

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ  
ИНВАЗИВНОГО ВИДА ЗЕМНОВОДНЫХ *Pelophylax ridibundus*  
(Amphibia, Anura), ИНТРОДУЦИРОВАННОГО  
В ВОДНЫЕ ОБЪЕКТЫ СРЕДНЕГО УРАЛА

© 2022 г. Л. А. Ковальчук<sup>а</sup>, \*, Л. В. Черная<sup>а</sup>, В. А. Мищенко<sup>а</sup>, Н. В. Микшевич<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Институт экологии растений и животных, Уральское отделение Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

<sup>б</sup>Уральский государственный педагогический университет, Екатеринбург, Россия

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

Поступила в редакцию 05.03.2021 г.

После доработки 24.12.2021 г.

Принята к публикации 26.12.2021 г.

Впервые представлены результаты исследований гематологических и биохимических параметров гомеостаза озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), сформировавшей устойчивые популяции в водоемах Среднего Урала. Лимфоцитарно-гранулоцитарный состав лейкограмм периферической крови характеризуется преобладанием агранулоцитов (73.3–77.1%), доля гранулоцитов – 23.0–26.7%. Значение интегрального лейкоцитарного индекса (0.29–0.36) соответствует условной норме физиологического состояния организма и его адаптивному потенциалу. У самцов интегральный лейкоцитарный индекс весной выше (0.36), чем у самок (0.29). Качественный состав аминокислотного спектра плазмы крови амфибий представлен 25 аминокислотами и их дериватами. Озерные лягушки характеризуются высоким содержанием в периферической крови метаболитических групп: незаменимых и гликогенных аминокислот, участвующих в процессах детоксикации, иммуномодуляции и формирования адаптивных реакций амфибий.

**Ключевые слова:** озерная лягушка, периферическая кровь, лейкоцитарная формула, аминокислоты

**DOI:** 10.31857/S0320965222040155

## ВВЕДЕНИЕ

Пресноводные экосистемы за последние десятилетия подвергаются все возрастающей эксплуатации, воздействию усиливающихся климатических изменений и техногенного пресса (Dudgeon et al., 2006; Strayer, Dudgeon, 2010; Poff et al., 2012). Среди всех классов позвоночных до трети видов земноводных находятся под угрозой исчезновения (Stuart et al., 2004; Global..., 2008). Исследователи отмечают перманентное сокращение природных популяций амфибий при массовом и неконтролируемом, в том числе браконьерском вылове их с целью контрабанды (Ляпустин, 2008). Вместе с тем, за последние десятилетия возросло расселение инвазивных водных организмов, обусловленное созданием водохранилищ, интенсификацией транспортных перевозок, глобальным потеплением и др. Виды-вселенцы оказывают значительное влияние на фауну регионов-реципиентов и вносят существенный вклад в микроэ-

волюционные процессы не только водных, но и наземных экосистем (Алимов, Богущкая, 2004), что требует пристального внимания к этой исключительно важной общебиологической проблеме (Дгебуадзе, 2014). К таким инвазивным видам относится озерная лягушка *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Ranidae, Amphibia) (Дгебуадзе и др., 2018).

Проблема биологических инвазий чужеродных видов за пределы их нативных ареалов актуальна и для фауны Урала. В герпетофауне Среднего Урала *P. ridibundus* появилась в 1969–1970 гг. в результате случайной интродукции головастиков озерной лягушки при зарыблении водохранилищ-охладителей тепловых станций мальками белого амура *Stenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844) и толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844) из водоемов Украины и Краснодарского края (Иванова, 1995). Активное расселение озерной лягушки на Среднем Урале происходит благодаря сезонным изменениям гидрологического режима водоемов, а также при наземной миграции в экосистемах сообщищающихся рек Тагил, Вогулка, Нейва, Исеть,

**Сокращения:** АК – аминокислоты, ИСЛ – интегральный лейкоцитарный индекс, НАК – незаменимые аминокислоты.

Пышма, Сысерть и водоемов-охладителей – Белоярское, Верхнетагильское и Рефтинское водохранилища (Большаков, Вершинин, 2005; Берзин и др., 2020). Большинство видов амфибий не может адаптироваться к обитанию в теплых водоемах. Однако озерная лягушка хорошо переносит высокие температуры и способна заселять даже горячие источники с температурой воды  $\geq 30.0^{\circ}\text{C}$  (Ляпков, 2014). В регионах с недостаточно теплым для нормального существования климатом интродуцированные экземпляры *P. ridibundus* обычно приживаются в водоемах антропогенного происхождения (Фоминых, Ляпков, 2011). Установлено, что озерные лягушки не заселяют прибрежные мелководные участки водоемов, предпочитаемые лягушками рода *Rana* в период нереста, и не представляют прямой угрозы для местных амфибий (Большаков, Вершинин, 2005), а в спектре их питания присутствуют корма, которые, как правило, избегают аборигенные виды земноводных (Иванова, Берзин, 2019).

С продолжающимся сокращением видов земноводных возникла проблема сохранения их численности в природных условиях и при искусственном разведении (Ван Хай Динь и др., 2013). Последнее требует надежных технологий непрерывной диагностики физиологического состояния животных и среды их обитания с использованием физиологических и биохимических биомаркеров, дающих достоверную информацию. Настоящее исследование ориентировано на разработку и применение эколого-физиологической оценки статуса инвазивного вида озерной лягушки *P. ridibundus*, позволяющего не только выявить степень адаптивного потенциала животных, но и составить в перспективе возможный сценарий преобразования структуры сообществ и популяций в условиях дестабилизированной среды.

Цель работы – оценить гематологические и биохимические параметры гомеостаза озерной лягушки, обитающей в водных объектах Среднего Урала.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях использованы взрослые особи озерной лягушки *P. ridibundus*, обитающие в термальных водах р. Тагил на участке сброса воды из Верхнетагильского водохранилища, расположенного на восточном склоне Уральских гор (Свердловская обл.,  $57^{\circ}22'$  с.ш.,  $59^{\circ}57'$  в.д.). Тепловой баланс Верхнетагильского водохранилища поддерживает температуру воды не ниже  $8.0\text{--}12.0^{\circ}\text{C}$ , не позволяя водоему замерзнуть зимой, обитающие в нем озерные лягушки активны и не впадают в зимнюю спячку (Иванова, 2017). В весенний период отлова животных температура воды в р. Тагил была в среднем  $21 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ , летом –  $27.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ , достигая периодически  $32^{\circ}\text{C}$  (Про-

хорова и др., 2004). Для водохранилища характерно не только тепловое, но и техногенное загрязнение, обусловленное близостью ( $\sim 13$  км) к водоему Кировградского медеплавильного комбината. По материалам Госдоклада (Государственный..., 2014), общий уровень загрязненности на протяжении ряда лет сохраняется, и воды р. Тагил характеризуются как “грязные”. Среднегодовые концентрации металлов в верховье реки превышают нормативы для водоемов рыбохозяйственного значения по соединениям Cu (4 ПДК), Fe (5 ПДК), Al (7 ПДК), Ni (3 ПДК), Zn (2 ПДК) (Рыбникова, Наволокина, 2020). Действие токсикантов влияет, в первую очередь, на показатели физиологических параметров организма (Ковальчук, 2008; Голованова и др., 2021). Ранее нами на участке сброса воды из водохранилища в р. Тагил определены концентрации тяжелых металлов (Cu, Zn, Cd, Pb, Ni) в донных отложениях и тканях хищной пиявки *Haemopsis sanguisuga* (Linnaeus, 1758) – биоиндикатора техногенного загрязнения (Черная, Ковальчук, 2018). В качестве контроля были донные отложения и взрослые особи *H. sanguisuga* р. Сулем из Висимского биосферного заповедника. Показано, что содержания тяжелых металлов в донных отложениях и в пробах тканей пиявок из р. Тагил достоверно превышали таковые из р. Сулем ( $p < 0.001$ ).

Отлов и содержание доставленных в лабораторию озерных лягушек осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Euroreap..., 1986; Yarrı, 2005). Экспериментальную группу представляли самцы и самки *P. ridibundus*, отловленные в сезон размножения (конец апреля, первая декада мая) и летом (последняя декада августа) в теплых водах р. Тагил ( $n = 54$ ).

Образцы крови животных брали из миокарда. Плазму получали центрифугированием крови в рефрижераторной ультрацентрифуге K-23D (Germany) в вакутайнерах “Bekton Dickinson ВР” (UK) с ЭДТА в течение 15 мин при 3000 об./мин. Показатели периферической крови животных определяли с помощью гематологического анализатора “BC-5800” (Mindray, China). Лейкоцитарную формулу подсчитывали (на 100 лейкоцитов) в мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе. На основании лейкоцитарной формулы рассчитывали ИСЛ – соотношение гранулоцитов и агранулоцитов в отн. ед., позволяющий оценить физиологическое состояние исследуемых особей и их адаптивный потенциал (Coico et al., 2003). Условно нормальное значение индекса сдвига лейкоцитов ИСЛ =  $0.19\text{--}0.38$  рассчитывали по лейкограмме животных из условно чистого водоема (Романова, 2005; Минеев, Минеева, 2014).

Содержание свободных АК в плазме крови определяли методом ионообменной хроматогра-

**Таблица 1.** Показатели периферической крови озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* из р. Тагил

Показатели	Пол	Весна (♂ <i>n</i> = 8, ♀ <i>n</i> = 10)	Лето (♂ <i>n</i> = 5, ♀ <i>n</i> = 7)	<i>p</i> -value Tukey's test
Гемоглобин, г/л	♂	56.60 ± 6.31 (43.44–67.88)	51.98 ± 1.77 (48.50–55.50)	0.93
	♀	32.46 ± 3.07 (26.5–38.18)	48.76 ± 3.68 (40.14–54.14)	0.04
Нейтрофилы, %:	♂	24.07 ± 1.44 (21.13–26.75)	17.01 ± 1.06* (15.00–19.00)	0.002
	♀	20.22 ± 0.36 (19.48–20.90)	15.44 ± 0.85* (13.86–17.14)	0.01
юные (незрелые)	♂	3.29 ± 0.34 (2.63–3.99)	5.74 ± 0.65* (4.50–7.00)	0.04
	♀	2.51 ± 0.41 (1.73–3.34)	6.14 ± 0.65* (5.00–7.43)	<0.001
палочкоядерные	♂	9.93 ± 0.68 (7.88–10.54)	7.00 ± 1.27* (4.75–9.75)	0.03
	♀	8.71 ± 0.70 (7.37–10.08)	5.00 ± 0.61* (3.71–6.14)	0.01
сегментоядерные	♂	11.54 ± 1.01 (9.70–13.63)	4.25 ± 0.42* (3.50–5.00)	<0.001
	♀	9.03 ± 0.88 (7.35–10.75)	4.27 ± 0.52* (3.29–5.43)	0.004
Эозинофилы, %	♂	2.65 ± 0.29 (2.05–3.19)	7.01 ± 1.28* (4.50–9.50)	0.04
	♀	2.75 ± 0.49 (1.95–3.82)	7.72 ± 1.53* (4.86–10.86)	0.004
Моноциты, %	♂	4.19 ± 0.59 (3.00–5.31)	6.25 ± 0.88 (4.50–8.25)	0.67
	♀	8.65 ± 1.17 (6.47–11.02)	6.42 ± 1.04 (4.29–8.43)	0.45
Лимфоциты, %	♂	69.11 ± 0.95 (67.45–71.18)	69.74 ± 1.09 (67.75–72.00)	0.99
	♀	68.42 ± 1.36 (65.63–70.95)	70.43 ± 1.36 (67.86–73.14)	0.70
Гранулоциты, %	♂	26.72 ± 1.72 (23.16–29.91)	24.02 ± 2.24 (19.5–28.5)	0.85
	♀	22.97 ± 0.87 (21.23–24.76)	23.18 ± 2.32 (18.69–28.02)	0.91
Агранулоциты, %	♂	73.30 ± 1.58 (70.21–76.53)	75.99 ± 1.96 (72.19–80.33)	0.70
	♀	77.07 ± 2.47 (72.15–81.94)	76.89 ± 2.39 (71.96–81.52)	0.93

Примечание. Даны средние значения и их ошибки, в скобках – пределы варьирования показателя, *n* – число особей; *p*-value Tukey's test.

\* – статистически значимые различия между группами (*p* < 0.05).

фии на анализаторе “AAA-339M” (Microtechna, Czech). Для каждого исследуемого образца на хроматограмме прописывался весь спектр АК с определением концентрации каждой из них в мкмоль/л и в % суммарного содержания. Проведен анализ 600 аминокислотных проб.

Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ “Statistica v. 10.0”. При оценке различий между группами определяли в выборке  $\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$  – среднее арифметическое и ошибка среднего бутстреп-распределения; [95% CI<sub>boot</sub>] – доверительный интервал бутстреп-распределения. Независимые группы сравнивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с перестановочным тестом (Permutation ANOVA;  $p = \Pr(|F_{ran}| \geq F_{obs})$ ), последующие (post-hoc) межгрупповые сравнения проводили с помощью критерия Тьюки с перестановочным тестом (Permutation Tukey's). Различия считали статистически значимыми при *p* < 0.05. Метод главных компонент (PCA) реализован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакеты “Vegan” и “Ade4”) (Chessel et al., 2004).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования сезонной изменчивости периферической крови самцов и самок озерной лягушки приведены в табл. 1. Лейкоцитарная формула самцов и самок *P. ridibundus* имеет лимфоидный характер и в весенний, и в летний период – от 68.4 до 70.4%. По содержанию агранулоцитов, ни для самцов, ни для самок не характерна сезонная динамика параметров периферической крови: лимфоцитов (*p* = 0.99 и *p* = 0.70 соответственно) и моноцитов (*p* = 0.67 и *p* = 0.45 соответственно) (табл. 1). Так, в летний период выраженная активация иммунных процессов у самок и самцов сопровождалась на фоне значимого падения содержания общих нейтрофилов возрастом количеством более юных форм нейтрофилов у самцов (в 1.7 раза), и самок (в 2.4 раза). У самцов наблюдалось снижение содержания функциональных форм: сегментоядерных нейтрофилов в 2.7 раза, палочкоядерных в 1.4 раза. У летних самок сократилось количество сегментоядерных (в 2.1 раза) и палочкоядерных нейтрофилов (в 1.7 раза). В то же время, отмечалось возрастание

доли эозинофилов (при норме 1–5%) у самцов в 2.6 раза ( $p = 0.04$ ), у самок в 2.8 раза ( $p = 0.004$ ) (табл. 1).

Наряду с изучением клеточного состава крови озерной лягушки, были исследованы биохимические параметры плазмы: аминокислотный спектр. Качественный состав спектра плазмы крови амфибий представлен 25 АК и их дериватами. В весенний период в плазме крови самцов общее содержание АК ( $2417.2 \pm 83.5$  мкмоль/л) было достоверно выше, чем у самок ( $1756.9 \pm 61.0$  мкмоль/л) ( $p = 0.0001$ ). Летом фонд АК у самцов снижался на 36% ( $1547.3 \pm 48.6$  мкмоль/л), у самок на 20% ( $1455.2 \pm 48.4$  мкмоль/л) (табл. 2). Доминировали гликогенные АК – аланин, глицин, глутамат. Их суммарный пул в общем фонде АК достигает 26% весной и до 31% летом. У исследованных озерных лягушек, как и у теплокровных животных, присутствовал полный спектр десяти незаменимых АК (табл. 2). Анализ показал, что у самок и самцов в летний период значительно повышалось процентное содержание незаменимых АК (52.0–52.9%) по сравнению с весенним периодом (42.2–48.7%) ( $p = 0.001$ ). Летом гендерные различия по незаменимым АК были выражены слабее, чем весной (табл. 2). Повышенное содержание лизина (8.57%), лейцина (7.44%), аргинина (6.0%) и гистидина (5.58%) было отмечено у самцов весенней популяции. На фоне пониженных концентраций подавляющего большинства незаменимых АК в плазме крови летних особей следует отметить повышение лейцина у самцов в 1.2 раза и у самок в 1.6 раза ( $p = 0.0001$ ) (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Система крови земноводных достаточно высоко организована, а состав и морфология лимфоидной системы не отличаются от данных в работах по позвоночным (Christin et al., 2004; Fournier et al., 2005; Davis et al., 2008; Arıkan, Çiçek, 2014; Романова, Николаев, 2014). Исследование периферической крови озерной лягушки показало, что в период полового созревания и размножения содержание гемоглобина у самцов в 1.7 раза выше, чем у самок. Лейкоцитарный состав крови этих амфибий, как и у всех позвоночных, представлен двумя группами клеток: гранулоцитами (гетерофилами и эозинофилами), ответственными за проявление реакции врожденного иммунитета, и агранулоцитами (моноцитами и лимфоцитами), ответственными за проявление реакции адаптивного иммунного ответа (табл. 1). Для озерных лягушек характерно высокое содержание лимфоцитов, обеспечивающих значительную эффективность клеточного иммунитета в весенний и летний сезоны и у самцов (69.1–69.7%), и у самок (68.4–70.4%) (табл. 1). Репрезентативным показателем усиления пресса антропогенной нагрузки на организм служит высокий уро-

вень агранулоцитов (73.3–77.1%) в крови, обеспечивающих иммунный “надзор” и специфическую реактивность организма (адаптивный иммунитет). Гендерные значимые различия наблюдали только в отношении моноцитов, их доля увеличена в крови самок в 2.1 раза в краткосрочно-весенний период биологического цикла по сравнению с самцами (табл. 1). Повышенная активация моноцитов продуцирует эндогенные регуляторы иммунного ответа – провоспалительные цитокины (Coico et al., 2003).

Лимфоцитарно-гранулоцитарный состав периферической крови амфибий характеризуется невысокой долей гранулоцитов (23.0–26.7%) (табл. 1). У самок и у самцов отмечены статистически значимые различия по содержанию в крови всех форм гранулоцитов (гетерофилов, эозинофилов) в весенний и летний периоды (табл. 1). Зарегистрирована разнонаправленность сезонной динамики нейтрофилов. Совокупность клеток, большая доля которых представлена нейтрофильными гранулоцитами, обеспечивает реакции неспецифической защитной системы организма весной в период репродуктивной активности у самцов ( $p = 0.002$ ) и самок ( $p = 0.01$ ) (табл. 1). Лейкоцитарный состав крови лягушек весной характеризуется значимо повышенным содержанием гетерофилов за счет увеличения числа зрелых сегментоядерных форм у самцов ( $p < 0.001$ ) и самок ( $p = 0.004$ ), что обеспечивает активную неспецифическую защиту организма от инфекций и токсических воздействий (табл. 1). Отмеченное значимое снижение функционально зрелых клеток (палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофильных гранулоцитов) в последней декаде летнего месяца у самцов и самок исследуемой популяции указывает на угрозу возникновения инфекций у особей. В летний период умеренное смещение лейкоцитарной формулы “влево” отражается в крови амфибий повышением относительного содержания незрелых (юных) нейтрофильных клеток у самок ( $p < 0.001$ ) и самцов ( $p = 0.04$ ). Известна чувствительность незрелых нейтрофилов к комплексу антропогенных и биотических факторов среды обитания. Летом стимуляция эозинофильного гранулоцитопоза у самцов *P. ridibundus* возросла в 2.6 раза, у самок в 2.8 раза (табл. 1). Функционально активные клетки крови эозинофилы, обладая фагоцитарной и бактерицидной активностью, реализуют противогельминтную иммунную защиту (Johnson, La Fonte, 2013). Наблюдаемая гиперэозинофилия может свидетельствовать об антитоксической и антимикробной реакциях в организме амфибий, обитающих в условиях пресса таких гемотоксикантов, как тяжелые металлы, нефтепродукты, пестициды (Чернышова, Старостин, 1994; Романова и др., 2018).

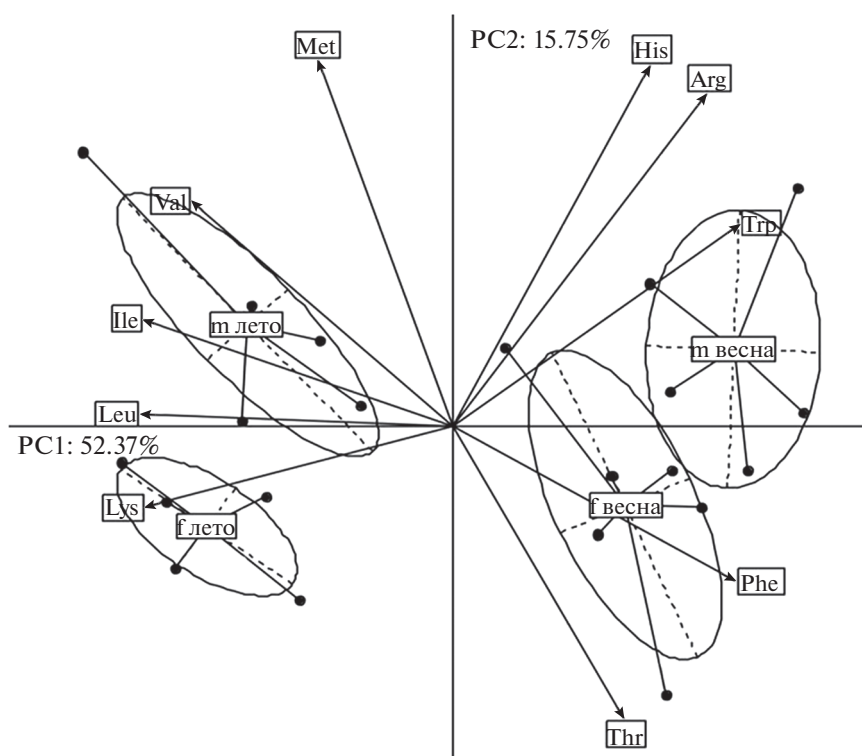
Отклонение ИСЛ от условной нормы свидетельствует о развитии патологических процессов

Таблица 2. Незаменимые аминокислоты (НАК) в плазме крови самцов и самок *P. ridibundus*

НАК, мкмоль/л	Весна ( <i>n</i> = 12)		Лето ( <i>n</i> = 12)		<i>p</i> “сезон” “пол” “сезон” × “пол”
	♂ ( <i>n</i> = 6)	♀ ( <i>n</i> = 6)	♂ ( <i>n</i> = 6)	♀ ( <i>n</i> = 6)	
Треонин	$154.8 \pm 10.5$	$107.1 \pm 7.9^a$	$70.3 \pm 5.4^*$	$89.9 \pm 5.0$	0.0001
	134.7–175.6	92.3–123.1	60.7–81.6	80.4–99.5	0.11
Валин	$94.6 \pm 11.2$	$69.7 \pm 3.6$	$81.8 \pm 3.6$	$76.8 \pm 6.0$	0.001
	75.3–118.8	63.8–77.8	75.0–89.0	67.0–90.2	0.75
Лейцин	$179.7 \pm 7.2$	$125.7 \pm 5.8^a$	$221.3 \pm 11.3^*$	$195.5 \pm 6.6^*$	0.05
	165.3–193.5	114.8–137.7	198.8–243.0	182.7–208.1	0.20
Изолейцин	$66.9 \pm 4.9$	$50.5 \pm 2.4$	$61.5 \pm 2.4$	$56.9 \pm 2.6$	0.0001
	57.5–75.7	46.0–55.2	57.6–66.6	52.0–62.0	0.0001
Метионин	$23.5 \pm 2.1$	$15.5 \pm 1.8$	$18.4 \pm 2.5$	$15.0 \pm 1.6$	0.12
	19.7–28.1	12.2–19.0	14.1–23.8	11.9–18.1	0.90
Фенилаланин	$119.8 \pm 8.7$	$100.6 \pm 10.2$	$49.1 \pm 2.7^*$	$42.7 \pm 1.9^*$	0.01
	102.0–135.8	78.5–120.4	43.0–53.1	38.9–46.2	0.11
Триптофан	$53.1 \pm 11.9$	$16.5 \pm 2.2^a$	Следы	Следы	0.23
	34.4–79.5	12.1–20.7			0.02
Лизин	$207.7 \pm 13.7$	$134.4 \pm 14.2^a$	$195.3 \pm 6.6$	$215.5 \pm 11.8^*$	0.31
	179.1–231.4	106.5–161.0	183.0–209.1	192.6–237.9	0.0001
Гистидин	$135.2 \pm 7.7$	$80.0 \pm 5.9^a$	$80.2 \pm 5.3^*$	$46.1 \pm 3.2^{*a}$	0.06
	120.4–150.4	69.0–91.6	70.3–90.8	40.0–52.3	0.001
Аргинин	$145.8 \pm 13.2$	$42.0 \pm 5.0^a$	$38.5 \pm 1.4^*$	$18.4 \pm 1.7^{*a}$	0.0001
	125.1–174.5	31.5–51.0	35.8–41.3	15.0–21.9	0.0001
НАК	$1180.9 \pm 54.2$	$742.7 \pm 28.3^a$	$816.4 \pm 17.9^*$	$757.3 \pm 27.7$	0.0001
	1098.2–1300.4	687.5–799.7	781.1–850.5	702.5–811.3	0.0001
Фонд АК	$2417.2 \pm 83.5$	$1756.9 \pm 61.0$	$1547.3 \pm 48.6^*$	$1455.2 \pm 48.4^*$	0.0001
	2271.3–2592.1	1634.1–1869.3	1457.7–1647.4	1359.5–1549.3	0.0001

Примечание. Над чертой – среднее значение и его ошибка, под чертой – пределы варьирования, *n* – число особей;  $p = \Pr(|F_{\text{ran}}| \geq F_{\text{obs}})$ : “сезон” – влияние главного фактора, характеризующего сезонную изменчивость; “пол” – влияние главного фактора, характеризующего гендерную изменчивость; “сезон” × “пол” – совместное влияние главных факторов; <sup>a</sup> – статистически значимые половые различия.

\* Статистически значимые сезонные различия ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 1.** Незаменимые аминокислоты (% фонда АК) плазмы крови самцов (m) и самок (f) озерной лягушки различных сезонных групп в пространстве главных компонент. PC1, PC2 – оси главных компонент – доля дисперсии данных, объясняемых главной компонентой, %; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями НАК; эллипсы – 95%-ные доверительные области. Arg – аргинин, His – гистидин, Ile – изолейцин, Leu – лейцин, Lys – лизин, Met – метионин, Phe – фенилаланин, Thr – треонин, Trp – триптофан, Val – валин.

у амфибий и негативном влиянии окружающей среды (Романова, 2005; Минеева, Минеев, 2014). В летний период не отмечено значимых различий по ИСЛ у самцов (0.31) и самок (0.30). Весной ИСЛ у самок был 0.29, у самцов этот показатель завышен, но не достигал уровня патологии (0.36). У исследованных особей озерных лягушек весной и летом ИСЛ варьировал в диапазоне 0.29–0.36, что соответствует условной норме физиологического состояния организма и их адаптивному потенциалу – 0.19–0.38. ИСЛ отражает формирование устойчивого функционирования адаптивных реакций, способствующих поддержанию высокой численности инвазивного вида при освоении новых мест обитания даже при перманентном воздействии различных поллютантов в условиях теплового загрязнения.

Один из наиболее информативных и адекватных биохимических показателей физиологического состояния эндотермных и эктотермных животных и их адаптивных возможностей – уровень аминокислотного обмена в тканях (Гараева и др., 2009; Каранова, 2011; Chernaya et al., 2016; Ковальчук и др., 2018; Kovalchuk et al., 2018). У озерных лягушек, как и у теплокровных животных, присутствует полный спектр функционально

значимых эссенциальных АК (табл. 2). Лизин, доминирующий в общем пуле АК в весенне-летний период (18–29%) и выступающий в качестве антиоксиданта, участвует в регуляции иммунологических функций и в процессах детоксикации ксенобиотиков. Гистидин и аргинин участвуют в процессах детоксикации и элиминации токсичных микроэлементов в тканях животных. Триптофан, модулируя иммунологические функции в краткосрочный период, участвует в синтезе альбуминов и глобулинов и в метаболизме гормона роста; влияет на углеводный обмен в организме. Повышенное содержание аргинина сопровождается стимуляцией фагоцитарной активности нейтрофилов и реализуется в дифференцировке В- и Т-лимфоцитов у самцов весной (Wu, 2009). Повидимому, снижение концентрации гистидина (на 41–42%) и аргинина (на 56–74%) в последнюю декаду августа в плазме крови самцов и самок связано с активным участием незаменимых АК в синтезе гемоглобина. Заслуживает внимания повышенное суммарное содержание глицина в плазме крови вместе с глутаминовой кислотой и цистеином весной у самцов и летом у самок, обеспечивающее амфибиям биосинтез трипептида (глутатиона), участвующего в детоксикации про-

дуктов метаболизма амфибий и в процессах размножения животных (Fogman et al., 2009).

Многомерный анализ главных компонент (РСА) позволил визуализировать сезонные и гендерные особенности спектра незаменимых АК в плазме крови озерной лягушки в весенне-летний период максимального напряжения метаболизма, подтверждая результаты выше представленного статистического анализа (рис. 1). Из рисунка видно, что все представленные данные образуют четыре самостоятельные группы, причем их наибольшая пространственная удаленность обусловлена сезонной спецификой аминокислотного обмена самцов и самок *P. ridibundus*. Первая главная компонента (PC1), на которую приходится 52.37% общей дисперсии исходных данных, отражает значимо повышенное содержание фенилаланина и триптофана в плазме крови весенних особей лягушек ( $p < 0.001$ ). Определен высокий коэффициент корреляции с PC1 содержания незаменимых аминокислот: лейцина (−0.88), изолейцина (−0.86), лизина (−0.86) и валина (−0.73) у лягушек летней популяции ( $p < 0.001$ ). Высокая корреляция и наибольший вклад во вторую главную компоненту (PC2), на которую приходится 15.75% дисперсии, вносят три незаменимых АК: метионин (0.60), для которого отсутствуют сезонные и половые различия; гистидин (0.59) и аргинин (0.54), повышенный уровень которых отмечен в плазме крови весенних самцов ( $p < 0.01$ ). Таким образом, озерные лягушки характеризуются высоким содержанием в периферической крови метаболитических групп: незаменимых и гликогенных аминокислот, участвующих в процессах детоксикации, иммуномодуляции и формирования адаптивных реакций амфибий.

**Выводы.** Впервые оценены гематологические и биохимические параметры гомеостаза озерной лягушки *P. ridibundus*, иллюстрируя специфику эффекторных механизмов иммунной системы, обусловленной физиологическими особенностями этого инвазивного вида, сформировавшегося устойчивые популяции в водоемах Среднего Урала. Показано, что в лимфоцитарно-гранулоцитарном составе периферической крови амфибий преобладают агранулоциты (73.3–77.1%). Доля гранулоцитов, обеспечивающих неспецифическую срочную защиту организма от инфекций и токсических воздействий, достигает у самцов и самок диапазона 23.0–26.7%. Инвазивный вид характеризуется высоким содержанием лимфоцитов в весенний и летний сезон как у самцов (69.1–69.7%), так и у самок (68.4–70.4%). ИСЛ (0.29–0.36) позволяет дать оценку физиологическому состоянию амфибий и уровню нагрузки на них антропогенного средового стресса. Весной величина ИСЛ у самок 0.29, у самцов этот показатель выше — 0.36, но не достигает уровня патологии. Впервые для *P. ridibundus* дана оценка АК-

спектра с позиции его участия в процессах детоксикации ксенобиотиков, иммуномодуляции и формирования адаптивных реакций амфибий, обеспечивающих выживание и эврибионтность вида за пределами нативного ареала. Исследованные параметры гомеостаза могут быть рекомендованы при оценке физиологического состояния гидробионтов и качества экологической среды в системе мониторинга природных и искусственных водных экосистем.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН (№122021000091-2).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алимов А.Ф., Богуцкая Н.Г. 2004. Биологические инвазии в водных и наземных экосистемах. Москва: Товарищество науч. изданий КМК.
- Берзин Д.Л., Чеботина М.Я., Гусева В.П. 2020. Накопление радионуклидов в озерной лягушке *Pelophylax ridibundus* в зоне атомного предприятия // Биология внутр. вод. № 6. С. 613. <https://doi.org/10.31857/S0320965220060042>
- Большаков В.Н., Вершинин В.Л. 2005. Амфибии и рептилии Среднего Урала. Екатеринбург: УрО РАН.
- Ван Хай Динь, Мукатова М.Д., Сколков С.А. 2013. О возможности использования озерной лягушки (*Rana ridibunda*) в качестве пищевого сырья // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. № 1. С. 190.
- Гараева С.Н., Редкозубова Г.В., Постолати Г.В. 2009. Аминокислоты в живом организме. Киев: Кишинев.
- Голованова И.Л., Филиппов А.А., Чеботарева Ю.В., Крылов В.В. 2021. Отдаленные последствия действия меди и электромагнитного поля на размерно-массовые показатели и активность пищеварительных гликозидаз у сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* // Биология внутр. вод. № 3. С. 302. <https://doi.org/10.31857/S0320965221020054>
- Государственный доклад о состоянии окружающей природной среды и влиянии факторов среды обитания на здоровье населения Свердловской области. 2014. Екатеринбург: УМЦ УПИ.
- Дгебуадзе Ю.Ю. 2014. Чужеродные виды в Голарктике: некоторые результаты и перспективы исследований // Рос. журн. биол. инвазий. Т. 7. № 1. С. 2.
- Дгебуадзе Ю.Ю., Петросян В.Г., Хляп Л.А. 2018. Самые опасные инвазионные виды России (ТОП-100). Москва: Тов-во науч. изданий КМК.
- Иванова Н.Л. 1995. Особенности экологии озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pall.), интродуцированной в водоемы-охладители // Экология. № 6. С. 473.
- Иванова Н.Л. 2017. Характер и темпы роста озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* Pall., интродуцированной в водоемы Среднего Урала // Изв. РАН. Серия биол. № 4. С. 413.

- Иванова Н.Л., Берзин Д.Л. 2019. Формирование популяционной специфики озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*) в водоемах Среднего Урала // Экология. № 6. С. 471.  
<https://doi.org/10.1134/S0367059719060064>
- Каранова М.В. 2011. Влияние острого холодового шока на пулы свободных аминокислот прудовой рыбы ротана *Percottus glehni* (Eleotridae, Perciformes) // Изв. РАН. Серия биол. № 2. С. 153.  
<https://doi.org/10.1134/S106235901102004X>
- Ковальчук Л.А. 2008. Эколого-физиологические аспекты адаптации к условиям техногенных экосистем. Екатеринбург: УрО РАН.
- Ковальчук Л.А., Мищенко В.А., Черная Л.В., Снитко В.П. 2018. Видовые особенности аминокислотного спектра плазмы крови рукокрылых (Mammalia: Chiroptera) Урала // Экология. № 4. С. 291.  
<https://doi.org/10.7868/S0367059718040066>
- Ляпков С.М. 2014. Озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) в термальных водоемах Камчатки // Зоол. журн. Т. 93. № 12. С. 1427.
- Ляпустин С.Н. 2008. Контрабанда объектов фауны и флоры и борьба с ней на Дальнем Востоке России (конец XX—начало XXI в.) Владивосток: ВФ РТА.
- Минеев А.К., Минеева О.В. 2014. Особенности гематологических параметров озерной лягушки *Rana ridibunda* Pallas, 1771 Саратовского водохранилища // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. Т. 23. № 2. С. 178.
- Прохорова Н.Б., Черняев А.М., Баженова Г.А. и др. 2004. Гидротехническое регулирование водных ресурсов. Водные ресурсы Свердловской области. Екатеринбург: АМБ. С. 123.
- Романова Е.Б. 2005. Гематологические аспекты механизмов адаптации природных популяций зеленых лягушек в условиях антропогенного средового стресса // Актуал. пробл. герпетол. и токсинол. № 8. С. 169.
- Романова Е.Б., Николаев В.Ю. 2014. Иммунофизиологические характеристики популяций зеленых лягушек урбанизированной территории // Изв. Самар. науч. центра РАН. Т. 16. № 5. С. 616.
- 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. № 2. С. 125.  
<https://doi.org/10.15393/j1.art.2018.7682>
- Рыбникова Л.С., Наволокина В.Ю. 2020. Оценка состояния гидросферы в верховьях бассейна реки Тагил (Свердловская область) // Проблемы недропользования. № 2. С. 81.  
<https://doi.org/10.25635/2313-1586.2020.02.081>
- Фоминых А.С., Ляпков С.М. 2011. Формирование новых особенностей жизненного цикла озерной лягушки (*Rana ridibunda*) в условиях подогреваемого водоема // Журн. общ. биол. Т. 72. № 6. С. 403.
- Черная Л.В., Ковальчук Л.А. 2018. Аспекты адаптации большой ложноконной пиявки *Haemoris sanguisuga* L. к антропогенному загрязнению водной среды // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды: Матер. VII Междунар. науч.-практ. конф. Челябинск. С. 60.
- Чернышова Э.В., Старостин В.И. 1994. Периферическая кровь лягушек рода *Rana* как тест-система для оценки загрязнения окружающей среды // Изв. РАН. Сер. биол. № 4. С. 656.
- Arikan H., Cicek K. 2014. Hematology of amphibians and reptiles: a review // North-West. J. Zool. V. 10. № 1. P. 190.
- Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J. 2004. The ade4 package-I: One-table methods // R. News. № 4. P. 5.
- 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. V. 466. № 1. P. 42.  
<https://doi.org/10.1134/S0012496616010129>
- Christin M.S., Mensed L., Gendron A.D., Ruby S. 2004. Effect of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens* // Aquatic Toxicology. V. 67. P. 33.
- Coico R., Sunshine G., Benjamini E. 2003. Immunology. A Short Course. Hoboken: Wiley-Liss Publications.
- Davis F.R., Maney D.L., Maers J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists // Functional Ecology. V. 22. P. 760.
- Dudgeon D., Arthington A.H., Gessner M.O. et al. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges // Biological Reviews. V. 81. P. 163.  
<https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123). Strasbourg, 1986. (<http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/QueVoulezVous>).
- Global amphibian assessment. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2008. Cambridge, UK. (available from: <http://www.globalamphibians.org>).
- Forman H.J., Zhang H., Rinna A. 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // Molecular Aspects of Medicine. V. 30. № 1–2. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
- Fournier M., Robert J., Salo H.M. et al. 2005. Immunotoxicology of Amphibians // Applied Herpetology. V. 2. P. 297.
- Johnson P.T., La Fonte B.E. 2013. Experimental infection dynamics: using immunosuppression and in vivo parasite tracking to understand host resistance in an amphibian-trematode system // J. Experimental Biology. V. 216. P. 3700.
- Kovalchuk L.A., Mishchenko V.A., Mikshevich N.V. et al. 2018. Free amino acids profile in blood plasma of bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) exposed to low positive and near-zero temperatures // J. Evol. Biochem. Physiol. V. 54. № 4. P. 281.  
<https://doi.org/10.1134/S002209301804004X>
- Poff N.L., Olden J.D., Strayer D.L. 2012. Climate Change and Freshwater Fauna Extinction Risk. In: Hannah L. (eds) Saving a Million Species. Island Press/Center for Resource Economics.  
[https://doi.org/10.5822/978-1-61091-182-5\\_17](https://doi.org/10.5822/978-1-61091-182-5_17)



- Strayer D., Dudgeon D. 2010. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges // Science. V. 29. № 1. P. 344.
- Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A. et al. 2004. Status and trend of amphibian decline and extinction worldwide // Science. V. 306. P. 1783.
- Wu G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition // Amino Acids. V. 37. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>
- Yarri D. 2005. The Ethics of Animal Experimentation. Oxford: Oxford University Press U.S. <https://doi.org/10.1093/919518174.001.0001>

## Hematological and Biochemical Parameters of an Invasive Amphibian Species *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura) Introduced into the Reservoirs of the Middle Urals

L. A. Kovalchuk<sup>1, \*</sup>, L. V. Chernaya<sup>1</sup>, V. A. Mishchenko<sup>1</sup>, and N. V. Mikshevich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Plant and Animal Ecology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences Russia, Yekaterinburg, Russia

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

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

For the first time, the results of studies of the hematological and biochemical parameters of the homeostasis of the lake frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), which formed stable populations in the reservoir of the Middle Urals, are presented. The lymphocyte-granulocyte composition of peripheral blood leukograms is characterized by a predominance of agranulocytes (73.3–77.1%), the proportion of granulocytes is 23.0–26.7%. The integral leukocyte index (ISL = 0.29–0.36) corresponds to the conditional norm of the physiological state of the organism and its adaptive potential. In spring, males have index ISL are higher (0.36) than females (0.29). The qualitative composition of the amino acid spectrum of the blood plasma of the lake frog is represented by 25 AA and their derivatives. Lake frogs are characterized by a high level of metabolic groups: essential and glycogenic amino acids. This AA are involved in both in the processes of detoxification of xenobiotics and in the processes of immunomodulation and the formation of adaptive reactions of amphibians.

**Keywords:** lake frog, peripheral blood, leukocyte formula, amino acids