

8. Neuropsychological disorders after occupational exposure to mercury vapors / [El B., Iwado V., Garcia M.A. et all.] // Rev. Neurol. – 2000. – Vol. 31. – № 8. – P. 741-742.
9. Adaptacija ta metaloligandnij gomeostaz: monografija / Omel'janchik L. O., Eshhenko Ju. V., Kuchkovs'kij O.M., Bovt V.D. – Zaporizhzhja : ZNU, 2013. – 351 s.
10. Bovt V.D. Zinc content in blood granulocytes of persons exposed to hydrogen sulphide and toxic metals / V.D. Bovt, J.V. Eshchenko // Eksperimental'na ta klinichna fiziologija ta biohimija. – 2012. – № 1. – S. 102-106.
11. Discovering Endophenotypes for major Depression / Hasler G., Drevets W. C., Manji H. K., Charney D.S. // Neuropsychopharmacology. – 2004. – Vol. 20. – P. 203-214.
12. Praktikum po obshhej, jeksperimental'noj i prikladnoj psihologii: ucheb. posobie / [Bilin V. D., Gajda V.M., Gerbachevskij V.K. i dr.]; pod obshh. red. A.A. Kroslova, S.A. Manicheva. – SPb. : Piter, 2000. – 560 s.
13. Ajzenk G. Supertesty IQ / G. Ajzenk. – M. : JeKSMO-Pres, 2002. – 208 s.
14. Lakin G.F. Biometrija: ucheb. posobie dlja biol. spec. vuzov / G. F. Lakin. – M. : Vysshaja shkola, 1990. – 352 s.

УДК 597.8:591.69:616-022.3

## ВИКОРИСТАННЯ ІНТЕГРАЛЬНИХ ІНДЕКСІВ СТРУКТУРИ ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ ДЛЯ ОЦІНКИ СТУПЕНЯ НАПРУЖЕННЯ АДАПТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* (AMPHIBIA: RANIDAE) В УМОВАХ ПРИРОДНОЇ ГЕМОПАРАЗИТАРНОЇ ІНВАЗІЇ

Задорожня В.Ю.

*Запорізький національний університет  
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

zadorovic@rambler.ru

У крові озерних жаб *P. ridibundus* були виявлені одноклітинні паразити, віднесені до 3 таксономічних родин: внутрішньоклітинні – *Hepatozoon* Miller 1908 (Apicomplexa: Adeleorina), *Dactylosoma* Labbe, 1894 (Apicomplexa: Dactylosomatidae) та позаклітинні – *Trupanosoma* Gruby 1843 (Kinetoplastida: Trupanosomatidae), а також личинкові стадії нематоди – мікрофілярії – із підряду Filariata. Серед досліджених груп *P. ridibundus* із різним ступенем гемопаразитарного навантаження найбільший індекс напруження визначений в особин із комбінованою поліінвазією (Hr+Tr+Mc+Dc), що на 14,21% ( $p < 0,01$ ) та на 11,58% ( $p < 0,01$ ) більше ніж в особин із подвійною (Hr+Tr) та потрійною (Hr+Tr+Mc) інвазією відповідно. Отримані дані засвідчили можливість використання інтегральних лейкоцитарних індексів для оцінки ступеня напруження адаптаційних процесів *P. ridibundus* в умовах природної гемопаразитарної інвазії.

*Ключові слова:* гемопаразити, *Pelophylax ridibundus*, лейкоцитарна формула, агранулоцити, гранулоцити, інтегральні лейкоцитарні індекси, ентропія, індекс домінування.

Задорожня В.Ю. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ИНДЕКСОВ СТРУКТУРЫ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ НАПРЯЖЕНИЯ АДАПТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* (AMPHIBIA: RANIDAE) В УСЛОВИЯХ ЕСТЕСТВЕННОЙ ГЕМОПАРАЗИТАРНОЙ ИНВАЗИИ / Запорожский национальный университет, 69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66

В крови озерных лягушек *P. ridibundus* были обнаружены одноклеточные паразиты, которые отнесены к 3 таксономическим семействам: внутриклеточные – *Hepatozoon* Miller 1908

(Apicomplexa: Adeleorina), *Dactylosoma* Labbe, 1894 (Apicomplexa: Dactylosomatidae) и внеклеточные – *Trypanosoma* Gruby 1843 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), а также личиночные стадии нематоды – микрофилярии – из подрода *Filariata*. Среди исследованных групп *P. ridibundus* с разной степенью гемопаразитарной нагрузки наибольший индекс напряжения определен у особей с комбинированной полиинвазией (Hp + Tr + Mc + Dc), что на 14,21% ( $p < 0,01$ ) и на 11,58% ( $p < 0,01$ ) больше чем у особей с двойной (Hp + Tr) и тройной (Hp + Tr + Mc) инвазией соответственно. Полученные данные показали возможность использования интегральных лейкоцитарных индексов для оценки степени напряжения адаптационных процессов *P. ridibundus* в условиях естественной гемопаразитарной инвазии.

**Ключевые слова:** гемопаразиты, *Pelophylax ridibundus*, лейкоцитарная формула, агранулоциты, гранулоциты, интегральные лейкоцитарные индексы, энтропия, индекс доминирования.

Zadorozhnyia V.Yu. LEUCOGRAM STRUCTURE INTEGRAL INDICES USE FOR *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* (AMPHIBIA: RANIDAE) ADAPTATIVE PROCESSES STRESS DEGREE ESTIMATION IN NATURAL HAEMOPARASITIC INVASION CONDITIONS / Zaporozhzhya national university, 69600, Ukraine, Zaporozhye, Zhukovsky str., 66

It is known, that adaptative processes stress in an organism can occur under external and internal factors influence. Haemoparasitic invasion can be one of internal factors which are capable to break homeostasis in organism.

Haemoparasites are a big enough group of unicells with a wide areal, owners variety, various pathogenicity level and so forth. There is a little-studied and consequently opened question about connection between haemoparasitic loading and adaptative processes stress in green frog organism.

The material was gathered in Hortitsa island territory (Zaporozhye). The research objects were lake frogs *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), samples volume was 52 individuals. Researches were spent in laboratory conditions on the basis of biological faculty of Zaporozhian national university. All researches were spent with observance of the principles stated in the Convention on vertebrate animals protection (Strasbourg, France, 1986).

Individuals distribution to groups was occurred after haemoparasites presence definition in blood films. Haemoparasites identification was spent by morphometric indices.

Hematological researches (leukocytes determination, leucogram calculation) were made with the help of standard methods. Blood films were made from 0,01 ml of blood, parasitic cargo analysis was estimated on invasion extensiveness indexes (EI, % ) and invasion intensity (II, examples). Endoglobular parasite invasion intensity was defined with their calculation on 1000 erythrocytes. Extracellular haemoparasites invasion intensity was counted on blood film (0,02 ml).

Integral leucocytal index was counted for organism nonspecific resistance estimation: the ratio of neutrophils percentage sum to lymphocytes percentage quantity (N/L).

K.Shannon's entropy was used for an estimation of blood leucogram absolute entropy (LAE). «The relative system organization» was used for domination index (R) definition.

The obtained quantitative data are processed statistically by means of application computer programs package «Statistica 6.0». Distinctions reliability was estimated on Mann-Whitney's nonparametric test size. The indices difference was considered statistically significant at 95% and more significance value ( $p \leq 0,05$ ).

In lake frogs *P. ridibundus* blood unicell parasites, which were referred to 3 taxonomic genera, have been found out: endocellular – *Hepatozoon* Miller 1908 (Apicomplexa: Adeleorina), *Dactylosoma* Labbe, 1894 (Apicomplexa: Dactylosomatidae) and extracellular – *Trypanosoma* Gruby 1843 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), and also nematodes larval stages – microfilaria – from subseries *Filariata*. Revealed haemoparasites specific definition is proceeding.

In considered sample individuals, which were free from haemoparasites, and individuals with monoinvasion were not revealed, EI with adeleid coccidias *Hepatozoon* (Hp), and also *Trypanosoma* (Tr) has made 100%, *Dactylosoma* EI (Dc) – 13,04% , microfilaria EI (Mc) – 43, 48% .

Average *Hepatozoon* II in the sample was  $13,32 \pm 3,44$  examples on 1000 erythrocytes, II *Dactylosoma* –  $0,38 \pm 0,31$  examples on 1000 erythrocytes, II *Trypanosoma* –  $58,78 \pm 10,94$  examples on blood film (0,01 ml) and II microfilaria –  $472,39 \pm 296,46$  examples on blood film (0,01 ml).

By carried out research results it has been established, that in blood of all of *P. ridibundus* individuals with a various haemoparasitic invasion combination lymphocytes has made the biggest cell pool, that means that blood has lymphocyte profile. Green frogs lymphocytes, similarly to the higher vertebrate lymphocytes, are the central immune system component, providing all basic immunity reactions, in particular adaptive immunity formation.

Lymphocytes relative quantity reduction at individuals with poliinvasion (Hp+Tr+Mc+Dc) on 13,62% ( $p < 0,01$ ) in comparison with the individuals, having threefold invasion (Hp+Tr+Mc) is established.

Leukocytes granulocytic pool changes analysis in *P. ridibundus* peripheral blood testifies to segmented neutrophils relative quantity significant increase on 23,87% ( $p < 0,01$ ) and stab neutrophils significant increase on 30,71% ( $p < 0,01$ ) at individuals with poliinvasion in comparison with individuals with threefold invasion.

Absolute quantity in different leukocytes pools changes analysis allows to ascertain authentic increase in all granulocytes forms at individuals with poliinvasion (Hp+Tr+Mc+Dc) in comparison with individuals with threefold (Hp+Tr+Mc) and double (Hp+Tr) invasion.

Among *P. ridibundus* investigated groups with different haemoparasitic loading degree the greatest stress index was defined in individuals with combined poliinvasion (Hp+Tr+Mc+Dc), that on 14,21% ( $p < 0,01$ ) and on 11,58% ( $p < 0,01$ ) is more than at individuals with double (Hp+Tr) and threefold (Hp+Tr+Mc) invasion accordingly.

By carried out research results the LAE changes and domination index in *P. ridibundus* with different haemoparasitic loading degree have found out their multidirectional changes, which testify to system structural organization reduction (its disorganization increase), at the expense of relative organization reduction in group of individuals with poliinvasion (Hp+Tr+Mc+Dc) unlike two other groups.

The obtained data have shown possibility of integral leucocytal indices use for *P. ridibundus* adaptative processes stress degree estimation in natural haemoparasitic invasion conditions.

*Key words:* gemoparazity, *Pelophylax ridibundus*, WBC, agranulocytes, granulocytes, integrated leukocyte index, entropy, dominance index.

## ВСТУП

Відомо, що напруження адаптаційних процесів в організмі може відбуватися внаслідок впливу зовнішніх та внутрішніх чинників. Одним із внутрішніх факторів, які здатні порушити гомеостаз в організмі, може бути гемопаразитарна інвазія. Гемопаразити – це досить велика група одноклітинних організмів із широким ареалом, різноманіттям хазяїв, різним рівнем патогенності тощо. Недостатньо дослідженим, а, отже, відкритим, залишається питання про зв'язок гемопаразитарного навантаження з напруженням адаптаційних процесів в організмі зелених жаб [1].

Серед методів оцінки стану організму важливе місце займає аналіз гематологічних показників. Система крові є однією з лабільних тканин, які дуже швидко реагують на дію зовнішніх та внутрішніх факторів.

Гематологічні показники варіюють у вузьких межах, здатні об'єктивно відображати різні фізіологічні та патологічні зміни стану організму та є незамінним матеріалом для отримання інформації про принципову повноцінність роботи багатьох систем організму. Одна з важливих характеристик, що відображає функціонування систем організму, – лейкоцитарна формула.

Лейкоцити є поліморфними та поліфункціональними клітинами крові, що виконують різноманітні фізіологічні та імунологічні функції [2]. Вони захищають організм від чужорідних тіл, забезпечують адаптацію організму до біотичних і абіотичних факторів та імунітет до паразитів [3].

При описі та оцінці змін лейкоцитарної формули, при дії різноманітних чинників, доводиться аналізувати достатньо великий обсяг інформації, що створює певні труднощі при інтерпретації отриманих даних щодо стану організму.

Застосування інтегральних лейкоцитарних індексів, зокрема ентропії Шенона, дозволяє сконцентрувати різну інформацію в одне число, наочно уявити динаміку відповіді різних ланок імунної системи та аналізувати одночасно дію різних стрес-факторів або різних їх концентрацій у порівняльному аспекті [4], що полегшує інтерпретацію отриманих даних.

За допомогою математичних моделей інформаційний аналіз дозволяє показати оптимальний стан функціональної системи, сформований адаптаційними резервами, а

також дизадаптаційний, якісно новий її стан. Із позицій теорії інформації уявляється можливо виявляти надлишкові і приховані можливості морфофункціональних систем [5].

Метою роботи є оцінка ступеня напруження адаптаційних процесів *Pelophylax ridibundus*, що інвазовані гемопаразитами за допомогою застосування інтегральних індексів лейкоцитарної формули.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Збір матеріалу здійснювався на території о. Хортиця (м. Запоріжжя). Об'єктом дослідження були озерні жаби *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), обсяг вибірки – 52 особини. Дослідження проводили в умовах лабораторії на базі біологічного факультету Запорізького національного університету, із дотриманням принципів, викладених у Конвенції по захисту хребетних тварин (Страсбург, Франція, 1986).

Розподіл особин на групи відбувався після визначення наявності гемопаразитів у мазках крові. Ідентифікацію гемопаразитів проводили за морфометричними показниками.

Гематологічні дослідження (визначення лейкоцитів, підрахунок лейкоцитарної формули крові) виконували загальноприйнятими методами [6]. Мазки крові виготовляли з 0,01 мл крові, за їх аналізом оцінювали паразитарний вантаж за індексами екстенсивності інвазії (EI, %) та інтенсивності інвазії (II, екз.). Іntenсивність інвазії внутрішньоеритроцитарних гемопаразитів визначали з розрахунком їх на 1000 еритроцитів. Іntenсивність інвазії позаклітинних гемопаразитів розраховували на мазок крові (0,01 мл).

Для оцінки неспецифічної резистентності організму розраховували інтегральний лейкоцитарний індекс: відношення суми відсоткового вмісту нейтрофілів до відсоткової кількості лімфоцитів (N/L) [7].

Систему лейкоцитів крові можна розглядати як замкнуту систему із певною кількістю відповідних структурних елементів. Тому для концентрації інформації про видову структуру популяції лейкоцитів, а також для виявлення загальної тенденції розвитку цієї системи доцільно використовувати індекс біологічного різноманіття або «ентропію», що ґрунтується на функції Шенона [8]. Для оцінки абсолютної ентропії лейкоцитарної формули крові (ЕЛФК) використовували ентропію К. Шенона (формула 1).

$$\text{ЕЛФК} = - \sum_{i=1}^N \frac{n_i}{N} \times \log_2 \frac{n_i}{N}, \quad (1)$$

де:  $n_i$  – чисельність  $i$ -ї форми лейкоцитів,  $N$  – сумарна чисельність лейкоцитів усіх форм.

При дослідженні структури лейкоцитарної формули відносно або абсолютне співвідношення певних форм лейкоцитів буде невизначеним. Вважається, що при однаковій частці усіх форм лейкоцитів імунна система як структура повністю дезорганізована, її невизначеність максимальна і дорівнює логарифму числа форм. Якщо деякі форми лейкоцитів стають домінантами, то закон рівної ймовірності порушується, а невизначеність структури зменшується [4, 9]. Отже, сенс розрахунку функції Шенона полягає в оцінці невизначеності структури системи, тобто ентропії системи.

Для виключення впливу відсутності окремих груп лейкоцитів у лейкоцитарній формулі визначали відносну ЕЛФК<sub>Віднос.</sub> за формулою (2):

$$\text{ЕЛФК}_{\text{Віднос.}} = \frac{\text{ЕЛФК}}{\text{ЕЛФК}_{\text{max}}} \times 100. \quad (2)$$

Максимальне значення ентропії лейкоцитарної формули крові (ЕЛФК<sub>max</sub>) дорівнює  $\log_2 6 = 2,58$  (де 6 – кількість груп лейкоцитів у нормі) [10, 11].

Для визначення індексу домінування (R) визначали «відносну організацію» системи [5] за формулою (3):

$$R = 1 - \frac{\text{ЕЛФК}}{\log_2 6}. \quad (3)$$

Для детермінованої системи, що складається з однієї домінуючої форми лейкоцитів, а інші представлені одиничними клітинами, цей показник наближається до 1. Для повністю дезорганізованої, тобто при однаковому вкладі всіх форм лейкоцитів, показник дорівнює 0.

Отримані кількісні дані оброблені статистично за допомогою пакета прикладних комп'ютерних програм «Statistica 6.0». Вірогідність відмінностей оцінювали за величиною непараметричного критерію Манна-Уїтні. Різниця показників вважалася статистично достовірною при рівні значущості 95% і більше ( $p \leq 0,05$ ).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У крові озерних жаб *P. ridibundus* були виявлені одноклітинні паразити, яких віднесено до 3 таксономічних родин: внутрішньоклітинні – *Hepatozoon* Miller 1908 (Apicomplexa: Adeleorina), *Dactylosoma* Labbe, 1894 (Apicomplexa: Dactylosomatidae) та позаклітинні – *Trypanosoma* Gruby 1843 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), а також личинкові стадії нематоди – мікрофілярії – із підряду Filariata. Видове визначення виявлених гемопаразитів триває.

В аналізованій вибірці особин, вільних від гемопаразитів, та особин із моноінвазією виявлено не було, ЕІ аделеїдними кокцидіями *Hepatozoon* (Hp) та *Trypanosoma* (Tr) становила 100%, ЕІ *Dactylosoma* (Dc) – 13,04%, ЕІ мікрофіляріями (Mc) – 43,48%.

У вибірці середня П *Hepatozoon* була  $13,32 \pm 3,44$  екз. на 1000 еритроцитів, П *Dactylosoma* –  $0,38 \pm 0,31$  екз. на 1000 еритроцитів, П *Trypanosoma* –  $58,78 \pm 10,94$  екз. на мазок крові (0,01 мл) та П мікрофілярій –  $472,39 \pm 296,46$  екз. на мазок крові (0,01 мл).

За комбінуванням різних видів гемопаразитів біли виділенні три групи, інтенсивність інвазії в кожній із груп наведено в таблиці 1.

Таблиця 1 – Інтенсивність інвазії в крові *P. ridibundus* із різним ступенем гемопаразитарного навантаження.

Групи тварин	Hp+Tr+Mc+Dc (n = 12)	Hp+Tr+Mc (n = 14)	Hp+Tr (n = 26)
Гемопаразити			
<i>Hepatozoon</i> , екз. на 1000 еритроцитів	$\frac{17,61 \pm 16,06}{0,39 - 49,71}$	$\frac{9,38 \pm 5,27}{0,98 - 40,39}$	$\frac{14,46 \pm 4,45}{0,59 - 55,88}$
<i>Trypanosoma</i> , екз. на мазок крові (0,01 мл)	$\frac{93,0 \pm 33,41}{51 - 159}$	$\frac{72,71 \pm 24,72}{17 - 202}$	$\frac{43,39 \pm 11,39}{2 - 120}$
Мікрофілярії, екз. на мазок крові (0,01 мл)	$\frac{208,67 \pm 136,11}{12 - 470}$	$\frac{1462,71 \pm 904,84}{18 - 6410}$	—
<i>Dactylosoma</i> , екз. на 1000 еритроцитів	$\frac{2,51 \pm 2,34}{0,13 - 7,19}$	—	—

Примітка: тут та далі у чисельнику  $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ ; у знаменнику – min – max значення.

Відомо, що при впливі різних стресових чинників, зокрема інвазивних, у популяції лейкоцитів крові відбуваються дестабілізаційні та дезорганізаційні процеси, що призводять до зниження адаптивних властивостей організму. Ці зміни відбуваються у співвідношенні різних пулів лейкоцитів, що наочно можна спостерігати при аналізі лейкоцитарної формули. Зміни в співвідношенні різних форм лейкоцитів можуть бути індикаторами ступеня дестабілізаційних процесів.

Основними типами клітин білої крові зелених жаб є лімфоцити, моноцити, нейтрофіли, еозинофіли і базофіли [12, 13]. Склад лейкоцитарної формули відображає видові, індивідуальні та екологічні особливості жаб, а співвідношення окремих типів клітин – функціональний стан організму і характер впливу біотичних та абіотичних стрес-факторів [14].

За результатами проведеного дослідження було визначено, що в крові всіх особини *P. ridibundus* із різним комбінуванням гемопаразитарної інвазії найбільший пул клітин складали лімфоцити, тобто кров має лімфоцитарний профіль (рис. 1). Лімфоцити зелених жаб, подібні до лімфоцитів вищих хребетних [2], є центральною ланкою імунної системи, що забезпечує всі основні реакції імунітету, зокрема формування адаптивного імунітету. Зменшення відносної кількості лімфоцитів в особин із поліінвазією (Нр+Тг+Мс+Дс) на 13,62% ( $p < 0,01$ ) порівняно з особинами, що мали потрійну інвазію (Нр+Тг+Мс), мало статистично достовірну відмінність.

У реалізації функцій клітинного імунітету важлива роль належить гранулоцитам. Гранулоцити *P. ridibundus* представлені нейтрофілами, еозинофілами та базофілами. Нейтрофіли за ступенем зрілості ядра поділяли на юні, паличко- та сегментоядерні.

Аналіз змін гранулоцитарного пулу лейкоцитів у периферичній крові *P. ridibundus* свідчить про достовірні збільшення на 23,87% ( $p < 0,01$ ) відносної кількості сегментоядерних та на 30,71% ( $p < 0,01$ ) паличкоядерних нейтрофілів у особин із поліінвазією порівняно з особинами з потрійною інвазією. Збільшення юних форм нейтрофілів не мали достовірних відмінностей в особин цих двох груп.

Найменший відносний вміст еозинофілів визначений в особин із подвійною (Нр+Тг) інвазією, що на 49,5% ( $p < 0,001$ ) менше ніж у особин із поліінвазією. Відносна кількість еозинофілів в особин із поліінвазією більша на 18,36% ( $p < 0,05$ ) ніж у особин із потрійною інвазією.

Статистичний аналіз змін щодо агранулоцитарного пулу лейкоцитів в особин із потрійною (Нр+Тг+Мс) та поліінвазією (Нр+Тг+Мс+Дс) не виявило вірогідних відмінностей. Порівняльний аналіз змін відносних показників лейкоцитарної формули між особинами із подвійною (Нр+Тг) та потрійною (Нр+Тг+Мс) інвазією не виявив статистично значущих відмінностей.

Для більш об'єктивного аналізу реальних співвідношень окремих форм лейкоцитів, окрім відсоткового складу лейкоцитарної формули, доцільно перевести їх в абсолютні числа (тис/мкл). Кількість лейкоцитів окремих видів може змінюватися незалежно від інших, саме тому необхідно розрізняти відносні та абсолютні зміни.

Найбільший загальний вміст лейкоцитів у крові *P. ridibundus* був визначений в особин із поліінвазією (Нр+Тг+Мс+Дс), що на 20,56% ( $p < 0,01$ ) більше, ніж в особин із потрійною (Нр+Тг+Мс) інвазією (табл. 2).

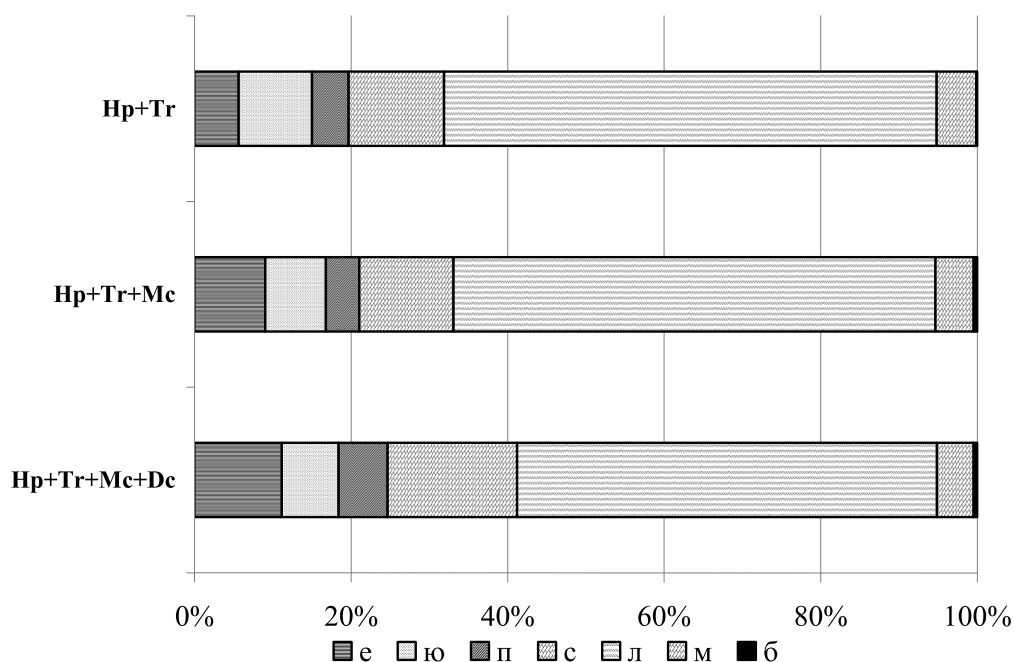


Рис. 1 Співвідношення (%) різних типів лейкоцитів у лейкоцитарній формулі крові *P. ridibundus* із різним ступенем гемопаразитарного навантаження (е – еозинофіли, ю – юні нейтрофіли, п – паличкоядерні нейтрофіли, с – сегментоядерні нейтрофіли, л – лімфоцити, м – моноцити, б – базофіли).

Таблиця 2 – Загальний вміст лейкоцитів та абсолютна кількість елементів лейкоцитарної формули у крові *P. ridibundus* із різним ступенем гемопаразитарного навантаження.

Групи тварин		Hp+Tr+Mc+Dc (n = 12)	Hp+Tr+Mc (n = 14)	Hp+Tr (n = 26)
Показники				
лейкоцити, тис/мкл		$\frac{16,0 \pm 3,46}{10 - 22}$	$\frac{12,71 \pm 2,78^{**}}{5 - 27}$	$\frac{15,15 \pm 2,19^{## \$}}{4 - 31}$
еозинофіли, тис/мкл		$\frac{1,92 \pm 0,73}{0,8 - 3,3}$	$\frac{1,27 \pm 0,46^{**}}{0,08 - 3,41}$	$\frac{1,17 \pm 0,57}{0,07 - 7,75}$
нейтрофіли	юні, тис/мкл	$\frac{1,10 \pm 0,5}{0,53 - 2,19}$	$\frac{0,71 \pm 0,09^{**}}{0,27 - 0,99}$	$\frac{1,54 \pm 0,53^{# \$\$}}{0,08 - 6,96}$
	паличкоядерні, тис/мкл	$\frac{0,89 \pm 0,15}{0,66 - 1,17}$	$\frac{0,40 \pm 0,08^{**}}{0,18 - 0,75}$	$\frac{0,76 \pm 0,14^{## \$\$}}{0,06 - 1,9}$
	сегментоядерні, тис/мкл	$\frac{2,04 \pm 0,78}{0,6 - 3,2}$	$\frac{1,29 \pm 0,28^{**}}{0,37 - 2,61}$	$\frac{1,91 \pm 0,45^{# \$}}{0,48 - 6,61}$
лімфоцити, тис/мкл		$\frac{9,10 \pm 3,34}{4,2 - 15,47}$	$\frac{8,28 \pm 2,19}{2,78 - 19,62}$	$\frac{8,96 \pm 1,04}{2,91 - 14,14}$
моноцити, тис/мкл		$\frac{0,77 \pm 0,22}{0,33 - 1,01}$	$\frac{0,71 \pm 0,32}{0,03 - 1,98}$	$\frac{0,78 \pm 0,25}{0,15 - 3,60}$
базофіли, тис/мкл		$\frac{0,06 \pm 0,03}{0 - 0,1}$	$\frac{0,09 \pm 0,06}{0 - 0,45}$	$\frac{0,01 \pm 0,01}{0 - 0,19}$

Примітки: тут та далі \*\* –  $p < 0,01$  при порівнянні особин із потрійною (Hp+Tr+Mc) інвазією з особинами із поліінвазією (Hp+Tr+Mc+Dc); # –  $p < 0,05$ , ## –  $p < 0,01$  при порівнянні особин із подвійною (Hp+Tr) інвазією з особинами із поліінвазією (Hp+Tr+Mc+Dc); \$ –  $p < 0,05$ , \$\$ –  $p < 0,01$  при порівнянні особин із подвійною (Hp+Tr) інвазією з особинами із потрійною (Hp+Tr+Mc) інвазією.

Аналіз змін абсолютної чисельності в різних пулах лейкоцитів дозволяє констатувати вірогідне збільшення всіх форм гранулоцитів в особин із поліінвазією (Hr+Tr+Mc+Dc) порівняно з особинами з потрійною (Hr+Tr+Mc) та подвійною (Hr+Tr) інвазією.

Встановлено збільшення еозинофілів на 33,85% ( $p < 0,01$ ) в особин із поліінвазією порівняно із особинами з подвійною інвазією. Зміни абсолютної кількості еозинофілів між іншими групами зелених жаб не мали вірогідних відмінностей.

Найбільша абсолютна кількість юних форм нейтрофілів спостерігалася в особин із подвійною (Hr+Tr) інвазією, що на 40% ( $p < 0,05$ ) більше ніж в особин із поліінвазією (Hr+Tr+Mc+Dc) та майже в 2,17 разу ( $p < 0,01$ ) більше ніж в особин із потрійною (Hr+Tr+Mc) інвазією.

У особин із поліінвазією (Hr+Tr+Mc+Dc) абсолютна кількість зрілих форм нейтрофілів (паличко- та сегментоядерних) була вірогідно більшою на 55,06% ( $p < 0,01$ ) та 36,76% ( $p < 0,01$ ) відповідно ніж в особин із потрійною (Hr+Tr+Mc) інвазією. Особини з подвійною (Hr+Tr) інвазією мали також більш високі абсолютні показники паличко- та сегментоядерних нейтрофілів (на 47,37% ( $p < 0,01$ ) та 32,46% ( $p < 0,05$ ) відповідно) ніж особини з потрійною (Hr+Tr+Mc) інвазією.

Беззаперечним є той факт, що нейтрофіли є активними ферментоутворювачами, що здатні до фагоцитозу та до здійснення різноманітних ефекторних функцій клітинного імунітету. Тому виявлені зміни у відносних та абсолютних кількостях гранулоцитів у вигляді часткового нетрофілізу можливо розглядати як окремі ознаки адаптаційного механізму, що підвищують захисну функцію крові.

При аналізі змін абсолютної кількості базофілів серед груп *P. ridibundus* із різним ступенем гемопаразитарного навантаження вірогідних відмінностей не виявлено.

Статистичний аналіз змін абсолютних показників агранулоцитарної ланки (лімфоцитів і моноцитів) лейкоцитів між трьома дослідженими групами жаб низькодостовірний ( $p > 0,05$ ) через високий рівень варіабельності цих показників. Це можна розглядати як додаткове свідчення нестабільного стану лімфоїдної системи, що розвивається в жаб під впливом гемопаразитарного навантаження.

Додатковим методом оцінки фізіологічного стресу в хребетних є використання індексу напруження N/L, що відображає співвідношення неспецифічного і специфічного захисту, тобто гуморальної і клітинної ланки імунної системи [15].

Лімфоцитарний профіль крові зелених жаб *P. ridibundus* визначає низькі значення індексу напруження N/L, його збільшення спостерігається у відповідь на дію стрес-індукованих факторів. Серед досліджених груп *P. ridibundus* із різним ступенем гемопаразитарного навантаження найбільший індекс напруження визначений в особин із комбінованою поліінвазією (Hr+Tr+Mc+Dc), що на 14,21% ( $p < 0,01$ ) та на 11,58% ( $p < 0,01$ ) більше ніж у особин із подвійною (Hr+Tr) та потрійною (Hr+Tr+Mc) інвазією відповідно (табл. 2).

За результатами проведеного дослідження змін ЕЛФК та індексу домінування в *P. ridibundus* із різним ступенем гемопаразитарного навантаження виявили їх різноспрямовані зміни, що свідчать про зменшення структурної організації системи (підвищення її дезорганізованості), за рахунок зменшення відносної організації в групі особин із поліінвазією (Hr+Tr+Mc+Dc) на відміну від двох інших груп (табл. 2).

Отже, виявлені зміни в ЕЛФК та відносної організації (індекс домінування) відбивають дестабілізаційні процеси та характер модифікаційних змін, що відбуваються в організмі *P. ridibundus* залежно від підвищення ступеня гемопаразитарного навантаження.



Таблиця 2 – Інтегральні лейкоцитарні індекси *P. ridibundus* із різним ступенем гемопаразитарного навантаження.

Групи тварин Показники	Hp+Tr+Mc+Dc (n = 12)	Hp+Tr+Mc (n = 14)	Hp+Tr (n = 26)
N/L	$\frac{0,65 \pm 0,28}{0,12 - 1,09}$	$\frac{0,44 \pm 0,12^{**}}{0,15 - 1,01}$	$\frac{0,46 \pm 0,08^{\#}}{0,19 - 1,33}$
ЕЛФК	$\frac{1,90 \pm 0,24}{1,42 - 2,17}$	$\frac{1,68 \pm 0,10^{**}}{1,43 - 2,25}$	$\frac{1,63 \pm 0,07^{\#\#}}{1,37 - 2,14}$
ЕЛФК <sub>Віднос</sub>	$\frac{73,39 \pm 9,28}{54,90 - 84,14}$	$\frac{64,87 \pm 3,97^{**}}{55,28 - 86,89}$	$\frac{63,18 \pm 2,85^{\#\#}}{52,88 - 82,74}$
R	$\frac{0,71 \pm 0,04}{0,67 - 0,79}$	$\frac{0,75 \pm 0,02^*}{0,66 - 0,78}$	$\frac{0,75 \pm 0,01^{\#}}{0,68 - 0,79}$

Результати проведеного дослідження показали, що зі збільшенням гемопаразитарного навантаження в організмі *P. ridibundus* відбувається підвищення ступеня напруження адаптаційних функціональних систем та зменшення стабільності структури лейкоцитів. Отримані дані свідчать про можливість використання інтегральних лейкоцитарних індексів для оцінки ступеня напруження адаптаційних процесів *P. ridibundus* в умовах природної гемопаразитарної інвазії.

Виявлені залежності інтегральних лейкоцитарних індексів *P. ridibundus* із рівнем природної гемопаразитарної інвазії вимагають подальшого глибокого вивчення.

### ВИСНОВКИ

1. У крові озерних жаб *P. ridibundus* були виявлені одноклітинні паразити, яких віднесено до 3 таксономічних родин: внутрішньоклітинні – *Hepatozoon* Miller 1908 (Apicomplexa: Adeleorina), *Dactylosoma* Labbe, 1894 (Apicomplexa: Dactylosomatidae) та позаклітинні – *Trypanosoma* Gruby 1843 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), а також личинкові стадії нематоди – мікрофілярії – із підряду *Filariata*.
2. За результатами проведеного дослідження було визначено, що в крові всіх особини *P. ridibundus* із різним комбінуванням гемопаразитарної інвазії найбільший пул клітин складала лімфоцити, тобто кров має лімфоцитарний профіль. Встановлено зменшення відносної кількості лімфоцитів в особин із поліінвазією (Hp+Tr+Mc+Dc) на 13,62% ( $p < 0,01$ ) порівняно з особинами, що мали потрійну інвазію (Hp+Tr+Mc).
3. Аналіз змін гранулоцитарного пулу лейкоцитів у периферичній крові *P. ridibundus* свідчить про достовірні збільшення на 23,87% ( $p < 0,01$ ) відносної кількості сегментоядерних та на 30,71% ( $p < 0,01$ ) паличкоядерних нейтрофілів в особин із поліінвазією порівняно з особинами з потрійною інвазією.
4. Аналіз змін абсолютної чисельності в різних пулах лейкоцитів дозволяє констатувати вірогідне збільшення всіх форм гранулоцитів в особин із поліінвазією (Hp+Tr+Mc+Dc) порівняно з особинами з потрійною (Hp+Tr+Mc) та подвійною (Hp+Tr) інвазією.
5. Серед досліджених груп *P. ridibundus* із різним ступенем гемопаразитарного навантаження найбільший індекс напруження визначений в особин із комбінованою поліінвазією (Hp+Tr+Mc+Dc), що на 14,21% ( $p < 0,01$ ) та на 11,58% ( $p < 0,01$ ) більше ніж в особин із подвійною (Hp+Tr) та потрійною (Hp+Tr+Mc) інвазією відповідно.
6. Отримані дані свідчать про можливість використання інтегральних лейкоцитарних індексів для оцінки ступеня напруження адаптаційних процесів *P. ridibundus* в умовах природної гемопаразитарної інвазії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Readel A. M. Blood Parasites of Frogs From an Equatorial African Montane Forest in Western Uganda / A.M. Readel, T.L. Goldberg // *J. Parasitol.* – 2010. – Vol. 96(2). – P. 448–450.
2. Галактионов В. Г. Эволюционная иммунология / Галактионов В. Г. – М. : ИКЦ Академкнига, 2005. 408 с.
3. Shutler D. Leukocyte Profiles of Northern Leopard Frogs, *Lithobates pipiens*, Exposed to Pesticides and Hematozoa in Agricultural Wetlands / D.Shutler, D.J. Marcogliese // *Copeia.* – 2011. – Vol. 2. – P. 301-307.
4. Зилов В.Г. Элементы информационной биологии и медицины / Зилов В. Г., Судаков К.В., Эпштейн О.И. – М. : МГУЛ, 2001. – 256 с.
5. Осипов А. И. Энтропия и ее роль в науке / А.И. Осипов, А.В. Уваров // *Соросовский образовательный журнал.* – 2004. – Т. 8, № 1. – С. 70–79.
6. Микряков В.Р. Использование индекса Шеннона для оценки последствий влияния стресс-факторов на структурную организацию состава лейкоцитов рыб / В.Р. Микряков, В.Г Терещенко, Д.В. Микряков // *Вопросы рыболовства.* – 2005. – Т. 6, № 3 (23). – С. 518-532.
7. Терещенко В.Г. Применение интегральных индексов структуры лейкоцитов для описания процессов, происходящих в иммунной системе рыб / В.Г. Терещенко, В.Р. Микряков, Д.В. Микряков // *Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов : расширенные материалы IV Междунар. конф., Борок, 24 – 27 сентября 2015 года.* – Ярославль : Филигрань, 2015. – С. 245 – 257.
8. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб) / Н.Т. Иванова. – М. : Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 184 с.
9. Davis A.K. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists (Review) / A.K. Davis, D. L. Maney, J. C. Maerz // *Functional Ecology.* – 2008. – Vol. 22. – P. 760–772.
10. Пат. На корисну модель № 30359 Україна (2007) GO1N 33/49). Спосіб діагностики донозологічного стану чоловіків / Омельянчик Л.О., Колісник Н. В., Самойленко Ж.С. Заяв. 22.10.2007. Опубл. 25.02.2008, Бюл. № 4. – 4 с.
11. Мызников И.Л. Методики информационного исследования морфологии белой крови / И.Л. Мызников, В.В. Марченко, Д.Г. Перминов // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* – 2013. – Т. 4 (53). – С. 21 – 26.
12. Allender M.C. Amphibian Hematology / M.C. Allender, M.M. Fry // *Vet. Clin. Exot. Anim.* – 2008. – Vol. 11. – P. 463 – 480.
13. Davis A.K. White blood cell differentials of northern cricket Frogs (*Acris c. crepitans*) with a compilation of Published values from other amphibians / A. K. Davis, A.W.M. Durso // *Herpetologica.* – 2009. – Vol. 65(3). – P. 260 – 267.
14. Romanova E.B. Peculiarities of Leukocytic Formula of Peripheral Blood of Green Frogs under Conditions of Anthropogenic Load / E.B. Romanova, O.Yu. Romanova // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* – 2003. – Vol. 39, № 4. – P. 480 – 484.

15. Narayan E. Urinary corticosterone responses and haematological stress indicators in the endangered Fijian ground frog (*Platymantis vitiana*) during transportation and captivity / E. Narayan, J.-M. Hero // *Australian Journal of Zoology*. – 2011. – Vol. 59. – P. 79 - 85.

## REFERENCES

1. Readle A. M. Blood Parasites of Frogs From an Equatorial African Montane Forest in Western Uganda / A.M. Readle, T.L. Goldberg // *J. Parasitol.* – 2010. – Vol. 96(2). – P. 448–450.
2. Galaktionov V.G. Jevoljucionnaja imunologija / Galaktionov V.G. . – M. : IKC Akademkniga, 2005. 408 s.
3. Shutler D. Leukocyte Profiles of Northern Leopard Frogs, *Lithobates pipiens*, Exposed to Pesticides and Hematozoa in Agricultural Wetlands / D.Shutler, D.J. Marcogliese // *Copeia*. – 2011. – Vol. 2. – R. 301-307.
4. Zilov V.G. Jelementy informacionnoj biologii i mediciny / Zilov V.G., Sudakov K.V., Jepshtejn O. I. – M. : MGUL, 2001. – 256 s.
5. Osipov A. I. Jentropija i ee rol' v nauke / A.I. Osipov, A.V. Uvarov // *Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal*. – 2004. – T. 8, № 1. – S. 70 – 79.
6. Mikrjakov V.R. Ispol'zovanie indeksa Shennona dlja ocenki posledstvij vlijanija stress-faktorov na strukturnuju organizaciju sostava lejkocitov ryb / Mikrjakov V.R., Tereshhenko V.G, Mikrjakov D.V. // *Voprosy rybolovstva*. – 2005. – T. 6, № 3 (23). – S. 518-532.
7. Tereshhenko V.G. Primenenie integral'nyh indeksov struktury lejkocitov dlja opisaniya processov, proishodjashhih v immunnoj sisteme ryb / V.G. Tereshhenko, V.R. Mikrjakov, D.V. Mikrjakov // *Problemy patologii, imunologii i ohrany zdorov'ja ryb i drugih gidrobiontov : rasshirennye materialy IV Mezhdunar. konfer., Borok, 24-27 sentjabrja 2015 goda*. – Jaroslavl' : Filigran', 2015. – S. 245-257.
8. Ivanova N.T. Atlas kletok krovi ryb (sravnitel'naja morfologija i klassifikacija formennyh jelementov krovi ryb) / N.T. Ivanova. – M. : Legkaja i pishhevaja promyshlennost', 1982. – 184 s.
9. Davis A. K. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists (Review) / Davis A. K., Maney D. L., Maerz J. C. // *Functional Ecology*. – 2008. – Vol. 22. – R. 760–772.
10. Pat. na korisnu model' № 30359 Ukraina (2007) GO1N 33/49). Sposib diagnostiki donozologichnogo stanu cholovikiv / Omel'janchik L.O., Kolisnik N.V., Samojlenko Zh.S. Zajav. 22.10.2007. Opubl. 25.02.2008, Bjul. № 4. – 4 s.
11. Myznikov I.L. Metodiki informacionnogo issledovanija morfologii beloju krovi / Myznikov I.L., Marchenko V.V., Perminov D.G. // *Zdorov'e. Medicinskaja jekologija. Nauka*. – 2013. – T. 4 (53). – S. 21 – 26.
12. Allender M.C. Amphibian Hematology / M.C. Allender, M.M. Fry // *Vet. Clin. Exot. Anim.* – 2008. – Vol. 11. – P. 463 – 480.
13. Davis A.K. White blood cell differentials of northern cricket Frogs (*Acris c. Crepitans*) with a compilation of Published values from other amphibians / A.K. Davis, A.W M. Durso // *Herpetologica*. – 2009. – Vol. 65(3). – P. 260 – 267.
14. Romanova E.B. Peculiarities of Leukocytic Formula of Peripheral Blood of Green Frogs under Conditions of Anthropogenic Load / E.B. Romanova, O.Yu. Romanova // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2003. – Vol. 39, № 4. – P. 480 - 484.
15. Narayan E. Urinary corticosterone responses and haematological stress indicators in the endangered Fijian ground frog (*Platymantis vitiana*) during transportation and captivity / E. Narayan, J.-M. Hero // *Australian Journal of Zoology*. – 2011. – Vol. 59. – P. 79 – 85.