенний (55.7%) и летний (60.3%) сезоны ( $p = 0.004$ ). Лимфоцитарно-гранулоцитарный состав периферической крови амфибий характеризуется невысокой долей гранулоцитов (39.3–44.4%) ( $p = 0.001$ ). В летний период в периферической крови *S. keyserlingii* отмечается тенденция к снижению доли гранулоцитов при возрастании агранулоцитов (табл. 1).

Показательна активная неспецифическая защита организма от токсических воздействий, вирусных и бактериальных инфекций у *S. keyserlingii* весной, что обеспечивается повышенным уровнем нейтрофилов ( $p = 0.001$ ) (табл. 1). У летних особей *S. keyserlingii* значимо возрастает содержание юных нейтрофилов в 1.5 раза и палочкоядерных нейтрофилов в 1.7 раза ( $p = 0.001$ ). Отмечена также разнонаправленность сезонной динамики сегментоядерных нейтрофилов в крови *S. keyserlingii*. Доля сегментоядерных нейтрофилов снижается в 3.4 раза ( $p = 0.001$ ) в летний период наземной фазы жизненного цикла *S. keyserlingii* (табл. 1).

**Таблица 1.** Лейкоцитарный состав периферической крови самцов среднеуральской популяции *Salamandrella keyserlingii* ( $\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$  (95% CI<sub>boot</sub>))

**Table 1.** Leukocyte composition of the peripheral blood of males from the Middle-Ural population of *Salamandrella keyserlingii* ( $\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$  (95% CI<sub>boot</sub>))

Показатели	Весна (n = 11)	Лето (n = 9)	p-value
Нейтрофилы, %	40.6 ± 1.0 (38.8–42.6)	33.4 ± 0.6* (32.3–34.4)	0.001
юные нейтрофилы, %	6.2 ± 0.3 (5.7–6.7)	9.3 ± 0.4* (8.6–10.0)	0.001
палочкоядерные нейтрофилы, %	10.1 ± 0.4 (9.3–10.9)	17.1 ± 0.3* (16.4–17.8)	0.001
сегментоядерные нейтрофилы, %	23.8 ± 0.6 (22.7–24.9)	7.1 ± 0.5* (6.1–8.0)	0.001
Эозинофилы, %	3.8 ± 0.2 (3.4–4.3)	5.9 ± 0.3* (5.4–6.3)	0.001
Базофилы, %	0.1 ± 0.0 (0.1–0.1)	0.1 ± 0.0 (0.1–0.1)	0.60
Моноциты, %	3.3 ± 0.2 (2.9–3.7)	3.6 ± 0.2 (3.3–3.9)	0.60
Лимфоциты, %	52.4 ± 1.0 (50.4–54.4)	56.7 ± 0.8* (55.2–58.1)	0.001
Гранулоциты, %	44.4 ± 1.0 (42.5–46.5)	39.3 ± 0.6* (38.1–40.5)	0.001
Агранулоциты, %	55.7 ± 1.2 (53.4–57.9)	60.3 ± 0.9* (58.7–61.9)	0.004
ИСЛ	0.80	0.65	

Примечание: \* – статистически значимые сезонные различия ( $p < 0.05$ ); ИСЛ – интегральный лейкоцитарный индекс.

Note: \* – Statistically significant differences between the groups ( $p < 0.05$ ); ИСЛ – integral leukocyte index.

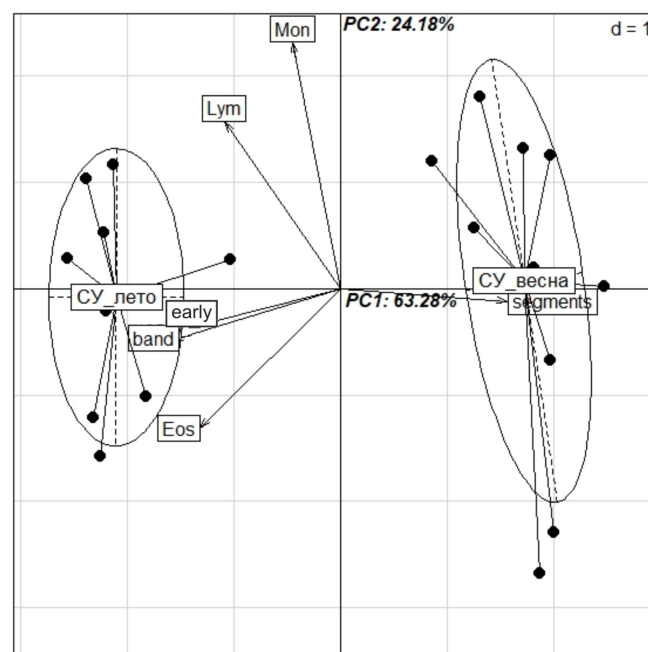
Эозинофилы, как функционально активные клетки крови, обладая фагоцитарной и бактерицидной активностью, реализуют противогельминтную иммунную защиту (LaFonte & Johnson, 2013). В летний период активация эозинофильного гранулоцитопоза в крови самцов *S. keyserlingii* возросла в 1.6 раза ( $p = 0.001$ ), что может свидетельствовать как об антиоксидантной, так и антимикробной реакции в организме амфибий, обитающих на территории городской агломерации (Минева, Минеев, 2011; Романова и др., 2013).

В периферической крови половозрелых *S. keyserlingii* в весенний (0.1%) и летний (0.1%) периоды отмечено значимое отсутствие различий по содержанию участников клеточных воспалительных и аллергических реакций, базофильных лейкоцитов. У самцов *S. keyserlingii* в весенне-летний период жизненного цикла отмечается активация моноцитов, продуцирующих провоспалительные цитокины – эндогенные регуляторы гемопоэза и клеточно-опосредованного иммунного ответа (Fournier et al., 2005; Davis et al., 2008; Zimmerman et al., 2010). Сезонных различий в лейкограммах исследуемых животных как по содержанию моноцитов ( $p = 0.60$ ), так и по содержанию базофилов ( $p = 0.60$ ) не выявлено, что свидетельствует об идентичности адаптивных механизмов исследуемых групп гидробионтов. Высокий показатель ИСЛ (0.80) для *S. keyserlingii* в весенний период по сравнению с ИСЛ *S. keyserlingii* летнего периода (0.65) подтверждает более выраженную реактивность системы врожденного иммунитета, обеспечивающей неспецифическую срочную защиту организма от патогенных антигенов среды обитания.

Метод главных компонент (РСА) позволяет визуализировать сезонную изменчивость показателей лейкоцитарной формулы *S. keyserlingii* (рис. 1, табл. 2). По первой главной компоненте (PC1), на которую приходится 63.28% общей дисперсии данных, показана пространственная дифференциация сезонных групп *S. keyserlingii*, согласно процентному содержанию изучаемых параметров. Наибольший вклад в сезонные различия лейкоцитарной формулы амфибий по PC1 вносят сегментоядерные (24.87%), палочкоядерные (23.06%) и юные нейтрофилы (20.32%), для которых характерны и наиболее высокие значимые ( $p < 0.001$ ) коэффициенты корреляции с

PC1: 0.97, -0.94, -0.88, соответственно. Вторая главная компонента (PC2), на которую приходится 24.18% дисперсии данных, демонстрирует внутривидовую неоднородность особей исследуемых групп амфибий по параметрам лейкоцитарной формулы (рис. 1, табл. 2).

Аминокислотный фонд плазмы крови *S. keyserlingii* представлен 17 свободными АК (табл. 3). Доминирующими АК являются гликогенный аспартат, гистидин, цистеин, лизин, их суммарное содержание составляет 50.1% от общего фонда свободных АК. Значительная аккумуляция этих АК позволяет предполагать их резервную роль в обеспечении низкотемпературной адаптации *S. keyserlingii* в условиях широкой амплитуды сезонных колебаний температур водной и наземной среды их обитания (Karanova, 2011; Каранова, 2020).



**Рис. 1.** Параметры лейкоцитарной формулы самцов *Salamandrella keyserlingii* в разные сезоны года (весна, лето) в пространстве первых двух главных компонент. Условные обозначения: PC1, PC2 – оси главных компонент, % – доля дисперсии данных, объясненных главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями (лейкоциты); эллипсы представляют собой 95% доверительные области; early, band, segments – юные, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, соответственно; Lym – лимфоциты; Mon – моноциты; Eos – эозинофилы.

**Fig. 1.** Parameters of the leukocyte formula of *Salamandrella keyserlingii* males in various seasons (spring and summer) in the space of the first two principal components. Designations: PC1, PC2 – axes of the main components, % – percentage of data variation explained by the main components; arrows reflect the correlation of the main components with the initial indicators (leukocytes); ellipses represent 95%-confidence areas; early, band, segments represent types of neutrophils; Lym – lymphocytes; Mon – monocytes; Eos – eosinophils.

**Таблица 2.** Результаты компонентного анализа лейкоцитарной формулы самцов *Salamandrella keyserlingii* в различные сезоны года**Table 2.** Results of the component analysis of the leukocyte formula of *Salamandrella keyserlingii* males in various seasons of the year

Показатели ( $i = 6$ )	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$ , %)	
	Главные компоненты (Principal components – PC), $j = 1, 2$			
	1	2	1	2
Юные нейтрофилы	-0.88***	-0.14	20.32***	1.35*
Палочкоядерные нейтрофилы	-0.94***	-0.18	23.06***	2.17
Сегментоядерные нейтрофилы	0.97***	-0.05	24.87***	0.15
Эозинофилы	-0.82***	-0.50*	17.65***	17.65*
Моноциты	-0.28	0.89***	2.07	54.08***
Лимфоциты	-0.68**	0.60**	12.03**	24.88**
	Собственные значения (eigen-values, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	3.80	1.45	63.28	24.18

Примечание: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .Note: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .**Таблица 3.** Свободные аминокислоты в плазме крови самцов *Salamandrella keyserlingii* (лето) ( $\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$  (95% CI<sub>boot</sub>))**Table 3.** Free amino acids in the blood plasma of *Salamandrella keyserlingii* males in summer ( $\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$  (95% CI<sub>boot</sub>))

Аминокислоты	мкмоль/л	Доля (%) от фонда АК
Аспарагиновая кислота	146.7 ± 5.3 (132.0–161.4)	13.5 ± 0.4 (12.3–14.7)
Глутаминовая кислота	27.1 ± 0.4 (25.9–28.3)	2.5 ± 0.1 (2.3–2.7)
Серин	31.1 ± 0.8 (28.8–33.4)	2.9 ± 0.1 (2.6–3.1)
Гистидин	188.9 ± 5.1 (174.9–203.1)	17.4 ± 0.5 (15.9–18.9)
Глицин	89.7 ± 2.6 (82.5–96.9)	8.3 ± 0.2 (7.8–8.7)
Треонин	35.4 ± 0.8 (33.3–37.6)	3.3 ± 0.1 (3.0–3.6)
Пролин	следы	–
Аргинин	78.6 ± 4.0 (67.5–89.8)	7.2 ± 0.3 (6.5–8.0)
Аланин	85.1 ± 2.3 (78.6–91.6)	7.8 ± 0.2 (7.3–8.4)
Тирозин	21.8 ± 1.6 (17.2–26.3)	2.0 ± 0.1 (1.6–2.4)
Цистеин	105.2 ± 4.5 (92.6–117.8)	9.7 ± 0.3 (8.9–10.5)
Валин	31.9 ± 0.9 (29.6–34.3)	2.9 ± 0.1 (2.8–3.1)
Метионин	72.4 ± 2.2 (66.3–78.6)	6.7 ± 0.2 (6.1–7.2)
Фенилаланин	27.4 ± 0.9 (24.9–29.8)	2.5 ± 0.1 (2.3–2.8)
Изолейцин	7.7 ± 0.2 (7.2–8.2)	0.7 ± 0.0 (0.6–0.8)
Лейцин	33.8 ± 1.1 (30.9–36.8)	3.1 ± 0.1 (2.8–3.4)
Лизин	103.3 ± 1.2 (99.9–106.6)	9.5 ± 0.2 (9.1–9.9)

В достаточно короткий на Урале летний период активного роста и развития у амфибионтов отмечено высокое содержание алифатической АК аланина (85.1 мкмоль/л) и глицина (89.7 мкмоль/л), что может быть связано с возросшими потребностями животных в фибриллярных белках – коллагене и эластине. Известно, что коллаген как основной структурный белок соединительной ткани содержит 33% глицина и 13% аланина (Северин, 2004). Аспарагиновая кислота, аланин и глицин (29.6%) участвуют в поддержании как азотистого баланса, так и постоянного уровня глюкозы, что обеспечивает организм необходимым количеством энергии, требуемой в процессах размножения и жизнеобеспечения. Исследователи отмечают, что повышенное содержание аргинина (78.6 мкмоль/л) и гистидина (188.9 мкмоль/л) связано с активным участием в синтезе гемоглобина и сопровождается стимуляцией фагоцитарной активности нейтрофилов, реализуясь в дифференцировке В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов у самцов (Wu, 2009). Повышенное содержание в плазме крови глицина вместе с глутаминовой кислотой и цистеином (20.5%) обеспечивают животным биосинтез трипептида – глутатиона, антиоксиданта, участвующего как в реакциях детоксикации продуктов метаболизма амфибий, так и в процессах размножения животных (Мазо, 1998; Forman et al., 2008).

Фонд свободных АК в плазме крови у *S. keyserlingii* составляет  $1086.1 \pm 15.4$  мкмоль/л, обеспечивая значимый уровень метаболических процессов (табл. 4). Анализ метаболиче-

ских групп АК в плазме крови исследованных амфибионтов показывает высокое процентное содержание (53.4%) функционально значимых незаменимых АК: аргинин, валин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин (табл. 3, табл. 4). На баланс азотистого и белкового обмена указывает высокий коэффициент отношения незаменимых АК к заменимым:  $K_{\text{НАК/ЗАК}} = 1.14$ . Эти важнейшие компоненты мышечной ткани представляют резервный источник энергии, повышающий выносливость амфибионтов во время интенсивных нагрузок и стресса. Незаменимые АК участвуют как в интенсивном наращивании мышечной массы, так и обеспечивают гормональную поддержку в период летнего роста и развития животных. Отмечена и значительная аккумуляция метаболически активных гликогенных АК (82.1%), способствуя активизации синтеза гликогена и глюкозы из других источников. Исследования показали значимое присутствие в крови АК с разветвленной цепью (лейцин, валин, изолейцин), защищающих мышечные волокна от окисления и деструкции (табл. 4)

Известно, что серосодержащим АК принадлежит связующая роль в интеграции основных метаболических процессов в организме, что связано не только с энергетическим обменом и участием в синтезе нуклеиновых кислот, коллагена и других белков, но и с обеспечением клеточного и гуморального иммунитета в периоды активного роста и развития (Северин, 2004). Серосодержащие АК цистеин и метионин (16.4%) выполняют ключевую роль и в процессах детоксикации.

**Таблица 4.** Метаболические группы свободных аминокислот в плазме крови самцов *Salamandrella keyserlingii* (лето) ( $\bar{X}_{\text{boot}} \pm SE_{\text{boot}}$  (95% CI<sub>boot</sub>))

**Table 4.** Metabolic groups of free amino acids in the blood plasma of *Salamandrella keyserlingii* males in summer ( $\bar{X}_{\text{boot}} \pm SE_{\text{boot}}$  (95% CI<sub>boot</sub>))

Аминокислоты	мкмоль/л	Доля (%) от фонда АК
Фонд свободных АК	$1086.1 \pm 15.4$ (1043.2–1128.9)	100
Гликогенные (ГГАК)	$892.2 \pm 14.5$ (851.8–932.5)	$82.1 \pm 0.3$ (81.3–83.0)
Заменимые (ЗАК)	$506.5 \pm 11.2$ (475.4–537.6)	$46.6 \pm 0.5$ (45.4–47.9)
Незаменимые (НАК)	$579.6 \pm 5.8$ (563.4–595.7)	$53.4 \pm 0.5$ (52.1–54.6)
С разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ)	$73.5 \pm 0.8$ (71.1–75.8)	$6.8 \pm 0.1$ (6.5–7.0)
Ароматические (АРАК)	$49.1 \pm 2.1$ (43.2–55.0)	$4.5 \pm 0.2$ (4.1–4.9)
Серосодержащие (ССАК)	$177.6 \pm 5.9$ (161.3–193.9)	$16.3 \pm 0.4$ (15.3–17.4)



### Заключение

На настоящий момент остается актуальной оценка и мониторинг экологического состояния популяций и сообществ симпатрических видов животных в связи с перманентно-возрастающими изменениями климатических условий среды, влияющих на численность и популяционный морфогенез в условиях дестабилизированной среды. В этой связи нами впервые представлены результаты исследований гематологических и биохимических параметров представителя герпетофауны Урала, *Salamandrella keyserlingii*. В состав лейкоцитарной формулы *S. keyserlingii* входят лимфоциты – одна из наиболее объемных групп иммунокомпетентных клеток, выполняющая функцию иммунного надзора в организме и отвечающая за формирование общего и специфического иммунитета. Лейкоцитарный состав крови *S. keyserlingii* представлен гранулоцитами (нейтрофилы: юные, палочкоядерные, сегментоядерные; базофилы, эозинофилы) и агранулоцитами (моноциты и лимфоциты). Показано, что периферическая кровь амфибионтов характеризуется преобладанием агранулоцитов, обеспечивающих иммунный надзор и избирательную реактивность организма (адаптивный иммунитет) как в весенний (55.7%), так и в летний (60.3%) сезоны ( $p = 0.004$ ). Лимфоцитарно-гранулоцитарный состав периферической крови *S. keyserlingii* характеризуется невысокой долей гранулоцитов (39.3–44.4%) и повышенным содержанием лимфоцитов (52.4–56.7%). Проведенный расчет ИСЛ подтвердил межсезонные различия в лейкоцитарном профиле исследованных амфибионтов: ИСЛ весной – 0.80, летом – 0.65. Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют впервые оценить гематологические параметры *S. keyserlingii*, иллюстрируя сезонную специфику эффекторных механизмов иммунной системы животных, обусловленную в свою очередь эколого-физиологическими особенностями амфибионтов из природных популяций Урала.

Впервые дана оценка содержанию свободных АК в плазме крови *S. keyserlingii* с позиции их участия в процессах иммуномодуляции и формирования адаптивных реакций, обеспечивающих выживание и эврибионтность вида в широком температурном диапазоне. Аминокислотный фонд плазмы крови амфибий представлен 17 АК. Анализ метаболических групп АК в плазме крови *S. keyserlingii* показывает высокое

процентное содержание гликогенных (82.1%) и незаменимых (53.4%) АК. Содержание АК в крови *S. keyserlingii* указывает на их востребованность и активное участие как в иммунных процессах и антиоксидантных реакциях, так и в процессах детоксикации ксенобиотиков и элиминации токсикантов в период роста и развития амфибий.

Полученные результаты исследований гематологических и биохимических показателей крови вносят существенный вклад в понимание механизмов адаптации амфибионтов к обитанию в перманентно изменяющихся условиях среды. Это имеет несомненный теоретический интерес и прикладное значение при разработке природоохранных мероприятий в системе мониторинга природных и искусственных водных экосистем.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН (№122021000091-2).

### Литература

- Берман Д.И., Лейрих А.Н., Михайлова Е.И. 1984. О зимовке сибирского углозуба *Hynobius keyserlingii* на Верхней Колыме // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. №3. С. 323–327.
- Большаков В.Н., Вершинин В.Л. 2005. Амфибии и рептилии Среднего Урала. Екатеринбург: Уральское отделение РАН. 126 с.
- Булахова Н.А., Михайлова Е.И., Берман Д.И. 2021. Фенология сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*, Caudata, Hynobiidae) в климатически различных районах северо-востока Азии // Природные ресурсы Арктики и Субарктики. Т. 26(2). С. 117–135. DOI: 10.31242/2618-9712-2021-26-2-8
- Вафис А.А., Пескова Т.Ю. 2009. Реакции крови озерной лягушки *Rana ridibunda* Pal. на воздействие сточных вод сахарных заводов // Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского. Т. 2(16). С. 8–18.
- Вершинин В.Л. 2014. Функциональные особенности популяций амфибий в градиенте урбанизации // Известия Самарского научного центра РАН. Т. 16(5–1). С. 344–348.
- Воробьева Э.И. (ред.). 1994. Сибирский углозуб (*Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870): Зоогеография, систематика, морфология. М.: Наука. 367 с.
- Гараева С.Н., Редкозубова Г.В., Постолати Г.В. 2009. Аминокислоты в живом организме. Кишнев: Типография Академии Наук Молдовы. 552 с.
- Змеева Д.В. 2009. Популяционная специфика репродуктивных показателей сибирского углозуба в ле-

- сопарковом поясе г. Екатеринбург // Эволюционная и популяционная экология (назад в будущее). Екатеринбург: УрО РАН. С. 62.
- Каранова М.В. 2020. Вторичные метаболиты и аспарагиновая кислота в мозге амфибий *R. temporaria* как низкотемпературные адаптогены // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. Т. 56(3). С. 207–212. DOI: 10.31857/S0044452920030043
- Красная книга Свердловской области: животные, растения, грибы. Екатеринбург: Мир, 2018. 450 с.
- Кузьмин С.Л. 2012. Земноводные бывшего СССР. М.: Т-во научных изданий КМК. 370 с.
- Куницын А.А. 2009. Материалы по распространению и экологии сибирского углозуба (*Hynobius keyserlingii*, Dybowski, 1870) в Прибайкалье // Байкальский зоологический журнал. №3. С. 31–34.
- Куранова В.Н., Фокина Е.В. 2008. Изменчивость развития и роста сибирского углозуба *Salamandrella keyserlingii* (Caudata, Amphibia) // Вопросы герпетологии. Санкт-Петербург: Зоологический институт РАН. С. 227–233.
- Литвинов Н.А., Файзулин А.И., Шураков А.И., Ганщук С.В. 2010. Анализ состояния кладок сибирского углозуба *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870 (Caudata, Amphibia) Предуралья // Поволжский экологический журнал. №4. С. 438–441.
- Ляпустин С.Н. 2008. Борьба с контрабандой объектов фауны и флоры на Дальнем Востоке России (конец XIX – начало XXI в.). Владивосток: ВФ РТА. 252 с.
- Ляпустин С.Н., Фоменко П.В. 2010. Земноводные Дальнего Востока: краткий справочник для сотрудников таможенных органов. Владивосток: ВФ РТА. 56 с.
- Мазо В.К. 1998. Глутатион как компонент антиоксидантной системы желудочно-кишечного тракта // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. №1. С. 47–53.
- Минева О.В., Минеев А.К. 2011. Нарушения лейкоцитарной формулы крови озерной лягушки Саратовского водохранилища // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Вып. 2(2). С. 94–97.
- Минева О.В., Минеев А.К. 2014. Особенности гематологических параметров озерной лягушки *Rana ridibunda* Pallas, 1771 Саратовского водохранилища // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. Т. 23(2). С. 178–184.
- Николаев В.Ю., Романова Е.Б. 2016. Иммуногематологические характеристики амфибий водоемов Нижегородской области разного гидрохимического состава // Проблемы региональной экологии. №3. С. 31–35.
- Романова Е.Б., Фадеева Г.А., Вершинина К.С., Николаев И.Ю. 2013. Изменение лейкоцитарной формулы крови озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) при гельминтозах // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Вып. 5(1). С. 141–147.
- Романова Е.Б., Шаповалова К.В., Рябинина Е.С. 2018. Лейкоцитарный состав крови и микроядра в эритроцитах амфибий загрязненных водных объектов Нижегородской области // Принципы экологии. Т. 7(2). С. 125–139. DOI: 10.15393/j1.art.2018.7682
- Северин Е.С. (ред.). 2004. Биохимия. М.: ГЭОТАР-Медиа. 784 с.
- Силс Е.А. 2008. Сравнительный анализ гематологических показателей остромордой (*Rana arvalis*, Nilsson, 1842) и озерной (*Rana ridibunda*, Pallas, 1771) лягушек городских популяций // Вестник Оренбургского государственного университета. Т. 10(92). С. 230–235.
- Соломонов Н.Г., Седалищев В.Т., Соломонов К.С., Кириллин Р.А., Протопопов С.Г. 2018. Зимовка сибирского углозуба *Salamandrella keyserlingii* (Dybowski, 1870) в Центральной Якутии // Природные ресурсы Арктики и Субарктики. Т. 23(1). С. 111–116.
- Хаитов Р.М. 2013. Иммунология: структура и функции иммунной системы. М.: ГЭОТАР-Медиа. 280 с.
- Шитиков В.К., Розенберг Г.С. 2014. Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. Тольятти: Кассандра. 314 с.
- Ярцев В.В., Евсеева С.С. 2018. Гистологическая характеристика кожи самок сибирского углозуба, *Salamandrella keyserlingii* (Caudata, Hynobiidae) в водную и наземную фазы сезонного цикла // Современная герпетология. Т. 18(3). С. 159–167. DOI: 10.18500/1814-6090-2018-18-3-4-159-167
- Alfimov A.V., Berman D.I. 2010. Reproduction of the Siberian Salamander, *Salamandrella keyserlingii* (Amphibia, Caudata, Hynobiidae), in Water Bodies on Permafrost in Northeastern Asia // Biology Bulletin. Vol. 37(8). P. 807–822. DOI: 10.1134/S1062359010080054
- Alford R.A., Bradfield K.S., Richards S.J. 2007. Global warming and amphibian losses // Nature. Vol. 447(7144). P. E3–E4. DOI: 10.1038/nature05940
- Ananjeva N.B., Uteshev V.K., Orlov N.L., Gakhova E.N. 2015. Strategies for Conservation of Endangered Amphibian and Reptile Species // Biology Bulletin. Vol. 42(5). P. 432–439. DOI: 10.1134/S1062359015050027
- Berman D.I., Meshcheryakova E.N., Bulakhova N.A. 2016. Extreme negative temperatures and body mass loss in the Siberian salamander (*Salamandrella keyserlingii*, amphibia, hynobiidae). *Doklady Biological Sciences* 468(1): 137–141. DOI: 10.1134/S001249661603011X
- Bosch J., Martínez-Solano I. 2006. Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain // Oryx. Vol. 40(1). P. 84–89. DOI: 10.1017/S0030605306000093
- Chernaya L.V., Kovalchuk L.A., Nokhrina E.S. 2016. Role of the tissue free amino acids in adaptation of medicinal leeches *Hirudo medicinalis* L., 1758 to extreme climatic conditions // Doklady Biological Sciences. Vol. 466. P. 42–44. DOI: 10.1134/S00124996616010129

- Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J. 2004. The ade4 package—1: One-table methods // R News. Vol. 4. P. 5–10.
- Coico R., Sunshine G., Benjamini E. 2003. Immunology. A Short Course. New York: Wiley-Liss. 237 p.
- Cooper E.L., Klempau A.E., Zapata A.G. 1985. Reptilian immunity // Biology Reptilia / C. Gans, F. Billett, P.F.A. Maderson (Eds.). Vol. 14: Development A. New York: John Wiley & Sons. P. 601–636.
- Council of Europe. 1986. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS123). Strasbourg: Council of Europe. Available from <http://cjnventions.coe.int/Treaty/Commun/QueVoulezVous>
- Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists // Functional Ecology. Vol. 22(5). P. 760–772. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x
- Dray S., Dufour A., Thioulouse J. 2022. ade4: Analysis of Ecological Data: Exploratory and Euclidean Methods in Environmental Sciences. R package .version 1.7-19. Available from <https://CRAN.R-project.org/package=ade4>
- Forman H.J., Zhang H., Rinna A. 2008. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // Molecular Aspects of Medicine. Vol. 30(1–2). P. 1–12. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.006
- Fournier M., Robert J., Salo H.M., Dautremepuits C., Brouseau P. 2005. Immunotoxicology of Amphibians // Applied Herpetology. Vol. 2(3). P. 297–309. DOI: 10.1163/1570754054507451
- Gallant A.L., Klaver R.W., Casper G.S., Lannoo M.J. 2007. Global Rates of Habitat Loss and Implications for Amphibian Conservation // Copeia. Vol. 4. P. 967–979. DOI: 10.1643/0045-8511(2007)7[967:GR OHLA]2.0.CO;2
- Global Amphibian Assessment. 2004. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Cambridge, UK. Available from <https://www.nature-serve.org/projects/global-amphibian-assessment>
- Hussain Q., Pandit A.K. 2012. Global amphibian declines: A review // International Journal of Biodiversity and Conservation. Vol. 4(10). P. 348–357. DOI: 10.5897/IJBC12.008
- IUCN. 2020. IUCN Red List Quadrennial Report 2017–2020. Available from: [https://nc.iucnredlist.org/redlist/resources/files/1630480997-IUCN\\_RED\\_LIST\\_QUADRENNIAL\\_REPORT\\_2017-2020.pdf](https://nc.iucnredlist.org/redlist/resources/files/1630480997-IUCN_RED_LIST_QUADRENNIAL_REPORT_2017-2020.pdf)
- James L.B. 1987. Amino acid analysis: a fall-off in performance // Journal of Chromatography A. Vol. 408. P. 291–295. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)81812-4
- Karanova M.V. 2011. The Effect of Cold Shock on the Free Amino Acid Pool of Rotan Pondfish *Percottus glehni* (Eleotridae, Perciformes) // Biology Bulletin. Vol. 38(2). P. 116–124. DOI: 10.1134/S106235901102004X
- Kovalchuk L.A., Mishchenko V.A., Mikshevich N.V., Chernaya L.V., Chibiryak M.V., Yastrebov A.P. 2018a. Free Amino Acid Profile in Blood Plasma of Bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) Exposed to Low Positive and Near-Zero Temperatures // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. Vol. 54(4). P. 281–291. DOI: 10.1134/S002209301804004X
- Kovalchuk L.A., Mishchenko V.A., Chernaya L.V., Snitko V.P. 2018b. Species-specific features of blood plasma amino acid spectrum of bats (Mammalia: Chiroptera) in the Urals // Russian Journal of Ecology. Vol. 49(4). P. 325–331. DOI: 10.1134/S1067413618040082
- Kovalchuk L.A., Chernaya L.V., Mishchenko V.A., Berzin D.L., Bolshakov V.N. 2021a. Amino Acid Spectrum in the Blood of the Endemic and Invasive Amphibian Species in the Fauna of the Ural // Doklady Biochemistry and Biophysics. Vol. 500. P. 327–330. DOI: 10.1134/S1607672921050124
- Kovalchuk L.A., Mishchenko V.A., Chernaya L.V., Bolshakov V.N. 2021b. Characteristic Immunohematological Parameters of Migratory (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) and Resident (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) Bat Species of the Ural Fauna. *Doklady Biological Sciences* 501: 210–213. DOI: 10.1134/S001249662106003X
- Kovalchuk L.A., Chernaya L.V., Mishchenko V.A., Mikshevich N.V. 2021c. Amino acid spectrum of blood of the lake frog *Pelophylax ridibundus* introduced into the ponds of the Middle Urals // Hydrobiological Journal. Vol. 57(3). P. 80–89. DOI: 10.1615/HYDROBJ.V57.I3.90
- LaFonte B.E., Johnson P.T. 2013. Experimental infection dynamics: using immunosuppression and in vivo parasite tracking to understand host resistance in an amphibian-trematode system // Journal of Experimental Biology. Vol. 216(19). P. 3700–3708. DOI: 10.1242/jeb.088104
- Li Y., Cohen J.M., Rohr J.R. 2013. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians // Integrative Zoology. Vol. 8(2). P. 145–161. DOI: 10.1111/1749-4877.12001
- Oksanen J., Simpson G.L., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O’Hara R.B., Solymos P., Szoecs E., Wagner H., Barbour M., Bedward M., Bolker B., Borcard D., Carvalho G., Chirico M., Caceres M., Durand S., Evangelista H.B.A., Fitz-John R., Friendly M., Furneaux B., Hannigan G., Hill M.O., Lahti L., McGlenn D., Ouellette M.H., Cunha E.R., Smith T., Stier A. et al. 2020. vegan: Community Ecology Package. R package. Version 2.5-7. Available from <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pounds J.A., Bustamante M.R., Coloma L.A., Consuegra J.A., Fogden M.P., Foster P.N., La Marca E., Masters K.L., Merino-Viteri A., Puschendorf R., Ron S.R., Sánchez-Azofeifa G.A., Still C.J., Young B.E. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming // Nature. Vol. 439(7073). P. 161–167. DOI: 10.1038/nature04246
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available from <https://www.R-project.org/>

- Rohr J.R., Raffel T.R., Romansic J.M., McCallum H., Hudson P.J. 2008. Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 105(45). P. 17436–17441. DOI: 10.1073/pnas.0806368105
- Romanova E.B., Shapovalova K.V., Ryabinina E.S., Gelashevili D.B. 2019. Leukocytic indices and micronucleus in erythrocytes as population markers of the immune status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) living in various biotopic conditions // Biology Bulletin. Vol. 46(10). P. 1230–1238. DOI: 10.1134/S1062359019100273
- Strayer D., Dudgeon D. 2010. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges // Journal of the North American Benthological Society. Vol. 29(1). P. 344–358. DOI: 10.1899/08-171.1
- Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S.L., Fischman D.L., Waller R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide // Science. Vol. 306(5702). P. 1783–1786. DOI: 10.1126/science.1103538
- Vershinin V.L., Vershinina S.D. 2013. Comparative analysis of hemoglobin content in four species of anurans from the Ural uplands. *Doklady Biological Sciences* 450(1): 155–157. DOI: 10.1134/S0012496613030137
- Vershinin V.L., Vershinina S.D., Berzin D.L., Zmeeva D.V., Kinev A.V. 2015. Long-term observation of amphibian populations inhabiting urban and forested areas in Yekaterinburg, Russia // Scientific Data. Vol. 2. Article: 150018. DOI: 10.1038/sdata.2015.18
- Whittaker K., Koo M.S., Wake D.B., Vredenburg V.T. 2013. Global Declines of Amphibians // Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition). Cambridge: Academic Press. P. 691–699. DOI: 10.1016/B978-0-12-384719-5.00266-5
- Wu G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition // Amino Acids. Vol. 37(1). P. 1–17. DOI: 10.1007/s00726-009-0269-0
- Yarri D. 2005. The Ethics of Animal Experimentation: A Critical Analysis and Constructive Christian Proposal. Oxford: Oxford University Press. 240 p. DOI: 10.1093/0195181794.001.0001
- Zimmerman L.M., Vogel L.A., Bowden R.M. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective // Journal of Experimental Biology. Vol. 213(5). P. 661–671. DOI: 10.1242/jeb.038315
- Ananjeva N.B., Uteshev V.K., Orlov N.L., Gakhova E.N. 2015. Strategies for Conservation of Endangered Amphibian and Reptile Species. *Biology Bulletin* 42(5): 432–439. DOI: 10.1134/S1062359015050027
- Berman D.I., Leirikh A.N., Mikhailova E.I. 1984. On the wintering of the Siberian salamander *Hynobius keyserlingii* in the Upper Kolyma. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 3: 323–327. [In Russian]
- Berman D.I., Meshcheryakova E.N., Bulakhova N.A. 2016. Extreme negative temperatures and body mass loss in the Siberian salamander (*Salamandrella keyserlingii*, amphibia, hynobiidae). *Doklady Biological Sciences* 468(1): 137–141. DOI: 10.1134/S001249661603011X
- Bolshakov V.N., Vershinin V.L. 2005. *Amphibians and reptiles of the Middle Urals*. Yekaterinburg: Ural Branch of the RAS. 126 p. [In Russian]
- Bosch J., Martínez-Solano I. 2006. Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain. *Oryx* 40(1): 84–89. DOI: 10.1017/S0030605306000093
- Bulakhova N.A., Mikhailova E.I., Berman D.I. 2021. Phenology of Siberian salamander (*Salamandrella keyserlingii*, Caudata, Hynobiidae) in climatically different regions of northeast Asia. *Arctic and Subarctic Natural Resources* 26(2): 117–135. DOI: 10.31242/2618-9712-2021-26-2-8 [In Russian]
- Chernaya L.V., Kovalchuk L.A., Nokhrina E.S. 2016. Role of the tissue free amino acids in adaptation of medicinal leeches *Hirudo medicinalis* L., 1758 to extreme climatic conditions. *Doklady Biological Sciences* 466: 42–44. DOI: 10.1134/S0012496616010129
- Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J. 2004. The ade4 package—I: One-table methods. *R News* 4: 5–10.
- Coico R., Sunshine G., Benjamini E. 2003. *Immunology. A Short Course*. New York: Wiley-Liss. 237 p.
- Cooper E.L., Klempau A.E., Zapata A.G. 1985. Reptilian immunity. In: C. Gans, F. Billett, P.F.A. Maderson (Eds.): *Biology of the Reptilia*. Vol. 14: Development A. New York: John Wiley & Sons. P. 601–636.
- Council of Europe. 1986. *European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS123)*. Strasbourg: Council of Europe. Available from <http://cjnventions.coe.int/Treaty/Commun/QueVoulezVous>
- Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology* 22(5): 760–772. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x
- Dray S., Dufour A., Thioulouse J. 2022. *ade4: Analysis of Ecological Data: Exploratory and Euclidean Methods in Environmental Sciences. R package version 1.7-19*. Available from <https://CRAN.R-project.org/package=ade4>
- Forman H.J., Zhang H., Rinna A. 2008. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 30(1–2): 1–12. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.006

## References

Alfimov A.V., Berman D.I. 2010. Reproduction of the Siberian Salamander, *Salamandrella keyserlingii* (Amphibia, Caudata, Hynobiidae), in Water Bodies on Permafrost in Northeastern Asia. *Biology Bulletin* 37(8): 807–822. DOI: 10.1134/S1062359010080054

Alford R.A., Bradfield K.S., Richards S.J. 2007. Global warming and amphibian losses. *Nature* 447(7144): E3–E4. DOI: 10.1038/nature05940

- Fournier M., Robert J., Salo H.M., Dautremepuits C., Brousseau P. 2005. Immunotoxicology of Amphibians. *Applied Herpetology* 2(3): 297–309. DOI: 10.1163/1570754054507451
- Gallant A.L., Klaver R.W., Casper G.S., Lannoo M.J. 2007. Global Rates of Habitat Loss and Implications for Amphibian Conservation. *Copeia* 4: 967–979. DOI: 10.1643/0045-8511(2007)7[967:GROHLA]2.0.CO;2
- Garaeva S.N., Redkozubova G.V., Postolati G.V. 2009. *Amino acids in a living organism*. Kishinev: Printing House of the Academy of Sciences of Moldova. 552 p. [In Russian]
- Global Amphibian Assessment. 2004. *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*. Cambridge, UK. Available from <https://www.nature-serve.org/projects/global-amphibian-assessment>
- Hussain Q., Pandit A.K. 2012. Global amphibian declines: A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation* 4(10): 348–357. DOI: 10.5897/IJBC12.008
- IUCN. 2020. *IUCN Red List Quadrennial Report 2017–2020*. Available from: [https://nc.iucnredlist.org/redlist/resources/files/1630480997-IUCN\\_RED\\_LIST\\_QUADRENNIAL\\_REPORT\\_2017-2020.pdf](https://nc.iucnredlist.org/redlist/resources/files/1630480997-IUCN_RED_LIST_QUADRENNIAL_REPORT_2017-2020.pdf)
- James L.B. 1987. Amino acid analysis: a fall-off in performance. *Journal of Chromatography A* 408: 291–295. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)81812-4
- Karanova M.V. 2011. The Effect of Cold Shock on the Free Amino Acid Pool of Rotan Pondfish *Percottus glehni* (Eleotridae, Perciformes). *Biology Bulletin* 38(2): 116–124. DOI: 10.1134/S106235901102004X
- Karanova M.V. 2020. Secondary Metabolites and Aspartic Acid in the Brain of the Frog *Rana temporaria* as Low-Temperature Adaptogens. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 56(3): 207–212. DOI: 10.31857/S0044452920030043 [In Russian]
- Khaitov R.M. 2013. *Immunology: structure and function of the immune system*. Moscow: GEOTAR-Media 280 p. [In Russian]
- Kovalchuk L.A., Mishchenko V.A., Mikshevich N.V., Chernaya L.V., Chibiryak M.V., Yastrebov A.P. 2018a. Free Amino Acid Profile in Blood Plasma of Bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) Exposed to Low Positive and Near-Zero Temperatures. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 54(4): 281–291. DOI: 10.1134/S002209301804004X
- Kovalchuk L.A., Mishchenko V.A., Chernaya L.V., Snitko V.P. 2018b. Species-specific features of blood plasma amino acid spectrum of bats (Mammalia: Chiroptera) in the Urals. *Russian Journal of Ecology* 49(4): 325–331. DOI: 10.1134/S1067413618040082
- Kovalchuk L.A., Chernaya L.V., Mishchenko V.A., Berzin D.L., Bolshakov V.N. 2021a. Amino Acid Spectrum in the Blood of the Endemic and Invasive Amphibian Species in the Fauna of the Ural. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 500: 327–330. DOI: 10.1134/S1607672921050124
- Kovalchuk L.A., Mishchenko V.A., Chernaya L.V., Bolshakov V.N. 2021b. Characteristic Immunohematological Parameters of Migratory (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) and Resident (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) Bat Species of the Ural Fauna. *Doklady Biological Sciences* 501: 210–213. DOI: 10.1134/S001249662106003X
- Kovalchuk L.A., Chernaya L.V., Mishchenko V.A., Mikshevich N.V. 2021c. Amino acid spectrum of blood of the lake frog *Pelophylax ridibundus* introduced into the ponds of the Middle Urals. *Hydrobiological Journal* 57(3): 80–89. DOI: 10.1615/HYDROBJ.V57.I3.90
- Kunitsyn A.A. 2009. Materials on the distribution and ecology of the Siberian salamander (*Hynobius keyserlingii*, Dybowski, 1870) in the Baikal region. *Baikal Zoological Journal* 3: 31–34. [In Russian]
- Kuranova V.N., Fokina E.V. 2008. Variability in the development and growth of the Siberian salamander *Salamandrella keyserlingii* (Caudata, Amphibia) In: *Issues of Herpetology*. St. Petersburg: Zoological Institute RAS. P. 227–233. [In Russian]
- Kuzmin S.L. 2012. *Amphibians of the former USSR*. Moscow Moscow: KMK Scientific Press Ltd. 370 p. [In Russian]
- LaFonte B.E., Johnson P.T. 2013. Experimental infection dynamics: using immunosuppression and in vivo parasite tracking to understand host resistance in an amphibian-trematode system. *Journal of Experimental Biology* 216(19): 3700–3708. DOI: 10.1242/jeb.088104
- Li Y., Cohen J.M., Rohr J.R. 2013. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integrative Zoology* 8(2): 145–161. DOI: 10.1111/1749-4877.12001
- Litvinov N.A., Faizulin A.I., Shurakov A.I., Ganshchuk S.V. 2010. Analysis of clutch status of Siberian newt *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870 (Caudata, Amphibia) near the Urals region. *Povolzhsky Journal of Ecology* 4: 438–441. [In Russian]
- Lyapustin S.N. 2008. *Fight against smuggling of objects of fauna and flora in the Russian Far East (late 19<sup>th</sup> – early 21<sup>st</sup> centuries)*. Vladivostok: VF RTA. 252 p. [In Russian]
- Lyapustin S.N., Fomenko P.V. 2010. *Amphibians of the Far East: a brief guide for customs officials*. Vladivostok: VF RTA. 56 p. [In Russian]
- Mazo V.K. 1998. Glutathione as a component of the antioxidant system of the gastrointestinal tract. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology* 1: 47–53. [In Russian]
- Mineeva O.V., Mineev A.K. 2011. Disorders of blood leukocyte formula in the Lake frog of the Saratov reservoir. *Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod* 2(2): 94–97. [In Russian]
- Mineeva O.V., Mineev A.K. 2014. Features of haematological parameters of lake frog *Rana ridibunda* Pallas, 1771 of the Saratov reservoir. *Samarskaya Luka: problems of regional and global ecology* 23(2): 178–184. [In Russian]
- Nikolaev V.Yu., Romanova E.B. 2016. Immunohematological characteristics of amphibians in reservoirs of the Nizhny Novgorod region of different hydrochemical composition. *Problems of regional ecology* 3: 31–35. [In Russian]

- Oksanen J., Simpson G.L., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O'Hara R.B., Solymos P., Szoecs E., Wagner H., Barbour M., Bedward M., Bolker B., Borcard D., Carvalho G., Chirico M., Caceres M., Durand S., Evangelista H.B.A., FitzJohn R., Friendly M., Furneaux B., Hannigan G., Hill M.O., Lahti L., McGlinn D., Ouellette M.H., Cunha E.R., Smith T., Stier A. et al. 2020. *vegan: Community Ecology Package. R package. Version 2.5-7*. Available from <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pounds J.A., Bustamante M.R., Coloma L.A., Consuegra J.A., Fogden M.P., Foster P.N., La Marca E., Masters K.L., Merino-Viteri A., Puschendorf R., Ron S.R., Sánchez-Azofeifa G.A., Still C.J., Young B.E. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439(7073): 161–167. DOI: 10.1038/nature04246
- R Core Team. 2020. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available from <https://www.R-project.org/>
- Red Data Book of the Sverdlovsk Region: animals, plants, fungi. Yekaterinburg: Mir, 2018. 450 p. [In Russian]
- Rohr J.R., Raffel T.R., Romansic J.M., McCallum H., Hudson P.J. 2008. Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(45): 17436–17441. DOI: 10.1073/pnas.0806368105
- Romanova E.B., Fadeeva G.A., Vershinina K.S., Nikolaev I.Yu. 2013. Leukogram changes in the marsh frog (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) with helminthiasis. *Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod* 5(1): 141–147. [In Russian]
- Romanova E.B., Shapovalova K.V., Ryabinina E.S. 2018. The leukocyte blood composition and micronuclei in the erythrocytes of amphibians in the polluted reservoirs of Nizhni Novgorod Region. *Principles of the Ecology* 7(2): 125–139. DOI: 10.15393/jl.art.2018.7682 [In Russian]
- Romanova E.B., Shapovalova K.V., Ryabinina E.S., Gelsahvili D.B. 2019. Leukocytic indices and micronucleus in erythrocytes as population markers of the immune status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) living in various biotopic conditions // *Biology Bulletin* 46(10): 1230–1238. DOI: 10.1134/S1062359019100273
- Severin E.S. (Ed.). 2004. *Biochemistry*. Moscow: GEOTAR-Media. 784 p. [In Russian]
- Shitikov V.K., Rosenberg G.S. 2014. *Randomization and bootstrap: statistical analysis in biology and ecology using R*. Togliatti: Cassandra. 314 p. [In Russian]
- Sils E.A. 2008. Comparative analysis of hematological parameters of moor frog (*Rana arvalis*, Nilsson, 1842) and lake frog (*Rana ridibunda*, Pallas, 1771) of urban populations. *Vestnik of Orenburg State Pedagogical University* 10(92): 230–235. [In Russian]
- Solomonov N.G., Sedalishchev V.T., Solomonov K.S., Kirillin R.A., Protopopov S.G. 2018. Wintering of Siberian salamander *Salamandrella keyserlingii* (Dybowski, 1870) in Central Yakutia. *Arctic and Subarctic Natural Resources* 23(1): 111–116. [In Russian]
- Strayer D., Dudgeon D. 2010. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society* 29(1): 344–358. DOI: 10.1899/08-171.1
- Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S.L., Fischman D.L., Waller R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306(5702): 1783–1786. DOI: 10.1126/science.1103538
- Vafis A.A., Peskova T.Yu. 2009. Blood Change of Lake Frog (*Rana ridibunda*) Influenced by Sugar-Beet Mill Sewage. *Problems of Contemporary Science and Practice. Vernadsky University* 2(16): 8–18. [In Russian]
- Vershinin V.L. 2014. Functional specific of amphibian populations in urbanistic gradient. *Proceedings of Samara Scientific Center of RAS* 16(5–1): 344–348. [In Russian]
- Vershinin V.L., Vershinina S.D. 2013. Comparative analysis of hemoglobin content in four species of anurans from the Ural uplands. *Doklady Biological Sciences* 450(1): 155–157. DOI: 10.1134/S0012496613030137
- Vershinin V.L., Vershinina S.D., Berzin D.L., Zmeeva D.V., Kinev A.V. 2015. Long-term observation of amphibian populations inhabiting urban and forested areas in Yekaterinburg, Russia. *Scientific Data* 2: 150018. DOI: 10.1038/sdata.2015.18
- Vorobyeva E.I. (Ed.). 1994. *Siberian Salamander (Salamandrella keyserlingii Dybowski, 1870): Zoogeography, systematics, morphology*. Moscow: Nauka. 367 p. [In Russian]
- Whittaker K., Koo M.S., Wake D.B., Vredenburg V.T. 2013. Global Declines of Amphibians. In: *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)*. Cambridge: Academic Press. P. 691–699. DOI: 10.1016/B978-0-12-384719-5.00266-5
- Wu G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37(1): 1–17. DOI: 10.1007/s00726-009-0269-0
- Yarri D. 2005. *The Ethics of Animal Experimentation: A Critical Analysis and Constructive Christian Proposal*. Oxford: Oxford University Press. 240 p. DOI: 10.1093/0195181794.001.0001
- Yartsev V.V., Evseeva S.S. 2018. Histological Characteristics of the Skin of *Salamandrella keyserlingii* (Caudata, Hynobiidae) Females in Aquatic and Terrestrial Phases of Seasonal Cycle. *Current Studies in Herpetology* 18(3): 159–167. DOI: 10.18500/1814-6090-2018-18-3-4-159-167 [In Russian]
- Zimmerman L.M., Vogel L.A., Bowden R.M. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology* 213(5): 661–671. DOI: 10.1242/jeb.038315
- Zmeeva D.V. 2009. Population specifics of the reproductive performance of the Siberian salamander in the forest park belt of Yekaterinburg. In: *Evolutionary and population ecology (back to the future)*. Yekaterinburg: Ural Branch of RAS. P. 62. [In Russian]

## ESTIMATION OF HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF A REPRESENTATIVE OF THE AMPHIBIOUS FAUNA OF THE URALS: *SALAMANDRELLA KEYSERLINGII* (CAUDATA, AMPHIBIA)

Liudmila A. Kovalchuk<sup>1,\*</sup> , Liudmila V. Chernaya<sup>1</sup> , Vladimir A. Mishchenko<sup>1</sup> ,  
Dmitry L. Berzin<sup>1</sup> , Nikolay V. Mikshevich<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of RAS, Russia*

\*e-mail: [kovalchuk@ipae.uran.ru](mailto:kovalchuk@ipae.uran.ru)

<sup>2</sup>*Ural State Pedagogical University, Russia*

The paper has presented for the first time the results of a study of hematological and biochemical parameters of a threatened species of the fauna of the Middle Urals, *Salamandrella keyserlingii* (Caudata, Amphibia). Mature males of *S. keyserlingii* (n = 30; sampled in spring and summer) living in the Protected Area «Kalinovsky Forest Park» (Sverdlovsk Region, Russia), located in the urban agglomeration of Yekaterinburg city, were used as research objects. The leukocyte composition of *S. keyserlingii* blood is represented by granulocytes (neutrophils: early, bands, segments; basophils, eosinophils) and agranulocytes (monocytes and lymphocytes). The peripheral blood of individuals was characterised by the predominance of agranulocytes. They provide immune surveillance and selective reactivity of the organism (adaptive immunity) both in spring (55.7%) and summer (60.3%) seasons ( $p < 0.001$ ). The content of granulocytes, providing non-specific urgent protection of the organism from infections and toxic effects, is ranged as 39.3–44.4% in males. In the spring and summer periods, the leukocyte formula of the peripheral blood of *S. keyserlingii* has a high lymphoid profile (52.4–56.7%). Seasonal variability of the integral leukocyte index (ISL) of *S. keyserlingii* was 0.80 in spring and 0.65 in summer. The content of free amino acids in the blood plasma of *S. keyserlingii* has been assessed for the first time from the standpoint of their participation in the processes of immunomodulation and the formation of adaptive reactions that ensures the survival and eurybiont of the species in a wide temperature range. The amino acid fund of *S. keyserlingii* blood plasma was represented by 17 amino acids: alanine, serine, threonine, lysine, leucine, valine, glycine, aspartic acid, glutamic acid, arginine, histidine, methionine, proline, phenylalanine, cystine, tyrosine, and isoleucine. The analysis of the metabolic groups of amino acids in the blood plasma of *S. keyserlingii* shows a high percentage of glycogenic amino acid (GGAA: 82.1%) and essential amino acids (EAA: 53.4%). The high content of amino acids in the blood indicates their relevance in the processes of protein synthesis, active participation in both immune processes and in the processes of detoxification and the formation of adaptive reactions during the summer period of amphibian's growth and development. The obtained results of studies of hematological and biochemical parameters of *S. keyserlingii*'s blood significantly expand the understanding of the adaptation mechanisms of amphibians to conditions of natural and anthropogenic habitat transformations. This is undoubtedly of theoretical interest and applies significance for development of environmental measures in the monitoring system of natural and artificial aquatic ecosystems.

**Key words:** amino acids, caudate amphibians, lymphocytes, peripheral blood, Siberian salamander