ЛЕЙКОЦИТАРНЫЙ СОСТАВ КРОВИ *ELAPHE DIONE* (SERPENTES: COLUBRIDAE) ЗАПОВЕДНИКА «ОРЕНБУРГСКИЙ» (РОССИЯ)

Е. Б. Романова[1,*], Е. И. Соломайкин[1], А. Г. Бакиев[2,], Р. А. Горелов[2]**

[1]*Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, Россия*
**e-mail: romanova@ibbm.unn.ru*
[2]*Институт экологии Волжского бассейна РАН, Россия*
***e-mail: herpetology@list.ru*

Поступила в редакцию: 29.03.2018

Впервые использован гематологический подход для оценки состояния популяции узорчатого полоза *Elaphe dione* на особо охраняемой территории (участок «Айтуарская степь» заповедника «Оренбургский»). Проведена оценка лейкоцитарной формулы крови с расчетом связанных с ней лейкоцитарных индексов (лимфоцитарно-гранулоцитарного, сдвига лейкоцитов, соотношения лимфоцитов и эозинофилов, соотношения гетерофилов и эозинофилов, соотношения гетерофилов и лимфоцитов), измерена площадь поверхности основных видов лейкоцитарных клеток: гетерофилов, базофилов, эозинофилов, азурофилов, моноцитов и лимфоцитов. Выявлены внутривидовые межполовые различия по содержанию гранулоцитов и агранулоцитов в крови узорчатого полоза. У самок по сравнению с самцами в периферической крови выше доля гетерофилов и моноцитов, но ниже доля базофилов и эозинофилов. Гетерофилы, базофилы и эозинофилы характеризовались умеренной ассоциацией, а моноциты сильной ассоциацией ($r = 0.82$, $R^2 = 0.67$, $p = 0.001$) с качественным признаком (полом особи). Морфометрические показатели клеток гранулоцитарного ряда самцов (гетерофилов, базофилов, эозинофилов) превышали аналогичные показатели самок узорчатого полоза. Статистически значимых различий по морфометрическим показателям мононуклеарных клеток (азурофилов, моноцитов и лимфоцитов) между самцами и самками узорчатого полоза не выявлено. Установлена сильная положительная корреляционная взаимосвязь относительного содержания гетерофилов (%) в периферической крови и индекса соотношения гетерофилов и лимфоцитов ($r = 0.97$, $p = 0.001$), что иллюстрировало более весомый вклад неспецифической защитной системы крови в адаптивные реакции организма. Отсутствие различий в интегральных показателях соотношения гетерофилов и лимфоцитов самцов и самок ($U = 1.33$, $p = 0.18$), свидетельствовало о сопоставимом уровне воздействия и идентичности физиологических механизмов адаптации, протекающих в организме рептилий в особо охраняемых условиях среды обитания. Картина крови и динамика лейкоцитарных индексов крови узорчатого полоза, обитающего на территории заповедника «Оренбургский», отражали активный отклик организма на комплекс экологических факторов среды, с наиболее выраженной активацией иммунных процессов у самок по сравнению с самцами.

Ключевые слова: *Elaphe dione*, заповедник «Оренбургский», лейкоцитарная формула крови, лейкоцитарные индексы, периферическая кровь, узорчатый полоз

Введение

Узорчатый полоз *Elaphe dione* (Pallas, 1773), являясь одним из наиболее широко распространенных видов змей палеарктической фауны, включен в Красный список МСОП с категорией Least Concern (Aghasyan et al., 2017). Через Оренбургскую область проходит северная граница ареала этого вида (Дебело, Чибилев, 2013), занесенного в областную Красную книгу с категорией статуса редкости 3 (Постановление Правительства…, 2014). По ориентировочной оценке, на территории Оренбуржья обитает несколько сотен особей (Давыгора, 1998). Вид охраняется в заповеднике «Оренбургский», где считается редким (Чибилев, 1999).

В настоящее время большинство мест обитания узорчатого полоза находится в условиях повышенной антропогенной нагрузки, что ведет к сокращению численности вида и требует специальных мер его охраны (Бакиев и др., 2004; Табачишина и др., 2005; Котенко, Курячий, 2009). В доступных источниках отсутствуют материалы по сравнительному изучению адаптивных реакций системы крови узорчатого полоза. Между тем, использование гематологического подхода для оценки состояния природных популяций животных, в том числе и змей (Воробьева, 2001; Salakij et al., 2002; Davis et al., 2008; Хайрутдинов, Соколина, 2010; Бакиев и др., 2015; Романова и др., 2016, 2017), на территориях с разной антропогенной трансформаци-

ей, имеет большой научный потенциал. Такой подход позволяет выявить количественно-качественные изменения иммунологических показателей крови, обеспечивающих устойчивое функционирование организма под воздействием комплекса биотических и абиотических факторов среды, что необходимо для повышения численности и сохранения уязвимых видов.

Целью работы являлась оценка интегральных лейкоцитарных показателей крови узорчатого полоза, обитающего на участке «Айтуарская степь» заповедника «Оренбургский».

В работе впервые применен гематологический подход, включающий определение лейкоцитарной формулы крови с расчетом связанных с ней лейкоцитарных индексов (сдвига лейкоцитов, соотношения лимфоцитов/эозинофилов, гетерофилов/эозинофилов, гетерофилов/лимфоцитов и лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс) и позволяющий оценить состояние иммунной системы узорчатого полоза *Elaphe dione* особо охраняемой природной территории.

Материал и методы

Отлов узорчатых полозов проводили 11–12 июня 2017 г. в северной части заповедного участка «Айтуарская степь», прилегающей к аулу Айтуар (51°06′ с.ш., 057°39′ в.д.) Кувандыкского района Оренбургской области (Россия). Длина туловища с головой (*L. corp.*) самок ($n = 8$) составила 445–775 мм, самцов ($n = 10$) – 430–685 мм. В течение суток после поимки у змей отбирали кровь и выпускали их в места отлова.

Для получения образцов крови животных обездвиживали путем захвата и делали пункцию верхнечелюстной вены иглой, смоченной в растворе гепарина. От каждого животного готовили по три мазка (окраска по Романовскому-Гимзе). Готовые мазки просматривали с иммерсией, при увеличении ×1600, с дифференцированным подсчетом лейкоцитов (Соколина и др., 1997). С учетом морфологических особенностей определяли шесть типов лейкоцитарных клеток (в %): гранулоциты (гетерофилы, базофилы, эозинофилы) и агранулоциты (азурофилы, моноциты, лимфоциты).

Линейные размеры лейкоцитов измеряли с помощью окуляр-микрометра cross-line (0.1 mm) (микроскоп Meiji Techno с иммерсией, Japan). Площадь поверхности клеток S (в мкм^2) рассчитывали по формуле эллипса:

$$S = \pi \cdot a \cdot b$$

где $\pi = 3.14$; a – длина большой полуоси эллипса, мкм; b – длина меньшей полуоси эллипса, мкм.

На основании лейкоцитарной формулы крови были рассчитаны интегральные лейкоцитарные индексы (отн. ед):

1) индекс сдвига лейкоцитов:

$$ИСЛ = \frac{\sum гранулоцитов}{\sum агранулоцитов}$$

2) индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов:

$$ИСЛЭ = \frac{Л}{Э}$$

3) индекс соотношения гетерофилов и эозинофилов:

$$ИСГЭ = \frac{Г}{Э}$$

4) лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс:

$$ИЛГ = \frac{Л \cdot 10}{Э + Г + Б}$$

5) индекс соотношения гетерофилов и лимфоцитов:

$$ИСГЛ = \frac{Г}{Л}$$

где $Л$ – лимфоциты; $Э$ – эозинофилы; $Г$ – гетерофилы; $Б$ – базофилы.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали непараметрическими методами с расчетом критериев Манна-Уитни (U), Спирмана (r) в пакете прикладных программ «Статистика». За величину статистической значимости принимали $\alpha = 0.05$.

Результаты и обсуждение

В вопросах дифференцировки лейкоцитарного ряда рептилий в литературе отмечаются определенные разногласия, в первую очередь связанные с выделением в отдельный вид азурофилов. В одних публикациях (Campbell, 2004; Orós et al., 2010) азурофилы представлены как молодые «незрелые» формы моноцитов, в других (LeBlanc et al., 2000; Salakij et al., 2002) их выделяют в самостоятельный тип и относят к агранулоцитам. Согласно последним данным, большинство исследователей дифференцирует лейкоциты рептилий на гранулоциты, представленные тремя типами крупных клеток – гетерофилами, эозинофилами и базофилами, и на мононуклеарные клетки, к которым относятся азурофилы, моноциты и лимфоциты (Хайрутдинов, Соколина, 2010; Stacy et al., 2011; Лисничая, Ефимов, 2014; Arican & Cicek, 2014; Васильев, 2016). Лейкоцитарный состав крови узорчатого полоза включал две группы клеток: агранулоциты (азурофилы, моноциты, лимфоциты), на долю которых приходилось до 70% клеток, и гранулоциты (гетерофилы, эозинофилы и базофилы), характери-

зующиеся многовариантными формами зернистости и наличием несегментированных или нечетко сегментированных ядер. Анализ лейкоцитарных формул выявил внутривидовые межполовые различия. Вначале отметим статистически значимые различия по количественному содержанию в крови самок и самцов всех форм гранулоцитов. Так, например, у самок по сравнению с самцами в периферической крови выше доля гетерофилов, но ниже доля базофилов и эозинофилов (табл. 1).

Среди агранулоцитов показательны результаты, полученные при количественном определении моноцитов. Доля этих клеток в крови самок более чем в два раза превышала аналогичный показатель периферической крови самцов ($U = 3.33$, $p = 0.0008$). Межполовые различия в лейкоцитарном составе клеток крови подтверждались и непараметрическим критерием корреляции (ассоциации) Спирмана. Наиболее сильную ассоциацию с качественным признаком (полом особи) обнаружили моноциты ($r = 0.82$, $R^2 = 0.67$, $p = 0.001$). Гетерофилы, базофилы и эозинофилы характеризовались умеренной ассоциацией с полом (табл. 2).

Известно, что лейкоцитарные клетки периферической крови рептилий ответственны за проявление как реакций врожденного (естественного) иммунитета (гетерофилы, базофилы эозинофилы, моноциты), так и адаптивного (приобретенного) иммунного ответа (лимфоциты). Моноциты, являясь крупными мононуклеарными клетки, выполняют фагоцитирующую и антигенпрезентирующую роль и, кроме того, продуцируют эндогенные регуляторы иммунного ответа – цитокины (Coico et al., 2003). Гетерофилы помогают подавить микробное вторжение, участвуют в формировании воспалительной реакции, фагоцитозе, обеспечивают защиту организма при инфекциях и стрессе (Jain, 1993; Campbell, 1996). Эти гранулоциты подготавливают условия в организме для дальнейшей реализации клеточно-опосредованного или гуморального иммунного ответа. Высокое содержание базофилов и эозинофилов в крови может свидетельствовать о паразитарных инвазиях. У рептилий эозинофилы участвуют в фагоцитозе иммунных комплексов, образующихся в присутствии паразитов; базофилы реагируют дегрануляцией, высвобождая гистамин (Sypek et al., 1984; Coico et al., 2003). В целом анализ лейкоцитарных формул крови узорчатого полоза *Elaphe dione* свидетельствовал об активации естественного иммунитета самок узорчатого полоза по сравнению с самцами.

Межполовые различия выявлены и в размерах гранулоцитов крови при определении площади поверхности лейкоцитарных клеток полоза узорчатого. Так, гранулоциты самок оказались несколько меньше гранулоцитов самцов: гетерофилы – в 1.33 раза ($U = 2.38$, $p = 0.017$), базофилы – в 1.25 раза ($U = 2.75$, $p = 0.005$), эозинофилы – в 1.85 раза ($U = 3.28$, $p = 0.001$) (табл. 3).

Таблица 1. Лейкоцитарный состав крови узорчатого полоза *Elaphe dione*
Table 1. Leukocyte blood count of Dione snake *Elaphe dione*

Статистические показатели	Гетерофилы, %	Базофилы, %	Эозинофилы, %	Азурофилы, %	Моноциты, %	Лимфоциты, %	*ИСЛ*	*ИСЛЭ*	*ИСГЭ*	*ИЛГ*	*ИСГЛ*
Самки ($n = 8$)											
M	9.75	6.50	10.0	11.12	9.37	53.25	0.35	6.25	1.14	20.7	0.19
m	0.95	0.68	1.16	0.95	0.49	1.19	0.02	1.23	0.21	1.49	0.02
Самцы ($n = 10$)											
M	6.80	10.10	16.10	11.7	4.60	50.30	0.50	3.45	0.46	16.05	0.14
m	0.75	1.23	1.64	1.00	0.60	1.75	0.04	0.35	0.07	1.35	0.02
Статистические различия											
U	**2.08**	**2.08**	**2.31**	0.26	**3.33**	1.11	**2.08**	**2.39**	**2.71**	1.82	1.33
p	**0.03**	**0.03**	**0.02**	0.79	**0.0008**	0.26	**0.03**	**0.01**	**0.006**	0.06	0.18

Примечание: *M* – среднее арифметическое, *m* – ошибка среднего арифметического, *U* – критерий Манна-Уитни, *p* – уровень значимости; жирным текстом выделены статистически значимые различия ($\alpha = 0.05$).

Таблица 2. Взаимосвязь показателей лейкоцитарной формулы с половой принадлежностью особей узорчатого полоза *Elaphe dione*
Table 2. Interrelation of the leucogram parameters with the sex of Dione snake *Elaphe dione* specimens

Показатели лейкограммы, %	Статистические показатели		
	R^2 – коэффициент детерминации	*r* – коэффициент корреляции	*p* – уровень значимости
Гетерофилы	**0.27**	**0.52**	**0.026**
Базофилы	**0.26**	**0.51**	**0.03**
Эозинофилы	**0.33**	**0.58**	**0.01**
Азурофилы	0.01	0.10	0.68
Моноциты	**0.67**	**0.82**	**0.001**
Лимфоциты	0.08	0.29	0.23

Примечание: жирным текстом выделены статистически значимые различия ($\alpha = 0.05$).

Таблица 3. Площадь поверхности (мкм^2) клеток лейкоцитарного ряда крови узорчатого полоза *Elaphe dione*
Table 3. The surface area (μm^2) of Dione snake *Elaphe dione* leukocytal series

Статистические показатели	Гетерофилы	Базофилы	Эозинофилы	Азурофилы	Моноциты	Лимфоциты
Самки						
M	103.27	74.06	110.42	114.35	124.32	56.23
m	8.27	4.33	11.13	9.65	8.06	4.33
Самцы						
M	138.14	92.68	204.75	131.39	117.10	73.36
m	8.76	3.31	23.67	12.88	10.83	6.76
Статистические различия						
U	**2.38**	**2.75**	**3.28**	1.09	0.56	1.92
p	**0.017**	**0.005**	**0.001**	0.273	0.570	0.053

Примечание: *M* – среднее арифметическое, *m* – ошибка среднего арифметического, *U* – критерий Манна-Уитни, *p* – уровень значимости; жирным текстом выделены статистически значимые различия ($\alpha = 0.05$).

Статистически значимых различий по морфометрическим показателям мононуклеарных клеток (азурофилов, моноцитов и лимфоцитов) между самцами и самками полоза узорчатого не выявлено.

Отклонения в лейкоцитарном составе периферической крови позвоночных животных, в том числе и рептилий, отражают физиологическое состояние животных при разнообразных стрессовых воздействиях. В качестве показателей, подтверждающих состояние особей использовалось несколько интегральных показателей: индекс сдвига лейкоцитов (*ИСЛ*), индекс соотношения гетерофилов и лимфоцитов (*ИСГЛ*), индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов (*ИСЛЭ*), индекс соотношения гетерофилов и эозинофилов (*ИСГЭ*) и лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (*ИЛГ*). Лейкоцитарные индексы считаются объективными индикаторами воздействия на иммунный статус организма животных, поскольку отражают взаимосвязи клеток крови и характеризуют работу эффекторных механизмов иммунной системы (Cabagna et al., 2005; Ткаченко, Дерхо, 2014) и довольно широко используется в экологических мониторинговых работах (Житенева и др., 1997; Романова и др., 2015).

Информативным показателем реактивности организма является индекс сдвига лейкоцитов (*ИСЛ*), представляющим собой отношение суммарного содержания гранулоцитов к агранулоцитам. Отклонение ИСЛ от условной нормы является признаком заболеваний, различных интоксикаций и негативного влияния окружающей среды. Проведенный расчет ИСЛ подтвердил внутривидовые межполовые различия в лейкоцитарном профиле узорчатого полоза. При этом более высокий показатель *ИСЛ* для самцов, по сравнению с самками (рис.), отражал дополнительно прирост в периферической крови доли базофилов, эозинофилов и снижение доли моноцитов, что могло быть связано с присутствием паразитов. Значимое снижение *ИСЛ*, установленное для самок узорчатого полоза ($U = 2.08$, $p = 0.03$), подтверждало более выраженную активацию иммунных реакций по сравнению с самцами за счет относительного содержания гетерофилов и моноцитов, отвечающих за повышение защитной функции крови в условиях воздействия комплекса факторов окружающей среды. Низкие значения индексов *ИСЛЭ* и *ИСГЭ* для самцов по сравнению с самками обуславливались приростом в периферической крови доли эозинофилов.

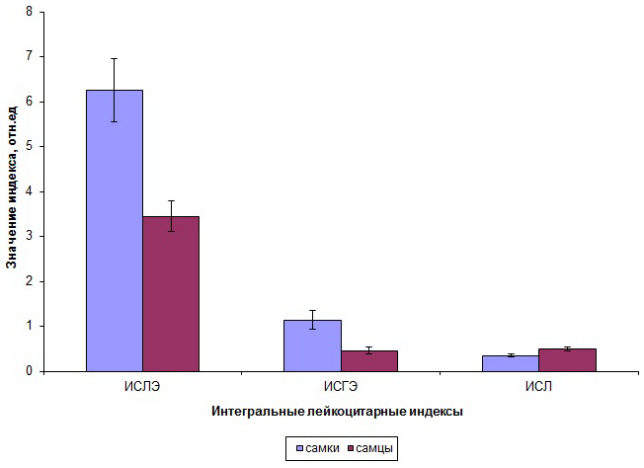

Рис. Значение интегральных лейкоцитарных индексов для самок и самцов *Elaphe dione*.
Fig. The integral lymphocyte indexes value for *Elaphe dione* males and females.

Как гематологический параметр стресса используется и индекс соотношения гетерофилов и лимфоцитов (*ИСГЛ*), предоставляющий данные о количественном изменении в лейкоцитарном звене иммунной системы и скоррелированный с уровнем гормонов стресса в крови животных (Davis et al., 2008). Отсутствие различий в показателе *ИСГЛ* ($U = 1.33$, $p = 0.18$) между самками и самцами, свидетельствовало о сопоставимом уровне воздействия и идентичности физиологических механизмов адаптации, протекающих в организме животных в условиях особо охраняемой природной территории. Отметим сильную положительную корреляционную статистическую взаимосвязь содержания гетерофилов (%) в крови и лейкоцитарного индекса, *ИСГЛ* ($r = 0.97$, $p = 0.001$), по сравнению с другими типами лейкоцитов и интегральными индексами, что иллюстрировало более весомый вклад неспецифической защитной системы крови в адаптивные реакции организма. Установлена ассоциативная статистическая взаимосвязь индексов: *ИСЛ* ($r = 0.56$, $p = 0.015$), *ИСЛЭ* ($r = 0.51$, $p = 0.02$), *ИСГЭ* ($r = 0.64$, $p = 0.004$) и *ИЛГ* ($r = 0.50$, $p = 0.03$) с полом животного.

Результаты проведенного исследования расширяют наши представления об особенностях морфологического состава крови рептилий и закономерностях изменения общей реакции организма рептилий в условиях среды обитания. Любые воздействия, изменяющие иммунологическую реактивность организма, могут нарушать формирование механизмов гомеостатического равновесия в системе «организм-среда» и отражаются на лейкоцитарном профиле крови животных. Для поддержания гомеостаза организма в специфичных условиях обитания рептилии (в том числе и узорчатый полоз) используют набор универсальных эффекторных клеток, представленный гетерофилами, эозинофилами, базофилами и мононуклеарами (азурофилами, моноцитами, лимфоцитами) (Jain, 1993; LeBlanc et al., 2000). У исследованной выборки не выявлены признаки стресс-индуцированной реакции лейкоцитов, маркером которой является повышение доли гетерофилов и снижение доли лимфоцитов (Cabagna et al., 2005; Davis & Maerz, 2008). Совокупность реакций неспецифической естественной защитной системы организма (содержание гетерофилов, эозинофилов), как и модуляция специфической иммунной защиты (содержание лимфоцитов), отвечающей за синтез иммуноглобулинов (Campbell, 1996, 2004), обеспечивала устойчивое функционирование организма узорчатых полозов, обитающих на особо охраняемой природной территории.

Заключение

Лейкоцитарная формула крови и динамика лейкоцитарных индексов крови узорчатого полоза из заповедника «Оренбургский» отражали активный отклик организма на комплекс экологических факторов среды, с наиболее выраженной активацией иммунных процессов у самок по сравнению с самцами. У самок по сравнению с самцами в периферической крови выше доля гетерофилов и моноцитов, но ниже доля базофилов и эозинофилов. Гетерофилы, базофилы и эозинофилы характеризовались умеренной ассоциацией, а моноциты сильной ассоциацией ($r = 0.82$, $R^2 = 0.67$, $p = 0.001$) с качественным признаком (полом особи). Морфометрические показатели клеток гранулоцитарного ряда самцов превышали аналогичные показатели самок. Отсутствие различий в интегральных показателях соотношения гетерофилов и лимфоцитов самцов и самок ($U = 1.33$, $p = 0.18$), свидетельствовало о сопоставимом уровне воздействия и идентичности физиологических механизмов адаптации, протекающих в организме животных в особо охраняемых условиях среды обитания.

Литература

Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Гелашвили Д.Б., Горелов Р.А., Доронин И.В., Зайцева О.В., Зиненко А.И., Кленина А.А., Макарова Т.Н., Маленев А.Л., Павлов А.В., Петрова И.В., Ратников В.Ю., Старков В.Г., Ширяева И.В., Юсупов Р.Х., Яковлева Т.И. 2015. Гадюки (Reptilia: Serpentes: Viperidae: *Vipera*) Волжского бассейна. Часть 1. Тольятти: Кассандра. 234 с.

Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Литвинов Н.А., Павлов А.В., Ратников В.Ю. 2004. Змеи Волжско-Камского края. Самара: Издательство Самарского научного центра РАН. 192 с.

Васильев Д.Б. 2016. Ветеринарная герпетология. М.: Аквариум. 420 с.

Воробьева А.С. 2001. Сравнительная характеристика периферической крови змей Волжского бассейна // Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии. Вып. 10. С. 25–30.

Давыгора А.В. 1998. Узорчатый полоз // Красная книга Оренбургской области. Животные и растения. Оренбург: Оренб. кн. изд-во. С. 82–83.

Дебело П.В., Чибилев А.А. 2013. Амфибии и рептилии Урало-Каспийского региона. Екатеринбург: УрО

РАН. 400 с. (Серия: Природное разнообразие Урало-Каспийского региона. Т. III).

Житенева Л.Д., Рудницкая О.А., Калюжная Т.И. 1997. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб. Справочник. Ростов-на-Дону: АзНИИРХ. 149 с.

Котенко Т.І., Курячий К.В. 2009. Полоз візерунковий *Elaphe dione* (Pallas, 1773) // Червона книга України. Тваринний світ. Киев: Глобалконсалтинг. С. 392.

Лисничая Е.Н., Ефимов В.Г. 2014. Особенности исследования морфологического состава крови рептилий // Научно-технический бюллетень НИЦ биобезопасности и экологического контроля ресурсов АПК. Т. 2(1). С. 61–74.

Постановление Правительства Оренбургской области от 16.04.2014 №229-п «О внесении изменений в постановление Правительства Оренбургской области от 26 января 2012 года № 67-п». 2014. 14 с. Точка доступа: http://oopt.aari.ru/sites/default/files/documents/pravitelstvo-Orenburgskoy-oblasti/N229--p_16-04-2014.pdf (дата обращения: 24.04.2018).

Романова Е.Б., Николаев В.Ю., Бакиев А.Г., Кленина А.А. 2015. Особенности лейкоцитарного состава крови самок обыкновенного ужа (*Natrix natrix*) и водяного ужа (*Natrix tessellata*) (Reptilia: Colubridae) // Современная герпетология. Т. 15(1/2). С. 69–76.

Романова Е.Б., Николаев В.Ю., Соломайкин Е.И., Бакиев А.Г., Горелов Р.А. 2016. Оценка лейкоцитарного состава крови гадюки обыкновенной *Vipera berus* из Самарской области // Принципы экологии. №5. С. 55–74.

Романова Е.Б., Соломайкин Е.И., Бакиев А.Г., Горелов Р.А., Кленина А.А. 2017. Иммуногематологические показатели ядовитых и неядовитых змей на территориях Волжского бассейна с разной антропогенной трансформацией // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Т. 19(2). С. 54–61.

Соколина Ф.М., Павлов А.В., Юсупов Р.Х. 1997. Гематология пресмыкающихся. Методическое пособие к курсу герпетологии, большому практикуму и семинарам. Казань: Казан. ун-т. 31 с.

Табачишина И.Е., Табачишин В.Г., Завьялов Е.В. 2005. Пространственное размещение и тенденции изменения численности узорчатого полоза *Elaphe dione* на севере ареала в Поволжье // Поволжский экологический журнал. №3. С. 277–280.

Ткаченко Е.А., Дерхо М.А. 2014. Лейкоцитарные индексы при экспериментальной кадмиевой интоксикации мышей // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. №3. С. 81–83.

Хайрутдинов И.З., Соколина Ф.М. 2010. Характеристика крови рептилий и ее связь с условиями среды обитания: учебно-методическое пособие к курсу «герпетология». Казань, Казанский университет. 44 с.

Чибилев А.А. 1999. Герпетофауна госзаповедника «Оренбургский» // Вторая конференция герпетологов Поволжья: Тезисы докладов. Тольятти. С. 55–56.

Aghasyan A., Avci A., Tuniyev B., Crnobrnja-Isailovic J., Lymberakis P., Andrén C., Cogalniceanu D., Wilkinson J., Ananjeva N.B., Üzüm N., Orlov N.L., Podloucky R., Tuniyev S., Kaya U., Li P., Borkin L., Milto K., Golynsky E., Rustamov A, Nuridjanov D., Munkhbayar K., Shestapol A. 2017. Elaphe dione // The IUCN Red List of Threatened Species 2017. Available from: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T157275A747623.en (Retrieved: 22.04.2018).

Arican H., Cicek K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review // North-Western Journal of Zoology. Vol. 10(1). P. 190–209.

Cabagna M.C., Lajmanovich R.C., Stringhini G., Sanchez-Hernandez J.C., Peltzer P.M. 2005. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agro ecosystems of Santa Fe Province, Argentina // Applied Herpetology. Vol. 2. P. 373–380. DOI: 10.1163/157075405774483085

Campbell T.W. 1996. Clinical pathology // Reptile medicine and surgery / D.R. Mader (Ed.). Philadelphia (Pa, US): W.B. Saunders Company. P. 248–257.

Campbell T.W. 2004. Hematology of Lower Vertebrates // 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). Midleton WI, USA: American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology. Available from: http://www.ivis.org/proceedings/ACVP/2004/Campbell1/ivis.pdf.

Coico R., Sunshine G., Benjamini E. 2003. Immunology: A Short Course. Hoboken, NJ: Wiley-Liss Publications. 500 p.

Davis A.K., Maerz J.C. 2008. Sex-related differences in hematological stress indices of breeding, paedomorphic mole salamanders // Journal of Herpetology. Vol. 42. P. 197–201. DOI: 10.1670/06-277R2.1

Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists // Functional Ecology. Vol. 22. P. 760–772. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x

Jain N.C. 1993. Essentials of Veterinary hematology. Philadelphia (Pa.): Lea and Febiger. 417 p.

LeBlanc C.J., Heatley J.J., Mack E.B. 2000. A review of the morphology of lizard leukocytes with a discussion of the clinical differentiation of bearded dragon, *Pogona viticeps*, leukocytes // Journal of Herpetological Medicine and Surgery. Vol. 10. P. 27–30. DOI: 10.5818/1529-9651.10.2.27

Orós J., Casal A.B., Arencibia A. 2010. Microscopic studies on characterization of blood cells of endangered sea turtles // Microscopy: Science, Technology, Application and Education / A. Méndez-Vilas, J. Dias (Eds.). Vol. 1. P. 75–84.

Salakij C., Salakij J., Chanhome L. 2002. Comparative hematology, morphology and ultra structure of blood cells in Monocellate cobra (*Naja kaouthia*), Siamese spitting cobra (*N. siamensis*) and Golden spitting cobra (*N. sumatrana*) // Kasetsart Journal (Natural Science). Vol. 36. P. 291–300.

Stacy N.I., Alleman A.R., Sayler K.A. 2011. Diagnostic hematology of Reptiles // Journal of Clinical and Laboratory Medicine. Vol. 31(1). P. 87–108. DOI: 10.1016/j.cll.2010.10.006

Sypek J.P., Borysenko M., Findlay S.R. 1984. Anti-immunoglobulin induced histamine release from naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina* // Developmental & Comparative Immunology. Vol. 8. P. 359–366.

References

Aghasyan A., Avci A., Tuniyev B., Crnobrnja-Isailovic J., Lymberakis P., Andrén C., Cogalniceanu D., Wilkinson J., Ananjeva N.B., Üzüm N., Orlov N.L., Podloucky R., Tuniyev S., Kaya U., Li P., Borkin L., Milto K., Golynsky E., Rustamov A, Nuridjanov D., Munkhbayar K., Shestapol A. 2017. *Elaphe dione*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2017*. Available from: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T157275A747623.en [Retrieved on: 22.04.2018].

Arican H., Cicek K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western Journal of Zoology* 10(1): 190–209.

Bakiev A.G., Garanin V.I., Gelashvili D.B., Gorelov R.A., Doronin I.V., Zaitseva O.V., Zinenko O.I., Klenena A.A., Makarova T.N., Malenyov A.L., Pavlov A.V., Petrova I.V., Ratnikov V. Yu., Starkov V.G., Shiryaeva I.V., Yusupov R.K., Yakovleva T.I. 2015. *Vipers (Reptilia: Serpentes: Viperidae: Vipera) in the Volga river basin*. Part 1. Togliatti: Cassandra. 234 p. [In Russian]

Bakiev A.G., Garanin V.I., Litvinov N.A., Pavlov A.V., Ratnikov V.Ju. 2004. *Snakes of Volga-Kama Region*. Samara: Publishing House of Samara Scientific Centre of RAS. 192 p. [In Russian]

Chibilev A.A. 1999. Herpetofauna of Orenburg State Nature Reserve. In: *The second conference of herpetologists of the Volga region: Theses of reports.* Togliatti. P. 55–56. [In Russian]

Cabagna M.C., Lajmanovich R.C., Stringhini G., Sanchez-Hernandez J.C., Peltzer P.M. 2005. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agro ecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology* 2: 373–380. DOI: 10.1163/157075405774483085

Campbell T.W. 1996. Clinical pathology. In: D.R. Mader (Ed.): *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia (Pa, US): W.B. Saunders Company. P. 248–257.

Campbell T.W. 2004. Hematology of Lower Vertebrates. In: *55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP).* Midleton WI, USA: American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology. Available from: http://www.ivis.org/proceedings/ACVP/2004/Campbell1/ivis.pdf.

Coico R., Sunshine G., Benjamini E. 2003. *Immunology: A Short Course*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss Publications. 500 p.

Davis A.K., Maerz J.C. 2008. Sex-related differences in hematological stress indices of breeding, paedomorphic mole salamanders. *Journal of Herpetology* 42: 197–201. DOI: 10.1670/06-277R2.1

Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22: 760–772. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x

Davygora A.V. 1998. Dione snake. In: A.S. Vasilyev (Ed.): *Red Data Book of the Orenburg Region. Animals and Plants.* Orenburg: Orenburg Publishing House. P. 81. [In Russian]

Debelo P.V., Chibilev A.A. 2013. *Amphibians and reptiles of the Ural-Caspian region*. Ekaterinburg: Ural Branch of RAS. 400 p. (Series: Natural diversity of the Ural-Caspian region. Vol. III) [In Russian]

Government of the Orenburg Region Resolution of April 16, 2014 №229-p «On Amendments to the Orenburg Region Government Resolution of January 26, 2012 No. 67-p». 2014. 14 p. Available from: http://oopt.aari.ru/sites/default/files/documents/pravitelstvo-Orenburgskoy-oblasti/N229-p_16-04-2014.pdf [Retrieved on: 27.03.2018]. [In Russian]

Jain N.C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology.* Philadelphia (Pa.): Lea and Febiger. 417 p.

Khairutdinov I.Z., Sokolina F.M. 2010. *Reptile Blood Characteristics and their Connection with Environmental Conditions: The Guidance Manual for Herpetology Course*. Kazan: Kazan University Press. 44 p. [In Russian]

Kotenko T.I., Kuriachyi K.V. 2009. Dione snake. In: *Red Data Book of Ukraine*. *Animals.* Kyiv: Globalkonsalting. P. 392. [In Ukrainian]

LeBlanc C.J., Heatley J.J., Mack E.B. 2000. A review of the morphology of lizard leukocytes with a discussion of the clinical differentiation of bearded dragon, *Pogona viticeps*, leukocytes. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 10: 27–30. DOI: 10.5818/1529-9651.10.2.27

Lisnichaya Y.N., Yefimov V.G. 2014. Features study morphological composition of blood reptiles. *Scientific and Technical Bulletin SIC Biosafety and Environmental Control Resources agribusiness* 2(1): 61–74. [In Russian]

Orós J., Casal A.B., Arencibia A. 2010. Microscopic studies on characterization of blood cells of endangered sea turtles. In: A. Méndez-Vilas, J. Dias (Eds.): *Microscopy: Science, Technology, Application and Education*. Vol. 1. P. 75–84.

Romanova E.B., Nikolaev V.Yu., Bakiev A.G., Klenina A.A. 2015. Features of leukocyte blood composition of females of grass snake (*Natrix natrix*) and dice snake (*N. tessellata*) at the Samara region. *Current Studies in Herpetology* 15(1/2): 69–76. [In Russian]

Romanova E.B., Nikolaev V.Yu., Solomaykin E.I., Bakiev A.G., Gorelov R.A. 2016. The research of leukocyte formula of blood of *Vipera berus* from Samara region. *Principles of the Ecology* 5: 55–74. [In Russian]

Romanova E.B., Solomaykin E.I, Bakiev A.G., Gorelov R.A, Klyonina A.A. 2017. Immunohematological Indicators of Non- and Poisonous Snakes in the Volga Basin Areas with Different Antropogenic Transformation. *Proceedings of the Samara Scientific Centre of RAS* 19(2): 54–61. [In Russian]

Salakij C., Salakij J., Chanhome L. 2002. Comparative hematology, morphology and ultra structure of blood cells in Monocellate cobra (*Naja kaouthia*), Siamese spitting co-

bra (*N. siamensis*) and Golden spitting cobra (*N. sumatrana*). *Kasetsart Journal (Natural Science)* 36: 291–300.

Sokolina F.M., Pavlov A.V., Yusupov R. 1997. *Reptile Hematology: The Guidance Manual for Herpetology Course, Long-Term Practical Work, and Seminars.* Kazan: Kazan University Press. 31 p. [In Russian]

Stacy N.I., Alleman A.R., Sayler K.A. 2011. Diagnostic hematology of Reptiles. *Journal of Clinical and Laboratory Medicine* 31(1): 87–108. DOI: 10.1016/j.cll.2010.10.006

Sypek J.P., Borysenko M., Finday S.R. 1984. Anti-immunoglobulin induced histamine release from naturallyabundant basophils in the snapping turtle *Chelydra serpentine*. *Developmental & Comparative Immunology* 8: 359–366.

Tabachishina I.E., Tabachishin V.G., Zavyalov E.V. 2005. Spatial location and trends in the variation of the number of the *Elaphe dione* in the north of the range in the Volga Region. *Povolzhsky Journal of Ecology* 3: 277–280. [In Russian]

Tkachenko E.A., Derkho M.A. 2014. Leukocyte Indexes in the Cadmium Experimental Intoxication of Mice. *Bulletin of Orenburg State Agrarian University* 3: 81–83. [In Russian]

Vasiliev D.B. 2016. *Veterinary herpetology*. Moscow: Aquarium. 420 p. [In Russian]

Vorobyeva A.S. 2001. Comparative characteristics of peripheral blood of serpents of the Volga Basin. In: *Actual problems of herpetology and toxicology*. Vol. 10. P. 25–30. [In Russian]

Zhiteneva L.D., Rudnitskaya O.A., Kalyuzhnaya T.I. 1997. *Ecological and hematological characteristics of some fish species. Directory*. Rostov-on-Don: AzNIIRH. 149 p. [In Russian]

THE LEUKOCYTE BLOOD COMPOSITION OF *ELAPHE DIONE* (SERPENTES: COLUBRIDAE) IN ORENBURG STATE NATURE RESERVE (RUSSIA)

Elena B. Romanova[1,*], Evgeny I. Solomaykin[1], Andrey G. Bakiev[2,], Roman A. Gorelov[2]**

[1]*Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Russia*
**e-mail: romanova@ibbm.unn.ru*
[2]*Institute of Ecology of the Volga River Basin of RAS, Russia*
***e-mail: herpetology@list.ru*

For the first time a hematological approach has been used to assess the status of the population of Dione snake *Elaphe dione* in a Protected Area (protected area «Aytuarskaya steppe» of the Orenburg State Nature Reserve). The blood formula (WBC) was calculated with the integral leukocyte indices (lymphocyte-granulocyte index, leukocyte shift index, index of the heterophiles and lymphocytes ratio, index of the heterophiles and eosinophils ratio, index of the lymphocytes and eosinophils ratio), the surface area of the main leukocyte types was measured: heterophiles, basophils, eosinophils, azurophiles, monocytes, and lymphocytes. Intraspecific gender differences were revealed for all the indicators studied. In females, the proportion of heterophiles and monocytes in peripheral blood is higher, compared with males; in contrast, the proportion of basophils and eosinophils is lower. Heterophiles, basophils, and eosinophils were characterised by moderate association with a qualitative trait (sex of the individual), and monocytes – by strong association ($r = 0.82$, $R^2 = 0.67$, $p = 0.001$). Morphometric parameters of male granulocytic series exceeded similar parameters of female ones. There were no statistically significant differences in morphometric parameters of mononuclear cells (azurophiles, monocytes, and lymphocytes) between males and females. A strong positive correlation was found between the content of heterophiles (%) in the blood and the ratio of heterophiles and lymphocytes ($r = 0.97$, $p = 0.001$), which illustrated the significant contribution of the nonspecific blood defence system to adaptive responses of the body. The absence of differences in the integral index of the heterophiles and lymphocytes ratio for males and females ($U = 1.33$, $p = 0.18$) indicated a comparable level of impact and identity of the physiological adaptation mechanisms occurring in the animals in Protected Area conditions. The haematic picture and the dynamics of leukocytal indexes of *Elaphe dione* living on the reserve territory reflected the active response of the organism to a complex of environmental factors , with the most pronounced activation of immune processes in females in comparison with males.

Key words: Dione snake, *Elaphe dione*, leukocytal index, Orenburg State Nature Reserve, peripheral blood, WBC (white blood cells)