

УДК 591.3,591.111.1

## ВЛИЯНИЕ pH НА ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ГОЛОВАСТИКОВ МАЛОАЗИАТСКОЙ ЛЯГУШКИ

© 2023 г. Д. М. Гамидова\*, @, А. И. Рабаданова\*

\*Дагестанский государственный университет, ул. Магомеда Гаджиева, 43а, Махачкала, 367000 Россия

@E-mail: Djamka\_90@mail.ru

Поступила в редакцию 23.05.2022 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

В статье представлены результаты исследований влияния кислых (4.0, 5.0) и щелочной (9.0) значений pH на цитоморфологические параметры эритроцитов крови головастика малоазиатской лягушки. Показано негативное влияние pH 4.0 на цитоморфологические особенности эритроцитов, выражающееся в уменьшении их геометрических параметров (площади, объема), что в итоге приводит к ухудшению выполняемой ими функции. Изменения линейных и геометрических параметров клеток крови головастика при воздействии pH 5.0 и 9.0 в обеих сериях эксперимента позволяют судить об их направленности на повышение эффективности транспорта кислорода, то есть носят компенсаторный характер.

*Ключевые слова:* эритроциты, кислотность среды, pH, головастики, малоазиатская лягушка

DOI: 10.31857/S1026347022600443, EDN: WCQFEG

Кислотность среды, являясь одним из важнейших абиотических факторов, оказывает значительное влияние на распространение и численность земноводных (Pough, Wilson, 1976; Böhmer, Rahmann, 1990; Pierce, Wooten, 1992; Griffiths, Wijer, 1994; Beebee, 1995; Pounds, 2001; Gardner, 2001; Muths *et al.*, 2003; D'Amen *et al.*, 2007). Согласно имеющимся данным колебания pH в кислую сторону часто сопровождается гибелью эмбрионов и сокращением процента вылупившихся личинок (Pough, Wilson 1976; Saber, Dunson 1978; Cooke 1981; Freda, Dunson 1985, Cummins 1986; Böhmer, Rahmann, 1990; Griffiths, Wijer, 1994), тогда как защелачивание среды приводит к снижению темпов роста и развитию аномалий у личинок амфибий (Griffiths, Wijer, 1994). До сих пор не выяснены механизмы подобного влияния. Остается открытым вопрос о том, какие системы организма и на какой стадии развития земноводных более подвержены негативному влиянию колебаний концентрации ионов водорода в среде, оказывает ли данный фактор прямое или опосредованное влияние на процессы жизнедеятельности.

Наиболее удобной и информативной моделью для выяснения этих вопросов являются эритроциты — клетки крови, чутко реагирующие на изменения факторов среды и от которых во многом зависит интенсивность метаболизма (Passantino, 2007; Davis, 2008a, 2008b; Claver Agustin, 2009). Одной из самых важных функций эритроцитов

является перенос кислорода и углекислого газа, а их размер и форма являются показателями площади, доступной для газообмена.

В изученной нами литературе отсутствуют данные о влиянии pH на эритроциты крови личинок и взрослых особей амфибий. Большинство имеющихся данных описывают количественный состав (Arıkan 1989, 1990; Arserim, Mermer, 2008; Dönmez *et al.*, 2009) и цитоморфологию (Atatür *et al.*, 1999, Arıkan *et al.*, 2001; Zhelev *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007; Grenat *et al.*, 2009a, 2009b) красных клеток крови взрослых представителей рода *Rana*. Несмотря на то, что данные клетки крови амфибий обладают высокой видоспецифичностью размеров (Gregory, 2001), результаты многих исследований показывают их изменчивость, обусловленную как загрязнением среды обитания, так и некоторыми другими факторами (Velcheva *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2008; Kozłowski *et al.*, 2010). Подобные вариации размеров эритроцитов многие авторы связывают с поверхностью, доступной для газообмена, поскольку в маленьком эритроците скорость газообмена быстрее, чем в крупном (Baraquet *et al.*, 2014).

Исследования по изучению размеров эритроцитов у личинок амфибий единичны (Baraquet *et al.*, 2014), что может быть связано с трудностями взятия у них крови. Тем более отсутствуют данные, учитывающие влияние различных факторов. Поскольку эффективность снабжения клеток кис-

лородом определяет успешность протекания всех стадий онтогенеза, особенно личиночной, изучение изменения морфологии и морфометрии эритроцитов в период личиночного развития приобретает особую актуальность. Кроме того, личинки бесхвостых представляют интерес для изучения, поскольку они широко используются в качестве биоиндикаторов для обнаружения мутагенных агентов в воде (Шварц, 1968; Davis, 2008a; Baraquet, 2013; Замалетдинов и др., 2019).

Особый интерес представляет также изучение изменения размеров тела головастиков, а также связь между этими двумя параметрами у амфибий при действии разных значений pH. Сопоставление данных о действии разных значений pH на изменение размеров и формы эритроцитов головастиков, может дать более развернутую картину об оптимальных и лимитирующих значениях этого фактора для условий развития каждого отдельного вида.

Актуальность подобного рода исследований диктуется еще и тем, что в последние годы наряду с исчезновением многих редких видов земноводных, явно намечается тенденция к сокращению численности даже широко распространенных видов бесхвостых амфибий в некоторых районах Дагестана. Одним из таких видов является малоазиатская лягушка (*Rana macrocnemis* Boulenger, 1885), которая в Дагестане распространена в широком диапазоне высот от – 27 до 3200 м н.у.м. В основном она населяет горную часть республики, придерживаясь умеренно-увлажненных биотопов. Для нереста она предпочитает слабощелочные водоемы (Mazanaeva, 2000; Аскендеров, 2017). По нашим наблюдениям pH водоемов в предгорных и горных районах, где были обнаружены икринки и головастики, значительно варьирует. Это может быть вызвано действием многих факторов. При этом известна доминирующая роль земноводных в цепях питания. Поэтому изучение вопроса о возможных причинах сокращения данного вида является актуальным для экологической физиологии, аутоэкологии и зоологии.

В связи с вышеизложенным целью данного исследования является изучение характера влияния разных значений pH на цитоморфологические особенности эритроцитов крови *R. macrocnemis*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Условия содержания и выращивания эмбрионов и личинок Rana macrocnemis*

Исследования проводились с конца февраля по июль 2020–2021 гг. В работе использовались фрагменты из 6–7 только что отложенных кладок *R. macrocnemis* (3200 икринок), собранных на территории Предгорного Дагестана (с. Ерси, Табасаранский район, высота 600 м н.у.м.). Экспери-

мент включал две серии опытов, в которых использовалось по восемь контейнеров, размером 35 × 25 × 35 (42 л). В первой серии изучался весь цикл эмбрионально-личиночного развития малоазиатской лягушки от недавно отложенных икринок до окончания метаморфоза (полная резорбция хвоста). Для этого икринки размещались поштучно в шесть экспериментальных контейнеров с различными значениями пониженной (4.0 и 5.0) и повышенной (9.0) pH, а также в три контрольных контейнера с обычной для природных водоемов pH (7.5–8.2). Во второй серии исследовалось постэмбриональное развитие *R. macrocnemis*, для чего личинки (выращивались при нормальной pH) сразу после их перехода к активному питанию размещались в контейнеры с различными значениями pH (4.0, 5.0 и 9.0). Плотность посадки составила 200 икринок (в первой серии) и 200 головастиков (во второй серии) на 25 л воды.

Объекты содержались в фильтрованной воде, полностью заменявшейся каждый день, что способствовало сохранению оптимальных значений кислорода в воде. Личинок после перехода на экзогенное питание кормили листьями шпината, предварительно ошпаренными кипятком, и аквариумным кормом для рыб. Измеряли процент насыщения кислородом с помощью микропроцессорного портативного оксиметра Hanna “HI 9145”, температуры с помощью аквариумных термометров “Barbus”, а также кислотность (с использованием карманного pH метра – pH Meterrange 0.00–14.00). Поскольку известно, что уровень pH постоянно меняется в зависимости от многих факторов, тестовые значения pH создавались и поддерживались путем добавления H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и NaOH, которые готовились из 0.1N стандарт/фильтров фиксанала после каждой смены воды. Измерение pH в контейнерах производилось 4 раза в день. При этом его изменения были незначительными.

В ходе эксперимента температура в помещении увеличивалась от 18°C в начале развития до 26°C – в конце. Подобное изменение температурного режима характерно и для природных условий. Концентрация кислорода в чистой фильтрованной воде в контейнерах при температуре около 24°C составляла 7.9 мг/л. Дополнительное снабжение воды кислородом не производилось, поскольку по литературным данным такая процедура не улучшает условий для развития икры и головастиков, так как связана с их сильным стрессом (Сурова, 2010). При измерении содержания кислорода было учтено количество особей на единицу объема (250 мл на 2 головастика). Это соотношение поддерживалось на протяжении всего эксперимента.

**Измерение морфометрических параметров.** На 28–30 стадиях личиночного развития у 20 случайно выловленных личинок в каждой серии при

различных рН производилось измерение линейно-весовых параметров. Для измерения общей длины личинок использовали штангенциркуль Electronic Digitalcaliper “ДЕКО” (с точностью 0.1 мм). Масса икринок измерялась с помощью торсионных весов “VT-500”, вес личинок определялся с помощью электронных весов “Масса-К” (с погрешностью 0.005 г).

Кровь для мазков брали через прямой прокол в сердце головастика на 28–30 стадиях развития (Gosner, 1960), после предварительного усыпления.

Для определения размеров эритроцитов и их ядер готовили мазки крови общепринятым гематологическим методом и окрашивали по Романовскому–Гимзе. Готовые мазки просматривали с иммерсией, при увеличении 1600. Измерения эритроцитов и ядер проводили через видеокуляр “TourCam 14.0 MP”, который встраивали в стереоскопический микроскоп МСП-1 “ЛОМО”. Полученные изображения обрабатывались с помощью программного обеспечения TopView.

Для расчета объема эритроцитов была использована следующая формула:  $V = \frac{4}{3}\pi ab^2$ , где  $V$  – объем,  $a$  – длинная полуось,  $b$  – короткая полуось эллипса. Толщину эритроцитов вычисляли по формуле:  $T = \frac{\pi b}{4}$ . При вычислении сферического индекса

( $E$ ) была использована формула:  $E = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}$ .

Площадь эритроцитов и ядер оценивали, принимая их форму за эллипсоидальную, и рассчитывали соотношение сторон, отражающее форму клетки. На основании полученных данных подсчитали ядерно-цитоплазматическое отношение ЯЦО по формуле  $S_{я}/S_{ц}$ ,  $S_{я}$  – площадь ядра,  $S_{ц}$  – площадь клетки.

**Статистическая обработка данных.** Различия между исследуемыми выборками определяли в результате регрессионного анализа данных в программе Excel 10 и Statistica 10. Достоверность различий оценивалась с использованием критерия Стьюдента ( $t$ ), для выборок с нормальным распределением ( $p \leq 0.05$ ). Рассчитывали среднее арифметическое по каждому морфометрическому параметру (Mean и стандартное отклонение SD). Нормальность распределения оценивали критериями Шапиро–Уилка, асимметрии и эксцесса. Для выборок с ненормальным распределением использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Рассчитывали коэффициент корреляции ( $r$ ) и коэффициент вариации (CV). Влияние разных значений рН на исследуемые параметры у головастика определяли на основе однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эритроциты головастика малоазиатской лягушки имеют овальную форму с центрально расположенным овальным ядром. Длина эритроцитов в контроле в среднем составляет  $18.3 \pm 1.7$  мкм, ширина –  $13.3 \pm 1.5$  мкм. Длина и ширина ядер колеблется в пределах  $8.9 \pm 1.4$  и  $7.2 \pm 1.0$  мкм соответственно. Соотношение L/W при таких значениях длины и ширины эритроцитов составляет  $1.4 \pm 0.1$ , а показатель сферичности ( $E$ ) равен  $0.7 \pm 0.1$  (табл. 1).

При содержании головастика в среде с различными значениями рН в обеих сериях опыта наблюдаются статистически значимые отличия от контроля ( $p \leq 0.05$ ). Так, в первой серии при рН 5.0 длина и ширина эритроцитов достоверно снижаются и составляют  $17.0 \pm 1.2$  и  $10.6 \pm 0.8$  мкм соответственно. В щелочной среде (рН 9.0) длина эритроцитов, напротив, увеличивается до  $19.5 \pm 1.5$  мкм, а ширина уменьшается до  $11.3 \pm 1.3$  мкм. Несмотря на такое противоположное влияние разных значений рН на линейные размеры эритроцитов, в обоих случаях отмечается их удлинение, на что указывает увеличение соотношения L/W до  $1.6 \pm 0.1$  (рН 5.0) и  $1.8 \pm 0.2$  (рН 9.0), а также индекса сферичности – до  $0.8 \pm 0.1$ .

Во второй серии эритроциты головастика, содержащихся при рН 4.0, имеют длину  $17.6 \pm 1.5$  мкм, что достоверно меньше контрольных значений. Ширина клеток крови при этом не изменяется. Подобная динамика приводит к уменьшению индекса сферичности до  $0.6 \pm 0.1$ , не влияя на соотношение L/W. При двух других значениях рН (5.0 и 9.0) наблюдается сходная тенденция: длина эритроцитов достоверно увеличивается, а ширина – снижается, что приводит к повышению соотношения L/W без изменения индекса сферичности.

Различия обнаруживаются также при распределении значений длины и ширины клеток (рис. 1). Так, в первой серии опытов наиболее широкий диапазон длины (14–24 мкм) и ширины (7–16 мкм) клеток крови наблюдается при рН 9.0. При этом наиболее высока встречаемость эритроцитов с длиной 18–20 мкм и шириной 10–11 мкм. У головастика, выращиваемых в кислой среде (рН 5.0), длина и ширина эритроцитов варьируют в меньшем диапазоне 14–21 и 8.5–12.5 мкм соответственно. Наиболее часто встречающаяся длина красных клеток при этом составляет 16–17 мкм, ширина – 11.0–11.5 мкм. То есть в кислой среде намечается тенденция к уменьшению длины эритроцитов и увеличению их ширины, а также уменьшению диапазона распределения.

Во второй серии опытов наименьший диапазон распределения по длине эритроцитов отмечен в среде с рН 4.0 (13–22 мкм), по ширине – в среде с рН 5.0 (6–18 мкм). В остальных условиях распределение длины колеблется от 12 до 26 мкм.

**Таблица 1.** Цитоморфологические параметры эритроцитов и их ядер *Rana macrocnemis* при воздействии разных значений pH

к	pH	Эритроциты							
		L	W	L/W	V	S	S/V	T	E
к	7.8	18.3 ± 1.7	13.3 ± 1.5	1.4 ± 0.1	444.5 ± 96.2	194.1 ± 36.9	0.44 ± 0.1	5.2 ± 0.6	0.7 ± 0.1
1	5	<b>17.0 ± 1.2</b>	<b>10.6 ± 0.8</b>	<b>1.6 ± 0.1</b>	<b>250.0 ± 36.2</b>	<b>141.1 ± 13.1</b>	<b>0.56 ± 0.1</b>	<b>4.1 ± 0.3</b>	<b>0.8 ± 0.1</b>
	9	<b>19.5 ± 1.5</b>	<b>11.3 ± 1.3</b>	<b>1.8 ± 0.2</b>	<b>335.1 ± 90.4</b>	<b>173.7 ± 28.2</b>	<b>0.52 ± 0.2</b>	<b>4.4 ± 0.5</b>	<b>0.8 ± 0.1</b>
2	4	17.6 ± 1.5	13.3 ± 1.2	1.3 ± 0.5	419.9 ± 96.8	185.8 ± 27.2	0.44 ± 0.1	5.2 ± 0.5	0.6 ± 0.1
	5	<b>19.6 ± 2.1</b>	<b>12.3 ± 1.7</b>	<b>1.7 ± 0.3</b>	<b>398.9 ± 97.9</b>	<b>189.3 ± 31.9</b>	<b>0.47 ± 0.1</b>	<b>4.8 ± 0.7</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>
	9	<b>19.2 ± 2.0</b>	<b>12.5 ± 1.4</b>	<b>1.6 ± 0.2</b>	<b>410.2 ± 97.1</b>	<b>190.6 ± 35.8</b>	<b>0.47 ± 0.1</b>	<b>4.9 ± 0.5</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>
Ядра эритроцитов									
к	7.8	8.9 ± 1.4	7.2 ± 1.0	1.2 ± 0.2	65.3 ± 24.9	51.8 ± 13.1	0.80 ± 0.2	2.8 ± 0.4	0.6 ± 0.1
1	5	<b>8.4 ± 1.1</b>	<b>5.7 ± 0.8</b>	<b>1.5 ± 0.4</b>	<b>36.9 ± 10.6</b>	<b>37.7 ± 6.4</b>	<b>1.03 ± 0.1</b>	<b>2.3 ± 0.3</b>	<b>0.7 ± 0.2</b>
	9	<b>10.3 ± 1.4</b>	7.1 ± 0.8	<b>1.5 ± 0.3</b>	<b>70.2 ± 19.8</b>	<b>57.7 ± 10.6</b>	0.82 ± 0.1	2.8 ± 0.3	<b>0.7 ± 0.1</b>
2	4	7.9 ± 1.1	6.1 ± 0.8	1.3 ± 0.3	39.8 ± 12.1	38.1 ± 7.6	0.96 ± 0.1	4.8 ± 0.6	0.5 ± 0.3
	5	<b>9.9 ± 1.4</b>	<b>7.0 ± 1.3</b>	<b>1.5 ± 0.4</b>	<b>67.7 ± 26.1</b>	<b>54.7 ± 12.8</b>	<b>0.81 ± 0.1</b>	<b>2.8 ± 0.5</b>	<b>0.6 ± 0.1</b>
	9	<b>8.8 ± 1.1</b>	7.1 ± 0.9	<b>1.3 ± 0.2</b>	<b>60.9 ± 19.2</b>	<b>49.6 ± 10.5</b>	0.82 ± 0.1	2.8 ± 0.3	<b>0.5 ± 0.2</b>

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверно значимые отличия ( $p \leq 0.05$ ) между сериями;    – достоверно значимые отличия ( $p \leq 0.05$ ) от контроля; L – длина, W – ширина, V – объем, S – площадь, S/V – соотношение площади поверхности к объему, T – толщина, E – индекс сферичности.

Диапазон распределения эритроцитов по ширине меньше, чем в контроле и составляет при pH 4.0 – 9–17 мкм, при pH 9.0 – 8–16 мкм. При этом в средах с изменением pH отмечается увеличение средних размеров эритроцитов без явно выраженной зависимости от значений кислотности среды.

Наблюдаемые изменения линейных значений эритроцитов отразились на их геометрических параметрах (объеме, площади, толщине), от которых зависит эффективность транспорта кислорода. В обеих сериях опыта объем эритроцитов снижается относительно контроля при всех значениях pH, особенно при pH 5.0. Так, в 1 серии опытов объем клеток крови ниже контрольных значений в 1.7 раз ( $p \leq 0.05$ ), во второй – в 1.1 раза ( $p \leq 0.05$ ). Что касается площади, то значения данного параметра ниже контроля в 1 серии опытов, особенно при pH 5.0 (на 27.3%,  $p \leq 0.05$ ). Во второй серии изменения площади относительно контроля незначительны (рис. 2). Сходная тенденция характерна и для толщины красных клеток крови.

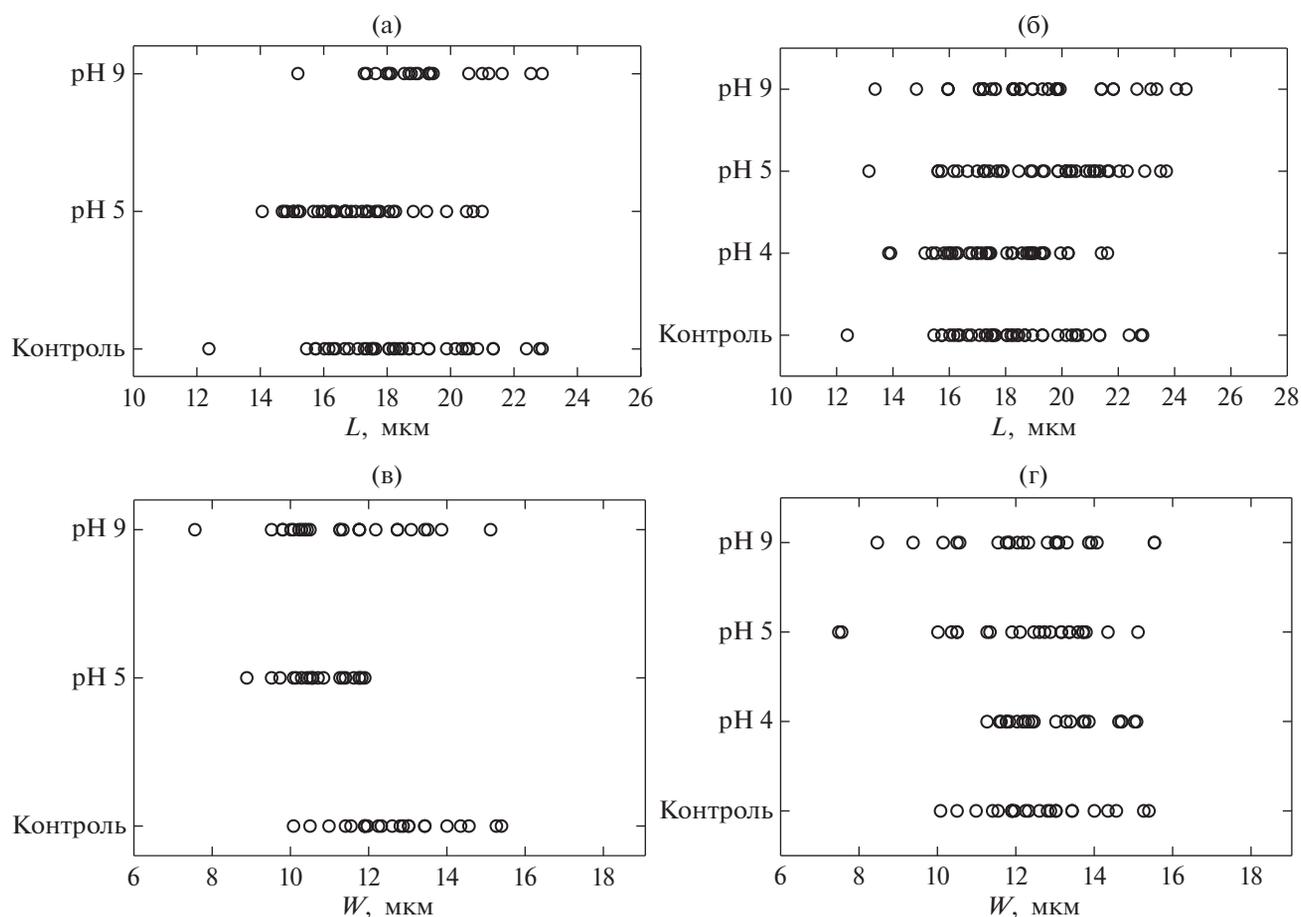
Распределение эритроцитов по объему и площади в контроле составляет 200–1000 мкм<sup>3</sup> и 100–350 мкм<sup>2</sup> соответственно (наиболее часто встречаются эритроциты объемом 300–400 мкм<sup>3</sup> и площадью 150–200 мкм<sup>2</sup>). Наиболее существенное влияние на диапазон распределения объема и площади pH оказывает в первой серии опытов. При pH 5.0 данный показатель сужается и составляет 150–400 мкм<sup>3</sup> и 100–190 мкм<sup>2</sup> соответственно (наиболее часто встречаются эритроциты объемом 200–300 мкм<sup>3</sup> и площадью 130–140 мкм<sup>2</sup>).

При pH 9.0 распределения по объему составляет 100–600 мкм<sup>3</sup> (чаще встречаются эритроциты объемом 200–300 мкм<sup>3</sup>), по площади – 100–240 мкм<sup>2</sup> (наиболее часто встречаются эритроциты площадью 140–160 мкм<sup>2</sup>).

Обращает на себя внимание тот факт, что на фоне уменьшения, как объема, так и площади эритроцитов в первой серии мы наблюдаем повышение соотношения S/V, что указывает на увеличение поверхности эритроцита в единицу объема. Это позволяет эритроцитам легче менять свою форму (увеличивается степень их деформации) и проходить через узкие капилляры, что улучшает транспортные функции крови. Кроме того, при высоком соотношении площади и объема любая молекула гемоглобина ближе располагается к поверхности, что совместно с уменьшением толщины эритроцитов (табл. 1) обеспечивает максимально ускоренный газообмен. Это позволяет рассматривать подобные изменения как компенсаторную реакцию на сдвиги значений pH, как в кислую, так и в щелочную сторону.

Уменьшение геометрических параметров эритроцитов при действии pH 4.0; 5.0 и 9.0 во второй серии, однако, не приводит к изменению соотношения S/V, что также может указывать на компенсаторный характер изменений, приводящих к оптимальному соотношению размеров эритроцитов для эффективного выполнения газотранспортной функции.

Таким образом, геометрические параметры особенно подвержены изменениям в первой се-



**Рис. 1.** Частота встречаемости параметров длины и ширины эритроцитов (мкм) *Rana macrocnemis* при разных pH в двух сериях: а, б – первая, в, г – вторая и в контроле.

рии опытов, что указывает на снижение кислородтранспортной функции крови при действии кислых значений pH 4.0, начиная с эмбрионального периода развития. Это подтверждается данными дисперсионного анализа, который отражается влияние pH на все исследуемые линейные и геометрические параметры (в среднем  $R \geq 50\%$ , табл. 2). Изменения же во второй серии опытов носят компенсаторный характер, что подтверждается отсутствием данного влияния на параметры, характеризующие кислородтранспортную

функцию – площадь, объем, толщину и ширину эритроцитов.

Исследование размеров ядер эритроцитов выявило достоверно значимые отличия не по всем исследуемым параметрам (см. табл. 1). Так, в первой серии опытов при pH 5.0 наблюдается значительное уменьшение ширины ядер (на  $20.8\%$ ,  $p \leq 0.05$ ) что приводит к увеличению соотношения  $L/W$  до  $1.5 \pm 0.4$  и индекса сферичности до  $0.7 \pm 0.2$ . Это указывает на удлинение ядер. При таких значениях длины и ширины практически уравниваются значения площади и объема ядер ( $36.9 \pm 10.6$  и

**Таблица 2.** Влияние разных значений pH на цитоморфологические особенности эритроцитов и параметры длины и веса тела головастиков *Rana macrocnemis*

Серии	Эритроциты							Головастики	
	L	W	V	S	S/V	T	E	m	l
1	$p = 0.000$	$p = 0.597$	$p = 0.846$						
2	$p = 0.010$	$p = 0.201$	$p = 0.946$	$p = 0.880$	$p = 0.040$	$p = 0.201$	$p = 0.000$	$p = 0.000$	$p = 0.000$

Примечание. Влияние фактора рассматривается при  $p \leq 0.05$ ; L – длина, W – ширина, V – объем, S – площадь, S/V – соотношение площади поверхности к объему, T – толщина, E – индекс сферичности, m – масса головастиков, l – длина головастиков.

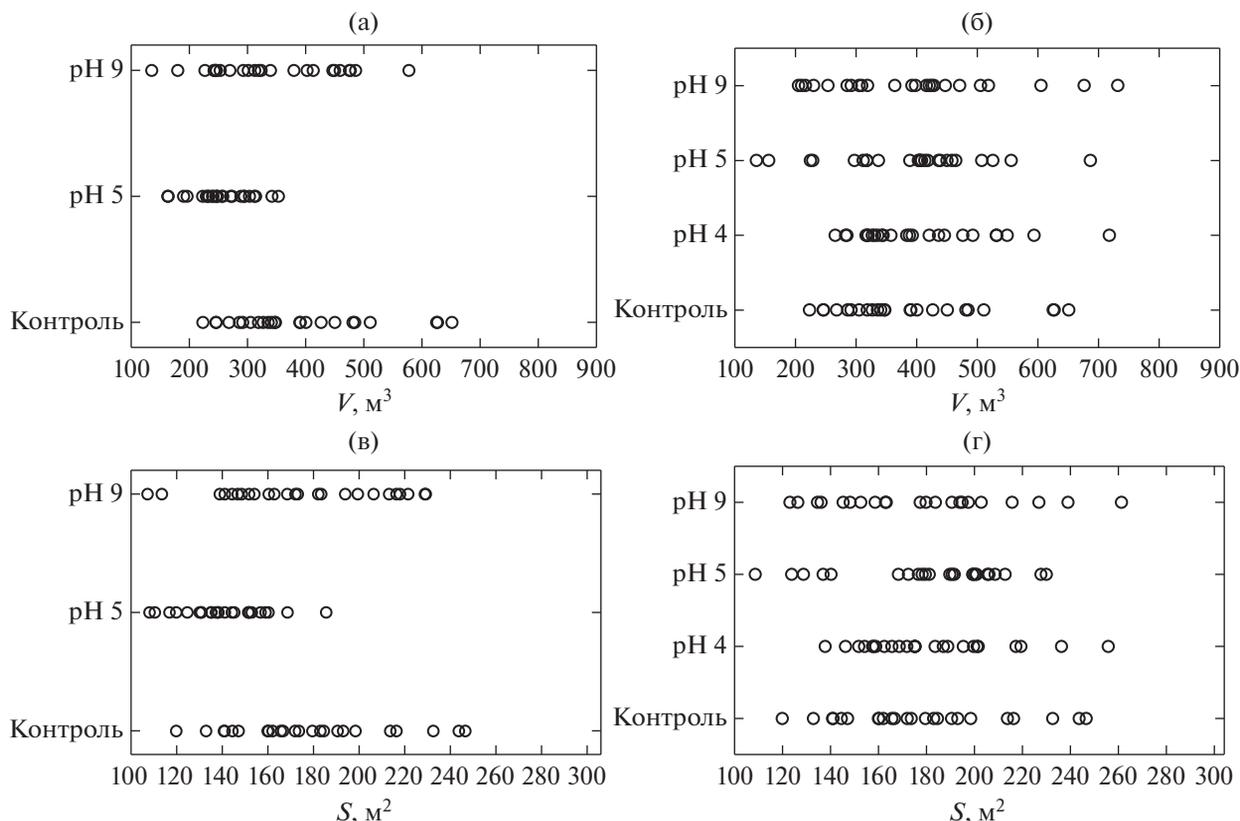


Рис. 2. Частота встречаемости параметров объема и площади эритроцитов (мкм) *Rana macrocnemis* при разных pH в двух сериях: а, б – первая, в, г – вторая и в контроле.

36.6 ± 6.4 мкм<sup>2</sup> соответственно), что сопровождается повышением соотношения  $S/V$  до 1.03. При pH 9.0 ядра также приобретают эллипсоидную форму, но уже за счет значимого увеличения их длины при незначительном уменьшении ширины, что в итоге приводит к тому же отношению  $L/W$ , как и при pH 5.0 (1.5 ± 0.3). Однако при таких линейных размерах отмечается увеличение площади и объема ядер (до 57.7 ± 10.6 и 70.2 ± 19.8 мкм<sup>2</sup> со-

ответственно), что сопровождается приближением соотношения  $S/V$  к значению контроля (0.82 ± 0.1).

Во второй серии наблюдаемые изменения носят разнонаправленный характер. Наибольшее влияние на размеры ядер эритроцитов оказывает pH 4.0. В данной среде наблюдается достоверно значимое уменьшение длины и ширины ядер, что не приводит, однако, к изменению их соотношения, которое составляет 1.3 ± 0.3 (как и в контроле). Однако, указанное изменение линейных размеров ядер сопровождается уменьшением их площади и объема до примерно одинаковых значений (39.8 ± 2.1 и 38.1 ± 7.6 мкм<sup>3</sup>) и приближению их соотношения к 1. При влиянии pH 5.0 и 9.0 изменение большинства параметров не являются достоверно значимыми.

Таблица 3. Изменение ядерно-цитоплазматического индекса эритроцитов *Rana macrocnemis* при действии различных значений pH

pH	$S_{ц}$ , мкм	$S_{я}$ , мкм	ЯЦО	
Контроль	7.8	142.3 ± 10.5	51,8 ± 13.1	0.36 ± 0.01
1 серия	5.0	<b>103.4 ± 9.6</b>	<b>37.7 ± 6.4*</b>	0.36 ± 0.01
	9.0	<b>116.0 ± 7.7</b>	<b>57.7 ± 10.6</b>	0.39 ± 0.03
2 серия	4.0	147.7 ± 11.2	<b>38.1 ± 7.6*</b>	<b>0.26 ± 0.01</b>
	5.0	<b>134.6 ± 10.1</b>	54.7 ± 12.8	<b>0.41 ± 0.02*</b>
	9.0	141.0 ± 13.1	49.6 ± 10.5	0.35 ± 0.01

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия от контроля; \* – между сериями.

Важной морфологической характеристикой эритроцитов, позволяющей оценить уровень метаболизма и выявить проявление компенсаторных реакций, является ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО), который определяется соотношением площади ядра ( $S_{я}$ ) и площади клетки ( $S_{ц}$ ). Результаты расчетов представлены в табл. 3.

Как видно из представленных данных в контроле ЯЦО составляет 0.36 ± 0.01. Такие же значения обнаружены в первой серии независимо от

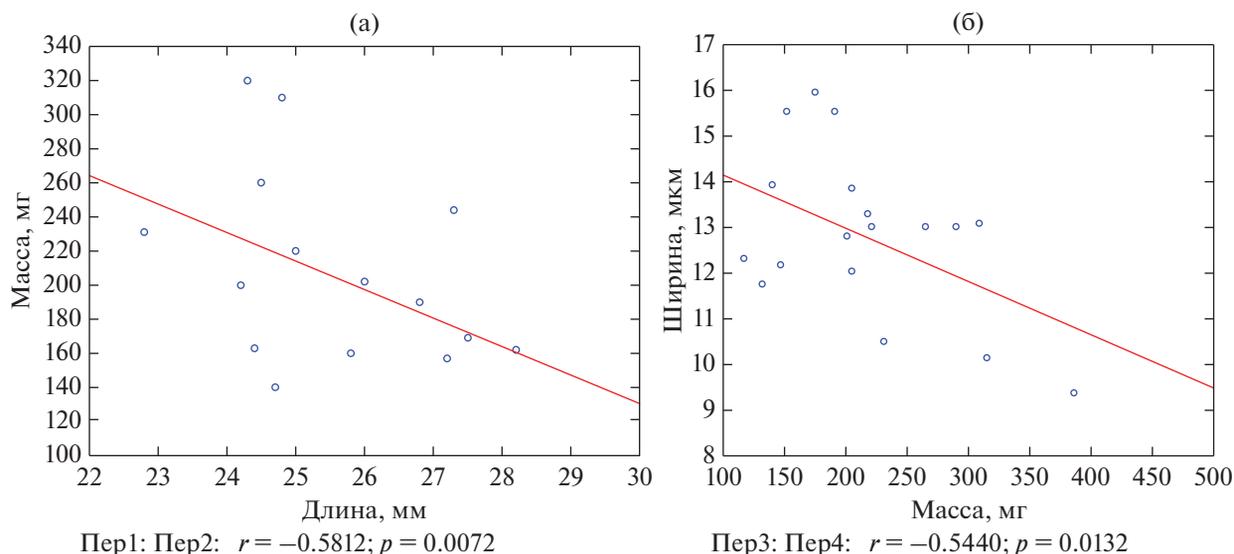


Рис. 3. Корреляционный анализ между массой ( $m$ ) и длиной тела головастика ( $l$ ) при pH 5.0 (а), массой тела и шириной эритроцита ( $W$ ) при pH 9.0 (б) у *Rana macrocnemis*.

значения pH. Во второй серии отмечено снижение данного показателя до  $0.26 \pm 0.01$  при pH 4.0 и повышение до  $0.41 \pm 0.02$  – при pH 5.0. Повышение ЯЦО может оказывать влияние на интенсивность газообмена, диффузию кислорода сквозь мембрану эритроцита и как следствие кислородную емкость клетки (Bondarieva *et al.*, 2012; Донкова, Рубай, 2017).

А.К. Дэвис (Davis, 2008b, М. Дас и П.К. Махапатра (Das, Mahapatra 2012) в своих исследованиях указывают на то, что размеры эритроцитов меняются при росте и метаморфозе личинок амфибий. Однако, эта закономерность выявлена без учета воздействия условий среды, в частности, pH. В наших исследованиях масса тела головастика в обеих сериях опытов увеличивается при pH 9.0 на 22.1–23.7%. Во второй серии при pH 4.0 масса тела, напротив, снижается на 39.5% ( $p \leq 0.05$ ), что отражается на данных дисперсионного анализа (см. табл. 2–3). В тоже время изменение pH не оказывает существенного влияния на длину тела личинок малоазиатской лягушки (достоверное снижение на 15.2% отмечено только при pH 4.0 (табл. 2). При этом в первой серии опытов корреляции с размерами эритроцитов не выявля-

но, тогда как во второй серии отмечена слабая отрицательная связь, ( $r = 0.5$ ) между массой тела головастика и шириной при pH 9.0. В остальных случаях средняя корреляционная связь ( $r = 0.6$ ) обнаружена только при pH 5.0 в первой серии между массой и длиной тела головастика (рис. 3).

В ходе корреляционного анализа в двух сериях между длиной и шириной эритроцитов и их ядер связь выявлена только в контроле ( $r = 0.5$ ). Между остальными исследуемыми параметрами отмечены средние ( $r \geq 0.5$ ) и высокие ( $r \geq 0.8$ ) положительные корреляционные связи, значения коэффициентов которых приближены к контрольным (рис. 4), за исключением отсутствия связи между длиной и объемом ядер. Однако в первой серии при обоих значениях pH (5.0 и 9.0) выявлена отрицательная корреляция между объемом и сферичностью ( $r = 0.6$ ), а также толщиной и сферичностью ( $r = 0.7–0.8$ ) эритроцитов (рис. 4а) и их ядер (рис. 4б). Во второй серии между этими же параметрами такой же характер связи отмечается при pH 5.0. Следует отметить, что в контроле эти параметры между собой не коррелируют (рис. 4).

Таблица 4. Длина (мм) и масса тела, (мг) *Rana macrocnemis* при воздействии различных значений pH

Параметры	Контроль	1 серия		2 серия		
		pH 5	pH 9	pH 4	pH 5	pH 9
$l$	$26.4 \pm 2.0$	$26.3 \pm 1.9$	$26.5 \pm 3.6$	$22.4 \pm 2.6^*$	$27.0 \pm 3.9$	$27.1 \pm 4.6$
$m$	$189.9 \pm 61.1$	$191.5 \pm 56.8$	$231.7 \pm 84.9^*$	$115.3 \pm 27.2^*$	$176.3 \pm 50.4$	$235.2 \pm 91.7^*$

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверно значимые отличия ( $p \leq 0.05$ ) между сериями; \* – достоверно значимые отличия ( $p \leq 0.05$ ) от контроля;  $l$  – длина тела,  $m$  – масса тела.

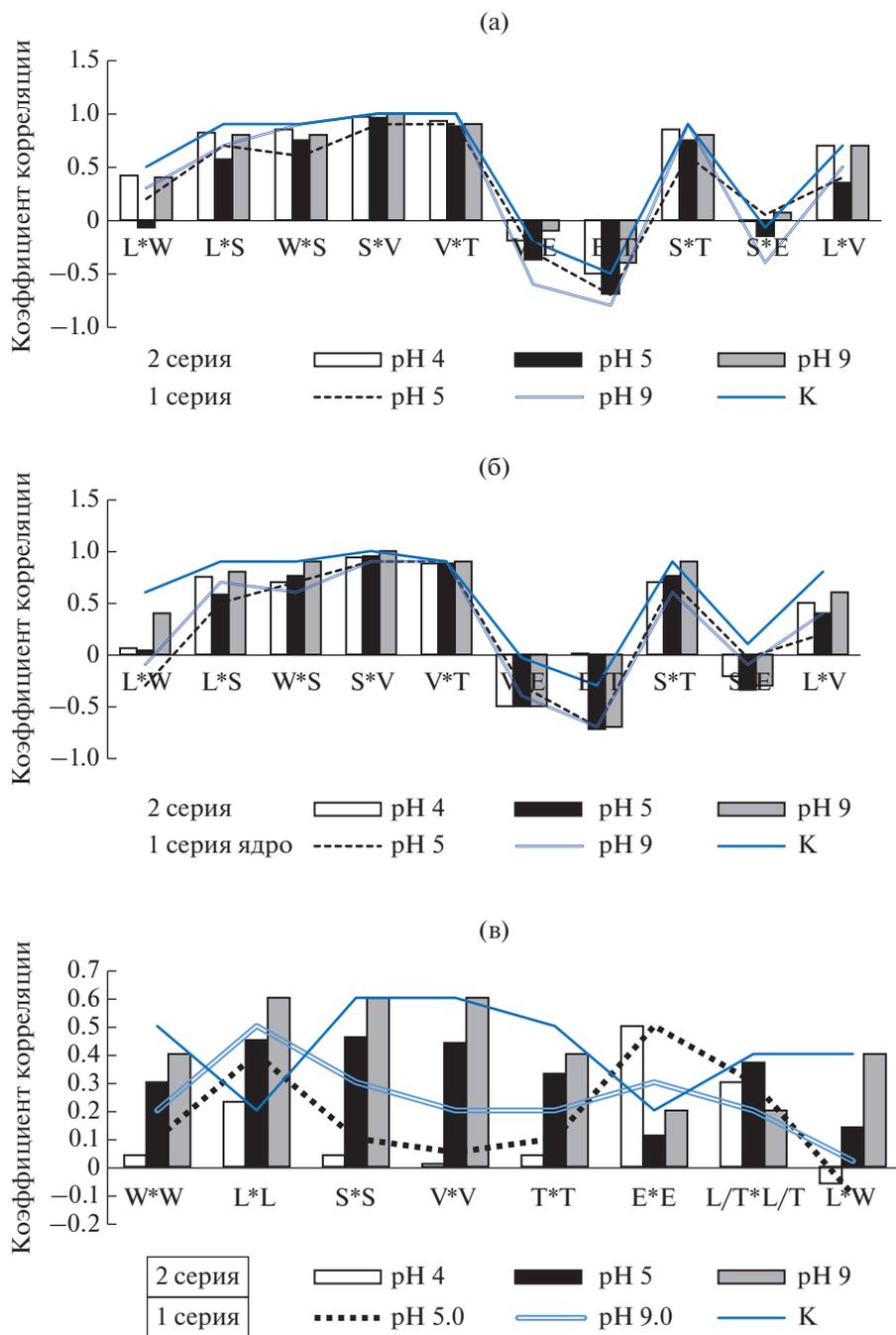


Рис. 4. Коэффициенты корреляции между параметрами эритроцитов (а), ядра (б) и эритроцит/ядро (в).

Разнонаправленный характер имеют данные, полученные при корреляционном анализе параметров эритроцитов и их ядер (рис. 4в). Разнонаправленный характер имеют данные корреляционного анализа между параметрами эритроцитов и их ядер (рис. 4в). Так, если в контроле наблюдается средняя корреляционная связь между большинством параметров ( $r = 0.5$ ), то при кислых значениях pH (4.0 и 5.0) в обеих сериях она полностью отсутствует. Исключение отмечается

между сферичностью эритроцитов и их ядер при тех же значениях pH во второй серии. Более близкие значения к контролю отмечаются при pH 9.0 в первой серии. Изменения морфологии эритроцитов при изменении pH среды явно требует дальнейших исследований для выяснения физиологического механизма и последствий этих изменений. Наши результаты могут быть полезны в качестве эталонных значений для будущих исследований, а также могут быть использованы в со-

четании с другими гематологическими параметрами для изучения изменений, происходящих в клетках крови во время метаморфозы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кислотность среды является важным абиотическим фактором, лимитирующим рост и развитие водных организмов. В связи с неуклонным ростом антропогенной нагрузки на водные экосистемы данный показатель подвержен значительным колебаниям, что, несомненно, приводит к сдвигу многих параметров гидробионтов и необходимости включения механизмов адаптации. Перспективным представляется изучение механизмов адаптации на клеточном уровне. Наиболее удобной моделью в этом плане являются эритроциты крови, от которых зависит транспортировка кислорода, а значит и интенсивность метаболических процессов.

В наших исследованиях показано, что влияние кислотности среды сопровождается характерными изменениями цитоморфологии эритроцитов головастика малоазиатской лягушки. Во многом эти изменения зависят от того с эмбрионального (1 серия) или личиночного (2 серия) периодов началось влияние разных значений рН.

Изменение линейных размеров эритроцитов в первой серии при воздействии как кислых, так щелочных значений рН приводит к увеличению соотношения L/W и индекса сферичности. Это сопровождается уменьшением объема и площади эритроцитов и повышением соотношения S/V. Кроме того, отклоненные от нормы значения рН сужают диапазон изменений длины и ширины эритроцитов.

Во второй серии динамика размеров эритроцитов при рН 4.0 сопровождается уменьшением соотношения L/W и индекса сферичности. При двух других значениях рН (5.0 и 9.0) наблюдается повышение данного соотношения, не сопровождающееся, однако, изменением индекса сферичности. В этой серии также не обнаружено изменение поверхности эритроцита в единицу объема, несмотря на уменьшение объема и площади эритроцитов.

Подобные изменения указывают на негативное влияние рН 4.0 на цитоморфологические особенности эритроцитов, действие которого, по-видимому, связано с более глубокими изменениями, затрагивающими молекулярный, клеточный и организменный уровни. В частности, в наших предыдущих исследованиях показано, что данные значения рН снижают выживаемость головастика, уменьшают процент вылупления и замедляют метаморфоз.

Влияние же других значений рН (5.0 и 9.0) вызывает адаптивный эффект, выражающийся в итоге в повышении эффективности транспорта

кислорода, хоть и достигается это разными модификациями линейных и геометрических параметров эритроцитов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аскендеров А.Д. Земноводные Дагестана: распространение, экология, охрана: дис. ... канд. биол. наук. Ин-т экологии Волжского бассейна РАН, 2017. 223 с.
- Донкова Н.В., Рубай А.А. Цитологические и морфометрические особенности клеток крови тритона до и после тотальной резекции конечностей // Вестник КрасГАУ. 2017. № 6. С. 57–64.
- Сурова Г.С. Изменение абиотических условий при содержании головастика с разной плотностью (на примере личинок травяной лягушки-*Rana temporaria* и серой жабы-*Bufo bufo*) // Совр. герпетология. 2010. Т. 10. № 1/2. С. 26–39.
- Замалетдинов Р.И., Назаров Н.Г., Свинин А.О., Дробот Г.П., Сальникова Е.Ю. Биохимические особенности периферической крови особей прудовой лягушки *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) из популяций, населяющих водоемы города Казани // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. 2019. № 1(25). С. 41–49. <https://doi.org/10.21685/2307-9150-2019-1-5>
- Шварц С.С. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных. Свердловск, 1968. 386 с.
- Arikan H. Anadolu'daki *Rana ridibunda* (Anura, Ranidae) populasyonlarının kan hücrelerinin sayısı bakımından incelenmesi // Turkish J. zoology, Ankara. 1989. V. 13. P. 54–59.
- Arikan H. *Rana ridibunda* (Anura, Ranidae) populasyonları üzerinde morfolojik ve serolojik aratımlar // Turkish J. zoology, Ankara. 1990. V. 14. P. 40–83.
- Arikan H., Çevik E.E., Kaya U., Mermer A. Anadolu'daki dag kurbagalarında eritrosit ölçümleri // Anadolu university Journal of science and Technology, Eskiehir. 2001. V. 2. P. 387–391.
- Atatür M.K., Arikan H., Çevik E.E. Erythrocyte sizes of some anurans from Turkey // Turkish J. zoology, Ankara. 1999. V. 23. P. 111–114.
- Arsirim S.K., Mermer A. Hematology of the Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey). E.U. Turk. // J. Fish. Aquat. 2008. Sc. 25. 39–46.
- Baraquet M. Intraspecific variation in erythrocyte sizes among populations of *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae) // Acta Herpetologica. 2013. № 8(2) P. 93–97. [https://doi.org/10.13128/Acta\\_Herpetol-12954](https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-12954)
- Baraquet M., Salas N.E., Martino A.L. Variation in the erythrocyte size among larvae, juveniles and adults of *Hypsiboas cordobae* (Anura, Hylidae) // Basic and Applied Herpetology. 2014. V. 28. P. 137–143. <https://doi.org/10.11160/bah.12010>
- Beebe T.J.C. Amphibian breeding and climate. Nature. 1995. V. 374. P. 219–220.
- Bondarieva A., Bibik Y.S., Samilo S.M., Shabanov D.A. Erythrocytes cytogenetic characteristics of green frogs from Siversky Donets centre of *Pelophylax esculentus*

- complex diversity // KarazinKharkiv Natl. Univ. Ser. Biol. 2012. V. 15. P. 116–123.
- Böhmer J., Rahmann H. Influence of surface water acidification on Amphibia // Fortsch. Zool. 1990. V. 38. P. 287–309.
- Claver J.A., Agustín I.E., Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates // J. Ex. Pet Medicine. 2009. V. 18. P. 87–97.  
<https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.04.006>
- Cooke A.S. Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field // Environ. Pollut. 1981. V. 25. P. 23–133.
- Cummins C.P. Effects of aluminium and low pH on growth and development in *Rana temporaria* tadpoles // Qscologiab (Berlin). 1986. V. 69. P. 248–252.
- D'Amen M., Vignoli L., Bologna M.A. The effects of temperature and pH on the embryonic development of two species of Triturus (Caudata: Salamandridae) // Amphibia-Reptilia. 2007. V. 28. P. 295–300.  
<https://doi.org/10.1163/156853807780202521>
- Das M., Mahapatra P.K. Blood cell profiles of the tadpoles of the Dubois's tree frog, *Polypedates teraiensis* Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae) // Scientific World J. 2012. 701746.  
<https://doi.org/10.1100/2012/701746>
- Davis A.K. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologist // Functional Ecology. 2008a. V. 22. P. 760–772.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
- Davis A.K. Ontogenetic changes in erythrocyte morphology in larval mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*, measured with image analysis // Comp Clin Pathol. 2008b. V. 17. P. 23–28.  
<https://doi.org/10.1007/s00580-007-0702-2>
- Dönmez F., Tosunoğlu M., Gül Ç. Hematological values in hermaphrodite, *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) // North-Western J. Zoology. 2009. V. 5. P. 97–103.
- Freda J., Dunson W.A. Field and laboratory studies of ion balance and growth rates of *Ranid* tadpoles chronically exposed to low pH // Copeia 1985. P. 415–423.
- Gao Z., Wang W., Abbas K., Zhou X., Yang Y., Diana J.S., Wang H., Wang H., Li Y., Sun Y. Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: Comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens // Comp. Bio. Phys. A. 2007. V. 147. P. 1001–1008.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.006>
- Gardner T. Declining amphibian population: a global phenomenon in conservation biology // Animal Biodiversity and Conservation. 2001. V. 24.2. P. 25–44.
- Gosner K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification // Herpetologica. 1960. V. 16. P. 183–190.
- Gregory T.R. The bigger the value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates // Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2001. V. 27. P. 830–843.  
<https://doi.org/10.1006/bcmd.2001.0457>
- Grenat P.R., Bionda C.L., Salas N.E., Martino A.L. Variation in erythrocyte size between juveniles and adults of *Odontophrynus americanus* // Amphibia-Reptilia. 2009a. V. 30. P. 141–145.
- Grenat P.R., Salas N.E., Martino A.L. Erythrocyte size as diagnostic character for the identification of live cryptic *Odontophrynus americanus* and *O. cordobae* (Anura: Cycloramphidae) // Zootaxa. 2009b. V. 2049. P. 67–68.  
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.2049.1.3>
- Griffiths R.A., de Wijer P. Differential effect of pH and temperature on embryonic development in the British newts (*Triturus*) // J. Zool., Lond. 1994. V. 234. P. 613–622.
- Kozłowski J., Czarnoński M., François-Krassowska A., Maciak S., Pis T. Cell size is positively correlated between different tissues in passerine birds and amphibians, but not necessarily in mammals // Biol Lett. 2010. V. 6. P. 792–796.  
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0288>
- Mazanaeva L.F. The distribution of Amphibians in Daghستان // Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union. Sophia. 2000. V. 5. P. 141–156.
- Mueller R.L., Gregory T.R., Gregory S.M., Hsieh A., Boore J.L. Genome size, cell size, and the evolution of enucleated erythrocytes in attenuate salamanders // Zoology (Jena). 2008. V. 111(3). P. 218–230.  
<https://doi.org/10.1016/j.zool.2007.07.010>
- Muths E., Campbell D.H., Corn P.S. Hatching success in salamanders and chorus frog at two sites in Colorado USA: effects of acidic deposition and climate // Amphibia-Reptilia. 2003. V. 24. P. 27–36.  
<https://doi.org/10.1163/156853803763806911>
- Passantino L., Massaro M.A., Jirillo F., Modugno D. Di., Ribaud M.R., Modugno G. Di., Passantino G.F., Jirillo E. Antigenically activated avian erythrocytes release cytokine-like factors: a conserved phylogenetic function discovered in fish // Immunopharmacol Immunotoxicol. 2007. V. 29. P. 141–152.  
<https://doi.org/10.1080/08923970701284664>
- Pierce B.A., Wooten D.K. Acid tolerance of *Ambystoma texanum* from central Texas // J. Herp. 1992. V. 26. P. 230–232.
- Pough F.H., Wilson R.E. Acid precipitation and reproductive success of *Ambystoma salamanders* / Proc. Internat. Symp. Acid Rain and Forest Ecosystem 1. 1976. P. 531–544.
- Pounds J.A. Climate and amphibian declines // Nature. 2001. V. 410. P. 639–640.  
<https://doi.org/10.1038/35070683>
- Saber P.A., Dunson W.A. Toxicity of bog water to embryonic and larval anuran amphibians. J. Exp. Zool 1978. V. 204. P. 33–42.
- Zhelev Z.M., Angelov M.V., Mollov I.A. A Study of some metric parameters of the erythrocytes in *Rana ridibunda* (Amphibia: Anura) derived from an area of highly developed chemical industry // Acta Zool. Bulgar. 2006. V. 58. P. 235–244.
- Velcheva I., Arnaudov A., Gecheva G., Mollov I. A study on some physiological parameters of three hydrobiotic species under the influence of copper // Proceedings of 2nd International Symposium of Ecologists of Montenegro, Kotor. 2006. P. 155–161.

## Effect of pH on Cytomorphological Parameters of Erythrocytes of the *Rana macrocnemis* Tadpoles

D. M. Gamidova<sup>1, #</sup> and A. I. Rabadanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dagestan State University, 43a Magomed Gadzhiyev str., Makhachkala, 367000 Russia

<sup>#</sup>e-mail: Djamka\_90@mail.ru

The article presents the results of studies of the effect of acidic (4.0, 5.0) and alkaline (9.0) pH values on cytomorphological parameters of erythrocytes of *Rana macrocnemis* tadpoles. The negative effect of pH 4.0 on the cytomorphological features of erythrocytes is shown, expressed in a decrease in their geometric parameters (area, volume), which leads to a deterioration of their function. Changes in the linear and geometric parameters of tadpole blood cells when exposed to pH 5.0 and 9.0 in both series of the experiment allow us to judge their focus on improving the efficiency of oxygen transport, that is, they are compensatory in nature.

*Keywords:* erythrocytes, acidity, pH, tadpoles, *Rana macrocnemis*