

Издатель

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

Научный электронный журнал

ПРИНЦИПЫ ЭКОЛОГИИ

<http://ecopri.ru>

№ 4 (46). Декабрь, 2022

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
В. Krasnov
А. 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

ПОПУЛЯЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ СИСТЕМЫ КРОВИ *EMYS ORBICULARIS* (REPTILIA: EMYDIDAE) ПРИ ИНВАЗИИ

РОМАНОВА
Елена Борисовна

доктор биологических наук, Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, romanova@ibbm.unn.ru

СТОЛЯРОВА
Ирина Александровна

бакалавр, Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, irinaisto75@gmail.com

БАКИЕВ
Андрей Геннадьевич

кандидат биологических наук, Самарский федеральный исследовательский центр РАН, herpetology@list.ru

ГОРЕЛОВ
Роман Андреевич

кандидат биологических наук, Самарский федеральный исследовательский центр РАН, gorelov.roman@mail.ru

Ключевые слова:

черепахи
лейкоцитарные индексы
периферическая кровь
лейкоцитарная формула
крови
гемопаразиты

Аннотация: Проведена оценка лейкоцитарного профиля крови и анализ зараженности гемопаразитами болотной черепахи *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) из Астраханской области России. В динамике двухлетних наблюдений в лейкоцитарных профилях болотной черепахи отмечено повышение относительного содержания гетерофилов (самцы) и снижение доли моноцитов (самцы, самки), возрастание индекса сдвига лейкоцитов (самцы, самки), понижение лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса (самцы), что иллюстрировало снижение реагирования иммунитета в целом и доминирующую роль гранулоцитов в неспецифических адаптивных реакциях организма. Доля пораженных эритроцитов, экстенсивность и интенсивность инвазии *Haemogregarina* spp. самок возросла, у самцов осталась на прежнем уровне. Выявлены половые различия в морфометрических параметрах инфицированных эритроцитов черепах. Площадь эритроцитов самцов значительно превышала аналогичный показатель самок, но не изменялась по сравнению с инфицированными клетками. Пораженные эритроциты самок отличались большей площадью и имели измененную форму. В крови инфицированных особей изменялось соотношение лейкоцитарных клеток в пользу гранулоцитов при уменьшении числа клеток лимфоцитарно-моноцитарного звена. Выявлена положительная слабая взаимосвязь между показателями инвазии и содержанием в периферической крови черепах эозинофилов, отрицательная слабая взаимосвязь с интегральными лейкоцитарными индексами соотношения лимфоцитов и гетерофилов к эозинофилам. Совокупность значений интегральных лейкоцитарных индексов отражала влияние паразита, при котором реактивность организма хозяина

не выходила за пределы нормальных значений. Установленная положительная умеренная корреляционная взаимосвязь между интенсивностью инвазии и длиной карапакса болотной черепахи позволяет прогнозировать более высокую интенсивность заражения в процессе онтогенетического развития рептилий.

© Петрозаводский государственный университет

Рецензент: В. А. Илюха

Получена: 03 июля 2022 года

Подписана к печати: 20 декабря 2022 года

Введение

Обширная область исследований посвящена изучению морфофизиологических адаптаций черепах к существованию на границе водной, наземной и воздушной среды (Wynneken et al., 2007). В дельту Волги заходит восточная часть ареала вида с таким образом жизни – болотной черепахи *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758), представленной здесь популяциями гаплоглинии I номинативного подвида *E. o. orbicularis* (Lenk et al., 1999; Дуйсебаева и др., 2019). В связи с нарастающими отклонениями сезонных температурных показателей и прессом антропогенной нагрузки особое внимание привлекает изучение эколого-физиологических механизмов адаптации черепах к новым формирующимся условиям, которые вызваны деградацией и загрязнением окружающей среды, болезнями или интродукцией инвазивных видов. Гематологические показатели являются индикаторами детерминантов окружающей среды (Alleman et al., 1992; Соколова и др., 1997; Вершинин, 2004; Павлов, 2019), а также ценными диагностическими инструментами при оценке состояния организма животных и изучении экофизиологического статуса организмов и популяций *in situ* (Davis et al., 2008; Perpignan, Sanchez, 2009). При этом весьма плодотворным методологическим подходом считается определение лейкоцитарной формулы крови с расчетом связанных с ней интегральных индексов. Ранее проведенными исследованиями в эритроцитах черепах *E. orbicularis* из природных популяций речных бассейнов Урала (Оренбургская область) и Волги (Астраханская область) обнаружены и идентифицированы гемопаразиты *Haemogregarina* spp. (Романова и др., 2021). В цикле работ, посвященных распространению и интенсивности инвазии водных черепах, выделяется два современных направления: во-первых, молекулярная идентификация (Ozvegy et al., 2015; Arizza et al., 2016) и морфология (Mihalca et al., 2002; Soares et al., 2014) гемопаразитов; во-вторых, иммуногематологический подход, позволяющий оценивать видоспецифиче-

ские адаптивные реакции и состояние иммунной системы организма системы крови черепах при инвазии с учетом гендерных, возрастных и биотопических различий. Следует отметить, что в рамках этого направления имеющиеся сведения о характере количественных изменений в крови черепах при заражении гемогрегаридами носят фрагментарный характер и зачастую противоречивы (Mihalca et al., 2002; Salakij et al., 2002; Ozvegy et al., 2015; Arizza et al., 2016). Кроме того, полностью отсутствуют динамические исследования по сравнительному анализу популяционных иммуногематологических характеристик водных черепах, обеспечивающих важнейшие гомеостатические функции организма. В этой связи задача отслеживания изменений направленности адаптивных реакций системы крови болотной черепахи в условиях естественных биотопов при инвазии является актуальной и необходимой как для теории, так и для решения практических природоохранных вопросов в области экофизиологии рептилий.

С учетом вышеизложенного целью работы являлся сравнительный анализ зараженности гемогрегаридами и лейкоцитарного профиля крови болотной черепахи *E. orbicularis* из Астраханской области в период двухлетних наблюдений (2020–2021 гг.).

Материалы

Объект исследования – особи *E. orbicularis*, добытые в окрестностях пос. Комсомольский Красноярского района Астраханской области, в слабопроточном озере на правом берегу р. Ахтуба. За два года было выловлено 108 особей: 48 особей (28 самок и 20 самцов) 27–29 августа 2020 г.; 60 особей (20 самок, 20 самцов и 20 молодых) 25–26 августа 2021 г. Проанализировано 204 гематологических препарата.

Работы проводили в соответствии с «Международными руководящими принципами для биомедицинских исследований на животных» (International Guiding..., 2012). Кровь у черепах брали путем прокола хвостовой вены. После взятия крови всех осо-

бей возвратили в места отлова.

Методы

Мазки крови (по два от каждой особи) готовили с помощью гематологического штапеля, высушивали на воздухе, затем фиксировали в спиртоэфирной смеси (1:1). Зафиксированные мазки хранили до окрашивания при комнатной температуре. Мазки окрашивали в течение 20 минут красителем Гимза азур-эозин по Романовскому (10–12-кратный раствор, фирма «Биолот», Россия), приготовленном на фосфатном буфере (рН 6.8–7.2). Готовые мазки просматривали на микроскопе «Meiji Techno», Япония, серия МТ 4000 с иммерсией, при увеличении $\times 1500$, с дифференцированным подсчетом лейкоцитов (Alleman et al., 1992; Соколина и др., 1997). По морфологическим особенностям определяли пять типов лейкоцитарных клеток (в %): гранулоциты (гетерофилы, базофилы, эозинофилы) и агранулоциты (моноциты, лимфоциты). Цифровые изображения препаратов выполняли камерой «Vision CAM» для тринокулярного микроскопа «Meiji Techno» (увеличение $\times 1500$).

На основании лейкоцитарной формулы крови рассчитали интегральные лейкоцитарные индексы в относительных единицах:

1) индекс сдвига лейкоцитов, ИСЛ = \sum гранулоцитов / \sum агранулоцитов;

2) индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов, ИСЛЭ = $L / Э$;

3) индекс соотношения гетерофилов и эозинофилов, ИСГЭ = $G / Э$;

4) лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс, ИЛГ = $L \times 10 / (Э + G + B)$;

5) индекс соотношения гетерофилов и лимфоцитов, ИСГЛ = G / L ,

где L – лимфоциты; $Э$ – эозинофилы; G – гетерофилы; B – базофилы.

Пол взрослых черепах определяли по внешним морфологическим признакам, у молодых особей половую принадлежность не устанавливали. Измеряли длину карапакса (в мм) черепах по его прямой средней линии от переднего края загривкового щитка до заднего конца шва между надхвостовыми щитками штангенциркулем.

Учет гемопаразитов проводили на 500 эритроцитов у каждой особи. Экстенсивность инвазии (E – количество особей вида, зараженных гемопаразитами, по отношению ко всему числу исследованных особей) рассчитывали по формуле: $E = (n / N) \times 100$ %. Среднюю интенсивность инвазии (I – количество паразитов, приходящихся в

среднем на одну черепаху) рассчитывали по формуле: $I = m / n$. Индекс обилия (ИО – количество гемопаразитов, приходящихся на одну исследованную особь) рассчитывали по формуле: $ИО = m / N$, где n – количество зараженных особей; m – количество обнаруженных гемопаразитов; N – количество исследованных особей хозяев.

Окуляр-микрометром проводили измерение диаметра лейкоцитарных клеток ($2r$), большой ($2a$) и малой ($2b$) осей здоровых и инфицированных эритроцитов. Площадь (мкм^2) клеток рассчитывали по формулам круга $S = \pi \times r^2$ или эллипса: $S = \pi \times a \times b$, где r – диаметр круга; a – большая полуось эллипса; b – малая полуось эллипса; $\pi = 3.14$.

Полученные первичные данные проверяли на соответствие нормальному распределению по специальным критериям Шапиро–Уилка, Лиллиефорса и Андерсона – Дарлинга. Ввиду несоответствия первичных данных нормальному распределению, центральные тенденции и рассеяние показателей описывали медианой (Me) и интерквартильным размахом (IQR). Многофакторным дисперсионным анализом с использованием лямбды Уилкса (λ Wilks) в качестве критериальной статистики оценивали влияние факторов (пола, возраста, зараженности, года взятия) на лейкоцитарные показатели; значимость отличий (p -значения) рассчитывали путем рандомизации с использованием перестановочной процедуры (Шитиков, Розенберг, 2014; Якимов, 2019). Данные сравнивали методами непараметрической статистики с расчетом критериев: Краскела – Уоллиса (H) (при множественном сравнении независимых групп по одному признаку), Данна (D) (множественный критерий при попарном сравнении групп), Манна – Уитни (u) при сравнении двух групп, Вилкоксона (w) при сравнении зависимых выборок, критерием z – при сравнении долей с поправкой Холма, при $\alpha = 0.007$, ранговым коэффициентом корреляции Спирмена (ρ) в пакете прикладных программ «Rstudio». За величину статистической значимости принимали $\alpha = 0.05$.

Результаты

Средняя длина карапакса половозрелых самок болотной черепахи составляла 137.25 ± 5.31 мм, самцов 155.00 ± 1.92 мм. Половых различий по этому показателю у взрослых болотных черепах не выявлено ($D = 2.07$, $p = 0.07$). У сеголеток он равен 90.50 ± 0.90 мм, что значительно меньше по сравнению с самками ($D = 6.10$, $p < 0.001$) и самцами ($D =$

8.18, $p < 0.001$). Самцы и самки болотной черепахи, добытые в разные годы, по средней длине карапакса не различались (самки: $w = 0.27$, $p = 0.77$; самцы $w = 0.57$, $p = 0.56$).

При дифференциации округлых лейкоцитарных клеток болотной черепахи с учетом расположения, наличия зернистости в цитоплазме и формы ядра окуляр-микрометром

измерили диаметр и рассчитали площадь клеток. Лейкоцитарные клетки самцов, за исключением эозинофилов, были крупнее аналогичных клеток самок и молодых особей. Самыми крупными лейкоцитами у всех особей являлись гетерофилы, самыми мелкими – лимфоциты (табл. 1).

Таблица 1. Морфометрия клеток лейкоцитарного ряда крови *Emys orbicularis* изученной популяции в 2021 г.

Показатели лейкограммы	1. Самцы половозрелые, n = 20		2. Самки половозрелые, n = 20		3. Сеголетки, n = 20		Статистические показатели	
	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR		
Гетерофилы	d	16	2	15	3	14	2	H = 42.298, $p < 0.001$ D1-2 = 4.725, $p < 0.001$ D1-3 = 6.233, $p < 0.001$
	S	201.06	50.27	176.71	68.33	153.94	43.98	
Эозинофилы	d	14	3	13	2.25	13	3	H = 3.970, $p = 0.137$
	S	153.94	63.62	132.73	46.53	132.73	63.62	
Базофилы	d	13	2	12	2	12	1	H = 25.890, $p < 0.001$ D1-2 = 3.404, $p = 0.001$ D1-3 = 4.977, $p < 0.001$
	S	132.73	40.84	113.1	37.7	113.1	18.06	
Моноциты	d	13	3	12	2	12	2	H = 37.811, $p < 0.001$ D1-2 = 5.477, $p < 0.001$ D1-3 = 5.160, $p < 0.001$
	S	132.73	63.62	113.1	37.7	113.1	37.7	
Лимфоциты	d	10	1	9	3	9	1	H = 25.332, $p < 0.001$ D1-2 = 3.723, $p < 0.001$ D1-3 = 4.795, $p < 0.001$
	S	78.54	14.92	63.62	31.22	63.62	13.35	

Примечание. *d* – диаметр клетки, мкм; *S* – площадь клетки, мкм²; *H* – критерий Краскела – Уоллиса; *D* – критерий Данна; *p* – достигнутый уровень значимости.

Значимо не различались параметры базофилов и моноцитов у самцов ($D = 0.62$, $p = 0.78$), самок ($D = 1.76$, $p = 0.13$) и молодых ($D = 0.89$, $p = 0.55$), а также диаметры и площади эозинофилов и моноцитов ($D = 0.83$, $p = 0.59$) в выборке самок.

В период начальных наблюдений (2020 г.) в лейкоцитарном профиле крови половозрелых болотных черепах значимые половые различия обнаружены по содержанию моноцитов, доля которых была выше в крови самцов (Романова и др., 2021). Неполовозрелых особей в этот период не анализировали.

Анализ лейкоцитарного состава крови в 2021 г. показал значимые половые различия по содержанию гранулоцитов: эозинофилов ($H = 28.58$, $p < 0.001$) и базофилов ($H = 8.30$, $p = 0.01$). Доля эозинофилов в крови самцов была значимо выше по сравнению с самками ($D = 2.85$, $p = 0.01$) и молодыми ($D = 5.32$, $p < 0.001$), доля базофилов меньше по сравнению с молодыми ($D = 2.75$, $p = 0.01$). Различие в количественном содержании эозинофилов в крови особей болотной

черепахи разного пола и возраста отразилось на интегральных лейкоцитарных показателях. Так, у неполовозрелых особей с низкой долей эозинофилов в крови индекс соотношения гетерофилов к эозинофилам (ИСГЭ) был выше по сравнению с самками ($D = 2.92$, $p = 0.01$) и самцами ($D = 5.17$, $p < 0.001$), а индекс соотношения лимфоцитов к эозинофилам (ИСЛЭ) выше по сравнению с самцами ($D = 5.10$, $p < 0.001$).

В динамике двухлетних наблюдений в лейкоцитарных профилях самцов болотной черепахи отмечено повышение относительного содержания гетерофилов и снижение доли моноцитов (табл. 2).

Интегральные индексы реактивности, дополняя друг друга, свидетельствовали о значимых изменениях в состоянии организма болотных черепах в наблюдаемый период времени, обусловленных комплексом внешних и внутренних экологических факторов, среди которых особая роль отводится гемопаразитам. Хорошо известно, что гемопротозойные одноклеточные рода *Haemogregarina* (Coccidia: Adeleorina:

Таблица 2. Изменение лейкоцитарного профиля самцов *Emys orbicularis* в течение 2020–2021 гг.

Показатели лейкограммы	Самцы 2020, <i>n</i> = 20		Самцы 2021, <i>n</i> = 20		Статистические показатели	
	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	Критерий Вилкоксона (<i>w</i>)	Уровень значимости (<i>p</i>)
Гетерофилы, %	11.50	9.50	15.00	13.00	2.56	0.01
Эозинофилы, %	12.00	7.50	13.00	11.50	1.48	0.13
Базофилы, %	21.50	13.50	20.50	7.50	0.63	0.52
Моноциты, %	10.00	8.00	6.00	3.00	4.70	0.000003
Лимфоциты, %	42.00	8.50	41.00	7.00	0.64	0.52
ИСЛ, отн. ед.	0.86	0.33	1.10	0.41	3.09	0.001
ИСЛЭ, отн. ед.	3.41	3.45	3.11	3.06	0.81	0.41
ИСГЭ, отн. ед.	1.15	0.91	1.08	1.38	0.90	0.36
ИЛГ, отн. ед.	9.29	3.38	6.54	3.03	2.28	0.02
ИСГЛ, отн. ед.	0.26	0.23	0.22	0.45	2.50	0.01

Примечание. Жирным выделены статистически значимые показатели.

В анализируемый период времени в крови самок обнаружено пониженное содержание моноцитов (табл. 3).

Таблица 3. Изменение лейкоцитарного профиля самок *Emys orbicularis* в течение 2020–2021 гг.

Показатели лейкограммы	Самки 2020, <i>n</i> = 28		Самки 2021, <i>n</i> = 20		Статистические показатели	
	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	Критерий Вилкоксона (<i>w</i>)	Уровень значимости (<i>p</i>)
Гетерофилы, %	12.00	10.00	17.00	7.50	1.89	0.05
Эозинофилы, %	10.50	10.00	8.00	9.50	0.73	0.46
Базофилы, %	23.50	10.00	24.00	10.00	1.86	0.06
Моноциты, %	7.50	3.00	4.00	3.00	3.24	0.001
Лимфоциты, %	45.00	11.00	38.00	9.50	1.08	0.27
ИСЛ, отн. ед.	0.88	0.37	1.11	0.31	2.27	0.02
ИСЛЭ, отн. ед.	4.15	5.40	4.90	6.24	0.04	0.96
ИСГЭ, отн. ед.	1.27	1.50	1.70	2.22	1.12	0.25
ИЛГ, отн. ед.	9.36	4.53	8.03	2.81	1.81	0.06
ИСГЛ, отн. ед.	0.24	0.25	0.38	0.27	1.47	0.13

Примечание. Жирным выделены статистически значимые показатели.

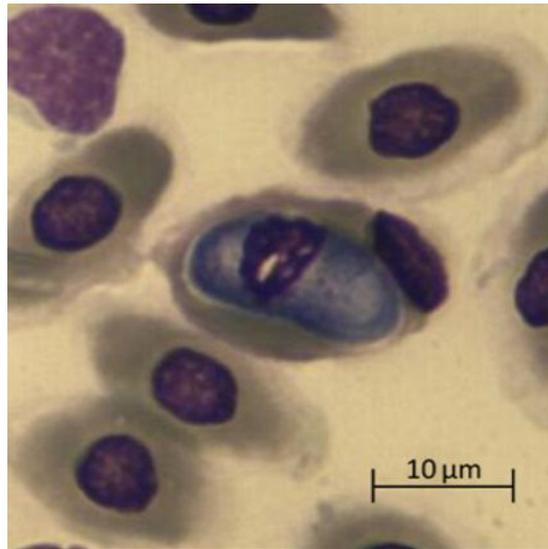
Haemogregarinidae) паразитируют в основном в организме эктотермных позвоночных, в т. ч. и черепаха (Данилевский, 1891; Финкельштейн, 1908; Мкртчян, 1966; Danilewsky, 1885; Segade et al., 2006; Zelmer, Platt, 2008; Adl et al., 2012; Dvorakova et al., 2014, 2015).

Проблема систематики гемогрегаринов не является предметом настоящей работы, но следует отметить, что морфология, внешний вид и форма гемогрегариновых паразитов (микрогометоцитов, макрогаметоцитов и трофозоитов, расположенных внутри эритроцитов зараженных особей) позволила отнести их к роду *Haemogregarina* из семейства Haemogregarinidae (Mihalca et al., 2002; Telford, 2009; Soares et al., 2014; Arizza et al., 2016). Расположенные в эритроцитах черепахи микрогометоциты имели бобовидную

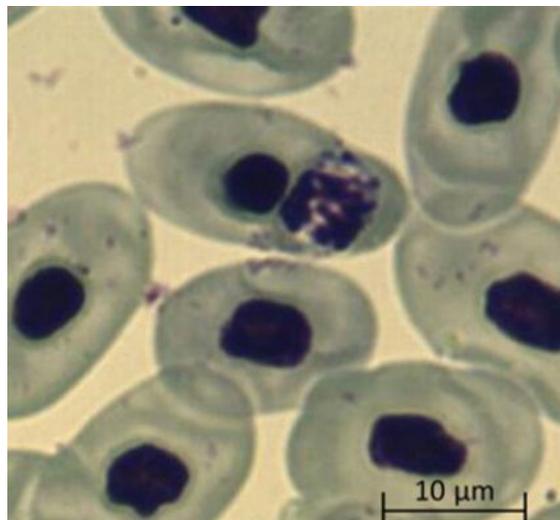
форму и большое центральное ядро (рисунок, а), макрогаметоциты имели овальную форму с зернистыми ядрами и располагались вблизи ядра эритроцита (рисунок, б). Зрелые трофозоиты U-образной формы смещали ядро эритроцитов в полярное положение и превышали его размеры (рисунок, в).

Многомерный дисперсионный анализ лейкоцитарного состава крови здоровых и инфицированных половозрелых самцов и самок, добытых в Астраханской области за два года (табл. 4), выявил значимое влияние таких факторов, как: пол (λ Wilks = 0.879, p = 0.005), год добычи (λ Wilks = 0.685, p = 0.002), и их взаимодействия (λ Wilks < 0.001, p = 0.001). Эффект фактора инфицированности гемопаразитами оказался не значимым (λ Wilks = 0.981, p = 0.731).

а



б



в



Микрофотографии паразитарных форм *Haemogregarina* spp., выполненные камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno ($\times 1500$): а – макрогаметоциты; б – микрогаметоциты; в – трофозоиты

Micrographs of parasitic forms of *Haemogregarina* spp. made by the Vision CAM camera for the Meiji Techno trinocular microscope ($\times 1500$): а – macrogametocytes; б – microgametocytes; в – trophozoites

Таблица 4. Лейкоцитарный состав крови здоровых и инфицированных половозрелых самцов и самок болотной черепахи разных лет взятия (2020–2021 гг.)

Показатели лейкограммы	Самцы				Самки			
	Здоровые		Инфицированные		Здоровые		Инфицированные	
	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR
2020 год								
Гетерофилы, %	6.00	7.00	12.00	8.00	9.00	4.00	13.50	11.00
Эозинофилы, %	12.00	6.00	12.00	9.00	12.00	10.00	12.00	7.50
Базофилы, %	28.00	12.00	21.00	12.00	25.00	8.00	20.00	10.00
Моноциты, %	12.00	7.00	10.00	7.00	7.00	2.00	9.70	4.50
Лимфоциты, %	44.00	4.00	42.00	9.00	47.00	8.00	42.00	11.50
Гранулоциты, % от лейкоцитов	49.00	11.00	46.00	9.00	47.00	10.00	48.50	11.50
Агранулоциты, % от лейкоцитов	51.00	11.00	54.00	9.00	53.00	10.00	51.50	11.00
2021 год								
Гетерофилы, %	22.00	8.00	15.00	13.00	22.50	4.50	16.50	7.00
Эозинофилы, %	11.00	4.00	13.50	13.00	17.00	22.00	8.00	8.50
Базофилы, %	27.00	8.00	20.00	7.00	20.00	12.50	24.00	9.50
Моноциты, %	2.50	3.00	6.00	3.00	4.50	4.00	6.00	3.00
Лимфоциты, %	37.50	1.00	41.50	8.00	34.00	2.00	44.50	9.00
Гранулоциты, % от лейкоцитов	60.00	4.00	52.00	8.00	60.00	5.00	52.00	6.50
Агранулоциты, % от лейкоцитов	40.00	4.00	48.00	8.00	40.00	5.00	48.50	6.50

В литературе имеются сведения о гипертрофии и изменении формы инфицированных гемогрегаринами эритроцитов черепах (Mihalca et al., 2002; Ozvegy et al., 2015; Arizza et al., 2016). Проведенный сравнительный морфометрический анализ выявил половые различия в параметрах инфицированных эритроцитов. Так, площадь эритроцитов без паразитов самцов статистически значимо превышала аналогичный показатель самок ($z = 2.74$, $p = 0.003$), но не изменялась по сравнению со здоровыми клетками ($z = 1.42$, $p = 0.92$). Пораженные эритроциты самок болотной черепахи имели большую площадь ($z = 2.11$, $p = 0.02$) и были слегка расширены ($z = 4.15$, $p = 0.0001$), в отличие от здоровых эритроцитов (табл. 6).

Отметим, что в эритроцитах отдельной особи (как самцов, так и самок) встречались гемопаразиты на разных стадиях развития (например, макрогаметы и трофозоиты). Можно полагать, что морфометрические различия в параметрах инфицированных эритроцитов могут быть обусловлены не только половой принадлежностью, но и стадией развития гемогрегариновых паразитов

или их количеством в клетке. Однако это предположение требует специального дополнительного объемного паразитологического анализа.

Показатели заражения болотных черепах *Haemogregarina* spp. в 2021 г. статистически значимо отличались от значений 2020 г. Межгодовые различия по суммарному популяционному показателю заражения гемогрегаринами свидетельствовали о повышении доли инфицированных эритроцитов ($z = 9.84$, $p < 0.001$) в крови болотных черепах. При этом существенно выросла доля зараженных клеток в крови самок ($z = 9.11$, $p < 0.001$) в отличие от самцов, у которых интенсивность инвазии и доля пораженных эритроцитов ($z = 1.94$, $p = 0.1$) оставались на прежнем уровне (табл. 7).

Более мелкие молодые особи отличались от самцов и самок более низкой зараженностью гемопаразитами. Проведенный анализ выявил значимое различие в количестве эритроцитов с паразитами у молодых по сравнению со взрослыми самками ($z = 10.63$, $p < 0.001$) и самцами ($z = 8.44$, $p < 0.001$). Отметим, что экстенсивность инвазии и доли

Таблица 6. Морфометрические параметры эритроцитов *Emys orbicularis* (Me / IQR)

Пол черепах	Эритроциты крови	a, мкм	b, мкм	a / b	S, мкм ²
Самки	1. Без паразитов, n = 100	20.00 / 2.00	12.00 / 1.00	1.73 / 0.32	188.50 / 33.97
	2. С паразитами, n = 100	20.00 / 2.50	13.00 / 3.00	1.53 / 0.50	197.92 / 54.98
Самцы	3. Без паразитов, n = 100	20.00 / 2.00	12.00 / 2.00	1.73 / 0.37	197.92 / 44.77
	4. С паразитами, n = 100	20.00 / 2.00	12.00 / 2.00	1.70 / 0.51	193.99 / 36.91
Статистические показатели		H = 13.15, p < 0.001; D2-3 = 3.56, p = 0.003	H = 19.58, p < 0.001; D1-2 = 4.39, p < 0.001	H = 20.42, p < 0.001; D1-2 = 4.05, p < 0.001; D2-3 = 3.60, p = 0.001; D2-4 = 3.23, p < 0.001	H = 8.31, p = 0.04; D1-2 = 2.11, p = 0.02; D1-3 = 2.74, p = 0.003
В целом по выборке	Без паразитов, n = 200	20.00 / 1.00	12.00 / 2.00	1.73 / 0.32	188.50 / 34.56
	С паразитами, n = 200	20.00 / 3.00	12.00 / 3.00	1.66 / 0.49	193.99 / 43.20
Статистические показатели:		u = 22283, p = 0.04	u = 16923, p = 0.007	u = 23610, p = 0.002	u = 19025, p = 0.40

Примечание. *a* – длина большой оси; *b* – длина малой оси; *S* – площадь клетки; *n* – количество просмотренных клеток; *H* – критерий Краскела – Уоллиса; *D* – критерий Данна; *u* – критерий Манна – Уитни.

эритроцитов с гемогрегаринами в крови самок и самцов в 2021 г. не различались ($z = 2.56, p > 0.007$).

Для определения направленности адаптивных реакций организма при инвазии был проведен сравнительный анализ индексов реактивности здоровых особей и инфицированных гемогрегаринами. У самок болотных черепах при инвазии гемопаразитами выявлено возрастание индексов ИСГЭ ($D = 2.40, p = 0.04$) и ИСГЛ ($D = 2.58, p = 0.02$) за счет изменения соотношения гранулоцитарных лейкоцитарных компонентов, что иллюстрировало существенные различия в адаптивных механизмах организма на уровне системы крови. У инвазионных самцов в динамике наблюдаемого периода наблюдалось возрастание ИСЛ ($D = 2.78, p = 0.01$), что свидетельствовало о преобладающей роли гранулоцитов в формировании адаптивного иммунного ответа организма (табл. 8).

Значимые значения ($p < 0.05$) корреляционных коэффициентов для самок черепах иллюстрировали снижение

суммарного содержания гранулоцитов ($\rho = -0.46$) за счет вклада гетерофилов ($\rho = -0.32$), повышение содержания агранулоцитов ($\rho = 0.39$) за счет вклада лимфоцитов ($\rho = 0.35$) (табл. 9). Для самцов и молоди болотной черепахи в отличие от самок корреляционной взаимосвязи гематологических показателей и наличия гемопаразитов не обнаружено.

Значимые значения ($p < 0.05$) корреляционных коэффициентов для самок черепах иллюстрировали снижение суммарного содержания гранулоцитов ($\rho = -0.46$) за счет вклада гетерофилов ($\rho = -0.32$), повышение содержания агранулоцитов ($\rho = 0.39$) за счет вклада лимфоцитов ($\rho = 0.35$) (табл. 9). Для самцов и молоди болотной черепахи в отличие от самок корреляционной взаимосвязи гематологических показателей и наличия гемопаразитов не обнаружено.

В целом по выборке выявлена положительная слабая взаимосвязь между показателями инвазии и содержанием в периферической крови эозинофилов ($\rho = 0.21$), а также отрицательная слабая взаимосвязь с

Таблица 7. Зараженность болотных черепах из Астраханской области гемогрегаринами

Выборки	Число зараженных особей	Число паразитов на 500 эритроцитов	Доля клеток с паразитами	E, %	I, отн. ед.	ИО, отн. ед.
2020 г.						
Самки (n = 23)	9	32	0.064	39.13	3.55	1.39
Самцы (n = 19)	14	82	0.164	73.68	5.85	4.31
В целом по выборке (n = 42)	23	114	0.228	54.76	4.95	2.71
2021 г.						
Самки (n = 20)	18	141	0.282	90	7.42	7.05
Самцы (n = 20)	19	106	0.212	95	5.88	5.3
Молодые (n = 20)	8	18	0.036	40	2.25	0.9
В целом по выборке (n = 60)	45	265	0.530	75	5.88	4.41

интегральными лейкоцитарными индексами ИСЛЭ ($\rho = -0.21$) и ИСГЭ ($\rho = -0.22$).

Обсуждение

Сравнительный анализ данных лейкоцитарного профиля крови болотной черепахи выявил количественно-качественные изменения в иммуногематологических показателях, направленные на адаптивный ответ и обеспечивающие функционирование организма. При изучении динамики интегральных лейкоцитарных индексов реактивности организма обращает на себя внимание возрастание индекса ИСЛ у самцов и самок, что иллюстрировало снижение реагирования иммунитета в целом и доминирующей роли гранулоцитов в неспецифических адаптивных реакциях организма. Отметим, что у самцов, но не у самок, одновременно отмечено и понижение ИЛГ, что может свидетельствовать о недостаточном ресурсе реакций специфического иммунитета. При этом отсутствие возрастания индекса ИСГЛ характеризует достаточную реактивность активного ответа организма на комплекс факторов среды, в т. ч. с учетом инвазии.

Анализ динамики интегральных лейкоцитарных индексов болотных черепах исследованной выборки позволяет заключить, что при поражении гемогрегаринами в организме инфицированных особей происходит изменение соотношения лейкоцитарных клеток. По всей видимости, отставание в реагировании на внедрение гемопаразитов со стороны моноцитов (самцы и самки) приводит, с одной стороны, к запаздыванию фазы завершеного фагоцитоза, а с другой – к поздней активации лимфоцитов как эффекторного звена иммунного ответа организма

хозяина, что обеспечивает более благоприятные условия для существования паразитарных форм *Haemogregarina* spp. Отметим, что ИЛГ находился в пределах нормальных значений у здоровых и инфицированных черепах. Этот индекс рассматривается как показатель сбалансированности реакции крови на заражение и на фоне незначительного повышения индекса ИСГЛ отражает влияние паразита, когда реактивность организма хозяина не выходит за пределы нормальных значений. Выявленная корреляционная взаимосвязь между показателями инвазии и возрастанием в крови количества эозинофилов подтверждает факт участия эозинофилов в иммунном ответе черепах против паразитарных форм *Haemogregarina* spp., что поддерживается и другими исследованиями (Mihalca et al., 2002).

Виды рода *Haemogregarina* spp. являются внутриэритроцитарными паразитами, имеют сложный жизненный цикл, который включает мерогонию и образование гаметоцитов в организме промежуточного хозяина (черепаха), а также гамогонию и спорогонию в кишечнике окончательного хозяина (пиявка, беспозвоночный переносчик) (Telford, 2009). Зараженные *Haemogregarina* spp. пиявки передают мерозоиты черепахам (Paperna, 1989; Siddall, Desser, 2001). Первичная мерогония происходит в легких, печени и селезенки промежуточного хозяина. Вторичная мерогония имеет место в эритроцитах, где формируются различные паразитарные стадии, в т. ч. и гамонты (Ozvegy et al., 2015).

Несмотря на существующее мнение о непатогенности гемогрегарин для черепах (Финкельштейн, 1908; Мкртчян, 1966;

Таблица 8. Значение лейкоцитарных индексов здоровых болотных черепах и при инвазии гемопаразитами

Лейкоцитарный индекс, отн. ед.	1. Без инвазии		При инвазии				Статистические показатели
	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	2. 2020 г.		3. 2021 г.		
			<i>Me</i>	<i>IQR</i>	<i>Me</i>	<i>IQR</i>	
Самки							
ИСЛ	0.88	0.34	0.94	0.45	1.08	0.28	$H = 2.06,$ $p = 0.35$
ИСЛЭ	4.41	6.40	4.19	3.92	5.14	6.02	$H = 2.30,$ $p = 0.31$
ИСГЭ	0.83	1.50	1.47	1.60	1.70	1.69	$H = 6.04,$ $p = 0.04$ $D_{1-3} = 2.40,$ $p = 0.04$
ИЛГ	9.56	3.51	9.03	4.18	8.33	2.85	$H = 1.56,$ $p = 0.45$
ИСГЛ	0.21	0.26	0.45	0.30	0.35	0.21	$H = 7.40,$ $p = 0.02$ $D_{1-3} = 2.58,$ $p = 0.02$
Самцы							
ИСЛ	1.00	0.68	0.85	0.31	1.08	0.34	$H = 8.99,$ $p = 0.01$ $D_{2-3} = 2.98,$ $p = 0.008$
ИСЛЭ	3.66	3.62	3.33	3.18	3.11	3.10	$H = 1.62,$ $p = 0.44$
ИСГЭ	1.20	1.58	1.22	1.08	1.05	1.33	$H = 1.16,$ $p = 0.92$
ИЛГ	8.57	5.06	9.50	3.27	8.00	3.25	$H = 2.69,$ $p = 0.25$
ИСГЛ	0.21	0.48	0.28	0.22	0.34	0.43	$H = 3.61,$ $p = 0.16$
В целом по выборке							
ИСЛ	0.94	0.43	0.88	0.42	1.08	0.34	$H = 8.87,$ $p = 0.01$ $D_{2-3} = 2.78,$ $p = 0.01$
ИСЛЭ	4.02	5.55	3.50	3.63	4.36	4.53	$H = 0.70,$ $p = 0.70$
ИСГЭ	0.95	1.35	1.25	1.50	1.40	1.75	$H = 2.88,$ $p = 0.23$
ИЛГ	9.19	4.58	9.09	3.84	9.07	2.94	$H = 2.90,$ $p = 0.23$
ИСГЛ	0.21	0.35	0.30	0.20	0.34	0.29	$H = 9.69,$ $p = 0.007$ $D_{1-3} = 3.10,$ $p = 0.005$

Примечание. Жирным выделены статистически значимые показатели.

Таблица 9. Анализ взаимосвязи интенсивности инвазии с лейкоцитарным профилем крови болотной черепахи коэффициентом ранговой корреляции Спирмена (ρ)

Показатель	Самцы	Самки	Сеголетки	Вся выборка
Гетерофилы, %	0.15	-0.32	0.11	-0.13
Эозинофилы, %	0.04	-0.20	0.10	0.21
Базофилы, %	-0.08	0.12	-0.04	-0.13
Моноциты, %	0.14	0.15	0.17	0.13
Лимфоциты, %	-0.18	0.35	-0.18	-0.04
ИСЛ, отн ед.	0.14	-0.43	0.12	-0.03
ИСЛЭ, отн ед.	-0.04	0.22	-0.15	-0.21
ИСГЭ, отн ед.	0.01	0.07	-0.08	-0.22
ИЛГ, отн. ед.	-0.16	0.41	-0.15	-0.01
ИСГЛ, отн. ед.	0.18	-0.33	0.12	-0.09

Mihalca et al., 2002; Perpignan, Sanchez, 2009) и их слабой связи с организмом хозяина (Данилевский, 1891; Soares et al., 2014), появляется все больше фактов, свидетельствующих о серьезных последствиях, происходящих в эритроцитах рептилий после внедрения в них паразитов, связанных с интенсификацией метаболизма и функциональной нагрузки эритроцита (Бейер, Сидоренко, 1972), изменением значения гематокрита, уменьшением числа эритроцитов и уровня гемоглобина (Thrall et al., 2004; Stacy et al., 2011; Ozvegy et al., 2015). Эритроциты являются постоянной составной частью микроокружения иммунокомпетентных клеток, следует отметить их роль в регуляции и реализации иммунного ответа. Способность эритроцитов сорбировать, концентрировать и модифицировать различные биологические активные вещества (антигены, медиаторы, гормоны) и оказывать воздействие на лимфопролиферацию, представляя их лимфоцитам, является важным звеном механизма регуляции иммуногенеза в естественных условиях, при стрессе и патологии (Васильев, 1975; Прокопенко, Сипливая, 1992; Кирдей, Дмитриева, 1995). Эритроциты рептилий вследствие их интенсивной метаболической активности служат прекрасным модельным объектом для изучения взаимоотношений паразита и хозяина на клеточном уровне (Бейер, Сидоренко, 1972). Можно полагать, что выявленные морфометрические параметры эритроцитов при инвазии, отражающие направленное изменение размеров клеток, по всей видимости, являются лишь внешней формой выражения происходящих в метаболизме клеток отклонений, направленных на обеспечение существования паразита в крови черепах до момента попадания в организм окончательного хозяина.

Заражение паразитами в популяции нарастает, о чем свидетельствуют суммарные популяционные показатели инвазии. Положительная умеренная корреляционная взаимосвязь между интенсивностью инвазии и длиной карапакса болотной черепахи ($\rho = 0.36$, $p < 0.05$) позволяет прогнозировать более высокую зараженность в процессе онтогенетического развития рептилий. На динамику передачи гемопаразитов на черепах, скорее всего, влияют сезонные колебания уровня воды в бассейне Нижней Волги. Перемещение и пребывание болотных черепах в районах затопления, по всей видимости, может увеличивать возможность заражения черепах через пиявок, чему способствует избыточное увлажнение и застойный водный режим (Sawyer, 1986).

Заключение

Проведенный сравнительный анализ адаптивных реакций системы крови и морфометрических показателей клеток крови болотной черепахи из Астраханской области показал, что пути адаптации на уровне системы крови к комплексу факторов среды, включая инвазию гемопаразитами, имеют существенные половые различия и временную динамику, иллюстрируя снижение реагирования иммунитета в целом и доминирующую роль гранулоцитов в адаптивных реакциях организма. Изучена зараженность болотных черепах гемопаразитами *Haemogregarina* spp. Показано возрастание суммарных популяционных показателей инвазии за двухлетний период, преимущественно за счет заражения самок. Высокая и нарастающая инвазия болотных черепах гемопаразитами свидетельствует о стабильном цикле передачи инфекции в Астраханской области. Для получения точных харак-

теристик и особенностей жизненного цикла гемогрегаринов в крови болотных черепах и ответа на вопрос о влиянии кровепаразитов на организм хозяина требуется проведение специального дополнительного паразитологического исследования и сравнительного экофизиологического анализа иммунного статуса инфицированных особей.

Библиография

- Бейер Т. В., Сидоренко Н. В. Цитохимическое исследование гемогрегаринов рептилий Армении. II. Сдвиги в содержании гемоглобина и общих белков в эритроцитах скальных ящериц, зараженных гемогрегаринами // Паразитология. 1972. Т. VI. Вып. 4. С. 385–390.
- Васильев Н. В. Очерки о роли кроветворной ткани в антителообразовании. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1975. 302 с.
- Вершинин В. Л. Гемопоз бесхвостых амфибий – специфика адаптациогенеза видов в современных экосистемах // Зоологический журнал. 2004. Т. 83, № 11. С. 1367–1374.
- Данилевский В. Я. Исследования по сравнительной паразитологии крови. Зоопаразиты крови у пресмыкающихся. Т. 2. Харьков, 1891. 145 с.
- Дуйсебаева Т. Н., Доронин И. В., Малахов Д. В., Кукушкин О. В., Бакиев А. Г. ГИС-анализ распространения и условий обитания *Emys orbicularis orbicularis* (Testudines, Emydidae): методические аспекты // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2019. № 1. С. 28–40. DOI: 10.21685/2307-9150-2019-1-4.
- Кирдей Е. Г., Дмитриева Л. А. Роль эритроцитов в регуляции и реализации иммунного ответа // Сибирский медицинский журнал. 1995. Т. 4, № 3. С. 5–8.
- Мкртчян З. А. Материалы к изучению паразитов крови рептилий Армении // Биологический журнал Армении. 1966. Т. XIX, № 10. С. 92–100.
- Павлов А. В. Ключевые моменты гематологии рептилий: особенности оценки лейкоцитарной части крови // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2019. № 1. С. 138–152. DOI: 10.21685/2307-9150-2019-1-14.
- Прокопенко Л. Г., Сипливая Л. Е. Эритроциты как модуляторы иммунологических реакций // Успехи физиологических наук. 1992. Т. 23, № 4. С. 89–106.
- Романова Е. Б., Столярова И. А., Бакиев А. Г., Горелов Р. А. Сравнительный лейкоцитарный профиль *Emys orbicularis* (Reptilia: Emydidae) из двух популяций // Современная герпетология. 2021. Т. 21, № 1/2. С. 30–42. DOI: 10.18500/1814-6090-2021-21-1-2-30-42.
- Соколова Ф. М., Павлов А. В., Юсупов Р. Х. Гематология пресмыкающихся: Методическое пособие по курсу герпетологии, большому практикуму и спецсеминарам. Казань: Казан. гос. ун-т, 1997. 31 с.
- Финкельштейн Н. Я. Чужеродные крови холоднокровных Кавказа // Архив Биологических Наук. 1908. Т. 13. Вып. 2. С. 132–164.
- Шитиков В. К., Розенберг Г. С. Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. Тольятти: Кассандра, 2014. 314 с.
- Якимов В. Н. Основы анализа биомедицинских и экологических данных в среде R. Часть 2: Учебное пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2019. 168 с.
- Adl S. M., Simpson A. G. B., Heiss A., Lane C. E., Lukeš J., Bass D., Bowser S. S., Brown M. W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Hoppenrath M., Lara E., Mitchell E. A. D., Gall L. L., Lynn D. H., Mcmanus H., Mozley-Stanridge S. E., Parfrey L. W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Spiegel F. W., Schoch C. L., Smirnov A. The revised classification of eukaryotes // Journal of Eukaryotic Microbiology. 2012. Vol. 59. Issue 5. P. 429–493. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.
- Alleman A. R., Jacobson E. R., Raskin R. E. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) // American Journal of Veterinary Research. 1992. Vol. 53. P. 1645–1651.
- Arizza V., Sacco F., Russo D., Scardino R., Arculeo M., Vamberger M., Marrone F. The good, the bad and the ugly: *Emys trinacris*, *Placobdella costata*, and *Haemogregarina stepanowi* in Sicily (Testudines, Annelida, and Apicomplexa) // Folia Parasitologica. 2016. Vol. 63: 029. DOI: 10.14411/fp.2016.029.
- Danilewsky B. Die Hämatozoën der Kaltblüter // Archiv für Mikroskopische Anatomie. 1885. Band 24. S. 588–598.
- Davis A. K., Maney D. L., Maerz J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists // Functional Ecology. 2008. Vol. 22. P. 760–767. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x.
- Dvořáková N., Kvičerová J., Hostovský M., Široký P. Haemogregarines of freshwater turtles from Southeast Asia with a description of *Haemogregarina sacaliae* sp. n. and a redescription of *Haemogregarina pellegrini* Laveran and Pettit, 1910 // Parasitology. 2015. Vol. 145. Issue 6. P. 816–826. DOI: 10.1017/S0031182014001930.
- Dvořáková N., Kvičerová J., Papoušek I., Javanbakht H., Tiar G., Kami H., Široký P. Haemogregarines from

- western Palaearctic freshwater turtles (genera *Emys*, *Mauremys*) are conspecific with *Haemogregarina stepanowi* Danilewsky, 1885 // *Parasitology*. 2014. Vol. 141. Issue 4. P. 522–530. DOI: 10.1017/S0031182013001820.
- International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. 2012. URL: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf (дата обращения: 27.05.2022).
- Lenk P., Fritz U., Joger U., Wink M. Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) // *Molecular Ecology*. 1999. Vol. 8. Issue 11. P. 1911–1922.
- Mihalca A., Achelaritei D., Popescu P. Haemoparasites of the genus *Haemogregarina* in a population of European pond turtles (*Emys orbicularis*) from Drăgășani, Vâlcea county, Romania // *Scientia Parasitologica*. 2002. Vol. 2. P. 22–27.
- Özvey J., Marinković D., Vučićević M., Gajić B., Stevanović J., Krnjaić D., Aleksić-Kovačević S. Cytological and molecular identification of *Haemogregarina stepanowi* in blood samples of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) from quarantine at Belgrade Zoo // *Acta Veterinaria-Beograd*. 2015. Vol. 65, No 4. P. 443–453. DOI: 10.1515/acve-2015-0037.
- Paperna I. Developmental cycle of chelonian haemogregarines in leeches with extra-intestinal multiporozoite oocysts and a note on the blood stages in the chelonian hosts // *Diseases of Aquatic Organisms*. 1989. Vol. 7. P. 149–153.
- Perpiñán D., Sánchez C. Morphologic and Cytochemical Characteristics of Blood Cells from the European Pond Turtle (*Emys orbicularis*) and the Mediterranean Pond Turtle (*Mauremys leprosa*) // *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 2009. Vol. 19. No 4. P. 119–127.
- Salakij C., Salakij J., Suthunmapinunta P., Chanhom L. Hematology, Morphology and Ultrastructure of Blood Cells and Blood Parasites from Puff-faced Watersnakes (*Homalopsis buccata*) // *Kasetsart Journal – Natural Science*. 2002. Vol. 36. P. 35–43.
- Sawyer R. T. Leech biology and behavior. Vol. 3. Oxford: Oxford University Press; Clarendon Press, 1986. 240 p.
- Segade P., Crespo C., Ayres C., Cordero A., Arias M. C., García-Estévez J. M., Iglesias Blanco R. *Eimeria* species from the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Reptilia: Testudines), in Galicia (NW Spain), with description of two new species // *Journal of Parasitology*. 2006. Vol. 92. Issue 1. P. 69–72. DOI: 10.1645/GE-3491.1.
- Siddall M. E., Desser S. S. Transmission of *Haemogregarina balli* from painted turtles to snapping turtles through the leech *Placobdella ornata* // *Journal of Parasitology*. 2001. Vol. 87. Issue 5. P. 1217–1218. DOI: 10.1645/0022-3395(2001)0872.0.CO.
- Soares P., de Brito E. S., Paiva F., Pavan D., Viana L.A. *Haemogregarina* spp. in a wild population from *Podocnemis unifilis* Troschel, 1848 in the Brazilian Amazonia // *Parasitology Research*. 2014. Vol. 113. P. 4499–4503. DOI: 10.1007/s00436-014-4139-7.
- Stacy N. I., Alleman A. R., Saylor K. A. Diagnostic hematology of reptiles // *Clinics in Laboratory Medicine*. 2011. Vol. 3. P. 87–108. DOI: 10.1016/j.cll.2010.10.006.
- Telford Jr. S. R. Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text. New York: CRC Press, 2009. 376 p.
- Thrall M. A., Dale C., Baker E., Lassen E. D. Hematology of reptiles // *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Pennsylvania, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. P. 259–276.
- Wyneken J., Bels V. L., Godfrey M. H. Biology of Turtles. Boca Raton: CRC Press, 2007. 408 p.
- Zelmer D. A., Platt T. R. Structure and similarity of helminth communities of six species of Australian turtles // *Journal of Parasitology*. 2008. Vol. 94. Issue 4. P. 781–787. DOI: 10.1645/GE-1487.1.

POPULATION-ECOLOGICAL ASPECTS OF ADAPTIVE REACTIONS OF THE *EMYS ORBICULARIS* (REPTILIA: EMYDIDAE) BLOOD SYSTEM DURING INVASION

ROMANOVA
Elena Borisovna

D.Sc., Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
romanova@ibbm.unn.ru

STOLYAROVA
Irina Alexandrovna

Bachelor, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
irinaisto75@gmail.com

BAKIEV
Andrey Gennadievich

Ph.D., Samara Federal Research Center of RAS, herpetology@list.ru

GORELOV
Roman Andreevich

Ph.D., Samara Federal Research Center of RAS, gorelov.roman@mail.ru

Keywords:

turtles
leukocytal index
peripheral blood
WBC (white blood cells)
leukocyte blood formula
hemoparasites

Summary: We carried out the assessment of the leukocyte profile of the blood and the analysis of infection with hemoparasites of the European swamp turtle *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) of the Astrakhan oblast of Russia. In the dynamics of two-year observations in the leukocyte profiles of the European swamp turtle, we noted an increase in the relative content of heterophiles (males) and a decrease in the proportion of monocytes (males, females), an increase in the leukocyte shift index (males, females), a decrease in the lymphocyte-granulocyte index (males). These results illustrate a decrease in the immune response in general and the dominant role of granulocytes in nonspecific adaptive reactions of the organism. The proportion of affected erythrocytes, the extent and intensity of invasion of *Haemogregarina* spp. in females increased, in males it remained at the same level. Gender differences in morphometric parameters of infected red blood cells of turtles were revealed. The area of red blood cells of males significantly exceeded that of females, but did not change in comparison with infected cells. The affected erythrocytes of females differed by a larger area and had a modified shape. In the blood of infected individuals, the ratio of leukocyte cells changed in favor of granulocytes with a decrease in the number of agranulocytes. A positive relationship was revealed between the indicators of invasion and the content of eosinophils in the peripheral blood of turtles, as well as a negative relationship with the integral leukocyte indices of the ratio of lymphocytes and heterophiles to eosinophils. The totality of the values of the integral leukocyte indices reflected the influence of the parasite, in which the reactivity of the host organism did not exceed the normal values. The revealed positive moderate correlation between the intensity of invasion and the length of the swamp turtle's carapace makes it possible to predict a higher intensity of infection during the ontogenetic development of reptiles.

Reviewer: V. A. Ilucha

Received on: 03 July 2022

Published on: 20 December 2022

References

Özvegy J., Marinković D., Vučićević M., Gajić B., Stevanović J., Krnjaić D., Aleksić-Kovačević S. Cytological and molecular identification of *Haemogregarina stepanowi* in blood samples of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) from quarantine at Belgrade Zoo, *Acta Veterinaria-Beograd*. 2015. Vol. 65, No 4. P. 443–453. DOI: 10.1515/acve-2015-0037.

- Adl S. M., Simpson A. G. B., Heiss A., Lane C. E., Lukeš J., Bass D., Bowser S. S., Brown M. W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Hoppenrath M., Lara E., Mitchell E. A. D., Gall L. L., Lynn D. H., Mcmanus H., Mozley-Stanridge S. E., Parfrey L. W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Spiegel F. W., Schoch C. L., Smirnov A. The revised classification of eukaryotes, *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2012. Vol. 59. Issue 5. P. 429–493. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.
- Alleman A. R., Jacobson E. R., Raskin R. E. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*), *American Journal of Veterinary Research*. 1992. Vol. 53. P. 1645–1651.
- Arizza V., Sacco F., Russo D., Scardino R., Arculeo M., Vamberger M., Marrone F. The good, the bad and the ugly: *Emys trinacris*, *Placobdella costata*, and *Haemogregarina stepanowi* in Sicily (Testudines, Annelida, and Apicomplexa), *Folia Parasitologica*. 2016. Vol. 63: 029. DOI: 10.14411/fp.2016.029.
- Beyer T. V. Sidorenko N. V. II. Cytochemical studies on the haemogregarines of armenian reptiles. II. Shifts in haemoglobin and total protein contents in the haemogregarine-infected erythrocytes of rock-lizards, *Parazitologiya*. 1972. T. VI. Vyp. 4. C. 385–390.
- Danilevskiy V. Ya. Studies in comparative blood parasitology. Blood zooparasites in reptiles. T. 2. Har'kov, 1891. 145 p.
- Danilewsky B. Die Hämatozoën der Kaltblüter, *Archiv für Mikroskopische Anatomie*. 1885. Band 24. S. 588–598.
- Davis A. K., Maney D. L., Maerz J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists, *Functional Ecology*. 2008. Vol. 22. P. 760–767. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x.
- Duysebaeva T. N. Doronin I. V. Malahov D. V. Kukushkin O. V. Bakiev A. G. GIS analysis of the distribution and habitat of *Emys orbicularis orbicularis* (Testudines, Emydidae): Methodological aspects, *Izvestiya vysshih uchebnyh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki*. 2019. No. 1. P. 28–40. DOI: 10.21685/2307-9150-2019-1-4.
- Dvořáková N., Kvičerová J., Hostovský M., Široký P. Haemogregarines of freshwater turtles from Southeast Asia with a description of *Haemogregarina sacaliae* sp. n. and a redescription of *Haemogregarina pellegrini* Laveran and Pettit, 1910, *Parasitology*. 2015. Vol. 145. Issue 6. P. 816–826. DOI: 10.1017/S0031182014001930.
- Dvořáková N., Kvičerová J., Papoušek I., Javanbakht H., Tiar G., Kami H., Široký P. Haemogregarines from western Palaearctic freshwater turtles (genera *Emys*, *Mauremys*) are conspecific with *Haemogregarina stepanowi* Danilewsky, 1885, *Parasitology*. 2014. Vol. 144. Issue 4. P. 522–530. DOI: 10.1017/S0031182013001820.
- Finkel'shteyn N. Ya. The parasitic blood of the cold-blooded of Caucasus, *Arhiv Biologicheskikh Nauk*. 1908. T. 13. Vyp. 2. P. 132–164.
- International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. 2012. URL: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf (data obrascheniya: 27.05.2022).
- Kirdey E. G. Dmitrieva L. A. The role of erythrocytes in the regulation and implementation of the immune response, *Sibirskiy medicinskiy zhurnal*. 1995. T. 4, No. 3. P. 5–8.
- Lenk P., Fritz U., Joger U., Wink M. Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758), *Molecular Ecology*. 1999. Vol. 8. Issue 11. P. 1911–1922.
- Mihalca A., Achelaritei D., Popescu P. Haemoparasites of the genus *Haemogregarina* in a population of European pond turtles (*Emys orbicularis*) from Drăgășani, Vâlcea county, Romania, *Scientia Parasitologica*. 2002. Vol. 2. P. 22–27.
- Mkrtychyan Z. A. Materials for the study of blood parasites of reptiles in Armenia, *Biologicheskii zhurnal Armenii*. 1966. T. XIX, No. 10. P. 92–100.
- Paperna I. Developmental cycle of chelonian haemogregarines in leeches with extra-intestinal multispore oocysts and a note on the blood stages in the chelonian hosts, *Diseases of Aquatic Organisms*. 1989. Vol. 7. P. 149–153.
- Pavlov A. V. Key points of reptiles hematology: peculiarities of estimation of the leukocytic blood, *Izvestiya vysshih uchebnyh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki*. 2019. No. 1. P. 138–152. DOI: 10.21685/2307-9150-2019-1-14.
- Perpiñán D., Sánchez C. Morphologic and Cytochemical Characteristics of Blood Cells from the European Pond Turtle (*Emys orbicularis*) and the Mediterranean Pond Turtle (*Mauremys leprosa*), *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 2009. Vol. 19. No 4. P. 119–127.
- Prokopenko L. G. Siplivaya L. E. Erythrocytes as modulators of immunological reactions, *Uspehi fiziologicheskikh nauk*. 1992. T. 23, No. 4. P. 89–106.
- Romanova E. B. Stolyarova I. A. Bakiev A. G. Gorelov R. A. Comparative leukocyte blood profile of *Emys orbicularis* (Reptilia: Emydidae) from two populations, *Sovremennaya gerpetologiya*. 2021. T. 21, No. 1/2. P. 30–42. DOI: 10.18500/1814-6090-2021-21-1-2-30-42.
- Salakij C., Salakij J., Suthunmapinunta P., Chanhom L. Hematology, Morphology and Ultrastructure of Blood Cells and Blood Parasites from Puff-faced Watersnakes (*Homalopsis buccata*), *Kasetsart*

- Journal – Natural Science. 2002. Vol. 36. P. 35–43.
- Sawyer R. T. Leech biology and behavior. Vol. 3. Oxford: Oxford University Press; Clarendon Press, 1986. 240 p.
- Segade P., Crespo C., Ayres C., Cordero A., Arias M. C., García-Estévez J. M., Iglesias Blanco R. *Eimeria* species from the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Reptilia: Testudines), in Galicia (NW Spain), with description of two new species, *Journal of Parasitology*. 2006. Vol. 92. Issue 1. P. 69–72. DOI: 10.1645/GE-3491.1.
- Shitikov V. K. Rozenberg G. S. Randomization and bootstrap: Statistical analysis in biology and ecology using R. Tol'yatti: Cassandra, 2014. 314 p.
- Siddall M. E. Desser S. S. 1217:TOHBFP2.0.CO.
- Soares P., de Brito E. S., Paiva F., Pavan D., Viana L.A. Haemogregarina spp. in a wild population from *Podocnemis unifilis* Troschel, 1848 in the Brazilian Amazonia, *Parasitology Research*. 2014. Vol. 113. P. 4499–4503. DOI: 10.1007/s00436-014-4139-7.
- Sokolina F. M. Pavlov A. V. Yusupov R. H. Hematology of reptiles: A methodological guide for the course of herpetology, a large workshop and special seminars. Kazan': Kazan. gop. un-t, 1997. 31 p.
- Stacy N. I., Alleman A. R., Saylor K. A. Diagnostic hematology of reptiles, *Clinics in Laboratory Medicine*. 2011. Vol. 3. P. 87–108. DOI: 10.1016/j.cll.2010.10.006.
- Telford Jr. S. R. Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text. New York: CRC Press, 2009. 376 p.
- Thrall M. A., Dale C., Baker E., Lassen E. D. Hematology of reptiles, *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Pennsylvania, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. P. 259–276.
- Vasil'ev N. V. Essays on the role of hematopoietic tissue in antibody formation. Tomsk: Izd-vo Tomskogo un-ta, 1975. 302 p.
- Vershinin V. L. Hematopoiesis of tailless amphibians – specificity of adaptationogenesis of species in modern ecosystems, *Zoologicheskii zhurnal*. 2004. T. 83, No. 11. P. 1367–1374.
- Wyneken J., Bels V. L., Godfrey M. H. *Biology of Turtles*. Boca Raton: CRC Press, 2007. 408 p.
- Yakimov V. N. Fundamentals of the analysis of biomedical and environmental data in the R environment. Part 2: Tutorial. Nizhniy Novgorod: Nizhegorodskiy gosuniversitet, 2019. 168 p.
- Zelmer D. A., Platt T. R. Structure and similarity of helminth communities of six species of Australian turtles, *Journal of Parasitology*. 2008. Vol. 94. Issue 4. P. 781–787. DOI: 10.1645/GE-1487.1.