

УДК 591.111.1: 597.95: 597.851

ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭКТОТЕРМНЫХ АМФИБИОНТОВ ФАУНЫ СРЕДНЕГО УРАЛА: СИБИРСКОГО УГЛОЗУБА (*SALAMANDRELLA KEYSERLINGII* DYBOVSKY, 1870, CAUDATA) И ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* PALLAS, 1771, ANURA)

© 2022 г. Л. А. Ковальчук^{1,*}, Л. В. Черная¹, В. А. Мищенко¹,
Д. Л. Берзин¹, академик РАН В. Н. Большаков¹

Поступило 03.03.2022 г.

После доработки 09.04.2022 г.

Принято к публикации 11.04.2022 г.

Впервые представлены результаты сравнительного анализа гематологических параметров экто-термных амфибионтов фауны Среднего Урала – сибирского углозуба (*S. keyserlingii*) и озерной лягушки (*P. ridibundus*). Показана видовая специфика иммунной защиты изученных видов по содержанию гранулоцитов и агранулоцитов ($p < 0.001$). Высокий лимфоцитарный профиль (73.3–76.1%) теплоустойчивой озерной лягушки обеспечивает активацию механизмов приобретенного адаптивного иммунитета. У сибирских углозубов, адаптированных к условиям низко отрицательных температур, присутствует набор неспецифических лейкоцитов (39.3–44.4%). В сравнении с озерными лягушками сибирские углозубы характеризуются более высоким развитием врожденного иммунитета.

Ключевые слова: сибирский углозуб, озерная лягушка, лимфоциты

DOI: 10.31857/S2686738922040096

Сокращающаяся численность популяций и видового разнообразия земноводных нарушает устойчивость сообществ водных и наземных экосистем в различных регионах планеты [1–3]. На территории горного Урала в его естественных и антропогенных ландшафтах обитают экологически контрастные по температурной толерантности виды амфибий из отряда Anura – озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) и из отряда Caudata – сибирский углозуб (*Salamandrella keyserlingii* Dybovsky, 1870) [4]. При исследовании механизмов гомеостаза сибирского углозуба и озерной лягушки нами показана видовая специфика термостабильного аминокислотного спектра плазмы крови изученных амфибий, поддерживающая их выживание и эврибионтность в широком температурном диапазоне [5]. Также отмечено присутствие в крови свободных аминокислот, обладающих иммуномодулирующими свойствами и участвующих в регуляции гемопоэза [5]. Известно, что в эволюционном аспекте роль системы крови позвоночных определяется

как решающая при формировании резистентности организма к воздействию биотических и абиотических факторов среды (температура, гипоксия, токсичные химические вещества, паразитарные инфекции, стресс) [6–8]. Помимо этого, система крови у представителей герпетофауны достаточно высоко организована, а состав и морфология лимфоидной системы не отличаются от данных имеющихся научных источников по исследованию позвоночных [9–14]. Это позволяет считать, что адаптивная стратегия длительного пребывания сибирского углозуба (СУ) в условиях низко отрицательных температур (–30°C...–45°C) и толерантность озерной лягушки (ОЛ) к экстремально положительным температурам (+28°C...+40°C) несомненно обуславливает выживание амфибионтов [5, 15, 16]. Однако основная информация о механизмах иммунной защиты природных популяций хвостатых и бесхвостых амфибий весьма ограничена, а реакции адаптивного иммунитета и участие неспецифических иммунных ответов в регуляции физиологических процессов практически не исследованы [6].

Цель работы – сравнительный анализ иммуногематологических параметров периферической крови эктотермных амфибионтов природных популяций фауны Среднего Урала: сибир-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

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

ского углозуба (*S. keyserlingii*) и озерной лягушки (*P. ridibundus*).

Экспериментальные группы животных представлены половозрелыми самцами *S. keyserlingii* ($n = 20$) и *P. ridibundus* ($n = 20$), отловленными на территории Свердловской области ($56^{\circ}42'$ с.ш. $61^{\circ}20'$ в.д.) в весенний (первая декада мая) и летний (последняя декада июля) сезоны 2019–2020 гг. Отлов амфибионтов в нерестовых водоемах проводился с помощью водного сачка; сбор особей СУ в летний период осуществляли вручную в наземных укрытиях. Животных без признаков заболеваний доставляли в лабораторию в отдельных контейнерах с влажным мхом в день отлова. Сибирский углозуб *S. keyserlingii* включен в Красную Книгу Среднего Урала [17]. Статус – III категория. Редкий, малочисленный вид на периферии ареала. Встречается повсеместно, но спорадически. Экспериментальные особи СУ отловлены на затененных участках прибрежной части Калиновского пруда, расположенного в особо охраняемой лесопарковой зоне городской агломерации. Температура воды в весенний период составляла $+11^{\circ}\text{C}$, в летний $+17^{\circ}\text{C}$ при среднесуточной температуре воздуха $+15^{\circ}\text{C}$ и $+21^{\circ}\text{C}$ соответственно. Взрослые особи СУ всю жизнь проводят на суше в прибрежной полосе нерестового водоема, за исключением короткого периода размножения. Длительного пребывания на солнце не переносят и при температуре в тени около $+27^{\circ}\text{C}$ погибают. Следует отметить, что большинство видов амфибий не способны адаптироваться к обитанию в теплых водоемах, тем не менее исследователи отмечают обитание озерной лягушки (инвазивный вид на Урале) в термальных водоемах, где температура воды достигает и до $+30^{\circ}\text{C}$ [4]. Опытные особи ОЛ отловлены в неглубоких заводях р. Тагил, где температура воды весной составляла в среднем $+21^{\circ}\text{C}$, а летом $+27^{\circ}\text{C}$ и выше, при среднесуточной температуре воздуха $+14^{\circ}\text{C}$ и $+19^{\circ}\text{C}$ соответственно. Зимой температура воды исследуемого водотока не опускается ниже $+10^{\circ}\text{C} \dots +12^{\circ}\text{C}$, и обитающие в нем ОЛ характеризуются отсутствием зимней спячки. Показатели периферической крови определяли с помощью гематологического анализатора “BC-5800” (Mindray, Китай). Лейкоцитарную формулу рассчитывали на 100 лейкоцитов в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе. На основании лейкоцитарной формулы определяли интегральный лейкоцитарный индекс (ИСЛ – соотношение гранулоцитов и агранулоцитов в отн. ед.), позволяющий оценить модуляцию эффекторных механизмов иммунной системы и степень напряженности компенсаторных процессов в организме. Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ “Statistica v. 10.0”. Метод главных компонент (РСА) реали-

зован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакеты “Vegan и “Ade4”) [18].

Исследования периферической крови амфибионтов показали статистически значимое повышенное содержание гемоглобина в 1.5 раза у СУ (59.8 ± 3.3 г/л) в сравнении с ОЛ (40.2 ± 2.5 г/л) ($p = 0.04$). Показатели содержания гемоглобина соответствуют значениям, приведенным в работах отечественных исследователей [10, 14, 19]. Превышение содержания тромбоцитов в 3.5 раза (41.7 ± 5.8 Г/л) ($p = 0.01$) и двукратное повышение тромбоцита (PCT = 0.02%) связаны с возросшей долей объема цельной крови, занимаемой тромбоцитами, участвующими в иммунных реакциях у ОЛ в сравнении с СУ. У сибирского углозуба в весенний и летний периоды отмечено высокое содержание лейкоцитов (77.0 ± 7.5 Г/л), что в 2.4 раза больше, чем у ОЛ ($p = 0.001$). Лейкоцитарный состав крови ОЛ и СУ, как и у всех позвоночных, представлен двумя группами клеток: гранулоцитами (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), определяющими реакции врожденного иммунитета, и агранулоцитами (моноциты, лимфоциты), ответственными за реакции адаптивного иммунного ответа [6, 20]. В весенний и летний периоды лейкоцитарная формула периферической крови исследуемых амфибий имеет лимфоидный профиль: у ОЛ (69.1–69.8%) и у СУ (52.4–56.7%) (табл. 1). Выявлены видовые различия по количественному содержанию лимфоцитов, гранулоцитов и агранулоцитов, отражающих взаимосвязь эффекторных механизмов иммунной системы генетически детерминированных видов амфибий ($p < 0.001$) (табл. 1).

Периферическая кровь исследованных видов характеризуется преобладанием агранулоцитов, обеспечивающих иммунный надзор и избирательную реактивность организма в весенний и летний сезоны: у ОЛ – 73.3–76.1% и у СУ – 55.7–60.3% ($p < 0.001$). Лимфоцитарно-гранулоцитарный состав периферической крови амфибий характеризуется невысокой долей гранулоцитов у ОЛ (24.0–26.7%) в сравнении с СУ (39.3–44.4%) ($p < 0.001$). В весенний и летний периоды в периферической крови СУ доля гранулоцитов в 1.7 раза выше, чем у ОЛ ($p < 0.001$), а доля агранулоцитов на 30% выше у ОЛ (табл. 1). Повышенный уровень нейтрофилов ($p < 0.001$) периферической крови СУ обеспечивает неспецифическую защиту организма как от токсических воздействий, так и от патогенных инфекций. Отмечена также разнонаправленность сезонной динамики палочкоядерных нейтрофилов в крови ОЛ и СУ ($p < 0.001$) (табл. 1). У летних особей ОЛ снижено содержание сегментоядерных нейтрофилов в 2.7 раза и у СУ в 3.3 раза.

Активация эозинофильного гранулоцитопоэза в крови самцов ОЛ в 2.6 раза ($p < 0.001$) и у СУ

Таблица 1. Параметры лейкоцитарной формулы самцов озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*) и сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*). Среднее арифметическое (X_{Mboot}), ошибка среднего (SE_{boot}) и доверительный интервал ([95% CI_{boot}]) бутстреп-распределения

Показатели, %	Вид	I. Весна		II. Лето		Tukey's test (<i>p</i> -value)	
		ОЛ (<i>n</i> = 8) СУ (<i>n</i> = 11)	ОЛ (<i>n</i> = 8) СУ (<i>n</i> = 11)	ОЛ (<i>n</i> = 12) СУ (<i>n</i> = 9)	ОЛ (<i>n</i> = 12) СУ (<i>n</i> = 9)		
Нейтрофилы	ОЛ	24.1 ± 1.4 [21.1–26.8]	17.1 ± 0.5* [16.2–18.0]	I–II (< 0.001)	Вид I: < 0.001 II: < 0.001		
	СУ	40.6 ± 1.0@ [38.8–42.6]	33.4 ± 0.6*@ [32.3–34.4]			I–II (< 0.001)	
– юные	ОЛ	3.3 ± 0.3 [2.6–4.0]	5.8 ± 0.4* [5.2–6.5]	I–II (< 0.001)	Вид I: < 0.001 II: < 0.001		
	СУ	6.2 ± 0.3@ [5.7–6.7]	9.3 ± 0.4*@ [8.6–10.0]			I–II (< 0.001)	
– палочкоядерные	ОЛ	9.2 ± 0.7 [7.9–10.5]	6.9 ± 0.6* [5.8–8.0]	I–II (0.05)	Вид I: 0.28 II: < 0.001		
	СУ	10.1 ± 0.4 [9.3–10.9]	17.1 ± 0.3*@ [16.4–17.8]			I–II (< 0.001)	
– сегментоядерные	ОЛ	11.5 ± 1.0 [9.7–13.7]	4.2 ± 0.2* [3.7–4.6]	I–II (< 0.001)	Вид I: < 0.001 II: < 0.001		
	СУ	23.8 ± 0.6@ [22.7–24.9]	7.1 ± 0.5*@ [6.1–8.0]			I–II (< 0.001)	
Эозинофилы	ОЛ	2.7 ± 0.3 [2.1–3.2]	6.9 ± 0.5* [5.9–7.9]	I–II (< 0.001)	Вид I: 0.05 II: 0.10		
	СУ	3.8 ± 0.2@ [3.4–4.3]	5.9 ± 0.3* [5.4–6.3]			I–II (< 0.001)	
Моноциты	ОЛ	4.2 ± 0.6 [3.0–5.4]	6.3 ± 0.5* [5.4–7.3]	I–II (0.001)	Вид I: 0.15 II: < 0.001		
	СУ	3.3 ± 0.2 [2.9–3.7]	3.6 ± 0.2@ [3.3–3.9]			I–II (0.60)	
Лимфоциты	ОЛ	69.1 ± 0.9 [67.5–71.1]	69.8 ± 0.5 [68.8–70.8]	I–II (0.60)	Вид I: < 0.001 II: < 0.001		
	СУ	52.4 ± 1.0@ [50.4–54.4]	56.7 ± 0.8*@ [55.2–58.1]			I–II (0.001)	

* – статистически значимые сезонные различия: I и II ($p < 0.05$); @ – видовые различия ($p < 0.05$); ОЛ – озерная лягушка, СУ – сибирский углозуб.

Note: * – statistically significant seasonal differences: I and II ($p < 0.05$); @ – species differences ($p < 0.05$); LF – Lake frog, SS – Siberian salamander.

в 1.6 раза ($p < 0.001$) в летний период свидетельствует о единых механизмах, определяющих способность животных к избирательной адаптивной стратегии как по антимикробной, так и по проти-

вогельминтной иммунной защите [13, 14]. В периферической крови половозрелых самцов СУ в весенний и летний периоды отмечено значимое содержание участников клеточных воспалитель-

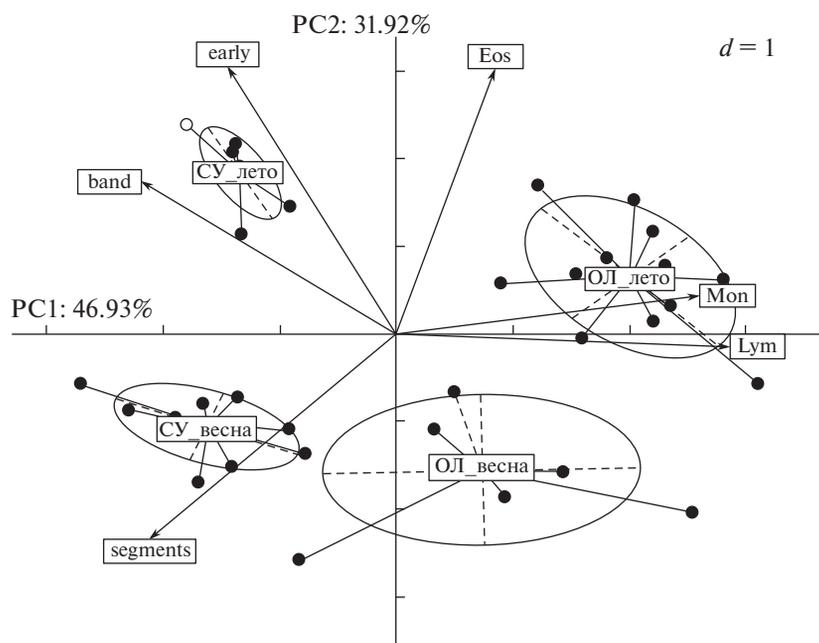


Рис. 1. Результаты компонентного анализа лейкограммы (%) сибирского углозуба (СУ) и озерной лягушки (ОЛ) в разные сезоны года. PC1, PC2 – оси главных компонент, % – процент дисперсии данных, объясненных главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями; эллипсы представляют собой 95% доверительные области.

ных реакций: базофильных лейкоцитов (0.08–0.09%) и их отсутствие в крови ОЛ. Межвидовые различия по содержанию моноцитов у исследуемых гидробионтов весной отсутствуют ($p = 0.15$) и наблюдаются в летний период ($p < 0.001$). Известно, что повышенная активация моноцитов, выполняющая фагоцитарную роль, продуцирует провоспалительные цитокины – эндогенные регуляторы гемопоэза и клеточно-опосредованного иммунного ответа [7, 11, 20].

По-видимому, в ответ на действие эндотоксинов среды обитания моноциты ОЛ (в отличие от СУ) в летний период усиливают выработку провоспалительных цитокинов, активируя систему естественного иммунитета ($p < 0.001$). Проведенный расчет ИСЛ подтвердил межвидовые различия в лейкоцитарном профиле исследованных животных. Высокий показатель ИСЛ (0.65–0.80) для СУ, по сравнению с ИСЛ (0.32–0.36) для ОЛ подтверждает более выраженную реактивность системы врожденного иммунитета, обеспечивающей неспецифическую срочную защиту организма от патогенных антигенов среды обитания ($p < 0.001$). Наряду с единицами закономерностями, выявленными в путях поддержания гомеостаза у двух видов амфибий: озерной лягушки и сибирского углозуба, показана и определенная стратегия разнонаправленности в механизмах аварийного регулирования иммунитета.

Использование метода главных компонент (РСА) позволило визуализировать видовую и се-

зонную специфику лейкоцитарного состава крови СУ и ОЛ, подтверждая результаты представленного выше статистического анализа. Показано, что 46.93% общей дисперсии параметров крови приходится на первую главную компоненту (PC1), 31.92% – на вторую главную компоненту (PC2) (рис. 1). Первая (PC1) и вторая (PC2) главные переменные обуславливают значимые различия амфибионтов по основным параметрам лейкоцитарной крови. Наибольший вклад в межвидовую изменчивость показателей крови по PC1 вносят лимфоциты (30.43%), моноциты (25.01%), палочкоядерные нейтрофилы (17.68%), сегментоядерные нейтрофилы (16.52%). Их коэффициенты корреляции с PC1 составили соответственно: 0.93, 0.84, –0.71, –0.68 ($p < 0.001$). Первая главная компонента по этим переменным четко выделяет в самостоятельные группы как особей резистентного вида к холоду (СУ), так и теплоустойчивого вида (ОЛ) (рис. 1). Со второй главной компонентой PC2 высоко коррелируют эозинофилы (0.80), юные нейтрофилы (0.81), сегментоядерные нейтрофилы (–0.62). Вклад этих показателей в сезонную изменчивость лейкоцитарной формулы изучаемых видов амфибий составил 33.67, 34.18 и 20.29%, соответственно, что также подтверждает неоднородность особей исследованных двух экологически контрастных видов амфибий по данным показателям. Из рисунка видно, что все представленные данные обособлены в четыре самостоятельные группы, причем их наибольшая

пространственная дифференциация обусловлена альтерацией лейкоцитарного состава крови в зависимости от сезона.

Таким образом, результаты проведенных исследований впервые позволили оценить видовую специфику эффекторных механизмов иммунной системы в регуляции физиологических процессов амфибионтов: озерной лягушки и сибирского углозуба, что обеспечивает выживание и эврипогенность исследованных видов в широком температурном диапазоне естественных и антропогенных ландшафтов Среднего Урала. Знание о наследственно обусловленных иммунологических параметрах гомеостаза видов, помимо несомненного теоретического интереса, имеют и прикладное значение при разработке природоохранных мероприятий в условиях быстрых преобразований среды обитания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Отлов и содержание животных в лаборатории осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и научных целей (European convention..., 1986).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Strayer D., Dudgeon D.* Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges // *Science*. 2010. V. 29. № 1. P. 344–358.
2. Global amphibian assessment. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2008. Cambridge, UK. (Available from: <http://www.globalamphibians.org>).
3. *Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., et al.* Status and trend of amphibian decline and extinction worldwide // *Science*. 2004. V. 306. P. 1783–1786.
4. *Большаков В.Н., Вершинин В.Л.* Амфибии и рептилии Среднего Урала. Екатеринбург; 2005.
5. *Ковальчук Л.А., Черная Л.В., Мищенко В.А., и др.* Аминокислотный спектр плазмы крови эндемичного и инвазивного видов земноводных фауны Урала // Доклады Российской академии наук. Научки о жизни. 2021. Т. 500. № 1. С. 478–482.
6. *Хаитов Р.М.* Иммунология: Структура и функции иммунной системы. М.: ГЭОТАР – Медиа. 2013.
7. *Davis F.R., Maney D.L., Maers J.C.* The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists // *Functional Ecology*. 2008. V. 22. P. 760–772.
8. *Ковальчук Л.А., Мищенко В.А., Черная Л.В., и др.* Особенности иммуногематологических параметров перелетного (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) и оседлого (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) видов рукокрылых фауны Урала // Доклады РАН. Научки о жизни. 2021. Т. 501. № 6. С. 49–52.
9. *Fournier M., Robert J., Salo H.M., et al.* Immunotoxicology of Amphibians // *Applied Herpetology*. 2005. V. 2. P. 297–309.
10. *Силс Е.А.* Сравнительный анализ гематологических показателей остромордой (*Rana arvalis*, Nilsson, 1842) и озерной (*Rana ridibunda*, Pallas, 1771) лягушек городских популяций // Вестник ОГУ. 2008. № 10 (92). С. 230–235.
11. *Zimmerman L.M., Vogel L.A., Bowden R.M.* Understanding the vertebrate immune system: Insights from the reptilian perspective // *Journal Experimental Biology*. 2010. V. 213. P. 661–671.
12. *Arikan H., Cicek K.* Hematology of amphibians and reptiles: a review // *North-West. J. Zool*. 2014. V. 10. № 1. P. 190–209.
13. *Романова Е.Б., Соломайкин Е.И., Бакиев А.Г. и др.* Лейкоцитарный состав крови *Elaphe diene* (Serpentes: Colubridae) заповедника “Оренбургский” (Россия) // *Nature Cons. Res. Заповедная наука*. 2018. № 3. С. 28–35.
14. *Романова Е.Б., Шаповалова К.В., Рябинина Е.С.* Лейкоцитарный состав крови и микроядра в эритроцитах амфибий загрязненных водных объектов Нижегородской области // *Принципы экологии*. 2018. № 2. С. 125–139.
15. *Берман Д.И., Мещерякова Е.Н., Булахова Н.А.* Экстремальные отрицательные температуры и потери массы сибирским углозубом (*Salamandrella keyserlingii*, Amphibia, Hynobiidae) // Доклады Академии Наук. 2016. Т. 468. № 5. С. 590–593.
16. *Ляпков С.М.* Озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) в термальных водоемах Камчатки // Зоол. журн. 2014. Т. 93. № 12. С. 1427–1432.
17. Красная книга Среднего Урала. Екатеринбург; Изд-во Урал. Ун-та. 1996.
18. *Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J.* The ade 4 package-I: One-table methods // *R News*. 2004. № 4. P. 5–10.
19. *Вершинин В.Л., Вершинина С.Д.* Сравнительный анализ содержания гемоглобина у четырех видов бесхвостых амфибий Уральской горной страны // Доклады РАН. 2013. № 4. С. 488–491.
20. *Coico R., Sunshine G., Benjamini E.* Immunology. A Short Course. Hoboken. NJ: Wiley-Liss Publications. 2003.

IMMUNOHEMATOLOGICAL PARAMETERS OF ECTOTHERMAL AMPHIBIANS OF THE FAUNA OF THE MIDDLE URALS: SIBERIAN SALAMANDER (*HYNOBIUS KEYSERLINGII* DYBOVSKY, 1870, CAUDATA) AND LAKE FROG (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* PALLAS, 1771, ANURA)

**L. A. Kovalchuk^{a,#}, L. V. Chernaya^a, V. A. Mishchenko^a,
D. L. Berzin^a, and Academician of the RAS V. N. Bolshakov^a**

^a *Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Plant and Animal Ecology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

[#]*e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru*

The results of a comparative analysis of hematological parameters of amphibians of the Middle Ural fauna: – Siberian salamander (*S. keyserlingii*) and Lake frog (*P. ridibundus*) are presented for the first time. The species specificity of the immune protection of amphibians by the granulocytes and agranulocytes content is shown ($p < 0.001$). The high lymphocytic profile (73.3–76.1%) of the thermophilous lake frog provides activation of the mechanisms of acquired adaptive immunity. Siberian salamanders adapted to conditions of low negative temperatures have a set of nonspecific leukocytes (39.3–44.4%). In comparison with Lake frogs, Siberian salamanders are characterized by a higher development of innate immunity.

Keywords: Siberian salamander, Lake frog, lymphocytes