

Оригинальная статья

УДК 598.132.4:591.111.1

<https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-2-190-204>

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* И *P. LESSONAE* (AMPHIBIA: RANIDAE), ИНФИЦИРОВАННЫХ ГЕМОПАРАЗИТАМИ

Е. Б. Романова , В. Д. Плотникова, Е. С. Рябинина

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет  
им. Н. И. Лобачевского

Россия, 603950, г. Нижний Новгород, просп. Гагарина, д. 23

Поступила в редакцию 21.11.2023 г., после доработки 23.12.2023 г., принята 25.12.2023 г., опубликована 28.06.2024 г.

**Аннотация.** Изучена направленность адаптивных реакций здоровых и инфицированных *Hepatozoon* spp. зеленых лягушек водных объектов Нижегородской области с различными гидрохимическими условиями. За период наблюдений выявлено заражение прудовых лягушек и возрастание суммарных популяционных показателей заражения *Hepatozoon* spp. самок и самок озерных лягушек. У озерных лягушек выявлена гипертрофия морфометрических показателей зараженных эритроцитов крови по сравнению со здоровыми клетками. Содержание нейтрофильных гранулоцитов в крови зараженных озерных лягушек было выше по сравнению со здоровыми особями, уровень иммунных комплексов не различался. У зараженных прудовых лягушек выявлено возрастание уровня крупных иммунных комплексов в сыворотке крови и индекса укрупнения по сравнению со здоровыми на фоне общего снижения резистентности организма в условиях сильного загрязнения среды обитания тяжелыми металлами и сульфатами. Для озерных лягушек установлена корреляционная взаимосвязь доли зараженных эритроцитов с содержанием в крови миелоцитов и юных форм нейтрофилов; для прудовых – с содержанием нейтрофилов и индексом укрупнения иммунных комплексов. Методом многофакторного дисперсного анализа выявлено значимое влияние на иммунный статус амфибий факторов: пол и взаимодействие пол/заражение гемопаразитами.

**Ключевые слова:** *Pelophylax ridibundus*, *P. lessonae*, *Hepatozoon* spp., формула крови, иммунные комплексы

**Соблюдение этических норм.** Протоколы с использованием животных были одобрены Комиссией по биоэтике Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского (протокол № 38 от 03.03.2020 г.).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования.** Романова Е. Б., Плотникова В. Д., Рябинина Е. С. Сравнительный иммуногематологический профиль *Pelophylax ridibundus* и *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae), инфицированных гемопаразитами // Поволжский экологический журнал. 2024. № 2. С. 190 – 204. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-2-190-204>

 **Для корреспонденции.** Институт биологии и биомедицины Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского.

ORCID и e-mail адреса: Романова Елена Борисовна: <https://orcid.org/0000-0002-1925-7864>, [romanova@ibbm.unn.ru](mailto:romanova@ibbm.unn.ru); Плотникова Валерия Дмитриевна: <https://orcid.org/0000-0002-4305-7651>, [psyche\\_medea@mail.ru](mailto:psyche_medea@mail.ru); Рябинина Елена Сергеевна: <https://orcid.org/0000-0001-5544-2912>, [ryabinina.e.s@yandex.ru](mailto:ryabinina.e.s@yandex.ru).

## ВВЕДЕНИЕ

Жизнеспособность популяций амфибий напрямую связана с состоянием особей, важными маркерами которого являются иммуногематологические показатели, подверженные влиянию комплекса экологических факторов и широко используемые для оценки долгосрочных перспектив выживания, сохранения и реабилитации видов (Леонтьева, Семенов, 1997; Пескова, 2002; Вершинин, 2004; Романова и др., 2018, 2023 и др.). При оценке состояния популяций используется и паразитологический анализ (Малютина, 2008; Шевкопляс, Лопатин, 2008; Файзулин, Зарипова, 2017; Чихляев и др., 2018 и др.), поскольку благодаря эвритопности, высокой численности и темпам размножения, особенностям жизненного цикла со сменой среды обитания, амфибии заражены многими видами паразитов (Рыжиков, Шарпило, Шевченко, 1980; Резванцева и др., 2010; Романова и др., 2013), в том числе гемопаразитами (Smith, 1996; Netherlands et al., 2014; Peskova et al., 2018; Mehus, Vaughan, 2013; Flaherty et al., 2021), и являются индикатором паразитарного заражения ареала (Гаибова, Мамедова, 2010).

Сведения о характере количественных изменений в крови лягушек при заражении гемопаразитами с учетом антропогенной нагрузки на среду обитания носят фрагментарный характер и зачастую противоречивы (Малышова, 2009; Гаибова, Мамедова, 2010; Smith, 1996; Netherlands et al., 2014; Peskova et al., 2018). Кроме того, практически отсутствуют динамические исследования по сравнительному анализу межвидовых особенностей функциональной активности иммунитета и немногочисленны данные о популяционных иммуногематологических характеристиках инфицированных амфибий. В этой связи задача отслеживания изменения направленности адаптивных реакций системы крови прудовых и озерных лягушек в условиях естественных биотопов является актуальной и своевременной, а также необходима как для теории, так и для решения практических природоохранных вопросов в области экофизиологии амфибий.

Цель работы: сравнительный анализ лейкоцитарного профиля и уровня циркулирующих иммунных комплексов в крови *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 и *P. lessonae* Camerano, 1882 Нижегородской области при заражении *Hepatozoon* spp.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом служили сборы озерных (103 особи) и прудовых (40 особей) лягушек шести водоемов Нижегородской области в 2020 – 2022 гг. В пробах воды с помощью спектрофотометра Nach DR-2800 (Nach Company, США) определены основные химические загрязнители (железо, марганец, медь, хром, нитраты ( $\text{NO}_3^-$ ), нитриты ( $\text{NO}_2^-$ ), сульфаты ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), сульфиды ( $\text{S}^{2-}$ ), никель, кобальт, цинк, свинец) и произведен расчет удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ) (РД 52.24.643-2002). У всех особей из сердца была взята кровь для определения лейкоцитарной формулы крови (Меньшиков и др., 1987). Дифференцировку клеток проводили на окрашенных по Романовскому – Гимза мазках крови под микроскопом Meiji Techno (Japan) с иммерсией (ув.  $\times 1500$ ). В сыворотке крови определяли уровень крупных и мелких циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК, ед. опт./10 мл) методом селективной преципитации в растворе полиэти-

ленгликоля (3.5 – 7.0%) (Гриневич, Алферов, 1981) с последующим расчетом индекса укрупнения (отн. ед.) как отношения содержания крупных комплексов к мелким иммунным комплексам.

На основании лейкоцитарной формулы были рассчитаны интегральные лейкоцитарные индексы (отн. ед.):

кровоно-клеточный показатель (ККП):  $= \text{Э} + \text{ПН} + \text{СН} / \text{Л} + \text{М};$

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

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

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

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

индекс соотношения нейтрофилов и эозинофилов (ИСНЭ):  $= \text{ПН} + \text{СН} / \text{Э};$

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

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

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

Учет внутриэритроцитарных гемопаразитов *Hepatozoon* spp. проводили на 500 эритроцитов каждой особи. Определяли: экстенсивности инвазии (Е, %) – количество особей вида, зараженных гемопаразитами, по отношению ко всему числу исследованных особей; среднюю интенсивность инвазии (I, отн.ед.) – количество паразитов, приходящихся в среднем на одну особь; индекс обилия (ИО, отн. ед.) – количество гемопаразитов, приходящихся на одну особь.

Окуляр-микрометром проводили измерение большой (2а) и малой (2b) осей здоровых и инфицированных эритроцитов. Площадь ( $\text{мкм}^2$ ) клеток рассчитывали по формуле эллипса:  $S = \pi \times a \times b$ , где,  $a$  – большая полуось эллипса;  $b$  – малая полуось эллипса;  $\pi = 3.14$ .

Полученные первичные данные проверяли на нормальность распределения по критериям Шапиро – Уилка, Лиллиефорса, Колмогорова – Смирнова (Реброва, 2008). Поскольку полученное значение  $p$  для данных критериев оказалось меньше принятого критического уровня ( $\alpha < 0.05$ ), то распределение показателей считали отличающимся от нормального. С учетом вида распределения полученные данные описывали медианой и межквартильным расстоянием. Статистический анализ проводили методами непараметрической статистики с расчетом критериев: Манна – Уитни ( $U$ ) (при сравнении двух независимых выборок); Краскела – Уоллиса ( $H$ ) (при множественном сравнении независимых групп по одному признаку) с поправкой Бонферрони; Данна ( $Z$ ) (множественным критерием при попарном сравнении групп), коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $\rho$ ), критерия  $z$  (при сравнении долей), а также методом многомерного дисперсионного анализа с использованием лямбды Уилкса ( $\lambda$ Wilks) в качестве критериальной статистики. Ввиду несоответствия первичных данных нормальному распределению, значимость отличий ( $p$ -значения) рассчитывалась путем рандомизации с использованием перестановочной процедуры (Шитиков, Розенберг, 2014). Группировку объектов исследования и визуализацию межгрупповых различий проводили методами классификационного анализа (кластерным анализом, методом главных компо-

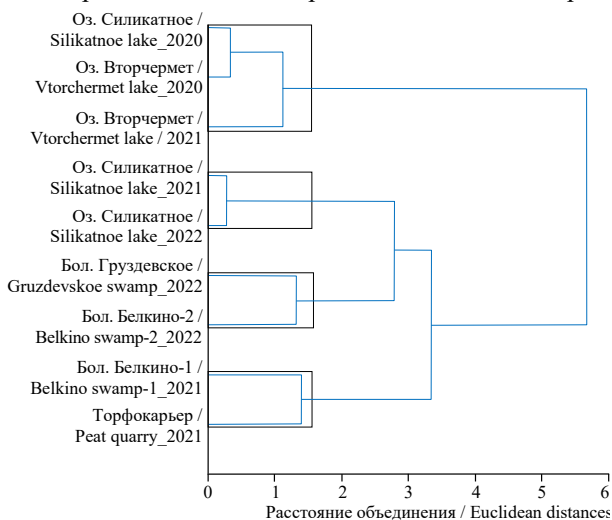
нент), реализованными в пакете прикладных программ Statistica 8 (StatSoft Inc., OK, USA). За величину уровня статистической значимости принимали  $\alpha = 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результат гидрохимического анализа водных объектов выявил превышение норматива качества воды для водоемов рыбохозяйственного назначения (ПДК<sub>рыб-хоз</sub>) по содержанию железа, марганца, меди, хрома, нитритов, сульфидов, кобальта, цинка, никеля. С целью группирования водных объектов по содержанию изученных химических элементов использовали кластерный анализ. Исследованные водоемы разделились на четыре кластера (рис. 1).

В первый кластер вошли оз. Вторчермет (2020 – 2021 гг.) с наиболее близкими гидрохимическими показателя и доминированием прудовых лягушек и оз. Силикатное (2020 г.) с близкими абиотическими условиями среды обитания озерных лягушек (IV класс, грязная, разряд «а») и высоким содержанием марганца, меди, хрома и цинка (табл. 1). Внутри этого кластера водные объекты объединялись в соответствии с межгодовыми гидрохимическими различиями. Второй кластер сформировало оз. Силикатное (2021, 2022) с доминированием озерных лягушек, в котором за период исследований качество воды ухудшилось и перешло по сравнению с 2020 г. из разряда «а» и разряда «б» – грязная (2021), а позднее – в разряд «в» – очень грязная (2022), за счет сильного загрязнения водоема органическими веществами, а также окисления сульфидов и серы, что подтверждалось значительным количеством сульфатов в пробах водного объекта. В третий и четвертый кластер вошли водные объекты Нижегородской области Борского и Павловского районов с более высоким, согласно УКИЗВ, уровнем загрязнения.

Водные объекты III кластера (Бол. Белкино-2 и Бол. Груздевское) с доминированием озерных лягушек, в отличие от городских объектов, отличались повышенным содержанием железа, меди, а также наличием дополнительных тяжелых металлов: никеля и кобальта. Оба водных объекта IV кластера, согласно УКИЗВ, относились к категории экстремально грязных вод с высоким содержанием сульфатов, меди, марганца, железа и других тяжелых металлов, при



**Рис. 1.** Дендрограмма иерархической кластеризации водных объектов Нижегородской области (2020 – 2022 гг.)

**Fig. 1.** Hierarchical clustering dendrogram of water bodies of the Nizhni Novgorod region (2020–2022)

этом в Бол. Белкино-1 (2021) доминировали прудовые, а в торфокарьере Ситниковского заказника (2021) – озерные лягушки.

**Таблица 1.** Превышение ПДК<sub>рыб-хоз</sub> (раз) химических элементов водных объектов, группирующихся по гидрохимическому составу

**Table 1.** Excesses over the maximum permissible concentrations of chemical elements (used for fishery reservoirs) in water bodies, grouped by hydrochemical composition

| Кластер / Cluster | Водоем / Год / УКИЗВ, отн. ед / Water body / Year / Specific Combinatorial Index of Water Pollution, rel. u.s | Fe   | Mn  | Cu   | Cr    | NO <sub>2</sub> | SO <sub>4</sub> | Zn | Ni   | Co  |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|------|-------|-----------------|-----------------|----|------|-----|
| I                 | Оз. Силикатное / Silikatnoe lake / 2020 / 5.1                                                                 | –    | 30  | 15.5 | 2.0   | 24.3            | –               | 39 | –    | –   |
|                   | Оз. Вторчермет / Vtorchermet lake / 2020 / 5.59                                                               | 1.3  | 60  | 90   | 3.3   | 10.3            | –               | 37 | –    | –   |
|                   | Оз. Вторчермет / Vtorchermet lake / 2021 / 4.4                                                                | –    | 30  | 60   | 4.9   | –               | –               | 4  | –    | 1.6 |
| II                | Оз. Силикатное / Silikatnoe lake / 2021 / 7.15                                                                | –    | 50  | 30   | 2.5   | –               | 600             | 11 | –    | –   |
|                   | Оз. Силикатное / Silikatnoe lake / 2022 / 8.82                                                                | –    | 20  | 40   | 2.0   | –               | 800             | 8  | –    | –   |
| III               | Бол. Груздевское / Gruzdevskoe swamp / 2022 / 10.36                                                           | 7.9  | 130 | 410  | 7.3   | –               | 74              | –  | 2.8  | 6.3 |
|                   | Бол. Белкино-2 / Belkino swamp_2 / 2022 / 11.03                                                               | 15.3 | 120 | 310  | 5.2   | –               | 22.6            | 50 | 6.23 | 6.4 |
| IV                | Торфокарьер / Peat quarry / 2021 / 19.2                                                                       | 13.7 | 220 | 440  | 8.2   | –               | 2200            | 2  | 1.8  | –   |
|                   | Бол. Белкино-1 / Belkino swamp / 2021 / 34.02                                                                 | 17.3 | 330 | 770  | 12.05 | –               | 5000            | 17 | 4.1  | 9   |

*Примечание.* Прочерк – отсутствует превышение ПДК<sub>рыб-хоз</sub> химического элемента.

*Note.* Dash means the absence of any excess over the maximum permissible concentrations (used for fishery reservoirs) of the chemical element.

В эритроцитах крови озерных лягушек (II, III кластер) и прудовых (IV кластер) были обнаружены гамонты гемопаразита *Hepatozoon* spp. (Hepatozoidae, Adeleida, Sporozoa). Как известно, представители семейства Hepatozoidae обладают особенно сложными жизненными циклами, которые значительно различаются между видами (Малышева, 2009; Smith, 1996; Netherlands et al., 2014). Заражение происходит при проглатывании комара, содержащего *Hepatozoon* spp. на стадии спорозонта. Спорозонты из кишечника лягушки мигрируют в паренхиматозные клетки печени, где подвергаются шизогонии с образованием меронтов. Меронты попадают в кровоток, где образуют гаметоциты. Развитие и рост гаметоцитов продолжается в эритроцитах, при этом ядро смещается к одному из полюсов клетки. Молодые гамонты имеют бобовидную форму тела и невыраженную паразитофорную вакуоль (рис. 2, а). Зрелые гамонты лежат в паразитофорной вакуоли, имеют широкоовальную форму, их цитоплазма сильно вакуолизирована (см. рис. 2, б). Это заключительная стадия развития в организме лягушки – промежуточного хозяина *Hepatozoon* spp.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ

Экстенсивность инвазии и доля зараженных эритроцитов различались у самок и самцов обоих видов амфибий. Выявлено значимое возрастание инвазии и доли зараженных клеток у самцов озерной лягушки оз. Силикатное (II кластер) в полевые сезоны 2021 – 2022 гг. ( $z = 2.6, p = 0.01$ ) в отличие от самок, у которых эти показатели не изменялись ( $z = 0.17, p > 0.05$ ). Интенсивность заражения самок озерных лягушек в условиях III кластера (Бол. Белкино-2) *Hepatozoon* spp. оказалась существенно выше ( $z = 6.33, p = 0.001$ ), что отражалось и на суммарных показателях интенсивности и экстенсивности инвазии в целом по выборке ( $z = 4.26, p = 0.001$ ) по сравнению с особями, обитающими в менее загрязненной водной среде (табл. 2).

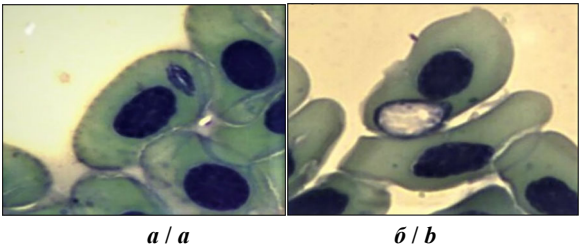


Рис. 2. Микрофотографии паразитарных форм *Hepatozoon* spp.: а – молодой гамонт, б – зрелый гамонт

Fig. 2. Microphotographs of *Hepatozoon* spp. parasitic forms: a – young gamont, b – mature gamont

Таблица 2. Зараженность озерных лягушек II и III кластеров *Hepatozoon* spp.  
Table. 2. Infestation of marsh frogs of clusters II and III with *Hepatozoon* spp.

| Выборки / Samplings                                            | Число зараженных особей /<br>Number of infected individuals | Число паразитов на 500<br>эритроцитов / The number of<br>parasites per 500 red blood cells | Доля клеток с паразитами /<br>The proportion of cells with<br>parasites | E, %  | I, отн. ед. / rel. un. | ИО, отн. ед. / AI, rel. un. |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------|------------------------|-----------------------------|
| Оз. Силикатное / Silikatnoe lake, 2021 (II кластер / cluster)  |                                                             |                                                                                            |                                                                         |       |                        |                             |
| Самки / Females (n = 14)                                       | 6                                                           | 19                                                                                         | 0.038                                                                   | 42.85 | 3.17                   | 1.36                        |
| Самцы / Males (n = 10)                                         | 7                                                           | 20                                                                                         | 0.04                                                                    | 70.0  | 2.86                   | 2.0                         |
| В целом по выборке / Total sample (n = 24)                     | 13                                                          | 39                                                                                         | 0.078                                                                   | 54.16 | 3.0                    | 1.62                        |
| Оз. Силикатное / Silikatnoe lake, 2022 (II кластер / cluster)  |                                                             |                                                                                            |                                                                         |       |                        |                             |
| Самки / Females (n = 5)                                        | 2                                                           | 20                                                                                         | 0.04                                                                    | 40.0  | 10.00                  | 1.25                        |
| Самцы / Males (n = 11)                                         | 6                                                           | 40                                                                                         | 0.08                                                                    | 54.55 | 6.67                   | 2.63                        |
| В целом по выборке / Total sample (n = 16)                     | 8                                                           | 60                                                                                         | 0.12                                                                    | 50.0  | 7.5                    | 3.88                        |
| Бол. Белкино-2 / Belkino swamp-2, 2022 (III кластер / cluster) |                                                             |                                                                                            |                                                                         |       |                        |                             |
| Самки / Females (n = 9)                                        | 7                                                           | 80                                                                                         | 0.16                                                                    | 77.78 | 11.43                  | 8.89                        |
| Самцы / Males (n = 5)                                          | 4                                                           | 45                                                                                         | 0.09                                                                    | 80.0  | 11.25                  | 9.0                         |
| В целом по выборке / Total sample (n = 14)                     | 11                                                          | 125                                                                                        | 0.25                                                                    | 78.57 | 11.36                  | 8.93                        |

Примечание. E – экстенсивность инвазии, I – средняя интенсивность инвазии, ИО – индекс обилия.

Note. E – extensiveness of invasion, I – average invasion intense, AI – abundance index.

Общая доля зараженных клеток прудовых лягушек (IV кластер) оказалась меньше ( $z = 7.87, p = 0.001$ ) по сравнению аналогичным показателем озерных лягушек (III кластер), за счет невысокой интенсивности заражения как самцов ( $z = 6.43, p = 0.001$ ), так и самок ( $z = 4.87, p = 0.001$ ) (табл. 3).

**Таблица 3.** Зараженность прудовых лягушек IV кластера *Hepatozoon* spp.

**Table 3.** Infection of pool frogs of cluster IV with *Hepatozoon* spp.

| Пол / Sex                                             | Число зараженных особей /<br>Number of infected individuals | Число паразитов на 500 эритроцитов /<br>Number of parasites per 500 red blood cells | Доля клеток с паразитами /<br>Proportion of cells with parasites | <i>E</i> , % | <i>I</i> ,<br>отн. ед. /<br>rel. un. | ИО,<br>отн. ед. /<br><i>AI</i> , rel. un. |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|
| Самки / Females<br>( <i>n</i> = 8)                    | 6                                                           | 32                                                                                  | 0.064                                                            | 75.0         | 5.33                                 | 4.0                                       |
| Самцы / Males<br>( <i>n</i> = 4)                      | 1                                                           | 2                                                                                   | 0.004                                                            | 25.0         | 2                                    | 0.5                                       |
| В целом по выборке / Total sample<br>( <i>n</i> = 12) | 7                                                           | 34                                                                                  | 0.068                                                            | 58.3         | 4.86                                 | 2.83                                      |

*Примечание.* *E* – экстенсивность инвазии, *I* – средняя интенсивность инвазии, ИО – индекс обилия.

*Note.* *E* – extensiveness of invasion, *I* – average invasion intense, *AI* – abundance index.

Площадь и длина зараженных эритроцитов самцов ( $z = 2.8, p = 0.03$ ;  $z = 3.18, p = 0.009$ ) и самок ( $z = 3.71, p = 0.001$ ;  $z = 2.68, p = 0.04$ ) озерных лягушек превышали показатели здоровых клеток. При этом у самок, в отличие от самцов, зараженные клетки были слегка расширены ( $z = 2.9, p = 0.02$ ). В целом по выборке озерных лягушек II кластера все морфометрические показатели зараженных эритроцитов оказались статистически значимо больше, чем аналогичные показатели здоровых клеток (табл. 4).

Многофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние на иммуногематологические показатели пола ( $\lambda_{Wilks} = 0.809, p = 0.028$ ) и взаимодействие факторов пол/заражение гемопаразитами ( $\lambda_{Wilks} = 0.814, p = 0.03$ ). Эффект фактора заражения гемопаразитами оказался незначимым ( $\lambda_{Wilks} = 0.95, p = 0.72$ ).

У зараженных озерных лягушек наименее загрязненного II кластера доля сегментоядерных форм ( $z = 2.67, p = 0.007$ ) и общее содержание нейтрофильных гранулоцитов ( $z = 2.31, p = 0.02$ ) было выше по сравнению со здоровыми особями, что отражалось на интегральных показателях ИСНЛ ( $z = 2.31, p = 0.02$ ) и ИСНЭ ( $z = 2.04, p = 0.04$ ) и свидетельствовало об активации неспецифической защитной системы крови. У озерных лягушек III, IV кластеров отклонений в лейкоцитарном профиле здоровых и инфицированных особей не обнаружено. Лейкограмма этих особей характеризовалась снижением количества лимфоцитов и нейтрофильных гранулоцитов, что отражало снижение адаптивных реакций системы крови и формирование стресс-индуцированной реакции при высоких значениях ИЛГ и низких показателях ККП, РОН, ИСНЛ, ИСЛ, ИЯСН.

Уровень активации гуморального иммунного ответа как зараженных, так и здоровых озерных лягушек в сходных гидрохимических условиях обитания был

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ

сопоставимым, о чем свидетельствовало отсутствие значимых различий между уровнем мелких и крупных ЦИК и индексом укрупнения инфицированных и здоровых особей, как во II (крупные –  $U = 710.5$ ,  $p = 0.12$ ; мелкие –  $U = 1536.5$ ,  $p = 0.05$ ; индекс укрупнения –  $U = 837$ ,  $p = 0.98$ ), так и в III кластере (крупные –  $U = 182$ ,  $p = 0.8$ ; мелкие –  $U = 147.5$ ,  $p = 0.24$ ; индекс укрупнения –  $U = 133$ ,  $p = 0.12$ ).

**Таблица 4.** Морфометрические параметры эритроцитов озерных лягушек II кластера (оз. Силикатное, г. Нижний Новгород) ( $Me / IQR$ )

**Table 4.** Morphometric parameters of erythrocytes of marsh frogs of cluster II (Silikatnoye lake, Nizhni Novgorod) ( $Me / IQR$ )

| Пол / Sex                                     | Эритроциты крови / Erythrocyte                  | $a$ , мкм / $\mu m$                                                                                                   | $b$ , мкм / $\mu m$               | $a / b$                                                                                                                        | $S$ , мкм <sup>2</sup> / $\mu m^2$                                                                                   |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Самки / Females                               | 1. Без паразитов / Without parasites, $n = 100$ | 22 / 4                                                                                                                | 14 / 2.75                         | 1.64 / 0.27                                                                                                                    | 939.34 / 267.04                                                                                                      |
|                                               | 2. С паразитами / With parasites, $n = 100$     | 23 / 4                                                                                                                | 14.5 / 3                          | 1.63 / 0.19                                                                                                                    | 1055.57 / 282.74                                                                                                     |
| Самцы / Males                                 | 3. Без паразитов / Without parasites, $n = 100$ | 22 / 3                                                                                                                | 14 / 2                            | 1.6 / 0.35                                                                                                                     | 984.88 / 243.47                                                                                                      |
|                                               | 4. С паразитами / With parasites, $n = 100$     | 24 / 3                                                                                                                | 14 / 2                            | 1.64 / 0.3                                                                                                                     | 1083.85 / 282.74                                                                                                     |
| Статистические показатели / Statistical index |                                                 | $H = 20.45$<br>$p < 0.01$                                                                                             | $H = 10.83$<br>$p = 0.013$        | $H = 2.39$<br>$p = 0.5$                                                                                                        | $H = 22.92$<br>$p < 0.01$                                                                                            |
|                                               |                                                 | $z_1 - z_2 = 2.68$ ,<br>$p = 0.04$ ;<br>$z_1 - z_4 = 4.03$ ,<br>$p = 0.0003$ ;<br>$z_3 - z_4 = 3.18$ ,<br>$p = 0.009$ | $z_1 - z_2 = 2.9$ ,<br>$p = 0.02$ | $z_1 - z_2 = 0.33$<br>$z_1 - z_3 = 0.8$<br>$z_1 - z_4 = 0.79$<br>$z_2 - z_3 = 0.3$<br>$z_2 - z_4 = 1.12$<br>$z_3 - z_4 = 1.44$ | $z_1 - z_2 = 3.71$ ,<br>$p = 0.001$ ;<br>$z_1 - z_4 = 4.01$ ,<br>$p = 0.0003$ ;<br>$z_3 - z_4 = 2.8$ ,<br>$p = 0.03$ |
| В целом по выборке / Total over the sample    | Без паразитов / Without parasites, $n = 200$    | 22 / 3                                                                                                                | 14 / 2                            | 1.63 / 0.3                                                                                                                     | 942.48 / 268.61                                                                                                      |
|                                               | С паразитами / With parasites, $n = 200$        | 23 / 3                                                                                                                | 14 / 2                            | 1.63 / 0.29                                                                                                                    | 1061.86 / 296.88                                                                                                     |
| Статистические показатели / Statistical index |                                                 | $U = 18439$<br>$p < 0.01$                                                                                             | $U = 20145$<br>$p = 0.002$        | $U = 23019.5$<br>$p = 0.04$                                                                                                    | $U = 17941.5$<br>$p < 0.01$                                                                                          |

*Примечание.*  $a$  – длина большой оси,  $b$  – длина малой оси,  $S$  – площадь клетки,  $H$  – критерий Краскела – Уоллиса,  $D$  – критерий Данна,  $u$  – критерий Манна – Уитни,  $n$  – количество просмотренных клеток. Жирным шрифтом выделены значимые различия.

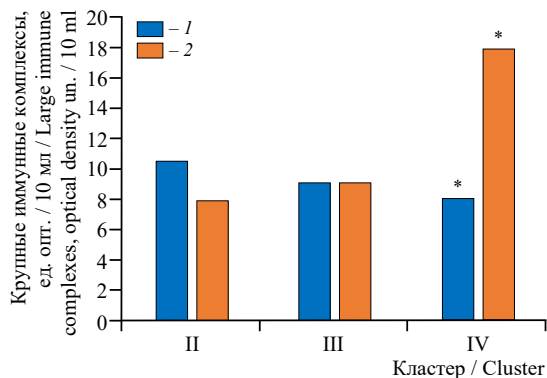
*Note.*  $a$  – the major axis length;  $b$  – the minor axis length;  $S$  – the area of the cell;  $H$  – the Kruskal–Wallis criterion;  $D$  – the Dunn criterion;  $U$  – the Mann–Whitney criterion;  $n$  – the number of viewed cells. Significant differences are highlighted in bold.

Реакцией прудовых лягушек на высокий уровень загрязнения являлась активация специфической иммунной составляющей, проявляющаяся повышением содержания в крови лимфоцитов. Изменение интегральных лейкоцитарных индексов: увеличение ККП ( $z = 2.75$ ,  $p = 0.006$ ), РОН ( $z = 2.85$ ,  $p = 0.004$ ), ИСНЛ ( $z = 3.35$ ;  $p = 0.0008$ ), ИСЛ ( $z = 3.217$ ,  $p = 0.001$ ) и снижение ИЛГ ( $z = 2.92$ ,  $p = 0.004$ ), ИСЛЭ ( $z = 2.27$ ,  $p = 0.023$ ) отображало перераспределение гранулоцитов и агранулоцитов в организмах прудовых лягушек I и IV кластеров. Лейкоцитарный состав крови зараженных и здоровых прудовых лягушек, обитающих в наиболее

загрязненных условиях (IV кластер), не различался и характеризовался пониженным суммарным содержанием гранулоцитов ( $z = 2.55, p = 0.011$ ), нейтрофильных гранулоцитов ( $z = 3.75, p = 0.0002$ ) за счет палочкоядерных ( $z = 3.45, p = 0.0003$ ) и сегментоядерных ( $z = 2.05, p = 0.037$ ) форм. Зараженные прудовые лягушки IV кластера отличались повышенным индексом укрупнения ( $U = 41, p = 0.0004$ ) и уровнем крупных иммунных комплексов ( $U = 64, p = 0.009$ ) (рис. 3) по сравнению со здоровыми особями, что свидетельствовало о снижении фагоцитарной функции и повышении реактивности иммунной системы организма в условиях сильного загрязнения среды обитания тяжелыми металлами, сульфатами и одновременного инфицирования гемопаразитами.

Исследование линейной связи количественных иммуногематологических показателей озерных лягушек с числом зараженных эритроцитов выявило наличие умеренной отрицательной корреляции в выборке II кластера с количеством эозинофилов ( $\rho = -0.36, p = 0.03$ ), в выборке III кластера – с уровнем крупных иммунных комплексов ( $\rho = -0.62, p < 0.05$ ). Для прудовых лягушек (IV кластер) установлена корреляционная взаимосвязь числа пораженных эритроцитов с суммарным содержанием нейтрофильных гранулоцитов ( $\rho = -0.57, p < 0.05$ ) и индексом укрупнения ( $\rho = 0.91, p < 0.05$ ) иммунных комплексов.

С целью изучения взаимосвязей между различными показателями иммунного статуса амфибий, находящихся в условиях одновременного воздействия комплекса абиотических и биотических экологических факторов, а также выявления факторов, которые упростили бы процесс классификации изучаемых выборок, мы воспользовались методом главных компонент. Первая главная компонента, соответствующая максимальному собственному значению 239.89, описывала приблизительно 82.78% общей дисперсии и обладала сильной положительной корреляцией



**Рис. 3.** Содержание крупных иммунных комплексов в сыворотке крови здоровых и зараженных зеленых лягушек: 1 – здоровые, 2 – инфицированные

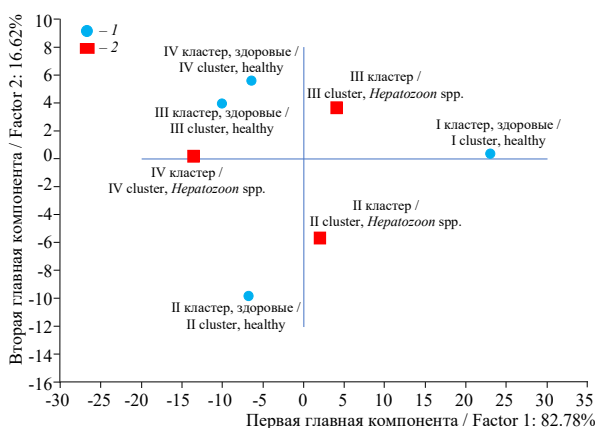
**Fig. 3.** Content of large immune complexes in the blood serum of healthy and infected green frogs: 1 – healthy, 2 – infected with *Hepatozoon* spp.

с переменными: эозинофилы (2.55), нейтрофилы (2.26), базофилы (1.54), и сильной отрицательной корреляцией с переменными: лимфоциты (-8.97), фракции мелких (-6.39) и крупных (-3.80) циркулирующих иммунных комплексов. Вторая компонента с собственным значением 48.17 описывала 16.62% оставшейся дисперсии и имела сильную положительную корреляцию с лимфоцитами (1.66) и миелоцитами (0.80); сильные отрицательные корреляции – с фракцией мелких (-5.94) и крупных (-1.09) иммунных комплексов, а также нейтрофилами (-0.92), эозинофилами (-0.80) и базофилами (-0.72).

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ

График рассеяния выборок в пространстве двух первых компонент визуализировал отличия функциональной активности иммунитета инфицированных и здоровых особей. В первом квадранте факторного пространства удаленно от других выборок располагались здоровые озерные лягушки наименее загрязненного I кластера, имеющие минимальный уровень крупных и мелких иммунных комплексов в сыворотке крови и относительно сбалансированный адаптивный ответ. Зараженные *Hepatozoon* spp. озерные лягушки занимали первый, второй и четвертый квадранты, что обуславливалось разнонаправленными изменениями лейкоцитарного профиля в разных гидрохимических условиях среды. Напротив, прудовые лягушки, как здоровые, так и зараженные по совокупности показателей были близки к здоровым озерным лягушкам III кластера и располагались во втором квадранте (рис. 4).

Следует отметить, что различия по исследованным показателям между выборками здоровых амфибий оказались гораздо значительнее, чем между выборками инфицированных особей. Лейкоцитарный профиль и маркеры популяционного гомеостаза (лейкоцитарные индексы реактивности) озерных и прудовых лягушек, дополняя друг друга, свидетельствовали о значимых изменениях в состоянии организма в специфических гидрохимических условиях среды, обусловленных комплексом внешних и внутренних экологических факторов, среди которых особая роль отводится гемопаразитам.



**Рис. 4.** График рассеивания выборок из популяций здоровых и зараженных озерных (I – III кластеры) и прудовых (IV кластер) лягушек в пространстве главных компонент, построенных по иммуногематологическим переменным: 1 – здоровые, 2 – инфицированные *Hepatozoon* spp.

**Fig. 4.** Dispersion graph of samples from the populations of healthy and infected marsh (clusters I–III) and pool (cluster IV) frogs in the space of the main components constructed by immunohematological variables: 1 – healthy, 2 – infected with *Hepatozoon* spp.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о взаимосвязи и разнонаправленности одновременного влияния комплекса абиотических и биотических экологических факторов на зеленых лягушек рода *Pelophylax*. Показано, что специфика гидрохимического загрязнения среды обитания влияет на интенсивность инфицирования лягушек гемопаразитами *Hepatozoon* spp. Постоянное нахождение амфибий в условиях повышенного загрязнения вызывает стрессовый тип адаптации, проявляющейся у озерных лягушек напряжением неспецифической защитной системы крови, а у прудовых характеризуется пониженным содержанием нейтрофильных

гранулоцитов и повышенной долей лимфоцитов. Межвидовые различия в путях адаптации на уровне системы крови озерных и прудовых лягушек к гидрохимическим условиям среды осложнялись дополнительным заражением амфибий *Hepatozoon* spp., как возможным фактором, который не только определяет численность животных (Frost, 2010), но и, подавляя иммунную защиту организма, повышает риски заражения другими инфекционными и вирусными заболеваниями. Кроме того, состояние постоянной интоксикации, обусловленное наличием гемопаразита, вызывает нарушение баланса системы антиген – антитело и существенные сбои в механизме гуморальной защиты организма.

Суммируя полученные результаты, следует заключить, что возможности реакций врожденного и адаптивного иммунитета озерных и прудовых лягушек в условиях подавления токсикантами водной среды крайне снижены, и, следовательно, отсутствие существенных изменений в организме амфибий при заражении эритроцитов *Hepatozoon* spp. может быть обманчивым. Можно полагать, что гипертрофия инфицированных эритроцитов, выполняющих регуляторные функции, отражается и на функциональной активности иммунокомпетентных клеток организма хозяина. Массовое заражение гемопаразитами *Hepatozoon* spp. может поставить под угрозу существование соответствующих видов амфибий. Таким образом, выявление и анализ эколого-физиологических особенностей паразитарных систем могут иметь решающее значение для лучшего понимания механизма межвидовых отношений паразит – хозяин и сохранения биологического разнообразия, что обосновывает необходимость дальнейших исследований путей формирования адаптивных стратегий амфибий, позволяющих особям успешно выживать, расширять ареал и существовать на антропогенно трансформированных территориях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вершинин В. Л. Гемопозз бесхвостых амфибий – специфика адаптациогенеза видов в современных экосистемах // Зоологический журнал. 2004. Т. 83, № 11. С. 1367 – 1374.
- Гаибова Г. Д., Мамедова С. О. Кровепаразиты озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* из водоёмов Азербайджана // Вестник Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина. Сер. Биология. 2010. № 920. С. 54 – 60.
- Гриневич Ю. А., Алферов А. Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабораторное дело. 1981. № 8. С. 493 – 495.
- Леонтьева О. А., Семенов Д. В. Земноводные как биоиндикаторы антропогенных изменений среды // Успехи современной биологии. 1997. Т. 117, вып. 6. С. 726 – 736.
- Мальшичева М. Н. К фауне кровепаразитов бесхвостых амфибий (Anura) Киргизии // Паразитология. 2009. Т. 43, вып. 1. С. 32 – 45.
- Малютина Т. А. Взаимоотношения в системе паразит – хозяин: биохимические и физиологические аспекты адаптации (ретроспективный обзор) // Российский паразитологический журнал. 2008. № 1. С. 22 – 40.
- Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П., Андреева З. М., Анкирская А. С., Балаховский И. С., Белокриницкий Д. В., Ворopaева С. Д., Гаранина Е. Н., Лукичева Т. И., Плетнева Н. Г., Смоляницкий А. Я. Лабораторные методы исследования в клинике М.: Медицина, 1987. 368 с.
- Пескова Т. Ю. Структура популяций земноводных как биоиндикатор антропогенного загрязнения среды. М.: Наука, 2002. 132 с.
- Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2008. 312 с.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ

Резванцева М. В., Лада Г. А., Кулакова Е. Ю. Возрастные и половые особенности гельминтофауны зеленых лягушек (*Rana esculenta* complex) на востоке Центрального Черноземья // Вестник Тамбовского государственного университета. Сер. Естественные и технические науки. 2010. Т. 15, вып. 2. С. 646 – 659.

РД 52.24.643-2002. Метод комплексной оценки степени загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям / Росгидромет. Ростов н/Д, 2002. 56 с.

Романова Е. Б., Фадеева Г. А., Вершинина К. С., Николаев В. Ю. Изменение лейкоцитарной формулы крови озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771) при гельминтозах // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. 2013. № 5. С. 141 – 147.

Романова Е. Б., Шаповалова К. В., Рябинина Е. С., Гелашивили 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. <https://doi.org/10.18500/1684-7318-2018-1-60-75>

Романова Е. Б., Лукоцина С. А., Рябинина Е. С., Плотникова В. Д. Эколого-физиологический анализ иммунных реакций *Pelophylax ridibundus* и *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae) антропогенно-трансформированных территорий // Поволжский экологический журнал. 2023. № 1. С. 77 – 96. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-1-77-96>

Рыжиков К. М., Шарпило В. П., Шевченко Н. Н. Гельминты амфибий фауны СССР. М.: Наука, 1980. 279 с.

Файзулин А. И., Заринова Ф. Ф. Гельминты озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) г. Салават (Республика Башкортостан) // Известия Самарского научного центра РАН. 2017. Т. 19, № 2. С. 75 – 79.

Шевкоплас В. Н., Лопатин В. Г. Влияние гельминтозов на течение иммунологических процессов у животных // Российский паразитологический журнал. 2008. № 4. С. 94 – 101.

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

Чихляев И. В., Кириллова Н. Ю., Кириллов А. А. Обзор гельминтов земноводных (Amphibia) Самарской области // Известия Самарского научного центра РАН. 2018. Т. 20, № 5(3). С. 385 – 400.

Flaherty B. R., Barratt J., Lane M., Talundzic E., Bradbury R. S. Sensitive universal detection of blood parasites by selective pathogen-DNA enrichment and deep amplicon sequencing // Microbiome. 2021. Vol. 9. Article number 1. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00939-1>

Frost D. R. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2010). New York, American Museum of Natural History, 2010. Available at: <https://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia> (accessed May 30, 2023).

Mehus J. O., Vaughan J. A. Molecular identification of Vertebrate and Hemoparasite DNA within mosquito blood meals from Eastern North Dakota // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2013. Vol. 13, № 11. P. 818 – 824. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1193>

Netherlands E. C., Cook C. A., Smit N. J. Hepatozoon species (Adeleorina: Hepatozoidae) of African bufonids, with morphological description and molecular diagnosis of *Hepatozoon ixoxo* sp. nov. parasitising three *Amietophrynus* species (Anura: Bufonidae) // Parasites and Vectors. 2014. Vol. 7. Article number 552. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0552-0>

Peskova T. Yu., Bachevskaya O. N., Plotnikov G. K. Hemoparasites of the lake frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Ranidae, Anura) inhabiting reservoirs of the North-Western Ciscaucasia // Current Studies in Herpetology. 2018. Vol. 18, iss. 3/4. С. 146 – 152. <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2018-3-4-146-152>

Smith T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina) // The Journal of Parasitology. 1996. Vol. 82, № 4. P. 565 – 585. <https://www.jstor.org/stable/3283781>

## Comparative immunohematological profile of *Pelophylax ridibundus* and *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae) infected with hemoparasites

E. B. Romanova ✉, V. D. Plotnikova, E. S. Ryabinina

Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod  
23 Gagarin Avenue, Nizhni Novgorod 603950, Russia

Received: November 21, 2023 / revised: December 23, 2023 / accepted: December 25, 2023 / published: June 28, 2024

**Abstract.** The direction of adaptive reactions of healthy and *Hepatozoon* spp.-infected green frogs from water bodies of the Nizhni Novgorod region with various hydrochemical conditions was studied. During the observation period, infection of pool frogs and an increase in the total population indicators of infection of male and female marsh frogs with *Hepatozoon* spp. were revealed. Hypertrophy of the morphometric parameters of infected blood erythrocytes compared with healthy cells was revealed in marsh frogs. The content of neutrophil granulocytes in the blood of infected marsh frogs was higher compared to healthy individuals, while the level of immune complexes did not differ. In infected pool frogs, an increase in the level of large immune complexes in the blood serum and the enlargement index was revealed compared to healthy ones against the background of a general decrease in the body's resistance in conditions of severe pollution of their habitat with heavy metals and sulfates. For marsh frogs, a correlation was established between the proportion of infected erythrocytes and the content of myelocytes and young forms of neutrophils in the blood; while for pool frogs – with the content of neutrophils and the enlargement index of immune complexes. The method of multifactorial dispersion analysis revealed a significant influence of such factors as gender and the interaction of gender/infection with hemoparasites on the immune status of amphibians.

**Keywords:** *Pelophylax ridibundus*, *P. lessonae*, *Hepatozoon* spp., WBC (white blood cells), immune complexes

*Ethics approval and consent to participate:* Animal protocols were approved by the Bioethics Commission of the Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod (protocol No. 38 dated March 3, 2020).

*Competing interests:* The authors have declared that no competing interests exist.

**For citation:** Romanova E. B., Plotnikova V. D., Ryabinina E. S. Comparative immunohematological profile of *Pelophylax ridibundus* and *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae) infected with hemoparasites. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2024, no. 2, pp. 190–204 (in Russian). <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2024-2-190-204>

## REFERENCES

Vershinin V. L. Hemopoiesis of anurans – specific features of adaptiogenesis in species in recent ecosystems. *Zoologicheskii zhurnal*, 2004, vol. 83, no. 11, pp. 1367–1374 (in Russian).

---

✉ *Corresponding author.* Department of Ecology of Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Russia.

*ORCID and e-mail addresses:* Elena B. Romanova: <https://orcid.org/0000-0002-1925-7864>, [romanova@ibbm.unn.ru](mailto:romanova@ibbm.unn.ru); Valeria D. Plotnikova: <https://orcid.org/0000-0002-4305-7651>, [psyche\\_medea@mail.ru](mailto:psyche_medea@mail.ru); Elena S. Ryabinina: <https://orcid.org/0000-0001-5544-2912>; [ryabinina.e.s@yandex.ru](mailto:ryabinina.e.s@yandex.ru).

Gaibova H. D., Mamedova S. O. Blood parasites of the Eurasian marsh frog *Pelophylax ridibundus* from the fresh waters of Azerbaijan. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series: Biology*, 2010, no. 920, pp. 54–60 (in Russian).

Grinevich Ju. A., Alferov A. N. Determination of immune complexes in the blood of cancer patients. *Laboratornoe delo*, 1981, no. 8, pp. 493–495 (in Russian).

Leontyeva O. A., Semenov D. V. Amphibians as bioindicators of anthropogenic change. *Uspekhi Sovremennoi Biologii*, 1997, vol. 117, no. 6, pp. 726–736 (in Russian).

Malysheva M. N. Contributions to the fauna of haemoparasites of batrachians (Amphibia, Anura) in Kyrgyzstan. *Parazitologiya*, 2009, vol. 43, iss. 1, pp. 32–45 (in Russian).

Malyutina T. A. The relationships in the system of parasite – host: Biochemical and physiological aspects adaptations (retrospective review). *Russian Journal of Parasitology*, 2008, no. 1, pp. 22–40 (in Russian).

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. *Laboratornye metody issledovaniya v klinike* [Laboratory Methods of a Research in the Clinic]. Moscow, Meditsina, 1987. 368 p. (in Russian).

Peskova T. Yu. *Struktura populatsij zemnovodnykh kak bioindikator antropogennoego zagryazneniya sredy* [Structure of Amphibian Populations as a Bioindicator of Anthropogenic Environmental Pollution]. Moscow, Nauka, 2002. 132 p. (in Russian).

Rebrova O. Yu. *Statisticheskij analiz meditsinskih dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA* [Statistical Analysis of Medical Data. Application of STATISTICA Package of Applied Programs]. Moscow, MediaSfera, 2008. 312 p. (in Russian).

Rezvantseva M. V., Lada G. A., Kulakova E. Yu. Age and sex peculiarities of helminthes' fauna of green frogs (*Rana esculenta* complex) on the east of Central Chernozem region. *Tambov University Bulletin. Series: Natural and Technical Sciences*, 2010, vol. 15, iss. 2, pp. 646–659 (in Russian).

RD 52.24.643-2002. *Metod kompleksnoi otsenki stepeni zagryaznennosti poverkhnostnykh vod po gidrokhimicheskim pokazateliam / Rosgidromet* [Method for a Comprehensive Assessment of the Degree of Pollution]. Rostov-on-Don, Rosgydromet Publ., 2002. 56 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).

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). <https://doi.org/10.18500/1684-7318-2018-1-60-75>

Romanova E. B., Lukonina S. A., Ryabinina E. S., Plotnikova V. D. Ecological and physiological analysis of immune reactions of *Pelophylax ridibundus* and *P. lessonae* (Amphibia: Ranidae) in anthropogenously transformed territories. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2023, no. 1, pp. 77–96 (in Russian). <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-1-77-96>

Ryzhikov K. M., Sharpilo V. P., Shevchenko N. N. *Gel'minty amfibij fauny SSSR* [Helminths of Amphibians of the USSR Fauna]. Moscow, Nauka, 1980. 279 p. (in Russian).

Fayzulin A. I., Zaripova F. F. Helminths of the marsh frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) of the city of Salavat (Republic of Bashkortostan). *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2017, vol. 19, no. 2, pp. 75–79 (in Russian).

Shevkopljas V. N., Lopatin V. G. The influence of helminthosis on current immunologic processes at animals. *Russian Journal of Parasitology*, 2008, no. 4, pp. 94–101 (in Russian).

Shitikov V. K., Rozenberg G. S. *Randomizatsiya i butstrep: statisticheskij analiz v biologii i jekologii s ispol'zovaniem R*. [Randomization and Bootstrap: Statistical Analysis in Biology and Ecology Using R]. Togliatti, Kassandra, 2014. 314 p. (in Russian).

Chikhlyayev I. V., Kirillova N. Yu., Kirillov A. A. Overview of helminths of amphibians (Amphibia) from the Samara region. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2018, vol. 20, no. 5(3), pp. 385–400 (in Russian).

Flaherty B. R., Barratt J., Lane M., Talundzic E., Bradbury R. S. Sensitive universal detection of blood parasites by selective pathogen-DNA enrichment and deep amplicon sequencing. *Microbiome*, 2021, vol. 9, article no. 1. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00939-1>

Frost D. R. *Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2010)*. New York, American Museum of Natural History, 2010. Available at: <https://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia> (accessed May 30, 2023).

Mehus J. O., Vaughan J. A. Molecular identification of Vertebrate and Hemoparasite DNA within mosquito blood meals from Eastern North Dakota. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2013, vol. 13, no. 11, pp. 818–824. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1193>

Netherlands E. C., Cook C. A., Smit N. J. *Hepatozoon* species (Adeleorina: Hepatozoidae) of African bufonids, with morphological description and molecular diagnosis of *Hepatozoon ixoxo* sp. nov. parasitising three *Amietophrynus* species (Anura: Bufonidae). *Parasites and Vectors*, 2014, vol. 7, article no. 552. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0552-0>

Peskova T. Yu., Bachevskaya O. N., Plotnikov G. K. Hemoparasites of the lake frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Ranidae, Anura) inhabiting reservoirs of the North-Western Ciscaucasia. *Current Studies in Herpetology*, 2018, vol. 18, iss. 3/4, pp. 146–152. <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2018-3-4-146-152>

Smith T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal of Parasitology*, 1996, vol. 82, no. 4, pp. 565–585. <https://www.jstor.org/stable/3283781>