

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОСТРОМОРДОЙ (*RANA ARVALIS*, NILSSON, 1842) И ОЗЕРНОЙ (*RANA RIDIBUNDA*, PALLAS, 1771) ЛЯГУШЕК ГОРОДСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ

Проанализированы изменения ряда гематологических показателей периферической крови сеголеток остромордой и озерной лягушек в градиенте урбанизации. Для животных с городской территории отмечено повышение защитной функции крови. Особенности параметров красной крови изучаемых видов бесхвостых амфибий определяются их функциональным состоянием, а также спецификой среды обитания.

Изменение естественных ландшафтов в результате деятельности человека приводит к возникновению особых условий, в которых происходит формирование новых биоценозов. Одним из примеров антропогенных ландшафтов являются городские территории со специфическим растительным и животным населением. Одним из важных компонентов урбанизированных биогеоценозов являются земноводные, нередко они оказываются в данных условиях единственными представителями фауны несинантропных позвоночных животных. При этом видовой состав батрахофауны городской среды и близлежащих естественных местообитаний принципиально не отличается. Вследствие особенностей жизненного цикла со сменой среды обитания, повышенной проницаемости голой кожи земноводные подвергаются более длительному и более интенсивному воздействию негативных факторов окружающей среды [6]. Довольно продолжительная индивидуальная жизнь амфибий (5-8 лет), высокая численность (особенно в нарушенных экосистемах) и привязанность к водным местам обитания делает эту группу животных одним из самых удобных объектов среди позвоночных животных в исследованиях по изучению механизмов адаптации животного населения к постоянно меняющимся условиям окружающей среды, в частности к условиям урбанизированных ландшафтов [2].

Система крови, являясь внутренней средой организма, представляет собой совокупность специализированных клеток, активно участвующих в физиологических функциях организма, чутко реагирующих на внешние раздражители и защищающих его от воздействия негативных факторов окружающей среды [12]. Это, в свою очередь, позволяет оценить не только

физиологическое состояние организма в конкретный период развития, но и его адаптивный потенциал. Поскольку земноводные, в частности представители рода *Rana*, характеризуются вполне развитой кроветворной и иммунной системами [15, 18], различные параметры этих систем могут отражать любые функциональные изменения, происходящие в процессе жизнедеятельности животного.

В задачи исследования входил анализ некоторых гематологических показателей периферической крови сеголеток двух видов бесхвостых амфибий рода *Rana* в градиенте урбанизации, а именно: остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilss., 1842), широко распространенного представителя местной батрахофауны, и озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pall., 1771), способной обитать не только в водоемах, загрязненных бытовыми отходами или удобрениями, но и в окрестностях крупных металлургических и химических предприятий, где другие виды земноводных не способны существовать [8].

Материалы и методы

На территории г. Екатеринбурга за период с июля по сентябрь 2000-2007 гг. был проведен отлов сеголеток остромордой и озерной лягушек из популяций, в разной степени подверженных действию урбанизации и загрязнения. Отлов сеголеток производился в первые две недели наземной жизни в непосредственной близости от водоемов, где протекало развитие личинок. В пределах города выделены четыре зоны, к которым приурочены места обитания земноводных:

I зона – в большей мере центральная часть города с многоэтажной застройкой, массивными асфальтовыми покрытиями,

водоемами с сильным промышленным загрязнением и лишены амфибий;

II зона – районы многоэтажной застройки с пустырями, участками с открытыми почвами, малыми водоемами с высоким уровнем загрязненности;

III зона – малоэтажная застройка, в основном районы, занятые домами частного сектора, пустыри, парки. Нередко биотопы этой зоны примыкают к лесопаркам;

IV зона – лесопарки города; местообитания этой зоны находятся в основном под действием рекреационной нагрузки.

В качестве контрольного для остромордой лягушки был выбран участок в 23 км от г. Екатеринбург, местообитания озерной лягушки располагаются только на городской территории. Зональная принадлежность местообитания определяется не столько его топографическим положением, сколько степенью суммарной антропогенной трансформированности территории [1]. Приемлемость настоящей типизации была подтверждена гидрохимическими анализами основных нерестовых водоемов по следующим показателям: pH, сульфаты, хлориды, свинец, ПАВ, БПК₅, нефтепродукты.

С каждого животного приготавливался мазок периферической крови по общепринятым методикам (окраска по Романовскому – Гимзе) с последующим подсчетом процентного соотношения различных видов лейкоцитов по унифицированному методу морфоло-

гического изучения форменных элементов крови (лейкоцитарная формула). Определение количества эритроцитов и лейкоцитов производилось по стандартному методу в счетной камере Горяева. Содержание гемоглобина определялось с помощью фотоэлектроколориметра гемиглобинцианидным методом [4]. Всего в ходе работы было исследовано 1188 сеголеток *R. arvalis* и 270 сеголеток *R. ridibunda*. Полученные результаты обработаны с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в статистическом пакете Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Анализ гематологических показателей сеголеток изучаемых видов земноводных выявил ряд различий, обусловленных как видовыми, так и популяционными особенностями. Видовые статистически значимые различия обнаружены по всем рассматриваемым показателям периферической крови сеголеток озерной и остромордой лягушек (табл. 1).

Как видно из таблицы, у *R. ridibunda* по сравнению с *R. arvalis* почти в два раза выше процентное содержание общих нейтрофилов за счет палочкоядерных и, главным образом, сегментоядерных форм. Доля малодифференцированных форм нейтрофилов у сеголеток озерной лягушки также выше. Кроме того, для лейкограммы *R. ridibunda* отмечено достаточно высокое содержание базофилов –

Таблица 1. Межвидовые различия гематологических показателей

Показатель	<i>Rana arvalis</i>	<i>Rana ridibunda</i>	Уровень значимости
Нейтрофилы общие, %	14.69±0.24	27.57±0.77	F=437.08, p=0.0000
миелоциты, %	0.74±0.03	1.12±0.08	F=23.47, p=0.0000
юные, %	1.78±0.04	2.65±0.12	F=69.26, p=0.0000
палочкоядерные, %	3.58±0.07	5.18±0.19	F=93.15, p=0.0000
сегментоядерные, %	8.60±0.15	18.62±0.56	F=578.35, p=0.0000
Эозинофилы, %	7.02±0.29	5.45±0.38	F=7.09, p=0.008
Базофилы, %	7.83±0.15	14.46±0.50	F=293.34, p=0.0000
Гранулоциты, %	29.54±0.37	47.48±0.77	F=488.74, p=0.0000
Моноциты, %	2.42±0.06	3.85±0.20	F=88.68, p=0.0000
Лимфоциты, %	68.04±0.38	48.70±0.79	F=534.06, p=0.0000
Эритроциты, тыс./мкл	103.83±5.14	177.17±6.48	F=56.95, p=0.0000
Лейкоциты, тыс./мкл	23.12±0.65	36.50±1.30	F=93.00, p=0.0000
Предшественники эритроцитов, тыс./мкл	7.61±0.29	10.42±0.50	F=22.00, p=0.00000
Гемоглобин, г/л	16.61±0.65	56.57±2.10	F=591.28, p=0.0000

Таблица 2. Межзональные различия лейкоцитарной формулы сеголеток озерной и остромордой лягушек, %

Показатель	Зона II	Зона III	Зона IV	Контроль
<i>Rana arvalis</i>				
Нейтрофилы общие	15.32±0.54	16.40±0.64	13.79±0.39	13.97±0.43
Сегментоядерные	8.95±0.32	10.01±0.40	8.06±0.25	7.86±0.29
Эозинофилы	6.3±0.41	6.02±0.51	8.44±0.68	6.87±0.50
<i>Rana ridibunda</i>				
Нейтрофильные миелоциты	1.36±0.14	0.74±0.15	1.05±0.12	–
Эозинофилы	7.25±0.65	6.22±1.04	3.37±0.41	–
Гранулоциты	50.45±1.12	46.14±1.96	45.23±1.19	–
Лимфоциты	45.09±1.15	51.22±2.03	51.02±1.17	–

клеток, выделяющих биологически активные вещества [12] и, возможно, участвующих в процессах нейтрализации токсических явлений [13]. Однако необходимо отметить, что информации о цитохимических свойствах и функциональной роли клеток этого типа у амфибий до сих пор очень мало и во многом она является спорной. Вероятно, исходно высокий уровень клеток гранулоцитарного ряда, моноцитов (выполняющих фагоцитарную функцию), общего количества лейкоцитов, эритроидных предшественников, эритроцитов и гемоглобина у озерной лягушки обуславливает высокий адаптивный потенциал особей данного вида и его устойчивость к условиям среды с высокой антропогенной нагрузкой, а также способствует успешному освоению новых местообитаний за пределами естественного ареала.

На основании анализа лейкоцитарной формулы периферической крови сеголеток *R. arvalis* и *R. ridibunda* с антропогенно трансформированной территории обнаружены изменения, касающиеся отдельных рядов дифференцировки лейкоцитов (табл. 2). У остромордой лягушки с ростом антропогенной нагрузки увеличивается доля нейтрофильных гранулоцитов ($F = 5.47$, $p = 0.001$), главным образом за счет увеличения доли сегментоядерных форм ($F = 8.29$, $p = 0.0000$). Доля малодифференцированных форм нейтрофилов на городской территории также незначительно возрастает по сравнению с контролем. У озерной лягушки с ростом урбанизации достоверно возрастает доля нейтрофильных миелоцитов ($F = 4.10$, $p = 0.0176$) и наблюдается тенденция к увеличению ос-

тальных форм нейтрофильных гранулоцитов. Обычно увеличение нейтрофилов наблюдается при различных интоксикациях и в стрессовых состояниях, что, возможно, справедливо и в данном случае. Таким образом, подобную стимуляцию нейтрофильного гранулоцитопоэза (без выраженного сдвига влево и лейкоцитоза) можно рассматривать и в качестве адаптационного механизма, повышающего защитную функцию крови. Известно, что нейтрофилы – активные ферментообразователи; они являются главным функциональным элементом клеточного иммунитета, участвуют в фагоцитозе бактерий и продуктов распада тканей и наиболее активно реагируют на изменения физиологического состояния организма [17].

Для сеголеток остромордой лягушки из загородной и лесопарковой популяций отмечено повышение в периферической крови доли эозинофилов по сравнению с городскими популяциями ($F = 4.2118$, $p = 0.0057$). Такая реакция, как правило, вызвана паразитарными инвазиями (чаще всего гельминтозами) [16], которые в большей степени характерны для естественных популяций, нежели городских [5]. У сеголеток озерной лягушки картина противоположная: увеличение эозинофильных лейкоцитов происходит в зоне мало- и многоэтажной застройки ($F = 11.91$, $p = 0.0000$) в два раза относительно наиболее благоприятной лесопарковой зоны. В данном случае стимуляцию эозинофильного гранулоцитопоэза можно рассматривать и как признаки своеобразной защитной (антитоксической и антимикробной) реакции организма, поскольку аналогичные изменения со стороны этих гранулоцитов

у земноводных, населяющих территории с антропогенными загрязнениями различного происхождения были отмечены и другими исследователями [3, 13]. По своим цитохимическим свойствам у холоднокровных позвоночных среди гранулоцитов нейтрофилы и эозинофилы являются наиболее функционально активными элементами крови [7].

В лейкограмме сеголеток озерной лягушки из зоны многоэтажной застройки наблюдается достоверное увеличение доли гранулоцитов ($F = 5.15$, $p = 0.0064$) и уменьшение доли лимфоцитов ($F = 7.30$, $p = 0.0008$) по сравнению с зоной малоэтажной застройки и лесопарками. Изменения общего количества лейкоцитов – показателя, характеризующегося у земноводных вариабельностью в

широких пределах, – при этом незначительны (34.10 ± 2.08 тыс./мкл, 40.98 ± 3.50 тыс./мкл и 37.11 ± 1.85 тыс./мкл соответственно) и не отличаются от данных, приведенных в литературе для животных этого вида в естественных условиях обитания [9]. Таким образом, изменения соотношения разных форм лейкоцитов у *R. ridibunda* свидетельствуют о развитии защитных процессов в организме, а выраженность этих изменений в значительной мере зависит от степени антропогенного воздействия. Значительных изменений в лейкоцитарной формуле сеголеток *R. arvalis* с ростом урбанизации (за исключением увеличения нейтрофильных гранулоцитов) не отмечено. Наблюдается тенденция к увеличению общего количества лейкоцитов от 20.33 ± 1.07 тыс./мкл у животных загородной популяции до 23.51 ± 1.12 тыс./мкл у животных зоны многоэтажной застройки. Таким образом, отсутствие выраженных колебаний как в относительных, так и в абсолютных значениях гематологических показателей, вероятно, может быть обусловлено тем, что этот вид амфибий уже адаптирован к специфическим условиям городских экосистем.

На межзональном уровне обнаружены различия и в гематологических параметрах красной крови. У сеголеток остромордой лягушки в градиенте урбанизации происходят разноплановые изменения количества эритроцитов и уровня гемоглобина. Так, в зонах II и IV содержание эритроцитов увеличивается по сравнению с контролем, а в зоне III, напротив, уменьшается ($F = 5.85$, $p = 0.0006$) (рис. 1). Количество гемоглобина с ростом антропогенной трансформации среды достоверно снижается ($F = 8.33$, $p = 0.0000$) (рис. 2). Однако с ростом урбанизации наблюдается некоторый рост числа эритроидных предшественников с 6.56 ± 0.47 тыс./мкл у животных загородной популяции до 8.15 ± 0.49 тыс./мкл у животных из популяции многоэтажной застройки. Известно, что в условиях резких изменений среды у земноводных отмечается выброс в периферическую кровь незрелых форм эритроцитов, свидетельствующий об активации процессов кроветворения [10].

Возможно, характер изменений изучаемых параметров может быть обусловлен

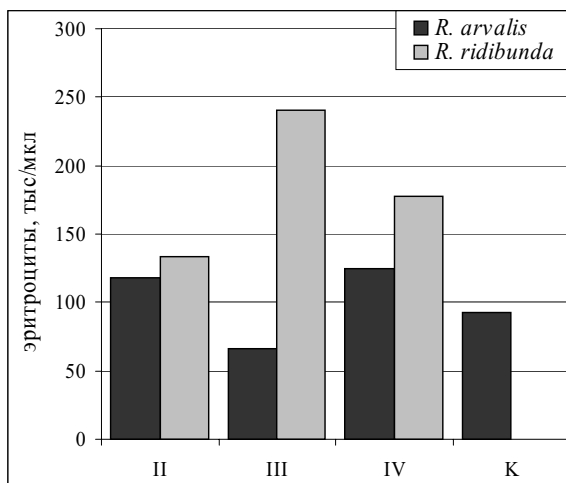


Рисунок 1. Межзональные различия количества эритроцитов

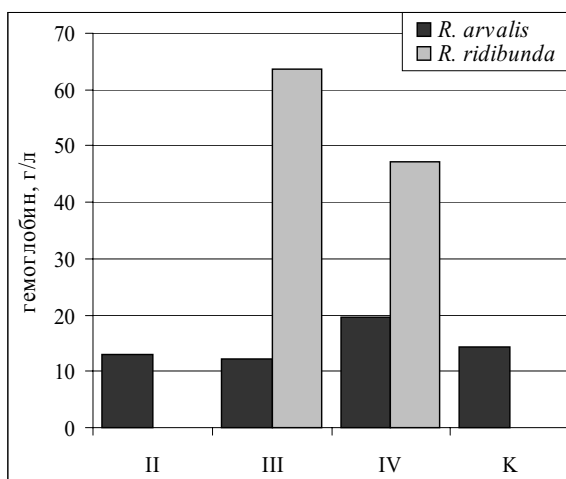


Рисунок 2. Межзональные различия количества гемоглобина

разной скоростью интенсификации процесса эритропоэза и темпов созревания эритроцитов в период метаморфоза и постметаморфоза, на протекание которых, в свою очередь, влияет специфика средовой компоненты.

У озерной лягушки с ростом урбанизации количество эритроцитов в III зоне увеличивается относительно наиболее благополучной лесопарковой зоны, а в зоне II уменьшается ($F = 22.47$, $p = 0.0000$) (рис. 1). Содержание гемоглобина определено только у сеголеток III и IV зон и также значительно увеличивается с ростом антропогенной нагрузки ($F = 20.79$, $p = 0.0000$) (рис. 2). Количество эритроидных предшественников резко снижается в зоне II относительно зоны III и IV ($F = 5.51$, $p = 0.0047$) и составляет 8.49 ± 0.71 тыс./мкл, 11.74 ± 1.65 тыс./мкл и 11.81 ± 0.67 тыс./мкл соответственно. Не исключено, что угнетение процесса эритропоэза и, как следствие, уменьшение кислородной емкости крови у сеголеток зоны многоэтажной застройки связано с патологическими процессами, нередко наблюдаемыми в печени животных (до 38–45% в выборке) из популяций данного участка, поскольку краевая зона печени на личиночной стадии и в период метаморфоза принимает активное участие в эритро- и гранулоцитопоэзе. Это предположение подтверждает тот факт, что органы кроветворения чувствительны к негативному воздействию токсикантов и аккумулируют некоторые из них (например, тяжелые металлы) [14]. В то же время увеличение кислородной емкости у животных зоны малоэтажной застройки может носить компенсаторный характер в ответ на неблагоприятные кислородные условия водоемов при меньшем повреждающем воздействии средовой компо-

ненты на функциональное состояние развивающегося организма в целом.

В ряде работ, проведенных на половозрелых земноводных, обитающих в зонах промышленного загрязнения (сточные воды химпредприятия) [11], а также в водоемах с высоким содержанием пестицидов [3], установлена тенденция к повышению содержания гемоглобина и эритроцитов в крови. Таким образом, увеличение кислородной емкости у амфибий в условиях антропогенной нагрузки можно считать адаптивным. Не исключено, что у земноводных городских популяций с возрастом изменения параметров красной крови будут носить аналогичный характер.

В результате проведенных исследований установлены видовые и популяционные особенности изучаемых показателей периферической крови сеголеток *R. arvalis* и *R. ridibunda* из популяций, населяющих территории с различной степенью урбанизации и загрязнения. Исходно высокий уровень клеток миелоидного и эритроидного ряда у озерной лягушки обуславливает высокий адаптивный потенциал особей этого вида и его устойчивость к условиям антропогенных ландшафтов, что способствует освоению новых местобитаний за пределами естественного ареала. Для животных с городской территории отмечено развитие иммунных процессов и повышение защитной функции крови. Показанные выше особенности лейкоцитарного профиля и особенно параметров красной крови изучаемых видов бесхвостых амфибий во многом определяются их онтогенетическими особенностями постметаморфического периода, а также спецификой среды обитания, накладывающей отпечаток на физиологическое состояние животных.

Список использованной литературы:

1. Вершинин В.Л. Распределение и видовой состав амфибий городской черты Свердловска // Информационные материалы Института экологии растений и животных. Свердловск, 1980. С. 5–6.
2. Вершинин В.Л. Экологические особенности популяций амфибий урбанизированных территорий / Автореф. ... дис. докт. биол. наук. Екатеринбург, 1997. 47 с.
3. Жукова Т.И., Пескова Т.Ю. Реакция крови бесхвостых амфибий на пестицидное загрязнение // Экология. 1999. № 4. С. 288–292.
4. Кост Е.А. Справочник по клиническим и лабораторным методам исследования. М.: Медицина, 1975. 383 с.
5. Лебединский А.А., Рыжкова Н.А. Гельминтоинвазия как биологический фактор, влияющий на состояние лягушек в условиях антропогенного воздействия // Экология и охрана окружающей среды. Рязань, 1994. С. 95–96.
6. Леонтьева О.А., Семенов Д.В. Земноводные как биоиндикаторы антропогенных изменений среды // Успехи современной биологии. 1997. Т. 117. № 6. С. 726–737.
7. Лобода Е.И. Морфологические и цитохимические особенности клеток белой крови у представителей некоторых видов холоднокровных позвоночных // Вестник зоологии. 1998. Т. 32. № 3. С. 54–57.

Силс Е.А. Сравнительный анализ гематологических показателей остромордой и озерной лягушек...

8. Мисюра А.Н. Экология фонового вида амфибий центрального степного Приднепровья в условиях промышленного загрязнения водоемов / Автореф. ... дис. канд. биол. наук. М., 1989. 16 с.
9. Романова Е.Б., Романова О.Ю. Особенности лейкоцитарной формулы периферической крови зеленых лягушек в условиях антропогенной нагрузки // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2003. Т. 39. № 4. С. 384–387.
10. Сюзюмова Л.М., Гребенникова С.И. Особенности эритропоэза у личинок бесхвостых амфибий в зависимости от условий развития // Экспериментальная экология низших позвоночных. Свердловск, 1978. С. 32–47.
11. Тарасенко С.Н. Гематологические аспекты адаптаций озерной лягушки к экстремальным условиям промышленного загрязнения среды // Вопросы герпетологии. Л., 1981. С. 129–130.
12. Хамидов Д.Х., Акилов А.Т., Турдыев А.А. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. Ташкент: Изд-во «Фан» УзССР, 1978. 168 с.
13. Чернышева Э.В., Старостин В.И. Периферическая кровь лягушек рода *Rana* как тест-система для оценки загрязнения окружающей среды // Известия РАН. Серия биологическая. 1994. № 4. С. 656–660.
14. Chiesa M.E., Rosenberg C.E., Fink N.E., Salibian A. Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae): effects of sublethal lead acetate // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2006. V. 50. № 3. P. 384–391.
15. Cooper E.L. Immunity mechanisms // Physiology of the amphibian / Ed Lofts B. Academic Press, Inc, 1976. V. 3. P. 163–272.
16. Elkan E. Pathology in the amphibia // Physiology of the amphibian / Ed B. Lofts. Academic Press, Inc, 1976. V. 3. P. 273–312.
17. Fournier M., Robert J., Salo H.M., Dautremepuits C., Brousseau P. Immunotoxicology of amphibians // Applied herpetology. 2005. № 2. P. 297–309.
18. Manning M.J., Horton J.D. RES structure and function of the Amphibia // The Reticuloendothelial System: a Comprehensive Treatise / Eds Cohen N., Siegel M.M. N.Y.–L.: Plenum Press, 1982. V. 3. P. 393.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ–Урал, проект № 07-04-96107