

УДК 597.851(470.341)

**ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНДЕКСЫ И МИКРОЯДРА В ЭРИТРОЦИТАХ
КАК ПОПУЛЯЦИОННЫЕ МАРКЕРЫ ИММУННОГО СТАТУСА
PELOPHYLAX RIDIBUNDUS (PALLAS, 1771) (AMPHIBIA: RANIDAE),
ОБИТАЮЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ БИОТОПИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ**

Е. Б. Романова, К. В. Шаповалова, Е. С. Рябинина, Д. Б. Гелашвили

*Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
Россия, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23
E-mail: romanova@ibbm.unn.ru*

Поступила в редакцию 3.08.2017 г., принята 21.11.2017 г.

Романова Е. Б., Шаповалова К. В., Рябинина Е. С., Гелашвили Д. Б. Лейкоцитарные индексы и микроядра в эритроцитах как популяционные маркеры иммунного статуса *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae), обитающих в различных биотопических условиях // Поволжский экологический журнал. 2018. № 1. С. 60 – 75. DOI: 10.18500/1684-7318-2018-1-60-75.

Проведена дифференцированная оценка форменных элементов крови и видов микроядер в эритроцитах озёрных лягушек (*Pelophylax ridibundus*), обитающих в водоёмах Нижегородской области, различающихся по происхождению, морфологии и химическому составу. Специфические абиотические условия (торфокарьер) и антропогенная нагрузка приводили к наиболее выраженному изменению лейкоцитарного состава крови, соответствующему нейтрофильному типу лейкомоидной реакции и возрастанию доли микроядер в эритроцитах. Установлена умеренная положительная корреляционная взаимосвязь между возрастанием количества разрыхленных микроядер ($r = 0.72$, $p = 0.0179$) и содержанием в водоёме нитритов (мг/л). Комплексное воздействие химических загрязнителей техногенного происхождения в высоких концентрациях (меди, хрома, нефтепродуктов) вызывало активизацию процесса эритропоза и напряжение гуморального звена иммунитета, что подтверждалось характером лейкомоидной реакции лимфатического типа. Клеточные и гуморальные формы иммунного реагирования, направленные на дифференциацию «своих» молекул от «чужих», обеспечивали стабильность онтогенеза лягушек под воздействием антропогенного пресса. Интегральные лейкоцитарные индексы: кровно-клеточный показатель, индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов, лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс и индекс сдвига лейкоцитов, отражающие уровень общей реактивности организма, могут рассматриваться как популяционные маркеры иммунного статуса амфибий.

Ключевые слова: *Pelophylax ridibundus*, микроядра, иммунный статус.

DOI: 10.18500/1684-7318-2018-1-60-75

ВВЕДЕНИЕ

Роль иммунной системы в адаптивных реакциях животных на изменение условий существования общепризнана. Объективными индикаторами воздействия на иммунный статус организма животных являются лейкоцитарные индексы, отражающие взаимосвязи клеток крови и позволяющие оценить работу эффекторных механизмов иммунной системы, а также уровень иммунологической реактивности

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНДЕКСЫ И МИКРОЯДРА В ЭРИТРОЦИТАХ

организма (Мустафина и др., 1999; Ткаченко, Дерхо, 2014 и др.). Характеристикой иммунного статуса определенных компонентов биоты, в том числе и амфибий, являются и показатели цитогенетического гомеостаза (частота aberrантных клеток, микроядер в клетках крови), отражающие ослабление адаптивных возможностей организма и рост патологических состояний (Жулева, Дубинин, 1994; Логинов и др., 2003, 2004; Манских, 2006 и др.).

Однако на сегодняшний день малоизученными являются вопросы оценки иммунного статуса амфибий под воздействием антропогенного пресса. Между тем знание механизмов регуляции защитных функций организма необходимо как для теории, так и для решения практических природоохранных вопросов в области экологии отдельных видов.

Целью работы являлась дифференцированная оценка форменных элементов крови и видов микроядер в эритроцитах озёрных лягушек (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771), обитающих в водоёмах Нижегородской области и различающихся по происхождению, морфологии и химическому составу.

В работе впервые установлено, что уровень изменения величины лейкоцитарных индексов: кровно-клеточного показателя, индекса соотношения нейтрофилов и лимфоцитов, лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса, индекса соотношения лимфоцитов и эозинофилов и индекс сдвига лейкоцитов, позволяет выявить признаки угнетения иммунной реактивности, что дает основание рассматривать их в качестве популяционных маркеров иммунного статуса амфибий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом работы служили сборы озёрных лягушек (*P. ridibundus*) (75 особей), обитающих в пяти водоёмах Нижегородской области, различающихся абиотическими условиями (Бакка, Киселева, 2008; Гелашвили и др., 2008).

Торфокарьер Ситниковского орнитологического заказника (далее – торфокарьер) (координаты: широта 56°43'42.93", долгота 44°07'17.99") представляет собой крупную систему водоёмов выработанных торфяных месторождений разного типа и возраста на месте переходных и низинных болот, разработанных способами гидроразмыва и фрезерным. Имеются небольшие участки неразработанных и восстановившихся после торфоразработок низинных и переходных болот. Водоёмы имеют неодинаковую глубину и разный характер растительности. На территории ведутся выборочные рубки леса на дрова, охотничье хозяйство (осенняя охота), любительское рыболовство.

Озеро Рустай (широта 56°50'57.11", долгота 44°80'11.11") является старицей р. Керженец, притока р. Волга. Проточное, глубина до 1.5 – 2 м, берега частично заросли камышом лесным (*Scirpus sylvaticus*).

Болото Круглое Дальнее, Приволжская возвышенность, Стародубье, водораздел рек Кудьяма и Кишма. В 11.7 км на юго-запад от г. Богородск, в 1 км на юг от с. Теряево (широта 56°02'47.45", долгота 43°35'69.87"). Болото переходного типа с низкорослым древостоем из сосны и берёзы, в западной части находится открытый водоём со сплавиной, образованной сфагновыми мхами и сабельником болотным. Место сбора ягод.

Озеро Жилново (широта 56°21'28.80", долгота 44°15'37.41"). Водоём входит с цепь пойменных озёр правобережья Волги, расположенных между г. Н. Новгородом и г. Кстово. Озеро находится на 1 км северо-восточнее д. Малая Ельня, протяженность озера 1.5 км и ширина до 300 м. Глубина от 2 до 4 м, есть мелководные участки. Берега зарастают травой, дно илистое.

Озеро Силикатное (широта 56°36'83.89", долгота 43°78'12.47"). Водоём создан искусственно на месте добычи песка для бетонных изделий ЗКПД-4. Водоём представляет собой канал длиной 6 км, имеющий примерно посередине большое озеро, разделенное насыпью. Канал начинается в промзоне неподалеку от оз. Светлоярское и заканчивается впадением в р. Чёрная возле пос. Высоково. Ширина озера 1.5 км, береговая черта в районе завода постоянно меняется в связи с добычей песка. Глубина в озере достигает 20 м, берег и дно песчаные, вода прозрачная. Заболоченности практически нет.

В исследованных водоёмах в прибрежной зоне были отобраны пробы воды, в которых с помощью спектрофотометра Nach DR-2800 (Nach Company, США) определены химические загрязнители: железо общее, марганец, медь, свинец, никель, цинк, хром, нитрит-ионы (NO₂), нитрат-ионы (NO₃), сульфаты, хлориды, нефтепродукты и водородный показатель (рН). Относительную степень загрязнения оценивали по коэффициенту комплексности загрязненности воды, рассчитанному по тринадцати ингредиентам и показателям качества воды, отвечающим свободному перечню № 3 (РД 52.24.643-2002), учитывая показатели, превышающие норматив качества воды для водоёмов рыбохозяйственного назначения (ПДК_{рыб-хоз}) (Нормативы качества воды..., 2010). Норматив качества воды водных объектов рыбохозяйственного назначения был выбран нами как наиболее жесткий из существующей нормативно-технической документации.

Число эритроцитов (тыс./мм³), лейкоцитов (тыс./мм³) и дифференцированный подсчет видов лейкоцитов (в %): нейтрофилов разной степени зрелости, базофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов, проводили общепринятым способом (Меньшиков и др., 1987). На основании лейкоцитарной формулы крови были рассчитаны интегральные лейкоцитарные индексы (отн. ед.) (Мустафина и др., 1999; Ткаченко, Дерхо, 2014; Sabagna et al., 2005):

$$1) \text{ кровно-клеточный показатель (ККП)} = \frac{\text{Э} + \text{ПН} + \text{СН}}{\text{Л} + \text{М}};$$

$$2) \text{ реактивный ответ нейтрофилов (РОН)} = \frac{\text{ПН} \times \text{СН}}{(\text{Л} + \text{М}) \times \text{Э}};$$

$$3) \text{ лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ)} = \frac{\text{Л} \times 10}{\text{Э} + \text{ПН} + \text{СН}};$$

$$4) \text{ индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ)} = \frac{\text{ПН} + \text{СН}}{\text{Л}};$$

$$5) \text{ индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов (ИСЛЭ)} = \frac{\text{Л}}{\text{Э}};$$

$$6) \text{ индекс соотношения нейтрофилов и эозинофилов (ИСНЭ)} = \frac{\text{ПН} + \text{СЭ}}{\text{Э}};$$

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНДЕКСЫ И МИКРОЯДРА В ЭРИТРОЦИТАХ

$$7) \text{ индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ)} = \frac{\text{Э} + \text{Б} + \sum \text{Н}}{\text{М} + \text{Л}};$$

$$8) \text{ индекс ядерного сдвига нейтрофилов (ИЯСН)} = \frac{\text{ПН} + \text{Мл} + \text{ЮН}}{\text{СН}},$$

где Мл – миелоциты; ЮН – юные нейтрофилы; ПН – палочкоядерные нейтрофилы; СН – сегментоядерные нейтрофилы; Э – эозинофилы; Б – базофилы; М – моноциты; Л – лимфоциты.

Подсчет микроядер (Жулева, Дубинин, 1994) осуществляли на микроскопе Meiji Techno (Meiji Techno Co, Япония) с использованием иммерсионного объектива при общем увеличении $\times 1500$ ($100 \cdot 10 \cdot 1.5$), просматривая для каждой особи по 2000 эритроцитов (30000 клеток на выборку).

В связи с отсутствием в литературе (Жулева, Дубинин, 1994) четких количественных и качественных классификационных характеристик шести видов микроядер, нами предложено выделять в эритроцитах амфибий четыре вида: *a* – хорошо оформленные, обособленные; *b* – прикрепленные; *в* – палочковидные; *г* – разрыхленные, с учетом формы микроядра и его расположения относительно основного

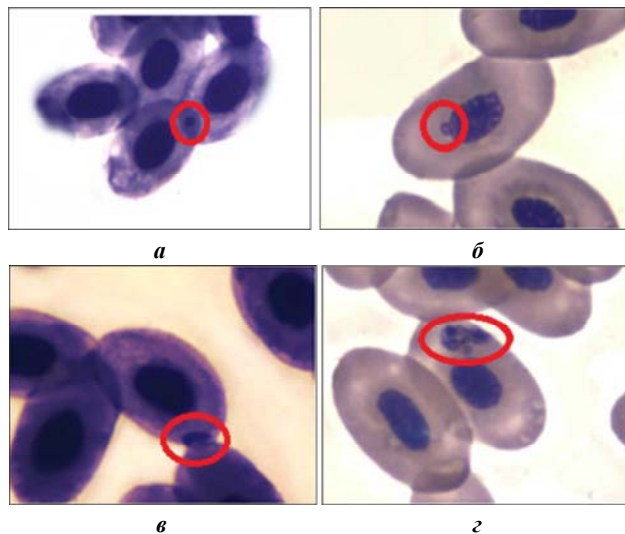


Рис. 1. Виды микроядер в эритроцитах крови *Pelophylax ridibundus*: *a* – обособленные, *b* – прикрепленные, *в* – палочковидные, *г* – разрыхленные

клеточного ядра (рис. 1).

Полученные первичные данные проверяли на нормальность распределения по критериям Шапиро – Уилка, Лиллиефорса, Колмогорова – Смирнова. Анализ данных проводили методами непараметрической статистики с расчетом критериев: Краскела – Уоллиса (*H*) (при множественном сравнении независимых групп по одному признаку); Данна (*D*) (множественный критерий при попарном сравнении групп), коэффициента ранговой корреляции Спирмена (*r*) (при анализе взаимосвязи) и по критерию *z* при сравнении до-

лей. Для выявления отличий между группами объектов по совокупности показателей был использован многомерный дисперсионный анализ с использованием лямбды Уилкса в качестве критериальной статистики. Ввиду несоответствия первичных данных нормальному распределению значимость отличий (*p*-значения) рассчитывалась путем рандомизации с использованием перестановочной процедуры (Шитиков, Розенберг, 2014). Классификацию выборок проводили кластерным ана-

лизом и методом главных компонент. За величину уровня статистической значимости принимали $p = 0.05$. При проведении множественных сравнений производилась коррекция критического уровня значимости с помощью поправки Бонферрони (Гланц, 1998).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные водоёмы различались уровнем и видом химических загрязнителей. Как известно, воды обводненных торфокарьеров отличаются кислотностью, низкой минерализацией, значительным содержанием органических соединений (Муравьева и др., 2010). Вода исследованного торфокарьера, по нашим данным, характеризовалась превышением ПДК_{рыб-хоз} по содержанию железа (18.3 ПДК) и нефтепродуктов (6 ПДК). Значение коэффициента комплексности загрязнённости воды составило 15.38%. Воды оз. Рустай также характеризовались невысоким уровнем загрязнения, обусловленным природными геохимическими факторами, в них обнаружено превышение ПДК_{рыб-хоз} по содержанию железа (11.4 ПДК) и марганца (2 ПДК). Коэффициент комплексности загрязнённости воды 15.38%.

Остальные три водоёма были в большей степени загрязнены микроэлементами техногенного происхождения. Болото Круглое Дальнее – марганцем (20 ПДК), медью (18 ПДК), хромом (3.5 ПДК) и нефтепродуктами (50 ПДК), коэффициент комплексности загрязнённости воды 30.76%; оз. Жилново – железом (2.5 ПДК), медью (182 ПДК), хромом (3.95 ПДК) и нефтепродуктами (40 ПДК), коэффициент комплексности загрязнённости воды 30.76%; оз. Силикатное – железом (2 ПДК), марганцем (10 ПДК), медью (2 ПДК), хромом (2.5 ПДК) и нефтепродуктами (19 ПДК), коэффициент комплексности загрязнённости воды 30.76%.

Для каждой выборки из популяций озёрных лягушек был получен набор цитогематологических показателей, усреднённых по всем исследованным особям. Между выборками выявлены статистически значимые различия по содержанию в крови лейкоцитов ($H = 35.41, p < 0.001$) и эритроцитов ($H = 20.95, p = 0.0003$) (табл. 1).

Таблица 1

Общее содержание лейкоцитов и эритроцитов в крови *Pelophylax ridibundus*

№ п/п	Водоём	Содержание лейкоцитов, тыс./мм ³	Содержание эритроцитов, тыс./мм ³
1	Торфокарьер	22.10±1.22*	215.50±14.6*
2	Оз. Рустай	15.53±1.12*	190.13±5.19*
3	Болото Круглое Дальнее	22.80±8.06*	219.73±5.26*
4	Оз. Жилново	16.27±0.85*	230.60±3.97*
5	Оз. Силикатное	15.40±0.42*	216.86±4.64*

* Статистически значимые различия по критерию Краскела – Уоллиса (H).

Статистически значимые различия по критерию Данна (D) при попарном сравнении содержания лейкоцитов выявлены между популяциями озёрных лягушек, обитающих в торфокарьере и оз. Рустай ($D = 3.57, p = 0.0035$); торфокарьере и оз. Жилново ($D = 3.17, p = 0.014$); торфокарьере и оз. Силикатное ($D = 3.61, p = 0.0002$); оз. Рустай и болоте Круглое Дальнее ($D = 4.25, p = 0.0002$); болоте Круг-

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНДЕКСЫ И МИКРОЯДРА В ЭРИТРОЦИТАХ

лое Дальнее и оз. Жилново ($D = 3.81, p = 0.0013$), болоте Круглое Дальнее и оз. Силикатное ($D = 4.30, p = 0.0001$). Попарное сравнение выборок лягушек по содержанию в крови эритроцитов выявило статистически значимое по критерию Данна возрастание исследованного показателя в популяциях, постоянно обитающих в среде, наиболее загрязненной нефтепродуктами: болото Круглое Дальнее и оз. Рустай ($D = 3.13, p = 0.015$), оз. Жилново и оз. Рустай ($D = 4.37, p = 0.00012$). Возрастание в крови количества эритроцитов можно считать адаптивной реакцией, поскольку при этом одновременно происходит и увеличение кислородной емкости крови, что обеспечивает, по всей видимости, лучшее выживание животных в условиях загрязнения водоёма нефтепродуктами.

Отметим наличие микроядер в эритроцитах лягушек всех исследованных выборок. По суммарному содержанию микроядер лягушки, обитающие в торфокарьере (114) и оз. Жилново (88) превосходили другие выборки. В табл. 2 приведены статистически значимые результаты попарного сравнения долей микроядер в эритроцитах озёрных лягушек исследованных выборок с применением z -критерия. Так, например, по суммарному содержанию микроядер выявлены статистически значимые различия между парами популяций, обитающих в торфокарьере и оз. Рустай ($z = 7.11, p < 0.001$); торфокарьере и болоте Круглое Дальнее ($z = 6.47, p < 0.001$); торфокарьере и оз. Силикатное ($z = 7.11, p < 0.001$); оз. Рустай и оз. Жилново ($z = 5.45, p < 0.001$); болоте Круглое Дальнее и оз. Жилново ($z = 4.78, p < 0.001$), оз. Жилново и оз. Силикатное ($z = 5.45, p < 0.001$).

Таблица 2

Содержание микроядер в эритроцитах периферической крови *Pelophylax ridibundus*, обитающих в водоёмах Нижегородской области

Виды микроядер	Водоёмы					Статистические показатели
	Торфокарьер (1)	Оз. Рустай (2)	Болото Круглое Дальнее (3)	Оз. Жилново (4)	Оз. Силикатное (5)	
Оформленные, обособленные	27/0.9*	14/0.46	13/0.43	42/1.4	4/0.13	$z_{1-5} = 4.13, p = 0.00005$; $z_{2-4} = 3.74, p = 0.0027$; $z_{3-4} = 3.91, p = 0.0013$; $z_{4-5} = 5.60, p < 0.001$
Палочковидные	6/0.2	1/0.03	2/0.06	–	1/0.03	–
Разрыхленные	49/1.63	12/0.40	17/0.56	35/0.17	20/0.67	$z_{1-2} = 4.73, p < 0.001$; $z_{1-3} = 3.94, p < 0.001$
Сумма микроядер	114/3.8	29/0.93	35/1.17	88/2.93	29/0.97	$z_{1-2} = 7.11, p < 0.001$; $z_{1-3} = 6.47, p < 0.001$; $z_{1-5} = 7.11, p < 0.001$; $z_{2-4} = 5.45, p < 0.001$; $z_{3-4} = 4.78, p < 0.001$; $z_{4-5} = 5.45, p < 0.001$

Примечание. Критерий z – сравнение долей; p – уровень значимости, при множественных сравнениях производилась коррекция показателя с помощью поправки Бонферрони; * – в числителе – число эритроцитов с микроядрами в выборке, шт.; в знаменателе – доля клеток с микроядрами на 1000 эритроцитов.

Корреляционный анализ с использованием рангового коэффициента Спирмена показал, что существует умеренная положительная корреляционная взаимосвязь ($r = 0.72$, $p = 0.0179$) между долей разрыхленных микроядер и содержанием в водоёме нитритов (мг/л) (см. табл. 2).

Известно, что нитриты взаимодействуют с гемоглобином крови и окисляют в нем 2-валентное железо (Дерягина, Реутов, 1996). В результате образуется метгемоглобин, который уже не способен переносить кислород (Darling, Roughton, 1942; Jaffe, Neumann, 1968; Antonini, Brunogi, 1970). Это нарушает нормальное дыхание клеток и тканей организма (с развитием тканевой гипоксии), вследствие чего накапливаются молочная кислота, холестерин и снижается интенсивность синтеза белковых продуктов, в том числе белков тубулинов, входящих в состав микротрубочек веретена деления и отвечающих за процессы расхождения хромосом.

Можно предполагать, что в условиях загрязнения водной среды нитритами появление микроядер в эритроцитах амфибий связано с задержкой клеточного цикла на стадиях мета- и анафазы, вызванного ингибирующим действием нитритов на ферменты репарации ДНК или блокировкой синтеза тубулинов.

Лейкоцитарный состав крови включает две группы клеток: агранулоциты (моноциты, лимфоциты), на их долю приходится около 50 – 70% клеток, и гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы и базофилы), характеризующиеся большим разнообразием. Анализ лейкоцитарных формул периферической крови исследованных выборок из популяций озёрных лягушек выявил изменения, касающиеся всех рядов дифференцировки клеток и большинства интегральных индексов. По совокупности цитогематологических показателей и лейкоцитарных индексов методом многомерного дисперсионного анализа показано различие между выборками (значение лямбды Уилкса, $\lambda_{Wilks} = 0.0727$, $p < 0.001$). Дальнейшее проведение сравнений по критерию Краскела – Уоллиса (H) и Данна (D) выявило перераспределение соотношения лейкоцитарного состава у амфибий, обитающих в конкретных гидрохимических условиях водной среды (табл. 3).

Установлено повышение значения индексов ККП, ИСЛ, ИСНЭ для популяции торфокарьера по сравнению с остальными выборками за счет увеличения процентной доли эозинофилов, сегментоядерных нейтрофилов и уменьшения доли лимфоцитов в лейкоцитарной формуле крови амфибий. Другими словами, в особых гидрохимических условиях среды возрастает функциональная активность нейтрофилов и лимфоцитов крови. Нейтрофилез, лимфопения и увеличение отношения доли нейтрофилов к лимфоцитам являются наиболее чувствительными показателями острого стресса у позвоночных животных.

Низкие значения индекса ККП и ИСЛ в отдельных выборках амфибий (оз. Силикатное, оз. Жилново) обуславливались приростом в периферической крови доли лимфоцитов и уменьшением доли эозинофилов. Известно, что повышение доли нейтрофилов и снижение доли лимфоцитов отражает у амфибий стресс-индуцированную реакцию лейкоцитов (Sabagna et al., 2005; Davis et al., 2008). В качестве праймирующих агентов, определяющих механизмы, направленность иммунных реакций и активность лейкоцитов, выступают цитокины (Харченко, 2009). По-видимому, специфика гидрохимических условий водной среды приводит в ор-

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНДЕКСЫ И МИКРОЯДРА В ЭРИТРОЦИТАХ

ганизме амфибий к усилению продукции воспалительных медиаторов, обуславливающих пролиферацию, а впоследствии и миграцию лимфоцитов, что хорошо иллюстрируется возрастанием реактивного ответа нейтрофилов (РОН) ($H = 41.37, p < 0.001$). Наше предположение о том, что поддержание иммунологической реактивности организма амфибий в условиях повышенного загрязнения среды определяется функциональной активностью нейтрофилов и лимфоцитов, подтверждается и снижением лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса (ИЛГ) ($H = 43.59, p < 0.001$), ИСЛЭ ($H = 25.75, p < 0.001$), а также возрастанием соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ) ($H = 45.47, p < 0.001$) в крови животных.

Таблица 3

Интегральные лейкоцитарные индексы (отн. ед.) *Pelophylax ridibundus*
Нижегородской области

Индекс	Водоёмы					Статистические показатели
	Торфокарьер (1)	Оз. Рустай (2)	Болого Круглое Дальнее (3)	Оз. Жилново (4)	Оз. Силикатное (5)	
Крово-клеточный показатель (ККП)	0.16±0.005	0.10±0.008	0.09±0.007	0.08±0.008	0.07±0.007	$H = 44.22, p < 0.001$; $D_{1-2} = 3.78, p = 0.002$; $D_{1-3} = 4.1, p = 0.0006$; $D_{1-4} = 5.52, p < 0.001$; $D_{1-5} = 5.85, p < 0.001$
Реактивный ответ нейтрофилов (РОН)	0.79±0.066	0.04±0.017	0.12±0.03	0.09±0.03	0.03±0.01	$H = 41.37, p < 0.001$; $D_{1-2} = 5.06, p < 0.001$; $D_{1-3} = 3.75, p < 0.001$; $D_{1-4} = 4.29, p = 0.0003$; $D_{1-5} = 5.27, p < 0.001$
Лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ)	62.62±1.92	110.07±13.9	106.9±7.27	158.7±23.3	171.32±26.7	$H = 43.59, p < 0.001$; $D_{1-2} = 3.71, p = 0.003$; $D_{1-3} = 4.05, p = 0.0008$; $D_{1-4} = 5.42, p < 0.001$; $D_{1-5} = 5.85, p < 0.001$
Индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ)	0.10±0.003	0.02±0.004	0.04±0.006	0.03±0.006	0.02±0.004	$H = 45.47, p < 0.001$; $D_{1-2} = 4.61, p < 0.001$; $D_{1-3} = 3.05, p = 0.035$; $D_{1-4} = 4.45, p < 0.001$; $D_{1-5} = 5.98, p < 0.001$
Индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов (ИСЛЭ)	17.64±0.90	15.60±2.33	19.70±4.72	24.50±2.80	20.49±2.42	$H = 25.75, p < 0.001$; $D_{2-4} = 3.12, p = 0.028$
Индекс соотношения нейтрофилов и эозинофилов (ИСНЭ)	1.81±0.09	0.39±0.08	0.84±0.30	0.65±0.11	0.27±0.07	$H = 46.04, p < 0.001$; $D_{1-2} = 4.91, p < 0.001$; $D_{1-3} = 3.05, p = 0.034$; $D_{1-4} = 3.49, p = 0.007$; $D_{1-5} = 5.67, p < 0.001$
Индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ)	0.34±0.01	0.25±0.01	0.26±0.02	0.24±0.01	0.19±0.08	$H = 33.27, p < 0.001$; $D_{1-2} = 3.54, p = 0.006$; $D_{1-3} = 3.10, p = 0.029$; $D_{1-4} = 4.29, p = 0.0002$; $D_{1-5} = 5.43, p < 0.001$
Индекс ядерного сдвига нейтрофилов (ИЯСН)	3.46±0.34	4.20±1.65	5.27±1.03	6.27±1.39	4.93±1.57	$H = 3.78, p = 0.58$

Методом главных компонент был проведен анализ совокупности цитогематологических показателей, полученных для выборок из популяций зелёных лягушек

Нижегородской области. Первая главная компонента, соответствующая максимальному собственному значению (7.32), описывала приблизительно 66.56% общей вариации и имела сильные положительные корреляции с основными лейкоцитарными индексами: ККП (0.99), ИСЛ (0.97), ИСНЛ (0.98) и РОН (0.95). Поэтому была нами условно обозначена как отражающая компенсаторные сдвиги в картине «белой» крови. Наибольший вклад во вторую факторную ось (со значением 2.74 и описывающей 24.90% общей вариации) вносил показатель общего содержания эритроцитов с коэффициентом сильной отрицательной корреляции (-0.97) (рис. 2).

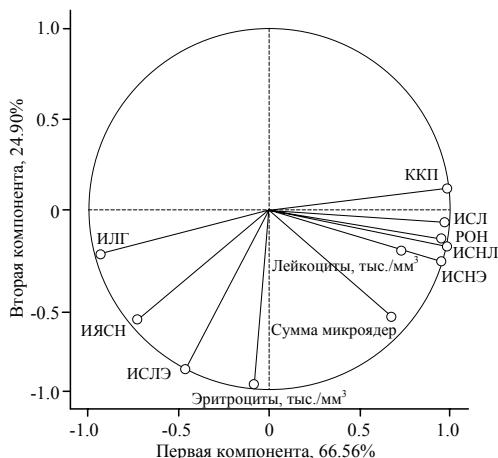


Рис. 2. График факторных координат, построенный на основе цитогематологических показателей *Pelophylax ridibundus*

существенных изменениях в иммунологических показателях крови амфибий. Выборки распределились более или менее равномерно по всей плоскости, что иллюстрировало разносторонний характер адаптивного ответа озёрных лягушек на специфику биотопических условий. Наименее выраженными отклонениями иммунного статуса характеризовалась выборка озёрных лягушек оз. Рустей. Возрастание доли нейтрофилов, снижение лимфоцитов и активизация процессов эритропоэза определяли

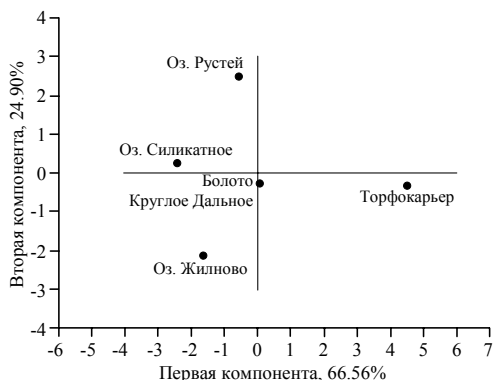


Рис. 3. График рассеивания исследованных выборок *Pelophylax ridibundus* в пространстве главных компонент

расположение выборок лягушек, обитающих в оз. Силикатное, оз. Жилново и болоте Круглое Дальнее, во втором и третьем квадрантах факторного пространства. Удаленно от других популяций располагалась выборка торфокарьера (четвертый квадрант), что свидетельствовало о преимущественном изменении лейкоцитарного профиля крови, а именно возрастании индексов ККП, РОН, ИСНЛ, ИСНЭ и ИСЛ. При этом отрицательную часть оси определяли переменные: лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ) и ядерный сдвиг нейтрофилов (ИЯСН).

График рассеивания исследованных выборок по анализируемым показателям в факторном пространстве (рис. 3) позволил представить массив полученных данных в более интегрированном и обобщенном виде. Условия водной среды обитания отражались на количественных и/или качественных изменениях в иммунологических показателях крови амфибий. Выборки распределились более или менее равномерно по всей плоскости, что иллюстрировало разносторонний характер адаптивного ответа озёрных лягушек на специфику биотопических условий. Наименее выраженными отклонениями иммунного статуса характеризовалась выборка озёрных лягушек оз. Рустей. Возрастание доли нейтрофилов, снижение лимфоцитов и активизация процессов эритропоэза определяли

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНДЕКСЫ И МИКРОЯДРА В ЭРИТРОЦИТАХ

Выборки озёрных лягушек из оз. Рустай и болота Круглое Дальнее, обитающих в условиях повышенного содержания марганца, по совокупности цитогематологических показателей оказались наиболее сходны, что подтверждалось наименьшим расстоянием относительной связи при кластерном анализе (рис. 4). Обе выборки из популяций лягушек характеризовались набором показателей лейкоцитарного состава, различающимся между собой по содержанию сегментоядерных нейтрофилов ($D = 3.44$, $p = 0.0006$) и базофилов ($D = 3.52$, $p = 0.0004$). По интегральным лейкоцитарным индексам различий между выборками не выявлено.

В отдельный кластер вошли два водоёма (оз. Силикатное и оз. Жилново) с высоким содержанием меди, хрома и нефтепродуктов. В лейкограммах лягушек, обитающих в этих водоёмах, наблюдалась тенденция к росту количества лимфоцитов на фоне уменьшения числа гранулоцитов. Эти изменения свидетельствовали о повышении напряжения гуморального звена иммунитета, что подтверждалось характером лейкомоидной реакции лимфатического типа.

Наиболее обособленное положение в дендрограмме занимал торфокарьер с уникальным сочетанием природных и антропогенных факторов. В условиях этого биотопа отмечены наиболее сильные отклонения в показателях иммунного статуса озёрных лягушек. Особи характеризовались высоким индексом сдвига лейкоцитарной формулы ($ИСЛ = 0.34 \pm 0.01$) и большим числом микроядер в эритроцитах крови. Состояние крови в большей степени соответствовало нейтрофильному типу лейкомоидной реакции.

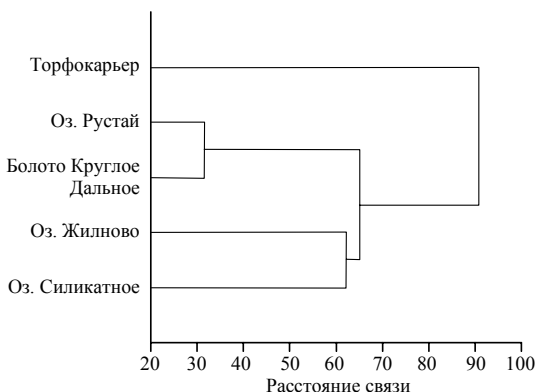


Рис. 4. Дендрограмма сходства исследованных популяций *Pelophylax ridibundus* по цитогематологическим показателям

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования расширяют теоретические представления о закономерностях изменения общей реактивности организма в условиях антропогенной нагрузки. При этом большинство изменений в организме если не напрямую детерминированы влиянием иммунологических факторов, то являются иммуно-опосредованными (Галактионов, 2004). Иммунологические взаимоотношения организма со средой обитания являются результатом воздействия, с одной стороны, антигенов, а с другой – распознавания и реагирования на эти антигены иммунной системы организма, ведущую роль в которых играют иммунокомпетентные клетки. Любые воздействия, изменяющие иммунологическую реактивность организма животных, могут нарушать формирование сложных механизмов обеспечения гомеостатического равновесия в системе «организм – среда обита-

ния». Вследствие этого особенно актуален поиск популяционных маркеров, позволяющих оценить работу эффекторных механизмов иммунной системы, а также уровень иммунологической реактивности, определяющие процесс формирования неспецифических адаптационных реакций.

Для поддержания гомеостаза организма в специфических условиях среды обитания животные используют набор универсальных эффекторных клеток. У амфибий это набор неспецифических лейкоцитов, представленный макрофагами, моноцитами, нейтрофилами, базофилами и эозинофилами. Моноциты и макрофаги обеспечивают фагоцитоз, «представление антигенов» и высвобождение цитокинов (Coico et al., 2003; Zimmerman et al., 2010). Нейтрофилы играют важную роль в антибактериальном иммунитете и участвуют в развитии воспалительной реакции. Базофилы и эозинофилы обладают высокоспецифичными функциями. Роль базофилов заключается в активном высвобождении гистамина при поступлении определённого антигена, что приводит к увеличению проницаемости кровеносных сосудов, усилению кровотока и привлечению других гранулоцитов к очагу воспаления. Эозинофилы являются самыми функционально активными элементами крови у амфибий и реализуют противогельминтную иммунную защиту (Малютина, 2008; Шевкопляс, Лопатин, 2008; Романова и др., 2013; Johnson, Fonte, 2013). Считается, что эта защита реализуется благодаря способности эозинофилов обеспечивать в нужный момент «взрывную» продукцию пероксида и супероксидных радикалов (Coico et al., 2003). Совокупность этих клеток, среди которых большую долю составляют нейтрофильные гранулоциты, обеспечивают реакции неспецифической естественной защитной системы организма. В состав лейкоцитарной формулы входят лимфоциты – одна из наиболее объёмных групп иммунокомпетентных клеток. В состав суммарных лимфоцитов входит целый ряд морфологически однотипных клеток: *T*-лимфоцитов, *B*-лимфоцитов, нулевых клеток (Лебедев, Понякина, 1990), реализующие механизмы адаптивного иммунитета. Поэтому в процессе адаптации к среде обитания у амфибий изменяются показатели клеточной и гуморальной защиты, что отражается на морфологическом составе крови.

Гидрохимические особенности среды обитания торфокарьера (кислотность, низкая минерализация, значительное содержание органических соединений, железа) в сочетании с антропогенной нагрузкой приводили к наиболее сильным изменениям иммунологической реактивности организма, что отражалось в отклонениях лейкоцитарного профиля крови и возрастании доли микроядер в эритроцитах крови озёрных лягушек. Комплексное воздействие химических загрязнителей техногенного происхождения в высоких концентрациях (меди, хрома и нефтепродуктов) вызывало активизацию процесса эритропоза и напряжение гуморального звена иммунитета, что подтверждалось характером лейкоцитарной реакции лимфатического типа. Изменение функциональной активности лейкоцитарных клеток крови озёрных лягушек иллюстрировало экологическую пластичность вида и обеспечивало устойчивое функционирование организма под действием антропогенного пресса.

Процесс иммунологической перестройки в организме озёрных лягушек, обитающих в разных биотопических условиях, отражала динамика лейкоцитарных

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНДЕКСЫ И МИКРОЯДРА В ЭРИТРОЦИТАХ

индексов: кровно-клеточного показателя (ККП), индекса соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ), лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса (ИЛГ), реактивного ответа нейтрофилов (РОН), индекса соотношения нейтрофилов и эозинофилов (ИСНЭ), индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ). Клеточные и гуморальные формы иммунного реагирования, направленные на дифференциацию «своих» молекул от «чужих», обеспечивали стабильность онтогенеза амфибий под воздействием антропогенного пресса. Таким образом, использованные интегральные показатели обладают информативностью, что позволяет рассматривать их в качестве популяционных маркеров иммунного статуса амфибий, постоянно адаптирующихся к изменяющимся условиям среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакка С. В., Киселева Н. Ю.* Особо охраняемые природные территории Нижегородской области. Нижний Новгород, 2008. 560 с.
- Галактионов В. Г.* Иммунология. М. : Изд. центр «Академия», 2004. 528 с.
- Гелашивили Д. Б., Копосов Е. В., Лантев Л. Я.* Экология Нижнего Новгорода. Н. Новгород : Изд-во Нижегород. гос. архитектурно-строительного ун-та, 2008. 530 с.
- Гланц С.* Медико-биологическая статистика / пер с англ. М. : Практика, 1998. 459 с.
- Дерягина В. П., Реутов В. П.* Экологические аспекты патофизиологии, связанные с нитратно-нитритным загрязнением окружающей среды // Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы (экспериментальные и клинические аспекты) : тез. докл. I Рос. конгресса по патофизиологии. М. : Изд-во Рос. гос. мед. ун-та, 1996. С. 239.
- Жулева Л. Ю., Дубинин Н. П.* Использование микроядерного теста для оценки экологической обстановки в районах Астраханской области // Генетика. 1994. Т. 30, № 7. С. 999 – 1004.
- Лебедев К. А., Понякина И. Д.* Иммунограмма в клинической практике. М. : Наука, 1990. 224 с.
- Логинов В. В., Гелашивили Д. Б., Романова Е. Б.* Особенности морфометрических и морфогенетических показателей популяций зелёных лягушек рода *Rana*, Нижнего Новгорода и Нижегородской области // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского. 2004. Вып. 3 (5). С. 73 – 79.
- Логинов В. В., Гелашивили Д. Б., Чупрунов Е. В., Силкин А. А.* Структурно-информационный анализ стабильности развития амфибий // Третья конф. герпетологов Поволжья : материалы региональной конф. / Ин-т экологии Волжского бассейна РАН. Тольятти, 2003. С. 44 – 47.
- Малютина Т. А.* Взаимоотношения в системе паразит – хозяин : биохимические и физиологические аспекты адаптации (ретроспективный обзор) // Рос. паразитол. журн. 2008. Вып. 1. С. 24 – 40.
- Манских В. Н.* К вопросу о механизмах образования микроядер в соматических клетках бесхвостых амфибий в норме и при действии N-нитрозо-N-метилкарбамида // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 141, № 2. С. 217 – 220.
- Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П., Андреева З. М., Анкирская А. С., Балаховский И. С., Белокрыницкий Д. В., Воробаева С. Д., Гаранина Е. Н., Лукичева Т. И., Плетнева Н. Г., Смоляницкий А. Я.* Лабораторные методы исследования в клинике. М. : Медицина, 1987. 368 с.
- Муравьева Л. В., Тихомиров О. А., Марков М. В.* Формирование аквально-территориальных комплексов выработанных торфяных болот и их классификация // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2010. Т. 152, кн. 4. С. 102 – 115.

Мустафина Ж. Г., Крамаренко Ю. С., Кобцева В. Ю. Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией // Клиническая лабораторная диагностика. 1999. № 5. С. 47 – 48.

РД 52.24.643-2002. Метод комплексной оценки степени загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям / Росгидромет. СПб. : Гидрометеиздат, 2003. 55 с.

Нормативы качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативы предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектах рыбохозяйственного значения (утв. приказом Федерального агентства по рыболовству от 18.01.2010 г. № 20). М., 2010. 90 с.

Романова Е. Б., Фадеева Г. А., Вершинина К. С., Николаев В. Ю. Изменение лейкоцитарной формулы крови озёрной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) при гельминтозах // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского. 2013. № 5 – 1. С. 141 – 147.

Ткаченко Е. А., Дерхо М. А. Лейкоцитарные индексы при экспериментальной кадмиевой интоксикации мышей // Изв. Оренб. гос. аграрного ун-та. 2014. № 3 (47). С. 81 – 83.

Харченко Е. П. Иммунная привилегия : патологический аспект // Иммунология. 2009. № 4. С. 249 – 255.

Шевкоплас В. Н., Лопатин В. Г. Влияние гельминтозов на течение иммунологических процессов у животных // Рос. паразитол. журн. 2008. Вып. 4. С. 94 – 101.

Шутиков В. К., Розенберг Г. С. Рандомизация и бутстреп : статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. Тольятти : Кассандра, 2014. 314 с.

Antonini E., Brunori M. Hemoglobin // Annual Review of Biochemistry. 1970. Vol. 39. P. 977 – 1042.

Cabagna M. C., Lajmanovich R. C., Stringhini G., Sanchez-Hernandez J. C., Peltzer P. M. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agro ecosystems of Santa Fe Province, Argentina // Applied Herpetology. 2005. Vol. 2, iss. 4. P. 373 – 380.

Coico R., Sunshine G., Benjamini E. Immunology. A Short Course. New York : Wiley-Liss Publ., 2003. 237 p.

Darling R. C., Roughton F. J. W. The effect of methemoglobin on the equilibrium between oxygen and hemoglobin // American J. of Physiology. 1942. Vol. 137, iss. 1. P. 56 – 68.

Davis A. K., Maney D. L., Maerz J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates : a review for ecologists // Functional Ecology. 2008. Vol. 22, iss. 5. P. 760 – 772.

Jaffe E. R., Neumann G. Hereditary methemoglobinemia, toxic methemoglobinemia and the reduction of methemoglobin // Annals of the New York Academy of Sciences. 1968. Vol. 151. P. 795 – 806.

Johnson P. T., La Fonte B. E. Experimental infection dynamics : using immunosuppression and *in vivo* parasite tracking to understand host resistance in an amphibian-trematode system // J. Experimental Biology. 2013. Vol. 216, iss. 19. P. 3700 – 3708.

Zimmerman L. M., Vogel L. A., Bowden R. M. Understanding the vertebrate immune system : insights from the reptilian perspective // J. Experimental Biology. 2010. Vol. 213, iss. 5. P. 661 – 671.

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

Elena B. Romavova, Kristina V. Shapovalova, Elena S. Ryabinina, and David B. Gelashvili

Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod
23 Gagarin Av., Nizhni Novgorod 603950, Russia
E-mail: romanova@ibbm.unn.ru

Received 3 August 2017, accepted 21 November 2017

Romavova E. B., Shapovalova K. V., Ryabinina E. S., Gelashvili D. B. 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. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2018, no. 1, pp. 60–75 (in Russian). DOI: 10.18500/1684-7318-2018-1-60-75.

A differentiated assessment of blood cells and micronucleus species in the erythrocytes of marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) living in reservoirs of the Nizhniy Novgorod region and differing by origin, morphology and chemical composition was performed. Specific abiotic conditions (a peat bog) and anthropogenic load led to the most expressed change of the leukocyte composition of the blood, corresponding to the neutrophilic type of leukemoid reaction and an increased fraction of micronucleus in the erythrocytes. A moderate positive correlation was found between the increase of the number of disintegrated micronucleus ($r = 0.72$, $p = 0.0179$) and the content (mg/l) of nitrites in the reservoir. The complex action of chemical pollutants of technogenic origin in high concentrations (copper, chromium, and oil products) caused activation of the erythropoiesis process and tension of the humoral immunity link, which was confirmed by the nature of leukemoid reaction of a lymphatic type. The cellular and humoral forms of immune reaction, directed to own-foreign molecule differentiation, provided stability of the ontogenesis of frogs under the anthropogenic press. Integral leukocyte indexes: the blood and cellular indicator, the neutrophil-lymphocyte ratio, the lymphocytic-granulocyte index and the index of leukocyte shift, which reflect the level of the body's general reactivity can be considered as population markers of the immune status of amphibians.

Key words: *Pelophylax ridibundus*, micronucleous, immune status.

DOI: 10.18500/1684-7318-2018-1-60-75

REFERENCES

- Bakka S. V., Kiseleva N. Yu. *Especially Protected Natural Territory of the Nizhni Novgorod Region*. Nizhni Novgorod, 2008. 560 p. (in Russian).
- Galaktionov V. G. *Immunology*. Moscow, Izdatel'skii tsentr "Academia" Publ., 2004. 528 p. (in Russian).
- Gelashvili D. B., Kuposov E. V., Laptev L. A. *Ecology of Nizhniy Novgorod*. N. Novgorod, Nizhny Novgorod State University of Architecture and Civil Engineering Publ., 2008. 530 p. (in Russian).

- Glantz S. *Primer of Biostatistics*. Moscow, Praktica Publ., 1998. 459 p. (in Russian).
- Deryagina V. P., Reutov V. P. The Ecological Aspects of a Pathophysiology Connected with a Nitrate-nitrite Pollution of Environment. *Pathophysiology of Organs and Systems. Typical Pathological Processes (experimental and clinical aspects): Theses of Reports I Russian Congress on Pathophysiology*. Moscow, Izdatel'stvo Rossiiskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta, 1996, pp. 239 (in Russian).
- Zhuleva L. Yu., Dubinin N. P. Use of Micronuclear Test for Assessment of an Ecological Situation in Areas of the Astrakhan Region. *Genetica*, 1994, vol. 30, no. 7, pp. 999–1004 (in Russian).
- Lebedev K. A., Ponyakina I. D. *Immunogram in Clinical Practice*. Moscow, Nauka Publ., 1990. 224 p. (in Russian).
- Loginov V. V., Gelashvili D. B., Romanova E. B. Features of Morphometric and Morphogenetic Indicators of Populations of Green Frogs of the Sort *Rana*, Nizhni Novgorod and Nizhni Novgorod Region. *Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod*, 2004, no. 3, pp. 73–79 (in Russian).
- Loginov V. V., Gelashvili D. B., Chuprunov E. V., Silkin A. A. Structural and Information Analysis of Stability of Development of Amphibians. *Third Conference of Herpetologists of the Volga Region: Materials of a Regional Conference*. Togliatti, Institute of Ecology of the Volga River Basin of RAS Publ., 2003, pp. 44–47 (in Russian).
- Malyutina T. A. The Relationships in the System of Parasite-Host: Biochemical and Physiological Aspects Adaptations (Retrospective Review). *Russian J. of Parasitology*, 2008, iss. 1, pp. 24–40 (in Russian).
- Manskikh V. N. Mechanisms of formation of micronuclei in somatic cells of tailless amphibians normally and under the effect of N-nitroso-N-methylcarbamide. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2006, vol. 141, no. 2, pp. 254–256.
- Menshikov V. V., Delektorskaya, L. N., Zolotnitskaya R. P., Andreeva Z. M., Ankirskaya A. S., Balakhovsky I. S., Belokrinitsky D. V., Voropaeva S. D., Garanina E. N., Lukicheva T. I., Pletneva N. G., Smolyanitsky A. I. *Laboratory Methods of a Research in the Clinic*. Moscow, Medicina Publ., 1987. 368 p. (in Russian).
- Muravieva L. V., Tikhomirov O. A., Markov M. V. The Formation of Aquatic-Terrestrial Complexes of Peat Pits and Their Classification. *Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series*, 2010, vol. 152, no. 4, pp. 102–115 (in Russian).
- Mustafina Zh. G., Kramarenko Yu. S., Kobtseva V. Yu. Integrated Hematologic Indicators in Assessment of Immunological Reactivity of an Organism at Patients with an Ophthalmopathy. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 1999, no. 5, pp. 47–48 (in Russian).
- G.D. 52.24.643-2002 *Method of Complex Assessment of Degree of Impurity of a Superficial Water on Hydrochemical Indicators*. Saint Petersburg, Gidrometeoizdat Publ., 2003. 55 p. (in Russian).
- Standards of Quality of Water of Water Objects of Fishery Value, Including Standards of Threshold Limit Values of Harmful Substances in Waters Water Objects of Fishery Value (approved by the order of the Federal Fishery Agency on 18 January 2010, no. 20)*. Moscow, 2010. 90 p. (in Russian).
- Romanova E. B., Fadeeva G. A., Vershinina K. S., Nikolaev V. Yu. Leukogram Changes in the Marsh Frog (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) with Helminthiasis. *Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod*, 2013, no. 5, pp. 141–147 (in Russian).
- Tkachenko Ye. A., Derkho M. A. Leukocytic Indices in Experimental Cadmium Intoxication of Mice. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*, 2014, no. 3, pp. 81–83 (in Russian).
- Harchenko E. P. Immune Privilege: Pathological Aspect. *Immunology*, 2009, no. 4, pp. 249–255 (in Russian).

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНДЕКСЫ И МИКРОЯДРА В ЭРИТРОЦИТАХ

Shevkopljas V. N., Lopatin V. G. The Influence of Helminthosis on Current Immunologic Processes at Animals. *Russian J. of Parasitology*, 2008, iss. 4, pp. 94–101 (in Russian).

Shitikov V. K., Rozenberg G. S. *Randomization and Bootstrap: Statistical Analysis in Biology and Ecology using R*. Togliatti, Kassandra Publ., 2014. 314 p. (in Russian).

Antonini E., Brunori M. Hemoglobin. *Annual Review of Biochemistry*, 1970, vol. 39, pp. 977–1042.

Cabagna M. C., Lajmanovich R. C., Stringhini G., Sanchez-Hernandez J. C., Peltzer P. M. Hematological Parameters of Health Status in the Common Toad *Bufo arenarum* in Agro Ecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology*, 2005, vol. 2, iss. 4, pp. 373–380.

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

Darling R. C., Roughton F. J. W. The Effect of Methemoglobin on the Equilibrium Between Oxygen and Hemoglobin. *American J. of Physiology*, 1942, vol. 137, iss. 1, pp. 56–68.

Davis A. K., Maney D. L., Maerz J. C. The use of Leukocyte Profiles to Measure Stress in Vertebrates: a Review for Ecologists. *Functional Ecology*, 2008, vol. 22, iss. 5, pp. 760–772.

Jaffe E. R., Neumann G. Hereditary methemoglobinemia, toxic methemoglobinemia and the reduction of methemoglobin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1968, vol. 151, pp. 795–806.

Johnson P. T., La Fonte B. E. Experimental Infection Dynamics: Using Immunosuppression and *in vivo* Parasite Tracking to Understand host Resistance in an Amphibian-Trematode System. *J. Experimental Biology*, 2013, vol. 216, iss. 19, pp. 3700–3708.

Zimmerman L. M., Vogel L. A., Bowden R. M. Understanding the Vertebrate Innate System: Insights from the Reptilian Perspective. *J. Experimental Biology*, 2010, vol. 213, iss. 5, pp. 661–671.