and then the difference of the pigment color intensity was calculated in the program CIEDE 2000

Spectrophotometric method was used to determine the concentration of carotenoids in yeast biomass. The concentration of β -carotene, torululin and torularodine was determined at 450, 509, 537 nm, respectively.

Comparison of the visual assessment of the pigment accumulation of yeast and the concentration of carotenoids was found to have a strong correlation $r=+1$. Dependence of signs is statistically significant, $p < 0.05$.

Screening of yeast – bioindicators of Chromium ions was researched. For bioindication of water quality, the most informative, as indicator microorganisms are *Sp. roseus* Y-333, *Rh. glutinis* Y-1333, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginosa* Y-1394 and *Rh. aurantiaca* Y-1195.

The yeast of *R. diobovatum* Y-43, unlike yeast of other genera, did not lose the ability to fully accumulate carotenoids and did not have a concentration interval between the loss of pigments and growth retardation, but gradually reduced the intensity of pigment color when the concentration of Chromium ions increased (in the range of 10–150 mg/dm³), which is a valuable property for bioindicative studies.

As a result of the comparative analysis of the influence of Chromium ions on yeast *Rhodosporidium*, *Metschnikowia*, *Sporobolomyces* and *Rhodotorula*, it can be noted that the genus *Rhodosporidium* was resistant to the effects of Chromium ions compared to other pigment-synthesizing yeast species, but the *Rhodotorula* species showed oligodynamic effect in the presence of potassium bichromate, therefore, there is an informative bioindicator of Chromium ions.

DOI <https://doi.org/10.26661/2312-2056/2018-23/1-14>

УДК 637/7:581.524.1

БИОМАРКЕРНІ ПОКАЗНИКИ СЕЛЕЗІНКИ

RANA RIDIBUNDA P.

Дунаєвська О. Ф.

Житомирський національний агроекологічний
університет

oksana_fd@ukr.net

З метою біомоніторингу оточуючого середовища раціонально застосовувати амфібії. Доцільною є розробка маркерних показників селезінки, яка є дуже чутливою до змін параметрів довкілля. Вивчені головні анатомічні, гістологічні, цитологічні показники селезінки представника класу Амфібії – жаби озерної. Встановлені морфологічні особливості селезінки: наявність меланомacroфагальних скупчень, відсутність чіткої межі між білою і червоною пульпами, наявність пульпарних трабекул з домінуванням серед них судинних, улімфоїдних вузликів диференціювалась одна періартеріальна зона. Визначені відносна маса, відносні площі основних структур, співвідношення між ними, характеристики лімфоцитів, еритроцитів як основні тестові критерії.

Біомоніторинг, амфібії, відносна маса, відносна площа, пульпа, еритроцит, лімфоцит

Амфібії – це один з видів холоднокровних хребетних тварин, які піддаються небезпечному антропогенному впливові та змінам навколишнього середовища [5, 7]. Дорослі амфібії чутливі до ранавірусів і, як наслідок, у результаті дії патогену, – істотна смертність [13]. Внаслідок деградації умов існування, екологічних змін, інфекційних хвороб відбувається скорочення чисельності популяції жаб. Земноводні у процесі свого онтогенезу піддаються впливу факторів як водного середовища, так і суходолу, тому можуть бути індикаторами наявності порушень в екотопах, у яких мешкають [8]. Особливо чутливі представники зелених жаб *Pelophylax esculentus complex*, зокрема, *Pelophylax ridibundus* P. [9]. При цьому, як біомаркери виступають морфологічні показники. За результатами досліджень Ф. Ф. Зарипової та А. І. Файзуліна (2012) відбувається достовірне зниження відносної маси (ВМ) селезінки

статевозрілих особин *R. ridibunda* P., які мешкають у водоймах, забруднених важкими металами [5]. Для оцінки якості питних вод проводять біотестування і цитогенетичний аналіз на організменому та клітинному рівнях тест-об'єктів представників жаб, у яких вивчається лейкоцитарна формула крові та кількісна характеристика лімфоцитів [2]. Тому знання про імунну систему є важливим як для збереження і заповідного відновлення популяцій [12], так і для біомоніторингу довкілля. Метою нашого дослідження було вивчення морфологічних показників селезінки *R. ridibunda* P. для пропозиції маркерів у системі біомоніторингу. Дослідження виконувалось згідно наукової тематики кафедри анатомії і гістології ЖНАЕУ «Розвиток, морфологія та гістохімія органів тварин у нормі та при патології», № державної реєстрації 0113V000900.

Матеріали та методи досліджень

Роботу виконували впродовж 2012–2018 рр. на кафедрі анатомії і гістології Житомирського національного агроєкологічного університету. Дослідження проводили на території СВАТ «Житомирський рибгосп» Ружинського району Житомирської області. Тварин підбирали за принципом аналогів за віком (2–3 роки), статтю, масою класу *Amphibia* – Земноводні *Rana ridibunda* P., 1771 – жаба озерна, n=254.

Лінійні параметри органу (ширину, довжину, висоту) визначали в мм прямим вимірюванням штангенциркулем «Электронный S-line 15-642» з точністю до 0,01 мм відразу після відбору органу у приміщенні лабораторії патоморфології при температурі 20 °С, вологістю 53 % та освітленістю 400 лк за штучного освітлення. Індекс розвитку селезінки (ІРС) обчислювали за формулою:

$$\text{ІРС} = \frac{\text{ШС}}{\text{ДС}} \cdot 100 \% \quad (1),$$

де ШС – ширина органа, ДС – довжина органа [6].

Зважування тварин проводили з точністю до 0,01 г на лабораторних вагах PS 1000/C/2, селезінки на аналітичних вагах ESJ200-4 з точністю 0,0001 г.

Відносну масу селезінки обчислювали за формулою:

$$\text{ВМ} = \frac{\text{АМ}}{\text{МТ}} \cdot 100 \% \quad (2),$$

де АМ – маса селезінки (г), МТ – маса тварини (г).

Матеріал фіксували в 10–12%-вому розчині нейтрального формаліну, промивали впродовж 24–48 год., зневоднювали в спирті зростаючої міцності, заливали в парафін за схемою, запропонованою Л. П. Горальським зі співавт. [3]. Гістозрізи виготовляли на санному мікротомі МС завтовшки 4–6 мкм, фарбували гематоксиліном Ерліха та еозином, за методом Ван-Гізон. Вивчення препаратів проводили на мікроскопі Olympus AX70 (Японія) з цифровою відеокамерою Olympus DP50, з'єднаною з ПК. Вимірювання мікроструктур селезінки виконували за допомогою лінійки окуляр-мікрометра та морфометричної сітки (квадратно-сіткові вставки) Горяєва мікроскопа Мігрос МС-50 та мікроскопа МБС-10 з постійною довжиною тубуса. Для стереометричного аналізу гістоструктур застосовували стереологічну методику точкової волюметрії [3]. Морфометричні дослідження здійснювали за допомогою програми «Master of Morphology» з точністю до 0,1 мкм. Для електронномікроскопічного дослідження селезінки забір матеріалу проводили негайно, довжина зразків не перевищувала 1 мм, фіксували 2,5 %-вим розчином глютарового альдегіду на фосфатному буфері з дофіксацією у 1 %-вому розчині оксиду осмію (IV) за Колфільдом. Потім матеріал зневоднювали у спиртах зростаючої міцності та ацетоні, заливали у суміш епон-аралдит, згідно із загальноприйнятою методикою [3]. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультратомі Reihart (Австрія), контрастували 2 %-вим розчином ураніацетату та цитратом свинцю і досліджували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К зі збільшенням у 4–20 тис. разів. Морфометричні дослідження

проводили на напівавтоматичному пристрої обробки графічних досліджень за допомогою програми «Органела».

Цифрові дані обробляли за допомогою програмного забезпечення Excel («Microsoft», США) і STATISTICA 6.0 («Stat-soft», США) із визначенням середнього (М) та його похибки ($\pm m$).

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), ЗУ «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006, ст. 26), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Результати та їх обговорення

За результатами отриманих даних, довжина селезінки становить $5,50 \pm 1,87$ мм; ширина – $4,12 \pm 1,72$ мм, висота – $3,39 \pm 1,66$ мм. ІРС дорівнює 74,91 %, тому форму визначили як округло-овальну. Анатомічними дослідженнями аномальних відхилень у формі органа не виявлено. Абсолютна маса селезінки становила $0,0770 \pm 0,0157$ г, відносна – $0,1170 \pm 0,0215$ %.

У статевозрілих жаб гістоархітектоніка селезінки повністю сформована. Згідно гістологічного аналізу чітко диференціювали опорно-скоротливий апарат і паренхіму. У складі опорно-скоротливого апарату виділяли капсулу і трабекули. Капсула має нерівномірні потовщення, найбільше вони виражені у ділянці хілуса, де знаходяться ворота селезінки. В пульпі знаходилися видовженої форми трабекули, серед них переважали судинні над сполучними. У всіх гістологічних препаратах пульпи виявляли неоформлену сполучну тканину. Капсула і трабекули утворені пухкою сполучною тканиною, в трабекулах спостерігали слаборозвинені пучки міоцитів. Відносна площа опорно-скоротливого апарату становила $5,39 \pm 0,07$ % від загальної площі селезінки. Пульпа розрізнялася біла і червона, чіткої межі між ними не спостерігали (рис. 1), хоча в деяких

ділянках їх розмежовували приплюснуті ретикулярні клітини. Їх основою є ретикулярна тканина, в якій виявляли фібробласти, макрофаги. Червона пульпа займала значну відносну площу селезінки – $80,67 \pm 6,53$ %, в ній знаходилися численні судини (рис. 2). Серед цитопопуляції розрізняли еритроцити, проеритроцити, еритробласти, адвентиціальні клітини, тромбоцити, мієлобласти, мієлоцити. Характерною ознакою білої пульпи є велика кількість, у порівнянні з червоною, лімфоцитів (рис. 3), щільне розташування клітин. Крім великих і малих лімфоцитів, в ній знаходилися макрофаги, лейкоцити. Ділянки білої пульпи розташовувалися у селезінці незакономірно і мали неправильну форму. В її складі виявили лімфоїдні вузлики (ЛВ) та періартеріальні лімфоїдні півхи (ПАЛП) (рис. 1).

Рисунок 1 – Пульпа селезінки жаби озерної: 1 – біла пульпа (ПАЛП); 2 – червона пульпа; 3 – судинна трабекула; 4 – артерія ПАЛП. Гематоксилін та еозин. $\times 280$

Figure 1 – Pulp of the spleen of the marsh frog: 1 – white pulp (lymphoid sheaths near the vessels); 2 – red pulp; 3 – vascular trabeculae; 4 – artery lymphoid sheaths near the vessels artery. Hematoxylin and eosin. $\times 280$

Такі структури виникають навколо артерій. У ЛВ навколо артерії сформовувалася періартеріальна зона. Відносна частка білої пульпи ($15,36 \pm 5,71$ %) майже втричі більша за частку опорно-скоротливого апарату, але менша

більше ніж в'ятеро за відносну площу червоної пульпи. При цьому співвідношення опорно-скоротливого апарату і пульпи становило 1:24,19, співвідношення білої пульпи і червоної пульпи – 1:5,25.

Рисунок 2 – Червона пульпа селезінки жаби озерної: 1 – еритроцит, 2 – просвіт капіляра, 3 – ендотелій кровоносного капіляра, $\times 5000$

Figure 2 – Red pulp of the spleen of the marsh frog: 1 – erythrocyte, 2 – lumen of the capillary, 3 – endothelium of the blood capillary, $\times 5000$

Особливістю клітинної популяції селезінки жаб є те, що пігментні клітини жаби озерної мають значну кількість гемосидерину за незначної кількості меланіну. Пігментований вигляд гістоструктури селезінки зумовлюють скупчення гемосидерину в фаголізосомах еритроцитів. Меланін може бути як фагоцитованим, так і синтезованим самою клітиною. Типовим варіантом пігментної клітини селезінки є округла форма з круглим ядром і цитоплазмою, заповненою численними дрібними гранулами. Тому для них запропонований термін «меланомакрофагальні скупчення», котрий відображає подібність з меланомакрофагальними

Рисунок 3 – Біла пульпа селезінки жаби озерної: 1 – лімфоцити, $\times 6000$

Figure 3 – White pulp of the spleen of the marsh frog: 1 – lymphocytes, $\times 6000$

центрами риб і водночас стверджує, що мова йде про інші утворення. Топографічно клітини, котрі містять пігмент, у селезінці можуть знаходитись як у білій, так і червоній пульпі. За нашими даними, сумарна площа меланомакрофагальних скупчень на зрізах селезінки становить у середньому $1,82 \pm 0,42$ %.

У нашій попередній науковій праці детально описана ультрамікроскопічна будова селезінки жаби озерної [4], тому зараз розглянемо морфометричні критерії основних клітин пульпи, які будуть додатковими маркерами у біомоніторингу. Встановлено, що еритроцит має довжину $15,36 \pm 5,71$ мкм, ширину – $15,36 \pm 5,71$ мкм. Малі лімфоцити за довжиною і шириною майже вдвічі менші за великі лімфоцити: $5,875 \pm 0,068$ і $3,627 \pm 0,054$ мкм; $9,124 \pm 0,752$ і $7,234 \pm 0,821$ мкм відповідно, за товщиною клітинної стінки різниця не така суттєва ($0,115 \pm 0,017$ та $0,1225 \pm 0,022$ мкм відповідно).

Встановлений нами клітинний склад паренхіми селезінки жаби збігається з результатами досліджень Н. М. Акуленко [1], Д. Р. Светашевої та М. П. Грушко [10], Н. К. Брікер зі співавт. [11]. Проте, за результатами наших досліджень, клітини, що дозрівають, розташовувались поодинокі і невеликими групами з 2–3 клітин. У пульпі органа основними були клітини гранулопоетичного і агранулопоетичного рядів, що описували й інші автори [10]. Дендритні макрофаги були подібні на такі у ссавців, що також було зазначено у працях Н. М. Акуленко [1]. У червоній пульпі селезінки жаби озерної спостерігали велику кількість еритроцитів, що схоже на депонування крові, як у ссавців. Це явище, на наш погляд, пояснюється особливостями умов середовища існування: за настання асфіксії вони надходять у кров.

Висновки

1. Біомаркерними критеріями селезінки жаби озерної у біомоніторингу доцільно є анатомічні та мікроскопічні показники: відносна маса, відносні площі опорно-скоротливого апарату, пульпи, їх співвідношення, площа

меланомacroфагальних скупчень, параметри еритроцитів і лімфоцитів.

2. Відносна маса селезінки дорівнює $0,1170 \pm 0,0215$ %. Значна відносна площа селезінки належить червоній пульпі – $80,67 \pm 6,53$ %, $15,36 \pm 5,71$ % займає біла пульпа, $5,39 \pm 0,07$ % опорно-скоротливий апарат та $1,82 \pm 0,42$ % меланомacroфагальні скупчення.

3. Цитоморфометрична характеристика клітин пульпи наступна: довжина еритроцитів $15,36 \pm 5,71$ мкм, ширина – $15,36 \pm 5,71$ мкм; довжина малих і великих лімфоцитів $5,875 \pm 0,068$ і $3,627 \pm 0,054$ мкм відповідно та ширина $9,124 \pm 0,752$ і $7,234 \pm 0,821$ мкм відповідно.

Література:

1. Акуленко Н. М. Сезонная динамика эритропоэза и его топографическое распределение у лягушки озерной. Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2008. № 2. С. 5–10.

2. Верголяс М. Р. Альтернативный метод оценки качества питьевых вод при помощи биотестирования. Актуальні проблеми транспортної медицини. 2016. № 4 (46). С. 159–166.

3. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології: навч. посібник. Житомир: Полісся, 2012. 288 с.

4. Дунаєвська О. Ф., Горальський Л. П., Стеченко Л. О., Колеснік Н. Л., Кривошеєва О. І. Особливості ультрамікроскопічної будови селезінки жаби озерної і жаби ставкової. Світ біології і медицини. 2018. № 2. 194–198. DOI 10.26724 / 2079-8334-2018-2-64-194-198.

5. Зарипова Ф. Ф., Файзулин А. И. Характеристика морфологических показателей популяций озёрной лягушки *Rana ridibunda* (Anura, Amphibia) урбанизированных территорий республики Башкортостан. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14, № 5. С. 145–149.

6. Инаков А.К. Анатомия и топография селезенки человека в постнатальном онтогенезе. Онтогенез и возрастная анатомия кровеносной и лимфатической систем человека. М., 1983. С.32–36.

7. Корж А. П., Задорожня В. Ю. Морфометрические и морфологические показатели зеленых лягушек городской и сельской местности юго-востока Украины. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2013. № 3 (146). Вип. 22. С. 72–77.

8. Марущак О. Ю. Морфологічні аномалії безхвостих амфібій (*Amphibia*, *Anura*) деяких регіонів України. Вивчення та збереження біорізноманіття в сучасних умовах: Матеріали заочної Всеукраїнської наукової конференції, присвяченої 180-річчю заснування кафедри зоології (вересень, 2014 р.). К.: КНУ, 2014. С. 40–43.

9. Некрасова О. Д. Направления мониторинга амфибий водно-болотных экосистем. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету. Серія Біологія. 2015. № 3–4 (64). С. 499–503.

10. Светашева Д. Р., Грушко М. П. Формирование некоторых органов лимфоцитопоэза жабы зелёной (*BUFO VIRIDIS LAURENTI*, 1768) в личиночный период развития. Современные тенденции развития науки и технологий: сб. науч. тр. по материалам V Междунар. науч.-практич. конф. (31 августа 2015 г.): в 4 ч. / Под общ. ред. Е. П. Ткачевой. Белгород: ИП Ткачева Е.П. 2015. № 5, ч. I. 164 с. С. 56–57.

11. Bricker N. K., Raskin R. E., Densmore C. L. Cytochemical and immunocytochemical characterization of bloodcells and immunohistochemical analysis of spleen cells from 2 species of frog, *Rana* (*Aquarana*) *catesbeiana* and *Xenopus laevis*. Veterinary Clinical Pathology. 2012. Vol. 41, № 3. P. 353–361.

12. Conservation and divergence in the frog immunome: pyrosequencing and de novo assembly of immune tissue transcriptomes / Savagea Anna E. et al. Gene. 2014. Vol. 542, № 2. P. 98–108.

13. High susceptibility of the endangered dusky gopher frog to ranavirus / W. B. Sutton et al. *Dis Aquat Org*. 2014. Vol. 112. P. 9–16. DOI: 10.3354/dao02792.

BIOMARKERS INDICATORS OF *RANA RIDIBUNDA* P.

Dunaievska O. F.

Zhytomyr National Agroecological University

Oksana_Fd@ukr.net

Marsh frogs are exposed to the factors of an environment in the process of their ontogenesis, so may be indicators of the presence of violations in ecotopes. The purpose of our study was to investigate the morphological parameters of the spleen in *R. ridibunda* P. for the proposition of markers in the system of biomonitoring.

The animals were selected to study according to the principle of analogues by age (2–3 years), the sex, the mass of the class Amphibia – Amphibians *Rana ridibunda* P., 1771 – marsh frog, $n = 254$. The linear parameters of the spleen and its relative mass were determined. For histological study, the material was fixed in a 10–12% solution of formalin, the histological cuts were stained with Ehrlich hematoxylin and eosin, using the Van Gison's method. For cytological examination of the spleen, the specimens were fixed with 2.5% glutaraldehyde solution, contrasted with 2 % solution of uranyl acetate and lead citrate and examined by an electron microscope of PEM-125K for an increase in 4–20 thousand times.

The length of the spleen was 5.50 ± 1.87 mm; the width – 4.12 ± 1.72 mm; the height – 3.39 ± 1.66 mm. The form was defined as round-oval. Anatomical studies of abnormal deviations in the form of an organ were not found. The relative mass is 0.1170 ± 0.0215 %.

In the mature frogs, the histoarchitectonics of the spleen are completely formed. According to the histological analysis, the musculoskeletal system and parenchyma were clearly differentiated. In the pulp, there were elongated shapes of trabecula, among which the vascular tissue dominated over the connective. The relative area of the musculoskeletal system was 5.39 ± 0.07 % of the total area of the spleen. The red pulp