

УДК 597.851:591.111.1

## ПОРІВНЯННЯ ДЕЯКИХ ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ДИПЛОЇДНИХ ТА ТРИПЛОЇДНИХ *PELOPHYLAX ESCULENTUS*

А.А. Бондарєва, К.В. Сєдова, Д.А. Шабанов

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна,  
пл. Свободи 4, 61022 Харків  
E-mail: a.bondaryeva@gmail.com, kristina.sedova@gmail.com,  
E-mail: d.a.shabanov@gmail.com

**Порівняння деяких гематологічних показників диплоїдних та триплоїдних *Pelophylax esculentus*. Бондарєва А.А., Сєдова К.В., Шабанов Д.А.** — Диплоїдні та триплоїдні їстівні жаби, *Pelophylax esculentus*, є вдалим об'єктом для дослідження впливу зміни плоїдності на фізіологічні процеси. Порівняно декілька гематологічних показників представників обох груп. Показано, що у триплоїдів зменшена кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну, а також підвищена активність лактатдегідрогенази в еритроцитах порівняно з диплоїдами. Останній параметр може свідчити про те, що у триплоїдних жаб є специфічні механізми компенсації збільшення розміру еритроцитів, зокрема, інтенсифікація анаеробного розщеплення глюкози.

Ключові слова: *Pelophylax esculentus*, триплоїдія, еритроцити, гемоглобін, лактатдегідрогеназа.

**The comparison of several hematological parameters of diploid and triploid *Pelophylax esculentus*. Bondareva A.A., Sedova K.V., Shabanov D.A.** — Diploid and triploid edible frogs, *Pelophylax esculentus*, are good objects to study the ploidy influence on physiological processes. Several hematological parameters of both groups were compared in the present study. It was shown that triploids have decreased red blood cells amount and hemoglobin level while their lactate dehydrogenase activity in erythrocytes was increased as compared to diploids. The latter parameter might indicate that triploid frogs have specific mechanisms to compensate the erythrocytes enlargement such as intensified anaerobic glucose catabolism.

Key words: *Pelophylax esculentus*, triploidy, erythrocytes, hemoglobin, lactate dehydrogenase.

### Вступ

Система газообміну є однією з найважливіших фізіологічних систем організму, що забезпечує підтримання більшості процесів життєдіяльності. Тому будь-які зміни у цій системі можуть мати наслідком зміни функціонування інших. На роботу системи газообміну хребетних тварин, крім іншого, впливають такі параметри, як кількість транспортних клітин (еритроцитів), їхні розміри, відносна поверхня, а також низка біохімічних показників.

З огляду на це система газообміну є вдалою моделлю для дослідження впливу зміни плоїдності клітин на функціонування тваринного організму. Одним із найцікавіших об'єктів для таких досліджень є представники гібридогенного комплексу зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex), до складу якого входять ставкові жаби, *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882), озерні жаби, *Pelophylax*

*ridibundus* (Pallas, 1771), а також їхні гібриди — їстівні жаби, *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758), котрі можуть бути представлені диплоїдами та триплоїдами (Plötner, 2005; Шабанов, Литвинчук, 2010). Триплоїдні особини через збільшення кількості генетичного матеріалу мають клітини (принаймні, еритроцити), у півтора рази більші за клітини диплоїдів, тому що збільшення ядра має мати наслідком і збільшення клітини в цілому для підтримання ядерно-плазматичного відношення. При цьому маса та розміри тіла не відрізняються у ди- та триплоїдів (Plötner, 2005; Шабанов, Литвинчук, 2010), що мало б приводити до зменшення кількості клітин. Зменшення кількості еритроцитів, зміни їхніх морфологічних показників та форми, а також деяких біохімічних показників крові (зокрема, зниження кількості гемоглобіну) у триплоїдів були спостережені на рибах, серед яких зустрічаються особини різної плоїдності (*Oncorhynchus mykiss* та *Scophthalmus maximus*). Ці ефекти у триплоїдних риб приводили до зниження стійкості до гіпоксії (Cal et al., 2001; Maxime, Labbé, 2005). Однак наші попередні дослідження з ди- та триплоїдними жабами показали, що статистично значимої різниці між ними у їхній стійкості до гіпоксії немає (Бондарева та ін., 2010). З іншого боку, нами було показано, що еритроцити триплоїдних жаб дійсно мають змінені морфологічні параметри, зокрема, зменшену відносну поверхню клітини та набувають більш еліптичної форми (Бондарева та ін., 2012). Це дозволяє припустити, що у триплоїдних гібридів зелених жаб існують специфічні механізми компенсації розмірних ефектів клітин, наприклад, підтримання кількості еритроцитів на тому ж рівні, що у диплоїдів, або зміна біохімічних показників крові. Так, для ди-, три- та тетраплоїдних *Misgurnus anguillicaudatus* показано зменшення кількості еритроцитів зі збільшенням плоїдності, проте вміст гемоглобіну у крові та в перерахунку на один еритроцит збільшувався (Gao et al., 2007).

Найголовнішим біохімічним показником крові, від якого залежить її киснева ємність, є гемоглобін (Hb). Гемоглобін *P. esculentus* не був досліджений детально, але відомо, що його молекулярна вага складає приблизно 68 кДа, за кількістю амінокислотних залишків він майже ідентичний людському гемоглобіну, а при розділенні у крохмальному гелі отримано щонайменше 5 фракцій (Tentori et al., 1965). Проте ці дані застарілі і потребують перевірки новими методиками. Щодо порівняння гемоглобіну ди- та триплоїдних гібридів в літературі даних немає. У *Rana cathesbeiana* виявлено поліморфізм гемоглобіну, різні форми якого в більшому чи в меншому ступені зазнають ефекту Бора, тобто збільшення ступеню дисоціації молекули гемоглобіну при зменшенні рН середовища (Baldwin, Riggs, 1974). Також для двох видів ропух, *Bufo bufo* та *Bufo viridis*, показано залежність фізико-хімічних властивостей гемоглобіну від умов проживання (Clementi et al., 2007). Тож, рівень гемоглобіну у крові та його фізико-хімічні властивості можуть відображати адаптацію організму до певних умов. Першим етапом у порівнянні гемоглобіну ди- та триплоїдних гібридів зелених жаб має бути визначення його кількості взагалі та вмісту в одній клітині.

З другого боку, головним джерелом енергії для еритроцитів є гліколітичне розщеплення глюкози. Термінальним ферментом цього шляху є лактатдегідрогеназа (ЛДГ, ЕС 1.1.1.27), що каталізує зворотне NAD-залежне перетворення пірувату у лактат. Тому її активність може відбивати інтенсивність метаболізму еритроцитів.

Метою роботи було визначити, чи відрізняються диплоїдні та триплоїдні особини *P. esculentus* за кількістю еритроцитів та за такими біохімічними показниками, як вміст гемоглобіну та активність ЛДГ в еритроцитах.

## Матеріал і методи

Досліди проводили на групі жаб, вилонених 10 травня 2011 р. у басейні р. Сіверський Донець в Зміївському районі Харківської області, що складалася з 9 самців *P. esculentus*: 6 диплоїдних та 3 триплоїдних; плідність встановлено непрямо за розмірами еритроцитів жаб (Plötner, 2005). Тварин наркотизували парами хлороформу, кров брали зі шлуночка серця за допомогою шприца з 0,2 мл гепарина. Подальші розрахунки коригували відповідно до коефіцієнту розведення крові.

Підрахунок кількості еритроцитів проводили у камері Горяєва за стандартною методикою (Ройтберг, Струтинский, 2011). Вміст гемоглобіну визначали ціанметгемоглобіновим фотометричним методом: кількість гемоглобіну пропорційна кількості ціанметгемоглобіну, що утворюється з гемоглобіну у присутності окислювача та іонів ціаніду; концентрацію розраховують, виходячи з оптичної щільності розчину. Крім вмісту гемоглобіну на одиницю об'єму крові, розраховували також вміст гемоглобіну в одному еритроциті та вміст гемоглобіну в 1 мкм<sup>3</sup> цитоплазми еритроцита. Для цього визначали об'єм еритроцитів та їхніх ядер, різниця між якими приймалася за об'єм цитоплазми. Розрахунки проводили, як в попередніх дослідженнях (Бондарева та ін., 2012).

Активність ЛДГ в попередньо лізованих еритроцитах визначали кінетичним УФ-методом. Метод базується на визначенні зменшення кількості NADH+H<sup>+</sup> у розчині за зменшенням абсорбції при 334 нм. Реакцію проводили при температурі 25°C, рН 7,4, запускали 1,5 мМ піруватом. Абсорбцію при 334 нм вимірювали через 1, 2, 3, 4 та 5 хвилин. Розраховували швидкість змінювання оптичної щільності ΔE/хв, яку множили на коефіцієнт 171,25 для перерахунку у мккат/л. Також визначали активність ЛДГ на один еритроцит.

Оцінку статистичної значимості різниці між двома групами проводили за допомогою t-критерію Стюдента для незалежних змінних (рівень значимості  $p = 0,05$ ).

## Результати

Значення вимірюваних показників представлені у таблиці 1. Встановлено, що кількість еритроцитів у триплоїдів зменшена на 37 % порівняно з диплоїдами. Кількість гемоглобіну у триплоїдів також зменшена на 27 % порівняно з диплоїдними особинами. Різниця у кількості гемоглобіну на один еритроцит статистично незначуща, а вміст гемоглобіну на одиницю об'єму цитоплазми у триплоїдів менший на 29 %. Щодо активності ЛДГ, то вона, навпаки, підвищена у триплоїдів майже вдвічі (45 %), а в перерахунку на одну клітину на 63 %.

Таблиця 1. Гематологічні показники диплоїдних та триплоїдних *P. esculentus*.

Table 1. Hematological parameters of diploid and triploid *P. esculentus*.

Плоїдність	Кількість еритроцитів, 10 <sup>10</sup> /л	Кількість Нб в крові, г/л	Вміст Нб на клітину, 10 <sup>-10</sup> г/л	Вміст Нб в 1 мкм <sup>3</sup> цитоплазми, 10 <sup>-13</sup> г/мкм <sup>3</sup>	Активність ЛДГ, мккат/л	Активність ЛДГ на еритроцит, мккат×10 <sup>-11</sup>
2n	18,68 ± 4,43	66,31 ± 9,58	3,56 ± 0,46	1,34 ± 0,16	2,78 ± 0,25	0,16 ± 0,048
3n	11,75 ± 0,93	48,27 ± 6,06	4,33 ± 1,31	0,95 ± 0,2	5,06 ± 0,96	0,43 ± 0,091
	<b>p &lt; 0,05</b>	<b>p = 0,006</b>	p = 0,39	<b>p = 0,022</b>	<b>p &lt; 0,05</b>	<b>p &lt; 0,05</b>

## Обговорення результатів

Зниження кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну у триплоїдів — очікуваний результат, що відповідає літературними даними по дослідженню риб (Cal et al., 2005; Maxime, Labbé, 2010). Крім того відомо, що існує різниця у кількості еритроцитів та їхніх морфологічних показниках, а також деяких біохімічних параметрах крові між зимуючими диплоїдними *P. esculentus* та особинами перед зимівлею, тобто різниця, зумовлена змінами в середовищі. Показано, що у зимуючих жаб зменшено кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну, відносно поверхню еритроцитів, проте клітини більш витягнуті по формі (Sinha, 1983). Під час зимівлі інтенсивність метаболізму жаб зведено до мінімуму, в той же час вони мають зазнавати гіпоксії. Порівнявши ди- та триплоїдних *P. esculentus* за всіма цими показниками, ми бачимо, що для триплоїдів характерні такі ж зміни гематологічних показників, як і для зимуючих жаб (Sinha, 1983; Бондарева та ін., 2012). Можна, таким чином, вважати, що триплоїди знаходяться у стані гіпоксії, але викликаної не зовнішніми чинниками, а внутрішніми, як збільшення розмірів еритроцитів. Проте, на відміну від зимуючих жаб, триплоїди мають підтримувати достатньо високий рівень метаболізму, бо за активністю, тривалістю життя тощо вони майже не відрізняються від диплоїдів (Шабанов, Литвинчук, 2001). Однак отримані результати не пояснюють механізмів, завдяки яким в організмі триплоїдів компенсуються розмірні ефекти еритроцитів.

З літературних даних відомо, що активність ЛДГ у безхвостих амфібій (зокрема, *Pelophylax esculentus*, *Rana temporaria* та *Bufo viridis*) підвищена, порівняно з ссавцями, крім того, у лімфі вона нижча, ніж у плазмі та сироватці крові (Fiedler, Reichel, 1969). Щодо порівняння активності ферменту у ди- та триплоїдних організмів, то встановлено, що у триплоїдних *Pleurodeles waltlii* вона нижча за таку у диплоїдів; крім того, існує залежність активності ЛДГ від статі: у самок вона вища (Audit et al., 1976). Отримані нами дані по активності ЛДГ у зелених жаб різної плоідності показують протилежну ситуацію: у самців триплоїдних жаб вона значно вища порівняно з диплоїдами. Ці результати свідчать, що за рівнем метаболізму еритроцити триплоїдів значно відрізняються від диплоїдних клітин, принаймні, це стосується анаеробного розщеплення глюкози. Збільшення активності ферменту може бути зумовлене як тільки збільшенням розмірів клітини, так й іншими факторами, зокрема, станом гіпоксії. Для *Astronotus ocellatus*, однієї з найбільш стійких до гіпоксії риб, показано збільшення кількості та активності ЛДГ у різних тканинах (Almeida-Val et al., 2000).

## Висновки

Збільшення активності ЛДГ є адаптацією до обмеженої кількості кисню, приводить до інтенсифікації анаеробного метаболізму. Активність ЛДГ у триплоїдів та диплоїдів зелених жаб потребує більш детального вивчення, зокрема, її визначення в інших тканинах організму, які найбільше потребують кисню (наприклад, м'язова, нервова тощо), проте вже зараз можна припустити, що підвищення її рівню у триплоїдів є одним з тих механізмів, які компенсують розмірні ефекти клітин.

*Автори висловлюють подяку Перському Є.Е. за підтримку даного досліджування, а також Воробйову С.Ю. та Мілько О.С. за участь у проведенні вимірювань.*

- Бондарева А.А., Махній Т.І., Шабанов Д.А. Чи впливають розмірні ефекти клітин диплоїдних та триплоїдних їстівних жаб на їх стійкість до гіпоксії? // Біологія та валеологія. — Вип. 12 — Харків: ХДПУ, 2010. — С. 10–15. — ([http://batrachos.com/Бондарева\\_ін\\_2010\\_Розмірні\\_ефекти](http://batrachos.com/Бондарева_ін_2010_Розмірні_ефекти)).
- Бондарева А.А., Бибик Ю.С., Саміло С.М., Шабанов Д.А. Цитогенетические особенности эритроцитов зеленых лягушек из Северско-Донецкого центра разнообразия *Pelophylax esculentus* complex // Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Сер. біологія. — 2012. — Вип. 15 (№ 1008) — С. 116–123. [http://batrachos.com/Бондарева\\_2012\\_Цитогенетические](http://batrachos.com/Бондарева_2012_Цитогенетические)
- Ройтберг Г.Е., Струтынский А.В. Лабораторная и инструментальная диагностика заболеваний внутренних органов. Учебное пособие. 2-е издание, перераб. и доп. — МЕДпресс-информ, 2011. — 816 с.
- Шабанов Д.А., Литвинчук С.Н. Зеленые лягушки: жизнь без правил или особый способ эволюции? // Природа. — 2001. — № 3 — С. 29–36. <http://batrachos.com/Лягушки>
- Almeida-Val V.M.F. et al. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. // Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. — 2000. — **125** (2). — P. 219–226.
- Audit I., Deparis P., Flavin M., Rosa R. Erythrocyte enzyme activities in diploid and triploid salamanders (*Pleurodeles waltlii*) of both sexes // Biochemical Genetics. — 1976. — **14** (9–10). — P. 759–769.
- Baldwin T.O., Riggs A. The hemoglobins of the bullfrog, *Rana catesbeiana* // The Journal of Biological Chemistry. — 1974. — **249** (19). — P. 6110–6118.
- Cal R.M., Vidal S., et al. Effect of triploidy on turbot haematology. // Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. — 2005. — **141**. — P. 35–41.
- Clementi M. et al. Oxygen transport in Amphibia: The functional properties of haemoglobins from *Bufo bufo* and *Bufo viridis* // The Journal of Biological Sciences. — 2007. — **7** (5). — P. 786–790.
- Fiedler H., Reichel A. Investigations of enzymes in blood fluid and lymph of anuran amphibians. // Comparative Biochemistry and Physiology. — 1969. — **28**. — P. 1199–1202.
- Gao Z., Wang W., Abbas K. et al. Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: Comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens // Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. — 2007. — **147** (4). — P. 1001–1008.
- Maxime V., Labbé L. The effect of ploidy and sexual maturation on the resistance of erythrocytes to haemolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Aquaculture. — 2010. — P. 305.
- Plötner J. Die Westpaläarktischen Wasserfrösche. — Bielefeld, 2005. — 161 s.
- Sinha R.C. Haematological studies on the prewintering and wintering frog, *Rana esculenta*. // Comparative Biochemical Physiology and Comparative Physiology. — 1983. — **74** (2). — P. 311–314.
- Tentori L., Vivaldi G., Carta S. et al. The hemoglobin of Amphibia. II. Characterization of the hemoglobin of *Rana esculenta* L. Physicochemical properties and amino acid composition // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 1965. — **108**. — P. 404–414.