

Władysław Zamachowski*

Wpływ dehydratacji na ilość hemoglobiny i wartość hematokrytu w krwi obwodowej żaby trawnej *Rana temporaria* L.

Streszczenie

Badania przeprowadzono na krwi żaby trawnej, *Rana temporaria* L. w okresie hibernacji. Przebadano wartość wskaźnika hematokrytowego i stężenie hemoglobiny w krwi obwodowej u 40 samic i 40 samców poddanych kontrolowanej dehydratacji.

Stwierdzono stopniowy wzrost wartości obu wskaźników czerwonych w miarę odwadniania żab, jak również dość duże wahania wartości wskaźników czerwonych między poszczególnymi osobnikami, głównie w grupie żab odwodnionych do utraty 30% ciężaru ciała.

WSTĘP

Obraz krwi płazów w zasadzie jest zbliżony do obrazu krwi kręgowców wyższych. W ich układzie czerwonych dostrzega się jednak pewne charakterystyczne cechy. U żab występuje duże zróżnicowanie indywidualne poszczególnych wskaźników, jak również zaznaczają się różnice sezonowe i płciowe. Przebadano krew obwodową wielu gatunków płazów, stwierdzając duże wahania między nimi w zakresie układu czerwonego. Szereg prac dotyczyło liczby i wielkości erytrocytów. Brano przy tym pod uwagę różnice płciowe (Arvey, 1947; Kaplan, 1952; Noble, 1954, Lange i Schermer, 1967), właściwości osobnicze (Hutchison i Szarski, 1965; Schermer, 1967),

* Zakład Zoologii Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie

zmiany sezonowe (Holzapfel, 1937; Rauf, 1967; Harris, 1972) oraz choroby wywołane obecnością pasożytów (Kaplan, 1951; Noble, 1954). W wyniku badań stwierdzono, iż zmiany wielkości erytrocytów zależne są od rozmiarów ciała, stanu odżywienia (Szarski i Czopek, 1966; Szarski, 1974) i wielkości ciśnienia osmotycznego płynów ustrojowych (Szarski i Czopek, 1965; Goniakowska, 1970; Goniakowska-Witalińska, 1974; Szarski, 1974). Zróżnicowanie liczby leukocytów u płazów przypisuje się właściwościom osobniczym, zmianom sezonowym (Schermer, 1967) i obecności pasożytów (Kaplan, 1951, 1952). Ilość hemoglobiny zależy między innymi od takich czynników, jak: zmiany sezonowe (Kaplan i Crouse, 1956), temperatura (Foxon, 1964), aktywność zwierzęcia (Gaumer i Goodnight, 1957) oraz wysokość n.p.m. (Stuart, 1951). Również i inne wskaźniki krwi żab są zmienne, np. hematokryt, i zależne od wielu czynników (Wisner, 1934; Harris, 1972). Jednym z czynników wpływających na obraz krwi obwodowej płaza może być uwodnienie organizmu. Stwierdzono, że zawartość wody w organizmie płaza ulega sezonowym zmianom (Zamachowski, 1968, 1977a). Zmienia się ona również w czasie pozbawienia zwierzęcia dostępu do wody. Płazy tracą wtedy wodę z organizmu głównie przez skórę. U poszczególnych gatunków różna jest wytrzymałość na brak wody i ilość jej utraty z organizmu (Zamachowski, 1977b). Niedobór wody w organizmie wpływa na zwolnienie procesów życiowych, a po przekroczeniu pewnej określonej granicy doprowadza do śmierci płaza. W trakcie odwadniania następuje zmniejszanie zawartości wody w tkankach i narządach, wówczas krążąca w tych narządach krew oddaje wodę zawartą w osoczu, co wpływa wyraźnie na zmiany w obrazie krwi obwodowej.

Celem niniejszej pracy jest więc określenie wpływu utraty wody z organizmu żaby trawnej - *Rana temporaria* L. na ilość hemoglobiny i wartość wskaźnika hematokrytowego.

MATERIAŁ I METODYKA BADAN

Badania przeprowadzono w 1984 roku w środkowym okresie hibernacji (III dek. stycznia) żaby trawnej - *Rana temporaria* L. Do badań użyto dojrzałych płciowo żab, samców i samic złowionych w okolicach Węgrzce Wielkie koło Krakowa. Złowione w strumieniu, będącym miejscem hibernacji, żaby przewożono do pracowni i przetrzymywano przez ok. 24 godziny w wodzie w temperaturze ok. 20°C w celu ich aklimatyzacji. Następnie żaby podzielono na 4 grupy (kontrolną i 3 doświadczalne), oddzielając samice od samców. Każda grupa składała się z 10 osobników. Łącznie przebadano 80 żab, 40 samic i 40 samców. Żaby grupy kontrolnej przebadano po 24 godzinach od chwili złowienia. Pozostałe żaby po 24 godzinach aklimatyzacji poddano procesowi odwadniania. Żaby pozbawione dostępu do wody, co spowodowało jej ubytek z ich organizmów, kontrolowano pod względem wielkości utraty ciężaru ciała. Pierwsza grupa poddana została utracie ok. 10% ciężaru ich ciała (samice $9.9\% \pm 0.5$, samce $10.1\% \pm 0.2$), druga ok. 20%, (samice $20.5\% \pm 0.4$, samce $19.9\% \pm 0.6$), trzecia zaś ubytkowi ok. 30% ciężaru ciała (samice $30.1\% \pm 0.4$, samce $30.8\% \pm 0.3$). Taka utrata ciężaru ciała nie powodowała śmierci żab, ale wpływała na znaczne obniżenie uwodnienia organizmu a także aktywności zwierząt. Czas dehydratacji uzależniony był od wymaganego eksperymentem ubytku ciężaru ciała i wahał się od kilku do ok. 24 godzin. W czasie trwania eksperymentu temperatura powietrza wahała się od 20 do 22°C, a wilgotność powietrza od 55 do 60%.

Po ściśle określonej utracie ciężaru ciała przez żaby, zabijano je niszcząc centralny system nerwowy, ważono i mierzono długość ciała, a następnie preparowano. Krew do analiz pobierano bezpośrednio z serca, po jego przecięciu w momencie maksymalnego wypełnienia krwią. Ilość hemoglobiny określano metodą Sahlięgo, wskaźnik hematokrytowy metodą mikrohematokrytową. Wskaźniki te określano jednakowo we wszyst-

kich grupach żab. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie, osobno dla samic i samców oraz poszczególnych grup. Wyliczono wartości średnie, odchylenie standardowe oraz porównano wyniki stosując test "t" Studenta - Gosseta. Różnicę przyjęto za istotną statystycznie, gdy prawdopodobieństwo jej zaistnienia było mniejsze od 0.05.

WYNIKI BADAŃ

Szczegółowe wyniki badań przedstawiono w tabeli 1 i na wykresach 1 i 2.

Ilość hemoglobiny

W grupie kontrolnej (żaby nie poddane dehydratacji) zawartość hemoglobiny w krwi obwodowej samic wynosiła średnio $5.03 \text{ mmol/l} \pm 0.93$, zaś u samców była nieco wyższa, gdyż wynosiła $5.34 \text{ mmol/l} \pm 1.43$. U żab poddanych dehydratacji w granicach 10% utraty ciężaru ciała (ok. 13% utraty wody) stwierdzono wzrost ilości hemoglobiny; u samic średnio o 1.67 mmol/l ($6.70 \text{ mmol/l} \pm 1.18$). Wzrost ten jest istotny ("t" = 3.506, $P < 0.05$). Również u samców nastąpił wzrost stężenia hemoglobiny średnio o 1.24 mmol/l ($6.58 \text{ mmol/l} \pm 0.50$). Wzrost ten jest również istotny ("t" = 2.597, $P < 0.05$).

Dalszy wzrost stężenia hemoglobiny nastąpił u żab poddanych dehydratacji w granicach ok. 20% utraty ciężaru ciała (ok. 26% utraty wody). Ilość hemoglobiny u samic tej grupy wynosiła średnio $8.01 \text{ mmol/l} \pm 1.92$, a więc była wyższa o 1.31 mmol/l w porównaniu z żabami, które utraciły 10% ciężaru ciała i o 2.98 mmol/l ("t" = 4.404, $P < 0.05$) w porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej. U samców wzrost stężenia hemoglobiny wynosił średnio 1.37 mmol/l w porównaniu z tymi, które utraciły 10% ciężaru ciała i 2.61 mmol/l ("t" = 4.468, $P < 0.05$) w porównaniu z żabami nie poddanymi

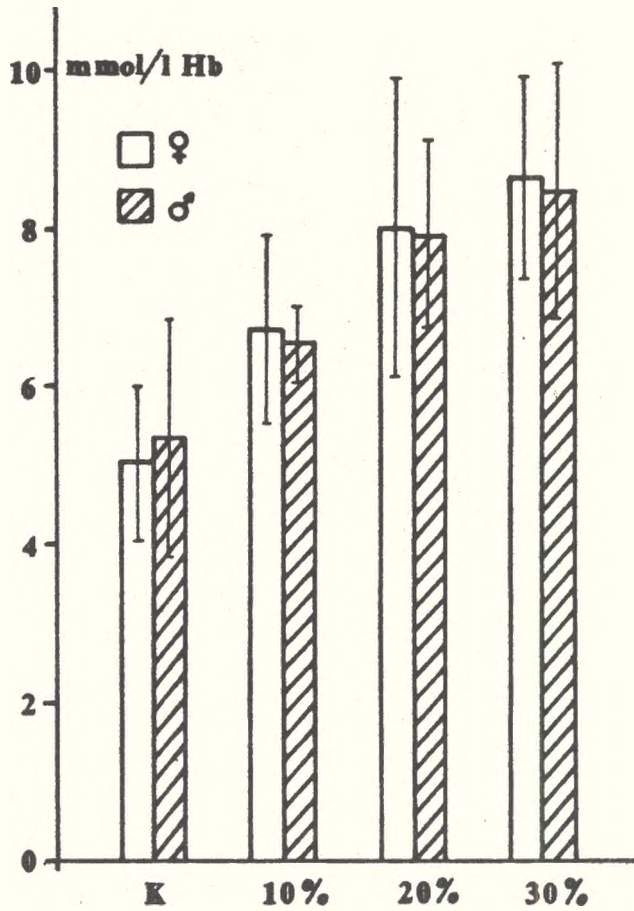
Tabela 1

Ilość hemoglobiny i wartość hematokrytu w krwi obwodowej
żaby trawnej, Rana temporaria L. w czasie dehydratacji

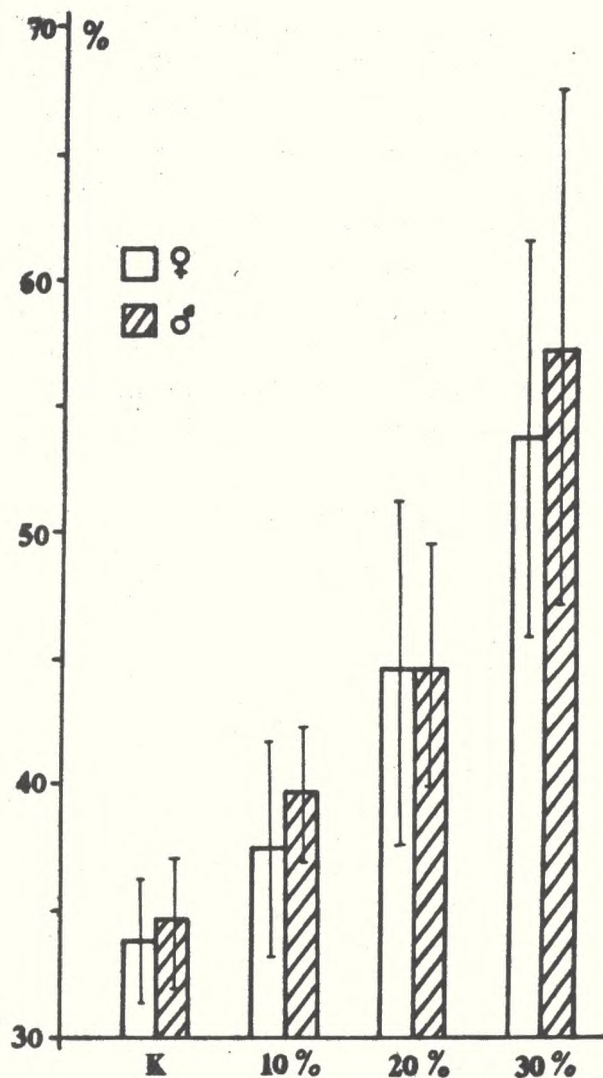
Utrata ciężaru ciała	Płeć	Ilość hemoglobiny w mmol/l Hb			Wartość hematokrytu w %		
		min.	maks.	śred. \pm SD	min.	maks.	śred. \pm SD
Kontrola	♀	3.97	6.76	5.03 \pm 0.93	30	39	33.8 \pm 2.5
	♂	3.66	9.12	5.34 \pm 1.43	32	39	34.6 \pm 2.4
10%	♀	5.03	8.50	6.70 \pm 1.18	32	45	37.6 \pm 4.4
	♂	5.96	7.45	6.58 \pm 0.50	37	47	39.9 \pm 2.8
20%	♀	4.96	11.42	8.01 \pm 1.92	38	63	44.8 \pm 6.9
	♂	6.45	9.93	7.94 \pm 1.18	40	53	44.8 \pm 4.7
30%	♀	6.95	11.42	8.69 \pm 1.30	41	70	54.0 \pm 7.9
	♂	6.02	10.86	8.50 \pm 1.61	40	73	57.5 \pm 11.2

SD - odchylenie standardowe.

Różnice między średnimi wartościami grup doświadczalnych a grupą kontrolną zarówno pod względem ilości hemoglobiny, jak i wartości hematokrytu we wszystkich przypadkach są statystycznie istotne.



Wykr. 1. Ilość hemoglobiny (w mmol/l Hb) w krwi obwodowej żaby trawnej, *Rana temporaria* L. po utracie 10%, 20% i 30% ciężaru ciała. K - grupa kontrolna



Wykr. 2. Wartość hematokrytu (w %) w krwi obwodowej żaby trawnej, Rana temporary L. po utracie 10%, 20% i 30% ciężaru ciała. K - grupa kontrolna

dehydratacji. U samców tej grupy zawartość hemoglobiny wynosiła średnio $7.94 \text{ mmol/l} \pm 1.18$.

W grupie żab poddanych dehydratacji w granicach utraty ok. 30% ciężaru ciała (ok. 38% utraty wody) ilość hemoglobiny u samic wynosiła średnio $8.69 \text{ mmol/l} \pm 1.30$. Nastąpił wzrost o 0.68 mmol/l w zestawieniu z samicami, które utraciły 20% ciężaru ciała i o 3.66 mmol/l w porównaniu do samic grupy kontrolnej. Różnica ta jest znaczna i istotna ($t = 7.195$, $P < 0.05$). U samców średni wzrost zawartości hemoglobiny wynosił 0.56 mmol/l w porównaniu z osobnikami, które utraciły ok. 20% ciężaru ciała i 3.16 mmol/l w zestawieniu z samcami grupy kontrolnej. Wzrost ten jest znaczny i statystycznie istotny ($t = 4.645$, $P < 0.05$).

Wskaźnik hematokrytowy

Wartość hematokrytu żab nie poddanych dehydratacji wynosi średnio u samic $33.8\% \pm 2.5$; u samców jest ona wyższa i wynosi średnio $34.6\% \pm 2.4$. U żab poddanych dehydratacji zaobserwowano wzrost hematokrytu u obu płci. Po odwodnieniu zwierząt w granicach ok. 10% utraty ciężaru ciała hematokryt wzrasta średnio u samic o 3.8%. Wzrost ten określa się jako istotny ($t = 2.375$, $P < 0.05$). U samców wzrost hematokrytu jest większy. Hematokryt wzrasta średnio o 5.3%. Jest to więc wzrost znaczny i istotny ($t = 4.530$, $P < 0.05$). U żab, które utraciły ok. 20% ciężaru ciała wskaźnik hematokrytowy u samic wynosi średnio $44.8\% \pm 6.9$. Wzrósł on o 7.2% w porównaniu z grupą żab, które utraciły 10% ciężaru ciała i o 11.0% w porównaniu z żabami grupy kontrolnej. Wzrost ten jest duży i istotny ($t = 4.741$, $P < 0.05$). U samców średnia wartość hematokrytu jest taka sama jak u samic. W zestawieniu z samcami, które utraciły 10% ciężaru ciała hematokryt wzrasta o 4.9%, zaś w porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej o 10.2%. Wzrost ten określić można jako istotny ($t = 6.108$, $P < 0.05$). Dalszy wzrost hematokrytu występu-

je u żab po ich odwodnieniu w granicach 30% utraty ciężaru ciała. U samic hematokryt wynosi średnio $54.0\% \pm 7.9$. Wzrasta on o 20.2% w porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej i jest statystycznie istotny ("t" = 7.710, $P < 0.05$). U samców natomiast badany hematokryt wynosi średnio $57.5\% \pm 11.2$. Wzrósł on o 22.9% w stosunku do osobników grupy kontrolnej. Wzrost ten jest znaczny i istotny ("t" = 6.326, $P < 0.05$).

DYSKUSJA

Jak wynika z przeprowadzonych badań zarówno ilość hemoglobiny, jak i wartość hematokrytu ulega zmianom w trakcie zmniejszania się uwodnienia organizmu żab. W środkowym okresie hibernacji zawartość hemoglobiny i wskaźnik hematokrytowy u obu płci jest zbliżony. Ilość hemoglobiny wynosi u samic średnio 5.03 mmol/l Hb, a u samców 5.34 mmol/l Hb. Wartość hematokrytu u samic wynosi średnio 33.8%, a u samców 34.6%. Wartości obu wskaźników trudne są do porównania z dotychczasowymi danymi bibliograficznymi z uwagi na fakt pomijania przez badaczy zasadniczej informacji, czy płazy pochodziły z warunków naturalnych, czy też były przetrzymywane przez okres zimy w laboratorium. Wielkość hematokrytu uzyskana dla żab złowionych w strumieniu, a więc zimujących w warunkach naturalnych jest znacznie niższa niż podawana przez Terentiewa (1950) i Wismera według Barańskiego i innych (1962).

W okresie hibernacji (III dek. stycznia) organizm żaby trawnej - *Rana temporaria* jest silnie uwodniony. Średnia zawartość wody u samic wynosi 77.1%, a u samców 80.7% (Zamachowski, 1968). Żaby pozbawione dostępu do wody tracą ją z organizmu. Utrata wody powoduje zmiany w uwodnieniu tkanek i narządów. Odbija się to również na wskaźnikach czerwono-krwinkowych. Po nieznacznym odwodnieniu (po utracie ok. 10% ciężaru ciała) następuje wzrost wartości hematokrytu i ilo-

ści hemoglobiny. Krew ulega zagęszczeniu, o czym świadczy wzrost wartości hematokrytu. Następuje to na skutek oddawania wody zawartej w osoczu krwi innym tkankom. Krew, jak wynika z badań Smitha i Jacksona (1931), podobnie jak skóra traci w czasie dehydratacji duże ilości wody. Straty wody z tych narządów i tkanek są dużo większe niż z nerek, jelit i serca. Do narządów, które tracą duże ilości wody w czasie dehydratacji należą również mięśnie (Nagorny 1922). Dodać należy, że wyżej wymienieni autorzy badali uwodnienie narządów w chwili śmierci żab na skutek odwodnienia.

Utrata wody z organizmu wpływa na zmiany stężenia hemoglobiny i wskaźnika hematokrytowego. Stopniowy wzrost obu wskaźników obserwuje się do momentu 30%-wej utraty ciężaru ciała (ok. 38% utraty wody). Wtedy obserwuje się jeszcze krążenie krwi w naczyniach krwionośnych skóry i w dużych naczyniach błony międzypalcowej, lecz krew płynie bardzo wolno.

Stwierdzono duże wahania w zakresie wielkości hematokrytu i zawartości hemoglobiny we krwi wszystkich grup żab, a szczególnie tych, które poddano dehydratacji. Wahania te świadczą zarówno o indywidualnych właściwościach osobnika, jak i o różnej jego reakcji na czynnik stresowy, jakim jest dehydratacja. Dodatkowym czynnikiem stresowym dla żab w tym okresie jest fakt, że w warunkach naturalnych nie są one narażone na utratę wody. Mają jej w tym okresie nadmiar, bowiem przebywają w strumieniu. Również i różne uwodnienie organizmu nie jest bez znaczenia. Duża ilość limfy w workach limfatycznych stanowi rezerwuar wodny w czasie dehydratacji dla narządów, w których spada zawartość wody. Wpływa to na ściśle określoną ogólną utratę wody z organizmu, choć nie będzie jednakowo wpływać na uwodnienie poszczególnych tkanek, w tym również krwi. Woda z osocza krwi przechodzi do innych tkanek i narządów, które są w pierwszej kolejności narażone na utratę wody. Należą do nich głównie skóra i mięśnie. Skóra jest narządem, poprzez który u żab następuje zarówno utrata, jak i uzupełnianie wody w organizmie.

Sumując, stwierdza się, że zarówno ilość hemoglobiny, jak i wartość hematokrytu wzrastają stopniowo wraz ze zmniejszaniem się uwodnienia organizmu żaby trawnej - *Rana temporaria*. Wzrost ten jak się wydaje jest efektem zagęszczania krwi na skutek zmniejszenia się zawartości wody w osoczu, a nie wynikiem reakcji zwierzęcia na odwodnienie. Czas, w którym zwierzę nie miało dostępu do wody (ok. 6 - 24 godzin) był za krótki, aby, na skutek uruchomienia mechanizmów obronnych, mógł nastąpić wzrost obu wskaźników czerwonokrwinkowych.

LITERATURA

1. Arvey L., 1974, Le dimorphism sexuel sanguin chez *Rana temporaria* L. et *Bufo vulgaris* Laur. Cr. Soc. Biol. 141, 457-459.
2. Barański S., Czerski P., Krzezińska-Ławkowicz I., Krzymowski T., Ławkowicz W., 1962, Układ krwiotwórczy zwierząt laboratoryjnych. PWN, Warszawa, 1-395.
3. Czopek J., 1956, Krew płazów. Zeszyty Nauk. UMK. Biol. 1.
4. Foxon E.G.H., 1964, Blood and respiration physiology of the Amphibia. W "Physiology of the Amphibia". Red. J.A. Moore. Acad. Press N. Y. and London, 151-202.
5. Gaumer A.E.H., Goodnight C.J., 1957, Some aspects of the hematology of turtles as related to their activity. Am. Midl. Nat. 58, 332-340.
6. Goniakowska L., 1970, The respiration of erythrocytes of some amphibians in vitro. Bull. Acad. Pol. Sci. Biol. 18, 793-797.
7. Goniakowska-Witalińska L., 1974, Respiration, resistance to hypotonic solutions and ultrastructure of erythrocytes of *Salamandra salamandra*. Bull. Acad. Pol. Sci. Biol. 22, 59-66.

8. Harris J.A., 1972, Seasonal variation in some hematological characteristics of *Rana pipiens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 43 A. 975-989.
9. Holzapfel R.A., 1937, The cyclic character of hibernation in frogs. *Q. Rev. Biol.* R. 65-84.
10. Hutchison V.H., Szarski H., 1965, Number of erythrocytes in some Amphibians and Reptiles. *Copeia* 3, 373-375.
11. Kaplan H.M., 1951, A study of frog blood and red-leg disease. *Trans. Ill. State Acad. Sci.* 44, 209-215.
12. Kaplan H.M., 1952, Variations in white blood cells between normal and red-leg frogs. *Trans. Ill. State Acad. Sci.* 45. 170-176.
13. Kaplan H.M., Crouse G.T., 1956, Blood changes underlying the seasonal resistance of frogs to disease. *Copeia* 1. 52-54.
14. Nagorny A., 1922, K woprosu swiazywanii wody w žiwych i mierztych organizmach. *Tr. Chark. Obszcz. Ispyt. Prirody.* 36.
15. Noble G.K. 1954. *The biology of the Amphibia.* New York.
16. Rouf M.A. 1969. *The hematology of the leopard frog *Rana pipiens*.* *Copeia* 4, 682-687.
17. Schermer S., 1967, *The blood morphology of laboratory animals.* Davis F.A. Philadelphia, 171-187.
18. Smith V., Jackson C., 1931, The changes during dessication and rehydration in the body and organs of the leopard frog (*Rana pipiens*). *Biol. Bull.* 60, 80-93.
19. Stuart L.C., 1951, The distributional implications of temperature tolerances and hemoglobin values. *Copeia* 2, 220-229.
20. Szarski H., 1974, Zagadnienie rozmiarów zwierząt kręgowych. *Postępy Biol. Komórki.* 3/4, 311-344.
21. Szarski H., Czopek J., 1965, Liver cell size in some species of Amphibia. *Zool. Polon.* 15, 51-64.
22. Szarski H., Czopek J., 1966, Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles. *Bull. Acad. Pol. Sci. Biol.* 6, 433-437.

23. Terentiew P.W., 1950, Laguzka. Gos. Izdat. Sow. Nauka. Moskwa. 1-335.
24. Wismer H., 1934, Untersuchungen über die physicalischen Elemente des Blutes von *Rana temporaria*. Biol. Gener. 10, 1.
25. Zamachowski W., 1968, Changes in the water content in the organism of the common frog (*Rana temporaria* L.) and the water frog (*Rana esculenta* L.) in the annual cycle. Acta Biol. Crac. Zool. 11, 213-225.
26. Zamachowski W., 1977a, The water economy in some European species of anuran amphibians during the annual cycle. I. Water content of the organism. Acta Biol. Crac. Zool. 20. 177-190.
27. Zamachowski W., 1977b, The water economy in some European species of anuran amphibians during the annual cycle. III. Resistance to water shortage. Acta Biol. Crac. Zool. 20, 207-228.

Władysław Zamachowski

THE INFLUENCE OF DEHYDRATION ON THE QUANTITY OF HEMOGLOBIN
AND ON HEMATOCRIT VALUE. IN PERIPHERAL BLOOD OF RANA
TEMPORARIA L.

Summary

The research was carried out on blood of *Rana temporaria* L. during the hibernation period. The value of hematocrit indicator was studied in 40 females and 40 males subject to controlled dehydration.

A gradual increase of the values of both, hematocrit and hemoglobin was proved as the frogs were dehydrated. It was also found out that there are considerably big oscillations of hematocrit and hemoglobin values among particular individuals, mainly in the group of frogs which were dehydrated up to 30% of body weight.

Владислав Замаховский

ВЛИЯНИЕ ДЕГИДРАТАЦИИ НА КОЛИЧЕСТВО ГЕМОГЛОБИНА И ВЕЛИЧИНУ ГЕМАТОКРИТА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛЯГУШКИ RANA TEMPORARIA L.

Резюме

Исследования были проведены во время гибернации на крови лягушки Rana temporaria L. Было проверено количество гематокритного индекса и сгущения гемоглобина в периферической крови у 40 самок и 40 самцов, подвергавшихся контролируемой дегидратации.

Подтверждается постепенный рост количества обоих эритроцитарных индексов во время дегидратации лягушек и значительно повышенные колебания количества эритроцитарных индексов, главным образом в группе лягушек, лишенных воды, до потери 30% веса тела.