

DOI 10.37000/abbsl.2025.115.05

УДК 597.8. 636.02

Ганна Овчаренко,

кандидат медичних наук, асистент кафедри нормальної і патологічної морфології та судової ветеринарії

Одеський державний аграрний університет, м. Одеса, Україна

ORCID: <https://bit.ly/475h7qE>

e-mail: ovcharenkowitz@gmail.com

Лариса Роша,

доктор медичних наук, професор кафедри нормальної і патологічної морфології та судової ветеринарії

Одеський державний аграрний університет, м. Одеса, Україна

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1027-1467>

e-mail: roshalg@ukr.net

Жанна Коренєва,

кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри нормальної і патологічної морфології та судової ветеринарії

Одеський державний аграрний університет, м. Одеса, Україна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2730-5990>

e-mail: koreneva-z@ukr.net

Ірина Бондаренко,

кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри нормальної і патологічної морфології та судової ветеринарії

Одеський державний аграрний університет, м. Одеса, Україна

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1019-3446>

e-mail: bondarenkoirina173@gmail.com

ГІСТОЛОГІЧНА СТРУКТУРА ПЕЧІНКИ ЖАБ ВИДУ BUFO BUFO У РЕПРОДУКТИВНИЙ ПЕРІОД

Анотація

*Печінка відіграє ключову роль у метаболізмі, детоксикації та імунитеті амфібій. Її гістологічна структура є відображенням функціонального стану та може змінюватися під впливом фізіологічних і екологічних факторів. Дослідження статевих відмінностей у будові печінки жаб *Bufo bufo* у період активної репродукції (квітень) є важливим для розуміння адаптивних механізмів, пов'язаних із різними фізіологічними потребами самців та самок.*

*Мета роботи полягає у порівняльній оцінці гістологічної організації печінки самців та самок жаб виду *Bufo bufo* у репродуктивно активний період (квітень). Зразки печінки (n=10: 5 самців, 5 самиць) відловлених жаб фіксували, обробляли за стандартною гістологічною методикою та забарвлювали гематоксиліном і еозином. Проводили світлову мікроскопію для опису загальної гістологічної будови. Кількісний аналіз меланомакрофагів*

здійснювали за допомогою програми CellProfiler на 46 гістологічних зображеннях з подальшим порівняльним аналізом морфометричних параметрів залежно від статі.

Гістологічна будова печінки *Bufo bufo* характеризується одношаровою пластинчастою організацією гепатоцитів, що формують кластерні структури з розвиненою синусоїдною мережею. Меланомакрофаги виявлялися у помірній кількості в обох статей без ознак патологічної пігментації. Морфометричний аналіз не виявив статистично значущих відмінностей у розмірах та кількості меланомакрофагів між самцями та самками. Патологічних змін у структурі печінки (фіброз, некроз, запальна інфільтрація) не спостерігалось. Отримані дані є базовою інформацією про морфологічний стан печінки жаб *Bufo bufo* у весняний період. Відсутність виражених статевих відмінностей у гістологічній будові та патологічних змін може свідчити про відносно сприятливий екологічний стан досліджуваної популяції на момент відбору. Результати можуть бути використані для порівняльних екоотоксикологічних досліджень, спрямованих на виявлення статевих особливостей реакції печінки амфібій на вплив забруднюючих речовин. Гістологічна організація печінки самців та самок *Bufo bufo* у квітні не має виражених статевих відмінностей і характеризується ознаками фізіологічної норми. Кількісні та морфометричні параметри меланомакрофагів також не демонструють залежності від статі. Відсутність патологічних змін свідчить про відсутність значного токсичного впливу на досліджуваних особин. Отримані результати є важливим підґрунтям для подальшого вивчення впливу екологічних факторів на печінку земноводних з урахуванням статевого диморфізму.

Ключові слова: *Bufo bufo*, печінка, гістологія, меланомакрофаги, морфометрія, статеві відмінності, репродуктивний період, амфібії, екологічна оцінка.

Вступ. Печінка є життєво важливим органом, що виконує широкий спектр метаболічних, детоксикаційних та імунних функцій у хребетних, включаючи амфібій. Гістологічна структура печінки відображає її функціональну активність та може зазнавати змін під впливом різноманітних фізіологічних та екологічних факторів. Амфібії, зокрема жаби виду *Bufo bufo*, є важливими компонентами екосистем, а їхній фізіологічний стан може слугувати індикатором здоров'я навколишнього середовища.

Існуючі дослідження демонструють, що структура печінки амфібій може варіювати залежно від виду, стадії розвитку, сезону та впливу зовнішніх факторів, таких як забруднення та паразитарні інвазії. Однак, порівняльні гістологічні дослідження печінки самців та самок жаб *Bufo bufo* у певний період річного циклу, зокрема у квітні, коли спостерігається активізація репродуктивних процесів, залишаються недостатньо вивченими.

Вивчення статевих відмінностей у гістологічній організації печінки жаб *Bufo bufo* є важливим для розуміння потенційних фізіологічних адаптацій, пов'язаних із репродуктивними функціями та метаболічними потребами самців та самок у весняний період. Квітень є критичним місяцем для багатьох видів амфібій, оскільки відбувається їхнє пробудження після зимівлі, міграція до місць розмноження та активна репродуктивна поведінка, що може суттєво впливати на функціональний стан внутрішніх органів, включаючи печінку.

Дослідження дозволить розширити фундаментальні знання про статеві особливості будови печінки у земноводних, сприяючи кращому розумінню адаптивних механізмів, пов'язаних із різними фізіологічними станами.

Гістологічні особливості печінки, такі як розмір гепатоцитів, щільність

синусоїдів, наявність та кількість меланомacroфагів, можуть відображати інтенсивність метаболічних процесів, які можуть відрізнятися у самців та самок у період підготовки до розмноження.

Отримані дані можуть слугувати базовою інформацією для оцінки впливу екологічних факторів (забруднення, зміни клімату) на стан печінки самців та самок жаб, виявляючи потенційні статеві відмінності у чутливості до стресових впливів. Гістологічний аналіз печінки може бути використаний як біомаркер для оцінки стану здоров'я популяцій жаб у природних умовах та виявлення негативних впливів антропогенних факторів.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Гістологічно печінка жаб має деякі риси, спільні з іншими хребетними, однак містить і унікальні особливості. Так, значна кількість меланіну печінки відіграє роль у захисті від ультрафіолетового випромінювання.

Печінка жаби має здатність до депонування поживних речовин і продуктів обміну, що важливо для виживання в умовах змін навколишнього середовища.

Функціональна активність печінки жаб демонструє виразну сезонну змінність, що пов'язана з особливостями їх репродуктивної стратегії та підготовкою до періодів фізіологічного навантаження, таких як розмноження чи зимова сплячка. Наприклад, у виду *Rana chensinensis* [1] спостерігається помітне зростання запасів глікогену та ліпідів перед обома цими критичними періодами. Водночас рівень цих речовин змінюється залежно від типу репродуктивної стратегії, яку реалізує тварина. Ці накопичення є ключовим енергетичним джерелом, що використовується як для забезпечення метаболічних витрат під час формування статевих клітин (овоцитів і сперматозоїдів), так і для таких енерговитратних процесів, як клітинний поділ і парування.

Основними ферментами вуглеводного обміну є [1]: 1) глікогенсинтаза – каталізує синтез глікогену з глюкози, особливо активна в передзимовий період і перед розмноженням, коли енергетичні запаси накопичуються; 2) глікогенфосфорилаза – відповідає за мобілізацію глікогену, розщеплюючи його до глюкозо-1-фосфату в періоди стресу, спарювання, зимівлі; 3) глюкозо-6-фосфатаза – ключова в останньому етапі глюконеогенезу, забезпечує вихід глюкози у сироватку крові.

У печінці жаб зберігається значна кількість ліпідів [2], які використовуються як джерело енергії. Ферментативний профіль гепатоцитів складається з: 1) ліпази, яка розщеплює тригліцериди до гліцеролу і жирних кислот; 2) ацетил-КоА карбоксилази – бере участь у синтезі жирних кислот та 3) β -окислювальних ферментів, що каталізують розпад жирних кислот до ацетил-КоА, який може далі використовуватись у циклі Кребса (3-гідрокси-3-метилглутарил-кофермент, холестерин-ацилтрансфераза та інші).

Під час спарювання спостерігається активне споживання ліпідів, а ферменти, відповідальні за β -окислення, значно активізуються.

Печінка жаб синтезує ферменти для транспорту, перетворення та детоксикації амінокислот: 1) амінотрансферази (АЛТ, АСТ) – забезпечують перенесення аміногруп для синтезу нових амінокислот; 2) глутаматдегідрогеназа – фермент, що бере участь у дезамінуванні; 3) синтази сечовини – хоча у жаб основним продуктом азотистого обміну є сечова кислота або аміак, у печінці можуть синтезуватись також проміжні метаболіти).

Ці ферменти відіграють важливу роль у забезпеченні ембріонального розвитку – самки передають продукти білкового обміну у жовтковий мішок яйця.

Багатофакторний аналіз Andrea Brenes-Soto зі співавт.[3] засвідчив значущу роль як ліпідів, так і амінокислот у енергетичному метаболізмі амфібій ряду Anura, що узгоджується з їхнім хижим способом життя. Ідентифіковані метаболічні шляхи вільного карнітину та довголанцюгових ацилкарнітинів, що регулюють метаболізм жирних кислот, поряд з утилізацією амінокислотних катаболітів, підтверджують збереження глюкози та генерацію енергії як за рахунок протеїногенних, так і кетогенних процесів. Додатково, висувається гіпотеза про участь малонілкарнітину в модуляції харчової поведінки та нутритивного статусу досліджуваних організмів.

Жаби, які живуть у природньому середовищі, часто піддаються впливу різноманітних токсинів і хімічних речовин. Тому детоксикаційні функції доволі яскраво виражені завдяки системі цитохрому P450 (бере участь у окисненні ксенобіотиків) та глутатіонпероксидази, каталази і супероксиддисмутази (СОД) – антиоксидантні ферменти, які захищають печінкові клітини від вільнорадикального ураження.

Висока активність цих ферментів у жаб пов'язана з сезонною зміною метаболізму — наприклад, у період гібернації або навесні після пробудження.

Цікаво, що зміна концентрації глікогену та ліпідів супроводжується протилежною динамікою меланінового пігменту в печінковій паренхімі. Зростання кількості меланіну, як показали автори, є обернено пропорційним до концентрації цих енергетичних резервів. Це свідчить про складну і багаторівневу регуляцію, в якій меланін може відігравати роль не лише пігменту, а й фактора, дотичного до апоптозу. Так, згідно з роботами L. Assisi зі співавт. [4], під час вітелогенезу меланін бере участь у процесах запрограмованої загибелі клітин, сприяючи оновленню гепатоцитів у період активної репродукції.

Підтвердженням сезонного характеру цих змін стали дослідження D. Mentino зі співавт. [5], які виявили, що максимальна кількість меланіну в печінці жаб (*Pelophylax esculentus*) припадає на травень-червень — період, що збігається з піком розмноження. Під час зимової сплячки рівень меланіну в печінці є вищим, ніж у період активності. Така пігментна насиченість підтримується як внаслідок репродуктивної активності, так і через гіпертрофічні процеси у тканинах печінки.

Ферментативно жовч утворюється завдяки 7-альфа-гідроксилазі холестерину (ключовий фермент синтезу жовчних кислот) та

глюкуронілтрансферази (бере участь у зв'язуванні білірубіну. Жовч у жаб менш пігментована, ніж у ссавців.

Мета. Метою цього дослідження є вивчення особливостей гістологічної будови та порівняльна оцінка гістологічної організації печінки самців та самок жаб виду *Bufo bufo* у репродуктивно активний період (квітень).

Виклад основного матеріалу дослідження. Місцями відлову амфібій *Bufo bufo* стали водойми та прибережна територія Хаджибейського, Тилігульського і Дністровського лиманів Одеської області (рис.1).

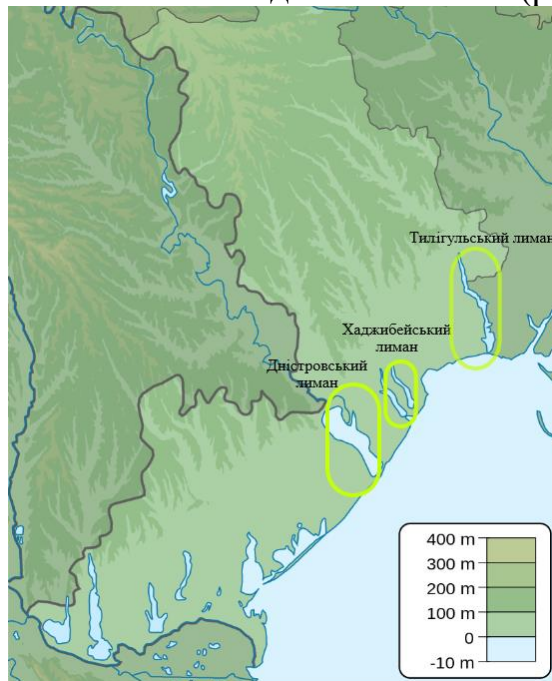


Рисунок. 1. Картографія ділянок для збору дослідних особин (рисунок авторів)

Відбір екземплярів для дослідження проводили довільно. Ловля відбувалася батрахологічним сачком у пластикові відра. Польові роботи проводилися протягом квітня 2024 р. ввечері (17.00-20.00). Обстеження проводилося поблизу водойм і мікромісць існування (повалені дерева, колоди, камені, висока трава) з виключенням стресових факторів для амфібій. Перед отриманням зразків органів (рис.2) екземпляри евтаназували ($n=10$: 5 самиць та 5 самців) після 15-хв. занурення у суспензію гвоздичної олії на буферній воді для амфібій (10 мл олії на 10 л води). Для приготування гістологічних препаратів печінки використовували стандартну методику, яка включає фіксацію тканини, зневоднення, просочення та заливку в парафін. Отримані зрізи товщиною 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином для проведення світлової мікроскопії.

На відміну від мікроструктури у ссавців, печінка жаби не має чітко вираженої часточкової організації і тріадної структури. Залежно від виду амфібій, структура гепатоцит-синусоїдних комплексів класифікується на три типи: багатошаровий, двошаровий та одношаровий типи (рис.3). Ця класифікація базується на відсотковому розширенні площі синусоїдів на одиницю площі, вимірюваному морфометрично. Гепатоцит-синусоїдні структури

амфібій відрізняються залежно від порядку: у жаб (Anura) переважає одношаровий тип, тоді як інші типи зустрічаються в інших групах амфібій.



Рисунок.2. Морфологічне обстеження дослідної особини (рисунок авторів)

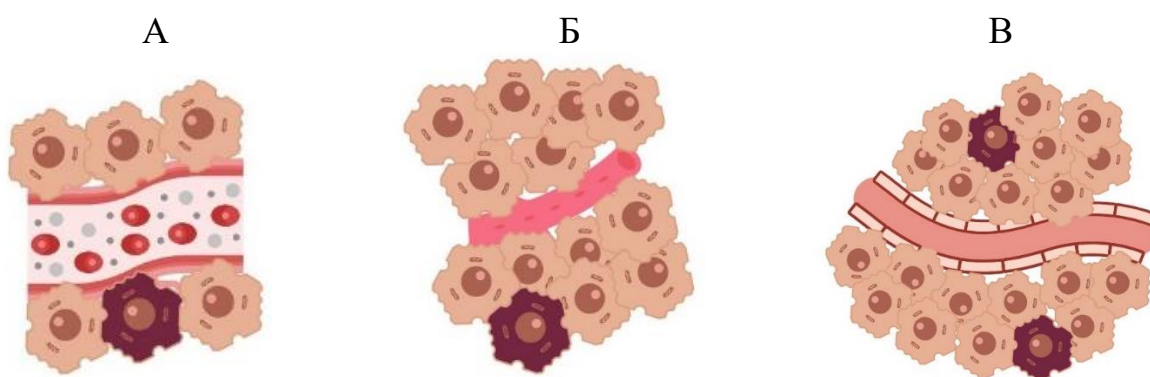


Рисунок 3. Схематична будова гепатоцит-синусоїдних комплексів амфібій (А - одношаровий тип: однорядні пластинки гепатоцитів з широкими, прямими синусоїдами (меланомакрофаги на рисунках позначені темно-коричневим кольором). Б - двошаровий тип: має подвійні шари гепатоцитів з нерегулярно розташованими синусоїдами. В - багатошаровий тип: характеризується багатошаровими пластинками гепатоцитів з вузькими, звивистими синусоїдами) (рисунок авторів).

Синусоїди – це капілярні мережі, розташовані між печінковими пластинками, утвореними гепатоцитами. У ссавців гепатоцити утворюють одношарові пластинки або тяжі. Портальні триади, що містять гілки ворітної вени та печінкової артерії, жовчну протоку та лімфатичні судини, оточені сполучною тканиною, розташовані в портальних просторах між печінковими часточками. Гістологічно вона складається з тяжів гепатоцитів острівцевого типу (на відміну від довгих «шнурів» гепатоцитів у ссавців). Артеріальні та венозні судини, синусоїдні капіляри розташовані в міжтяжових просторах у прошарках пухкої волокнистої сполучної тканини, яка забезпечує підтримку та

фіксацію цих судин, полегшує дифузію поживних речовин та кисню до оточуючих клітин і тканин, а також сприяє видаленню продуктів обміну речовин.

У печінці *Bufo bufo* гепатоцити формують одношарову пластинчасту структуру. Ці клітини мають поліедричну форму з округлим ядром, розташованим у центрі. Гепатоцити організовані у скупчення кластерного (острівцевого) типу, які оточені густою мережею синусоїдальних капілярів. У тканині чітко ідентифікуються окремо розташовані елементи: порталні венули, печінкові артерії та жовчні протоки, які анатомічно розмежовані між собою.

Структура печінки однорідна, лише з незначними варіаціями вмісту пігменту та морфології клітин. Під час гістологічного аналізу печінки самок жаб у період розмноження (квітень) паренхіма виглядала цитоплазматично насиченою, а вміст меланіну та ліпідних включень був помірним. Морфологічно активність гепатоцита проявляється у великому, світлому ядрі з добре помітним ядерцем та багатою на органели цитоплазмою, що відображає високий рівень синтезу білків, ліпідів та інших молекул. Подібна морфологічна картина спостерігалась і у самців: гепатоцити також характеризувалися насиченою цитоплазмою.

Меланомакрофаги у гістопрепаратах розташовані у вигляді окремих клітин або невеликих скупчень у паренхімі печінки, зокрема в міжгепатоцитарних просторах та вздовж синусоїдних капілярів. Вони не формували чітко організованих центрів, як, наприклад, у нирках чи селезінці деяких інших хребетних. Меланомакрофаги - це спеціалізовані клітини печінки, часто згруповані в острівці. Меланофори містять численні темно-коричневі або чорні гранули меланіну. Вони містять такі пігменти, як меланін, ліпофусцин, гемосидерин. Площа, зайнята меланомакрофагами, може змінюватися залежно від фізіологічного стану, віку та факторів середовища, але у здорових жаб вони завжди присутні в помірних кількостях, завдяки чому гістопрепарат печінки має строкатий вигляд (рис.4).

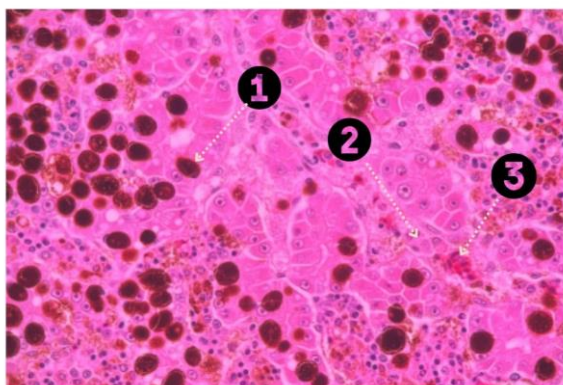


Рисунок 4. Печінка *Bufo bufo*, забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 400$, 1 – меланомакрофаг, 2 – гепатоцит, 3 - синусоїдний капіляр (рисунок авторів)

Меланомакрофаги є пігментованими фагоцитарними клітинами, які зустрічаються в печінці жаб, а також в інших органах пойкилотермних хребетних, таких як нирки та селезінка риб [6,7]. Ці клітини характеризуються

наявністю меланіну, а також інших пігментів, таких як ліпофусцин та гемосидерин, у своїй цитоплазмі.

Меланомакрофаги беруть участь у поглинанні та руйнуванні різноманітних речовин, включаючи клітинний детрит, бактерії та інші чужорідні матеріали, подібно до звичайних макрофагів [7].

Вони синтезують та накопичують меланін, який може відігравати цитопротекторну роль, діючи як антиоксидант та захищаючи від пошкодження ДНК. Також вони беруть участь у метаболізмі інших пігментів, таких як гемосидерин, що утворюється при руйнуванні еритроцитів [6].

Меланомакрофаги можуть брати участь у детоксикації різних забруднюючих речовин та ксенобіотиків, накопичуючи їх у своїй цитоплазмі. Збільшення кількості та розмірів меланомакрофагів у печінці жаб може бути індикатором впливу екологічних стресорів [8]. Існують дані, що меланін може брати участь у вродженому імунитеті та регулювати активність цитокінів, взаємодіяти з іншими імунними клітинами в печінці. Меланомакрофаги можуть бути залучені до підтримання гомеостазу, регуляції фіброзу та контролю базофілів [7].

Кількість та активність меланомакрофагів у печінці жаб можуть змінюватися залежно від різних факторів, включаючи сезонні зміни, стан здоров'я, вплив забруднюючих речовин та радіації.

Кількість меланіну та інших пігментів у печінці може збільшуватися після розмноження або у відповідь на стрес навколишнього середовища, але за нормальних умов ці пігменти присутні на низькому або середньому рівні [9,10]. Під час розмноження і підготовки до гібернації меланін виступає індикатором метаболічного стресу або участі в апоптозі клітин (зокрема під час вітелогенезу). Пігментні клітини у самок також мають імунозахисну роль, оскільки меланін може бути відповіддю на оксидативний стрес, що виникає під час масової мобілізації енергії. Нам було цікаво оцінити кількісний показник меланомакрофагів у печінці самців та самиць, який ми провели у CellProfiler завдяки аналізу батареї зображень у модулях IdentifyPrimaryObjects та MeasureObjectSizeShape (рис. 5) з наступним кореляційним порівняльним аналізом. Меланомакрофаги ідентифікували як темні клітини із великою площею, які відокремлювалися на основі інтенсивності сигналу та розміру.

Порівняльний аналіз батареї з 46 гістологічних зображень печінки, проведений у програмному середовищі CellProfiler, не виявив статистично значущої кореляції ані морфометричних параметрів клітин, ані їх кількості, залежно від статі особини. Обробка включала стандартизовану сегментацію клітинних структур та подальше вимірювання розмірів і щільності клітин. Незважаючи на очікувану можливу статеву варіабельність, результати продемонстрували однорідність морфологічних показників у вибраній вибірці, що свідчить про відсутність виражених статевозалежних відмінностей у структурній організації печінкової тканини в межах досліджуваної групи (рис.6).

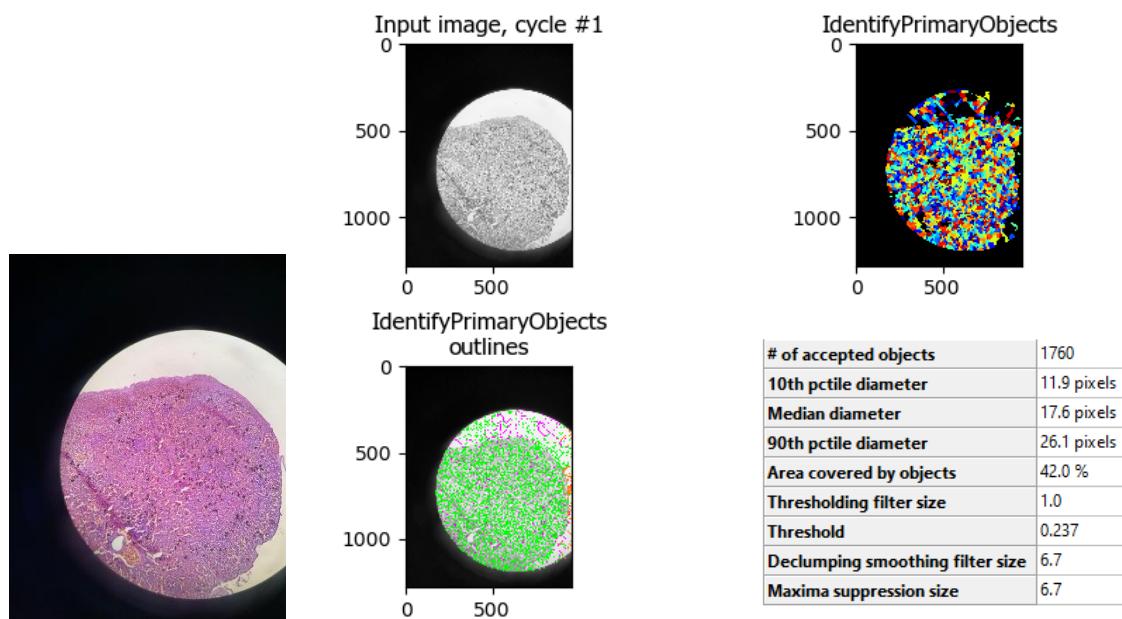


Рисунок 5. Обробка фотографії гістопрепарату у CellProfiler з метою попиксельного визначення найкрупніших клітин у зразку. Для цього зображення проходить низку етапів цифрової обробки: перетворення в градації сірого, нормалізацію контрасту та автоматичне сегментування об'єктів за заданими морфометричними критеріями (рисунок авторів).

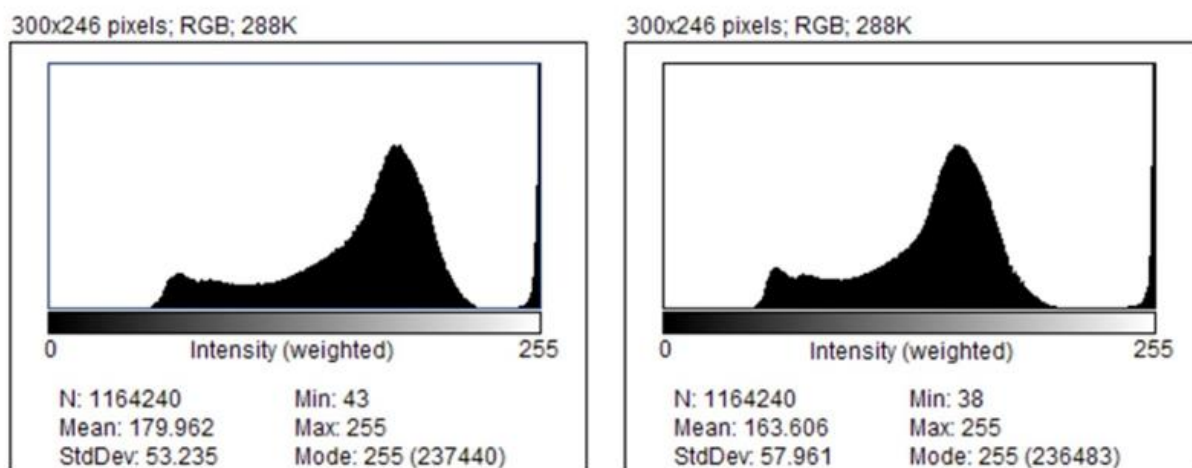


Рисунок 6. Порівняльний аналіз вимірювання розмірів і щільності меланомакрофагів *Vufo vufo* у квітні (рисунок авторів)

У жодному з проаналізованих зразків печінки жаб не було виявлено морфологічних змін, які б свідчили про наявність патологічних процесів, зокрема фіброзу, некрозу, запальної інфільтрації чи інших типових ознак токсичного ураження тканин.

Гістологічна структура зберігала характерну для здорової печінки архітектуру, без порушення цілісності гепатоцитів чи ознак міжклітинного

набряку. Відсутність таких змін дозволяє зробити попередній висновок про те, що досліджувані особини не зазнавали впливу значущого екологічного забруднення на момент відбору матеріалу.

Висновки та перспективи подальших досліджень.

1. Гістологічна будова печінки жаб *Bufo bufo* у репродуктивно активний період характеризується одношаровою пластинчастою організацією гепатоцитів, які утворюють кластерні структури з добре розвиненою синусоїдною мережею.
2. Меланомакрофаги виявлялися у помірній кількості як у самців, так і у самок, без ознак патологічної пігментації чи надмірного накопичення фагоцитованого матеріалу.
3. Порівняльний морфометричний аналіз 46 гістологічних зображень, виконаний у CellProfiler, не виявив достовірної залежності кількісних і площинних параметрів меланомакрофагів від статі особин.
4. У жодному зі зразків не було зафіксовано морфологічних ознак патології, таких як фіброз, некроз або запальна інфільтрація, що дозволяє зробити висновок про відсутність впливу токсичних екологічних факторів на досліджену популяцію.
5. Отримані результати свідчать про фізіологічну норму печінкової тканини жаб у період весняної активності та можуть бути використані як база для подальших екотоксикологічних досліджень.

Список використаної літератури

1. Dinsmore, S., & Swanson, D. (2008). Temporal patterns of tissue glycogen, glucose, and glycogen phosphorylase activity prior to hibernation in freeze-tolerant chorus frogs, *Pseudacris triseriata*. *Canadian Journal of Zoology*. 86. <https://doi.org/10.1139/Z08-088>
2. Bruscalupi, G., Castellano, F., Scapin, S., & Trentalance, A. (1989) Cholesterol metabolism in frog (*Rana esculenta*) liver: seasonal and sex-related variations. *Lipids*. Feb;24(2):105-8. doi: 10.1007/BF02535245.
3. Brenes-Soto, A., Marc, T., Michael, Y. (2019) The Role of Feed in Aquatic Laboratory Animal Nutrition and the Potential Impact on Animal Models and Study Reproducibility. *ILAR Journal*, 60(2), 197. doi:10.1093/ilar/ilaa006.
4. Assisi, L., Autuori, F., Botte, V., Farrace, M. G. & Piacentini, M. (1999). Hormonal control of “tissue” transglutaminase induction during programmed cell death in frog liver. *Experimental Cell Research*. 247(2), 339-346.
5. Mentino, D., Scillitani, G., Marra, M. & Mastrodonato, M. (2017). Seasonal changes in the liver of a non-hibernating population of water frogs, *Pelophylax kl. esculentus* (Anura: Ranidae). *The European Zoological Journal*. 84(1), 525-535.
6. Steinel, N., Bolnick, D. Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Frontiers in Immunology* Volume 8 – 2017. URL=<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2017.00827> (дата звернення 25.04.2025).
7. Franco-Belussi, L, Provete, D.B., Borges, R.E., & De Oliveira, C., Santos, L.R.S. (2020) Idiosyncratic liver pigment alterations of five frog species in response to contrasting land use patterns in the Brazilian Cerrado. *PeerJ*. Aug 26;8:e9751. doi: 10.7717/peerj.9751. PMID: 32913675; PMCID: PMC7456255.

8. Burraco, P., Salla, R.F., Orizaola, G. (2023). Exposure to ionizing radiation and liver histopathology in the tree frogs of Chornobyl (Ukraine). *Chemosphere*. Feb;315:137753. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.137753. Epub 2023 Jan 3. PMID: 36608893.
9. Barni, S., Vaccarone, R., Bertone, V., Frascini, A., Bernini, F. & Fenoglio, C. (2002). Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta*. *Journal of Anatomy*. 200(2), 185-194.
10. C. De Oliveira, L. Franco-Belussi, L. Z. Fanali, and L. R. S. Santos, in *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Terrestrial Models*, ed. M. L. Larramendy and M. L. Larramendy, The Royal Society of Chemistry, 2017, pp. 123-142.

Hanna Ovcharenko,

Candidate in Medical Sciences, Assistant at the Department of Normal and Pathological Morphology and Forensic Veterinary Medicine

Odesa State Agrarian University, Odesa, Ukraine

ORCID: <https://bit.ly/475h7qE>

e-mail: ovcharenkowow@gmail.com

Larysa Rocha,

Doctor of Medical Sciences, Professor at the Department of Normal and Pathological Morphology and Forensic Veterinary Medicine

Odesa State Agrarian University, Odesa, Ukraine

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1027-1467>

e-mail: roshalg@ukr.net

Zhanna Koreneva,

Candidate in Veterinary Sciences, Associate Professor at the Department of Normal and Pathological Morphology and Forensic Veterinary Medicine

Odesa State Agrarian University, Odesa, Ukraine

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2730-5990>

e-mail: koreneva-z@ukr.net

Iryna Bondarenko,

Candidate in Veterinary Sciences, Associate Professor at the Department of Normal and Pathological Morphology and Forensic Veterinary Medicine

Odesa State Agrarian University, Odesa, Ukraine

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1019-3446>

e-mail: bondarenkoirina173@gmail.com

HISTOLOGICAL STRUCTURE OF THE LIVER IN BUFO BUFO TOADS DURING THE REPRODUCTIVE PERIOD

Abstract

The liver plays a crucial role in metabolism, detoxification, and immunity in amphibians. Its histological structure reflects its functional state and can change under the influence of physiological and environmental factors. The study of sex differences in the liver structure of Bufo bufo frogs during the active reproductive period (April) is important for understanding the adaptive mechanisms associated with the different physiological needs of males and females.

Comparative assessment of the histological organization of the liver in male and female Bufo bufo frogs during the reproductively active period (April).

Methods: liver samples (n=10: 5 males, 5 females) from captured frogs were fixed, processed using standard histological techniques, and stained with hematoxylin and eosin. Light microscopy was performed to describe the general histological structure. Quantitative analysis of melanomacrophages was performed using CellProfiler software on 46 histological images, followed by a comparative analysis of morphometric parameters depending on sex.

The histological structure of the Bufo bufo liver is characterized by a single-layered lamellar organization of hepatocytes forming cluster structures with a well-developed sinusoidal network. Melanomacrophages were found in moderate numbers in both sexes without signs of pathological pigmentation. Morphometric analysis revealed no statistically significant differences in the size and number of melanomacrophages between males and females. No pathological changes in the liver structure (fibrosis, necrosis, inflammatory infiltration) were observed. The obtained data provide baseline information on the morphological state of the liver of Bufo bufo frogs in the spring period. The absence of pronounced sex differences in the histological structure and pathological changes may indicate a relatively favorable ecological condition of the studied population at the time of sampling. The results can be used for comparative ecotoxicological studies aimed at identifying sex-specific features of the amphibian liver response to pollutants. The histological organization of the liver in male and female Bufo bufo in April does not show significant sex differences and is characterized by signs of physiological norm. Quantitative and morphometric parameters of melanomacrophages also do not demonstrate dependence on sex. The absence of pathological changes indicates the lack of significant toxic effects on the studied individuals. The obtained results are an important basis for further study of the influence of environmental factors on the amphibian liver, taking into account sexual dimorphism.

Keywords: Bufo bufo, liver, histology, melanomacrophages, morphometry, sex differences, reproductive period, amphibians, ecological assessment.

Reference

1. Dinsmore, S., & Swanson, D. (2008). Temporal patterns of tissue glycogen, glucose, and glycogen phosphorylase activity prior to hibernation in freeze-tolerant chorus frogs, *Pseudacris triseriata*. *Canadian Journal of Zoology*. 86. <https://doi.org/10.1139/Z08-088>
2. Bruscalupi, G., Castellano, F., Scapin, S., & Trentalancia, A. (1989) Cholesterol metabolism in frog (*Rana esculenta*) liver: seasonal and sex-related variations. *Lipids*. Feb;24(2):105-8. doi: 10.1007/BF02535245.
3. Brenes-Soto, A., Marc, T., Michael, Y. (2019) The Role of Feed in Aquatic Laboratory Animal Nutrition and the Potential Impact on Animal Models and Study Reproducibility. *ILAR Journal*, 60(2), 197. doi:10.1093/ilar/ilaa006.
4. Assisi, L., Autuori, F., Botte, V., Farrace, M. G. & Piacentini, M. (1999). Hormonal control of “tissue” transglutaminase induction during programmed cell death in frog liver. *Experimental Cell Research*. 247(2), 339-346.
5. Mentino, D., Scillitani, G., Marra, M. & Mastrodonato, M. (2017). Seasonal changes in the liver of a non-hibernating population of water frogs, *Pelophylax kl. esculentus* (Anura: Ranidae). *The European Zoological Journal*. 84(1), 525-535.
6. Steinel, N., Bolnick, D. Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Frontiers in Immunology* Volume 8 – 2017. URL=<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2017.00827> (дата звернення 25.04.2025).
7. Franco-Belussi, L, Provete, D.B., Borges, R.E., & De Oliveira, C., Santos, L.R.S. (2020) Idiosyncratic liver pigment alterations of five frog species in response to contrasting land use patterns in the Brazilian Cerrado. *PeerJ*. Aug 26;8:e9751. doi: 10.7717/peerj.9751. PMID: 32913675; PMCID: PMC7456255.

8. Burraco, P., Salla, R.F., Orizaola, G. (2023). Exposure to ionizing radiation and liver histopathology in the tree frogs of Chornobyl (Ukraine). *Chemosphere*. Feb;315:137753. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.137753. Epub 2023 Jan 3. PMID: 36608893.
9. Barni, S., Vaccarone, R., Bertone, V., Frascini, A., Bernini, F. & Fenoglio, C. (2002). Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta*. *Journal of Anatomy*. 200(2), 185-194.
10. C. De Oliveira, L. Franco-Belussi, L. Z. Fanali, and L. R. S. Santos, in *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Terrestrial Models*, ed. M. L. Larramendy and M. L. Larramendy, The Royal Society of Chemistry, 2017, pp. 123-142.

Стаття надійшла до редакції 21 травня 2025 року.

Стаття пройшла рецензування 2 червня 2025 року.

Стаття опублікована 30 червня 2025 року.