



Издатель

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет»
Российская Федерация, г.Петрозаводск, пр.Ленина,33

Научный электронный журнал

ПРИНЦИПЫ ЭКОЛОГИИ

<http://ecopri.ru>

№ 2 (52). Июнь, 2024

Главный редактор

А. В. Коросов

Редакционный совет

В. Н. Большаков
А. В. Воронин
Э. В. Ивантер
Н. Н. Немова
Г. С. Розенберг
А. Ф. Титов
Г. С. Антипина
В. В. Вапиров
А. М. Макаров

Редакционная коллегия

Т. О. Волкова
Е. П. Иешко
В. А. Илюха
Н. М. Калинкина
J. P. Kurhinen
А. Ю. Мейгал
J. B. Jakovlev
B. Krasnov
A. Gugotek
В. К. Шитиков
В. Н. Якимов

Службы поддержки

А. Г. Марахтанов
Е. В. Голубев
С. Л. Смирнова
Н. Д. Чернышева
М. Л. Киреева

ISSN 2304-6465

Адрес редакции

185910, Республика Карелия, г.Петрозаводск, пр. Ленина, 33. Каб. 453

E-mail: ecopri@psu.karelia.ru

<http://ecopri.ru>





УДК 598.132.4:591.111.1

СРЕДНЕАЗИАТСКАЯ ЧЕРЕПАХА *TESTUDO HORSFIELDII* GRAY, 1844 (REPTILIA: TESTUDINIDAE): АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ КРОВИ

РОМАНОВА
Елена Борисовна

доктор биологических наук, Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950, Россия, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, romanova@ibbm.unn.ru

СТОЛЯРОВА
Ирина Александровна

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950, Россия, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, irinaisto75@gmail.com

БАКИЕВ
Андрей Геннадьевич

кандидат биологических наук, Самарский федеральный исследовательский центр РАН, 445003, Тольятти, ул. Комзина, 10, herpetology@list.ru

ГОРЕЛОВ
Роман Андреевич

кандидат биологических наук, Самарский федеральный исследовательский центр РАН, 445003, Тольятти, ул. Комзина, 10, gorelov.roman@mail.ru

Ключевые слова:
пресмыкающиеся аридной зоны
лейкоцитарные индексы
периферическая кровь
лейкоцитарная формула крови
Казахстан

Аннотация: Использован гематологический подход для характеристики природной популяции среднеазиатской черепахи *Testudo horsfieldii* из Мангистауской области Республики Казахстан. Проведена оценка лейкоцитарной формулы крови с расчетом связанных с ней лейкоцитарных индексов (лимфоцитарно-гранулоцитарного, сдвига лейкоцитов, отношения лимфоцитов и эозинофилов, отношения гетерофилов и эозинофилов, отношения гетерофилов и лимфоцитов). Методом многомерного дисперсионного анализа выявлены значимые различия по совокупности лейкоцитарных показателей самцов (12 особей) и самок (22 особи). Межполовые различия проявлялись повышенным содержанием лимфоцитов и значением лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса, пониженным соотношением гетерофилов и лимфоцитов у самок. Повышенное значение индекса соотношения гетерофилов и лимфоцитов у самцов свидетельствует о стрессовом воздействии на них. У самок выявлены умеренная положительная корреляционная связь длины карапакса с содержанием в их крови гранулоцитов и эозинофилов, отрицательная связь – с суммарным содержанием агранулоцитов за счет вклада лимфоцитов. У самок, в отличие от самцов, преобладали лимфоцитарно-зависимые иммунные реакции. Методом главных компонент проведена дифференциация самцов и самок с более полным количественным описанием лейкоцитарного состава. Картина крови и динамика ее лейкоцитарных индексов отражали активный отклик организма на специфический комплекс экологических факторов среды обитания *T. horsfieldii* в аридной зоне.

© Петрозаводский государственный университет

Рецензент: В. Л. Вершинин

Рецензент: В. А. Черлин

Получена: 04 июня 2024 года

Подписана к печати: 13 июня 2024 года

Введение

Для рептилий, населяющих аридную зону с ее «жесткими» климатическими условиями, важную роль играет мобилизация адаптационных резервов, определяемая в первую очередь ключевой иммуногематологической гомеостатической системой организма. К типичным рептилиям аридной зоны Азии относится среднеазиатская черепаха *Testudo horsfieldii* Gray, 1844 – представитель семейства Сухопутные черепахи Testudinidae. Латинское название вида дано по: The Reptile Database (2024). Некоторые отечественные герпетологи обозначают вид научным названием *Agrionemys horsfieldii* (Gray, 1844). Он распространен в Казахстане, Туркменистане, Узбекистане, Таджикистане, Киргизии, Иране, Афганистане, Китае, Пакистане. Границы имеющего разрывы видового глобального естественного ареала обозначены на карте в статье Д. А. Бондаренко (2021, с. 39).

Опубликованные данные о лейкоцитарном составе крови данного вида получены при изучении особей, длительное время содержавшихся в условиях неволи (Knotkova et al., 2002; Романова и др., 2023), никакие половые различия черепах при этом в публикациях не отмечены. С учетом вышеизложенного цель работы заключалась в сравнении лейкоцитарных характеристик самцов и самок среднеазиатской черепахи из природной популяции.

Материалы

Среднеазиатских черепах (22 самки и 12 самцов) отловили 5–6 мая 2023 г. на северо-западной границе ареала, полуострове Мангышлак, в западных окрестностях с. Кызылозен Тупкараганского района Мангистауской области Республики Казахстан. Половую принадлежность определяли по внешним морфологическим признакам. Длину карапакса (*L. car.*) измеряли по его средней линии, от переднего края загривного щитка до наиболее выдающейся назад точки надхвостового щитка, с помощью штангенциркуля.

Методы

Кровь у черепах отбирали в день поимки или следующий за ним день. От каждой черепахи готовили по два мазка крови, взя-

той из хвостовой вены. Мазки высушивали на воздухе и фиксировали в спирте. Окраску зафиксированных мазков проводили красителем Гимза азури-эозин по Романовскому (10–12-кратный раствор, фирма «Биолот») в течение 20 минут. Полученные окрашенные препараты крови черепах просматривали на микроскопе Meiji Techno (Japan, серия MT 4000) с иммерсией, при общем увеличении $\times 1500$. Для получения лейкоцитарной формулы крови гранулоциты дифференцировали на гетерофилы (Г), эозинофилы (Э) и базофилы (Б), агранулоциты – на моноциты и лимфоциты (Л).

Гетерофилы среднеазиатской черепахи содержат в цитоплазме большие, эозинофильные, удлинённые и яйцевидные цитоплазматические гранулы. Ядро с плотным хроматином смещено к краю клетки (рис. 1.1). Эозинофилы – крупные клетки сферической формы с периферическим ядром, цитоплазма заполнена овальными гранулами (рис. 1.2). Базофилы представлены округлыми небольшими клетками, гранулы цитоплазмы, окрашивающиеся в темный цвет, плотно окружают ядро клетки (рис. 1.3). Моноциты имеют расположенное на периферии клетки овальное бобовидное ядро и обильную цитоплазму (рис. 1.4). Лимфоциты имеют округлую форму с неровными очертаниями; цитоплазма окрашивается в бледно-голубой цвет и может содержать тонкую азурофильную зернистость (рис. 1.5).

По полученным результатам лейкограммы сделали расчет ряда интегральных лейкоцитарных индексов в относительных единицах: сдвига лейкоцитов (ИСЛ = Σ гранулоцитов / Σ агранулоцитов); соотношения лимфоцитов и эозинофилов (ИСЛЭ = Л / Э); соотношения гетерофилов и эозинофилов (ИСГЭ = Г / Э); лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ = $L \times 10 / \text{Э} + \text{Г} + \text{Б}$); индекс соотношения гетерофилов и лимфоцитов (ИСГЛ = Г / Л).

Манипуляции с черепахами провели в соответствии с «Международными руководящими принципами для биомедицинских исследований на животных» (International Guiding..., 2012). После взятия крови все черепахи были возвращены в места отлова.

Для сравнения двух групп – самцов и самок – в пакете прикладных программ



Рис. 1. Лейкоцитарные клетки крови *Testudo horsfieldii*: 1 – гетерофил; 2 – эозинофил; 3 – базофил; 4 – моноцит; 5 – лимфоцит
Fig. 1. Leukocyte blood cells of *Testudo horsfieldii*: 1 – heterophils; 2 – eosinophil; 3 – bazophil; 4 – monocyte; 5 – lymphocyte

«STATISTICA v.10», согласно виду распределения данных, использовали методы непараметрической статистики с расчетом критерия Манна – Уитни (u). Различия между полами по совокупности показателей крови оценивали методом многофакторного дисперсионного анализа. Ранговым коэффициентом Спирмена (ρ) изучали взаимосвязь морфометрических и гематологических показателей. Для упорядочивания и уменьшения размерности данных применяли метод главных компонент. За величину статистической значимости принимали $\alpha = 0.05$.

Результаты

В нашей выборке из природы преобладающими клеточными элементами в белой крови *Testudo horsfieldii* являлись аграну-

лоциты, представленные лимфоцитами и моноцитами. Как и в выборках среднеазиатской черепахи из неволи (Knotkova et al., 2002; Романова и др., 2023), в общий состав агранулоцитов основной вклад вносили лимфоциты, а в общий состав гранулоцитов – гетерофилы, по сравнению с последними доли эозинофилов и базофилов были значительно меньше.

Значимые половые различия в природной популяции по совокупности лейкоцитарных показателей выявлены методом многомерного дисперсионного анализа (λ Wilks = 0.733, $p = 0.046$). Самцы и самки значительно различались по содержанию лимфоцитов и по суммарному содержанию агранулоцитов, а также значениям двух лейкоцитарных индексов – ИЛГ и ИСГЛ (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительный анализ лейкоцитарного состава периферической крови самцов и самок *Testudo horsfieldii*

Показатели лейкограммы	Самцы ($n = 12$)		Самки ($n = 22$)		Статистические сравнения		Вся выборка, самцы и самки ($n = 34$)	
	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	u	p	<i>Me</i>	<i>IQR</i>
Гетерофилы, %	24.50	9.50	21.00	12.00	1.52	0.12	22.00	11.00
Эозинофилы, %	12.00	8.00	10.00	8.00	0.28	0.77	10.00	8.00
Базофилы, %	7.50	7.50	7.00	8.00	0.40	0.68	7.00	8.00
Моноциты, %	7.50	4.50	6.00	4.00	0.94	0.34	6.00	5.00
Лимфоциты, %	48.00	6.50	52.00	11.00	2.84	0.004	50.00	10.00
Гранулоциты, %	43.50	8.00	41.00	11.00	1.68	0.09	42.00	10.00
Агранулоциты, %	55.16	7.50	59.00	11.00	1.99	0.04	57.00	10.00
ИСЛ, отн. ед.	0.77	0.26	0.69	0.32	1.79	0.07	0.72	0.31
ИСЛЭ, отн. ед.	4.33	4.60	5.00	5.95	0.56	0.56	5.10	5.22
ИСГЭ, отн. ед.	2.38	2.36	2.14	2.26	0.28	0.77	2.27	2.28
ИЛГ, отн. ед.	11.02	3.32	12.50	6.11	2.26	0.02	12.09	4.96
ИСГЛ, отн. ед.	0.48	0.16	0.37	0.25	2.39	0.01	0.42	0.23

Ряд лейкоцитарных показателей крови корреляционно связан с размерами исследованных черепах, как показали значения рангового коэффициента Спирмена и его статистической значимости. У самок, в отличие от самцов, которые представлены выборкой малого объема, выявлена значимая корреляционная связь разной направленности между большинством показателей лейкоцитарного профиля и длиной карапакса. Значимых различий медианных значений длины карапакса в выборках между самца-

ми (176.25 ± 5.47 мм) и самками (182.09 ± 4.78 мм) не выявлено ($u = 1.03, p = 0.29$).

Для выборки в целом (самцы и самки), как и для выборки самок, установлены: статистически значимая положительная связь длины карапакса с содержанием в крови эозинофилов, гранулоцитов в целом и индексом сдвига лейкоцитов (ИСЛ), а также значимая отрицательная связь с содержанием лимфоцитов, суммарным содержанием агранулоцитов и индексами ИСЛЭ, ИСГЭ, ИЛГ (табл. 2).

Таблица 2. Корреляционный анализ связей между лейкоцитарными показателями крови и длиной карапакса *Testudo horsfieldii*

Показатели лейкограммы	Самцы ($n = 12$)		Самки ($n = 22$)		Самцы и самки ($n = 34$)	
	ρ	p	ρ	p	ρ	p
Гетерофилы, %	-0.29	0.16	-0.07	0.63	-0.17	0.15
Эозинофилы, %	0.35	0.09	0.37	0.013	0.33	0.005
Базофилы, %	0.05	0.81	0.08	0.59	0.07	0.52
Моноциты, %	-0.002	0.99	0.06	0.66	0.008	0.94
Лимфоциты, %	-0.29	0.16	-0.38	0.010	-0.28	0.018
Гранулоциты, %	0.24	0.25	0.37	0.012	0.28	0.021
Агранулоциты, %	-0.24	0.24	-0.37	0.012	-0.27	0.026
ИСЛ, отн. ед.	0.25	0.23	0.37	0.012	0.28	0.020
ИСЛЭ, отн. ед.	-0.37	0.07	-0.44	0.002	-0.39	0.001
ИСГЭ, отн. ед.	-0.40	0.051	-0.34	0.021	-0.33	0.005
ИЛГ, отн. ед.	-0.28	0.16	-0.38	0.010	-0.29	0.016

В более наглядном и обобщенном виде описание лейкоцитарного состава крови *T. horsfieldii* выполнено методом главных

компонент, позволяющим визуализировать межполовые различия на графике распределения самцов и самок (рис. 2).

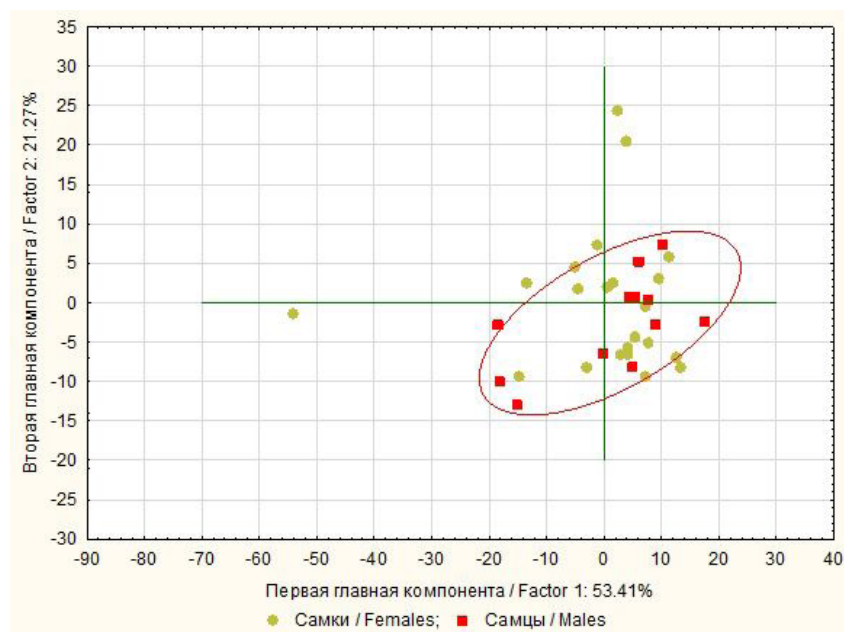


Рис. 2. Ординационная диаграмма, построенная по лейкоцитарному профилю крови самцов и самок *Testudo horsfieldii*

Fig. 2. Ordination diagram based on the leukocyte profile of males and females of *Testudo horsfieldii*

В первую компоненту, соответствующую собственному значению 199.51 и описывающую 53.41 % общей дисперсии, наибольший вклад вносят эозинофилы (сильная положительная корреляция 0.73) и индексы ИСГЭ и ИСЛЭ (сильная отрицательная корреляция -0.93 и -0.97 соответственно). Вторая главная компонента с собственным значением 79.44 описывает 21.27 % оставшейся дисперсии и имеет сильную положительную корреляцию с содержанием базофилов (0.81) и отрицательную корреляцию с содержанием гетерофилов (-0.88).

Показатели белой крови самок среднеазиатской черепахи разбросаны по факторному пространству и располагаются во всех квадрантах, что свидетельствует о более высокой экологической пластичности. Напротив, самцы более схожи по лейкоцитарному составу крови и объединяются в первом, третьем и четвертом квадрантах. Наибольший вклад в межполовую дискриминацию по лейкоцитарному профилю среднеазиатской черепахи вносят гранулоцитарные лейкоцитарные клетки (гетерофилы, базофилы и эозинофилы).

Обсуждение

Полученные данные иллюстрируют ведущую роль неспецифической защитной системы крови в ходе онтогенеза среднеазиатских черепах, что обеспечивает, по всей видимости, более устойчивое функционирование организма в условиях аридной зоны. Анализируя собственные результаты и данные литературы, можно сформулировать по крайней мере три обобщения. Во-первых, в крови самок выявлено повышенное содержание лимфоцитов по сравнению с самцами, что иллюстрировало активацию специфической иммунной системы организма. Во-вторых, лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ), который может рассматриваться как показатель сбалансированности иммунного ответа, у самцов был пониженным и отражал наличие относительной и (или) абсолютной лимфопении. Такая картина лейкоцитарной крови свидетельствует, с одной стороны, о намечающейся в организме самцов тенденции к незавершенности иммунных реакций, а с другой – о возможности активного иммунного ответа организма на комплекс экологических факторов среды обитания. В-третьих, более низкое значение индекса соотношения гетерофилов к лимфоцитам (ИСГЛ) у самок позволяет полагать, что в природных условиях аридной зоны по-

сле спаривания они испытывают меньший стресс и характеризуются большей стрессоустойчивостью по сравнению с самцами, что, по-видимому, объясняется повышенной активацией лимфоцитарно-зависимых иммунных реакций. Заметим, что в эволюции птиц низкое соотношение гетерофилов и лимфоцитов у таксонов, а соответственно, и высокая относительная доля лимфоцитов в циркулирующей крови рассматриваются как физиологический компонент медленного темпа жизни с высокой вероятностью выживания (Minias, 2019). По данным, взятым из наблюдений герпетологов в зоопарках и частных коллекциях, рекорд продолжительности жизни у среднеазиатской черепахи – 56 лет – принадлежит самкам при рекорде для самцов 49 лет (Cherepahi.ru, 2024). Возможно, большая продолжительность жизни самок связана с повышенным содержанием лимфоцитов в их крови.

В эритроцитах крови исследованных нами самцов и самок *T. horsfieldii* гемопаразиты не обнаружены, однако уменьшение соотношения гетерофилов и лимфоцитов в крови рептилий может быть вызвано и другими причинами, например, одновременным комплексным воздействием абиотических (патогены среды) и биотических (гельминты) факторов, что требует проведения дополнительных специальных популяционных исследований.

Заключение

Впервые получены базовые популяционные иммуногематологические характеристики природной популяции среднеазиатской черепахи *T. horsfieldii*, добавляющие новую информацию к знаниям о системе крови рептилий в условиях аридной зоны.

В лейкоцитарном профиле самок *T. horsfieldii* выявлено преобладание лимфоцитарно-зависимых иммунных реакций, проявляющихся более низким соотношением гетерофилов и лимфоцитов, а соответственно, и более высокой долей лимфоцитов в циркулирующей крови по сравнению с самцами. Самки характеризуются более высокой экологической пластичностью и стрессоустойчивостью по сравнению с самцами. Выявленные различия могут быть связаны как с половыми физиологическими особенностями вида, обусловленными активацией лимфоцитарно-зависимых иммунных реакций, так и носить сезонный характер. Для получения более точных характеристик половых различий лейкоцитарного

профиля среднеазиатских черепах требуется проведение дополнительного сравнительного экофизиологического анализа иммунного статуса самцов и самок в другие периоды сезонного цикла.

Выявлена статистически значительная положительная связь между содержанием в

крови гранулоцитов, а также значительная отрицательная связь между суммарным содержанием агранулоцитов за счет вклада лимфоцитов и длиной карапакса, что иллюстрировало преобладание неспецифических защитных иммунных реакций в онтогенезе среднеазиатских черепах.

Библиография

- Бондаренко Д. А. Итоги изучения распространения, систематики и экологии среднеазиатской черепахи, *Agrionemys horsfieldii* (Gray, 1844) (Testudines, Testudinidae) // Труды Института зоологии Республики Казахстан. Т. 1. Вып. 1. Алматы: Институт зоологии Республики Казахстан, 2021. С. 37–70.
- Романова Е. Б., Столярова И. А., Бакиев А. Г., Горелов Р. А. Сравнительный лейкоцитарный профиль и размерные характеристики клеток крови сухопутных черепах из Самарского зоопарка // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2023. Т. 25, № 5. С. 58–70. Cherepahi.ru. URL: <http://www.reptile-database.org> (дата обращения: 30.05.2024).
- International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. URL: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf (дата обращения: 30.05.2024).
- Knotkova Z., Doubek J., Knotek Z., Hajkova P. Blood Cell Morphology and Plasma Biochemistry in Russian Tortoises (*Agrionemys horsfieldi*) // Acta Veterinaria Brno. 2002. Vol. 71. P. 191–198.
- Minias P. Evolution of heterophil/lymphocyte ratios in response to ecological and life-history traits: A comparative analysis across the avian tree of life // Journal of Animal Ecology. 2019. Vol. 88. P. 554–565.

CENTRAL ASIAN TORTOISE *TESTUDO HORSFIELDII* GRAY, 1844 (REPTILIA: TESTUDINIDAE): ADAPTIVE BLOOD REACTIONS

ROMANOVA
Elena Borisovna

D.Sc., N.I.Lobachevsky National Research Nizhny Novgorod State University, 23 Gagarin Ave., Nizhny Novgorod 603950, Russia, romanova@ibbm.unn.ru

STOLYAROVA
Irina Alexandrovna

N.I.Lobachevsky National Research Nizhny Novgorod State University, 23 Gagarin Ave., Nizhny Novgorod 603950, Russia, irinaisto75@gmail.com

BAKIEV
Andrey Gennadyevich

Ph.D., Samara Federal Research Center RAS, 10 Komzin St., Togliatti, 445003, Russia, herpetology@list.ru

GORELOV
Roman Andreevich

Ph.D., Samara Federal Research Center RAS, 10 Komzin street, Togliatti, 445003, Russia, gorelov.roman@mail.ru

Keywords:

reptiles of the arid zone
leukocyte indices
peripheral blood
leukocyte formula of blood
Kazakhstan

Summary: To characterize the natural population of the Central Asian turtle *Testudo horsfieldii* from the Mangystau region of the Republic of Kazakhstan, a hematological approach was used. The leukocyte formula of the blood was assessed with the calculation of the leukocyte indices associated with it (lymphocyte-granulocyte, leukocyte shift, ratio of lymphocytes and eosinophils, ratio of heterophils and eosinophils, ratio of heterophils and lymphocytes). The method of multivariate analysis of variance revealed significant differences in the total leukocyte parameters of males (12 individuals) and females (22 individuals). Sex differences were manifested by an increased content of lymphocytes and the value of the lymphocyte-granulocyte index, as well as a decreased ratio of heterophils and lymphocytes in females. An increased value of the heterophils-lymphocytes ratio index in males indicates a stressful effect on them. In females, a moderate positive correlation was found between the length of the carapace and the content of granulocytes and eosinophils in their blood, and a negative correlation of that with the total content of agranulocytes due to the contribution of lymphocytes. In females, unlike males, lymphocyte-dependent immune reactions predominated. The principal components method was used to differentiate males and females with a more complete quantitative description of the leukocyte composition. The blood pattern and dynamics of its leukocyte indices reflect the active response of the body to a special complex of environmental factors of *T. horsfieldii* habitat in the arid zone.

Reviewer: V. L. Vershinin
V. A. Cherlin

Received on: 04 June 2024

Published on: 13 June 2024

References

- Bondarenko D. A. The results of studying the distribution, systematics and ecology of the Central Asian turtle, *Agrionemys horsfieldii* (Gray, 1844) (Testudines, Testudinidae), Trudy Instituta zoologii Respubliki Kazakhstan. T. 1. Vyp. 1. Almaty: Institut zoologii Respubliki Kazakhstan, 2021. P. 37–70.
- Cherepahi.ru. URL: <http://www.reptile-database.org> (data obrascheniya: 30.05.2024).
- International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. URL: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf (data obrascheniya: 30.05.2024).

- Knotkova Z., Doubek J., Knotek Z., Hajkova P. Blood Cell Morphology and Plasma Biochemistry in Russian Tortoises (*Agrionemys horsfieldi*), Acta Veterinaria Brno. 2002. Vol. 71. P. 191–198.
- Minias P. Evolution of heterophil/lymphocyte ratios in response to ecological and life-history traits: A comparative analysis across the avian tree of life, Journal of Animal Ecology. 2019. Vol. 88. P. 554–565.
- Romanova E. B. Stolyarova I. A. Bakiev A. G. Gorelov R. A. Comparative leukocyte profile and size characteristics of blood cells of land turtles from the Samara Zoo, Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossiyskoy akademii nauk. 2023. T. 25, No. 5. P. 58–70.