

УДК 574.3.591

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЙ СОСТАВ КРОВИ ОБЫКНОВЕННОГО УЖА (*Natrix natrix*) И ВОДЯНОГО УЖА (*N. tessellata*) ИЗ НАЦИОНАЛЬНОГО ПАРКА «САМАРСКАЯ ЛУКА»

© 2014 Романова Е.Б.¹, Николаев В.Ю.¹, Бакиев А.Г.², Клёнина А.А.²

¹Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород

²Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

Поступила 01.02.2014

Проведены определение и оценка качественного состава клеток лейкоцитарного ряда в периферической крови ужа обыкновенного (*Natrix natrix*) и ужа водяного (*N. tessellata*), обитающих в Национальном парке «Самарская Лука». На межвидовом уровне в лейкоцитарных формулах крови не выявлено значимых различий. У ужа обыкновенного установлены внутривидовые различия по содержанию в крови базофилов (самки – самцы) и гетерофилов (самцы – неполовозрелые особи).

Ключевые слова: *Natrix natrix*, *Natrix tessellata*, лейкоцитарная формула, рептилии, периферическая кровь, иммунный статус.

Адаптация к изменяющимся условиям обитания протекает не одинаково не только в различных систематических группах организмов, но и у близких видов и даже популяций. Известно, что гематологическая составляющая иммунитета отражает любые функциональные изменения организма, происходящие в процессе жизнедеятельности животного [2]. Это ярко выражено у низших наземных позвоночных – амфибий и рептилий, чья зависимость от внешних условий среды хорошо известна [11]. Поэтому сравнительный анализ гематологических характеристик двух видов змей рода *Natrix*: ужа обыкновенного *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) и ужа водяного *N. tessellata* (Laurenti, 1768) важен для выявления специфики путей адаптации на уровне одной из системы организма. Учитывая, что рептилии – эволюционно первая группа животных, у которой начинается расхождение клеток по самостоятельным лимфатическим и кровеносным путям [12, 13], изучение гематологии рептилий представляет важный шаг на пути к детальному исследованию иммуногемопоза этих животных в условиях антропогенной трансформации среды.

Целью работы являлась оценка лейкоцитарной формулы крови змей рода *Natrix*, обитающих на территории Национального парка «Самарская Лука».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На территории национального парка «Самарская Лука» в полевые сезоны 2012–2013 гг. (конец июля – начало августа) был произведён отлов двух видов змей: ужа обыкновенного (в 2012 г. – 15 особей; в 2013 г. – 14 особей) и ужа водяного (в 2012 г. – 43

особи; в 2013 г. – 42 особи). Для получения образцов крови змеям делали пункцию верхнечелюстной вены иглой, смоченной в растворе гепарина. После этого ужей возвращали в места отлова. По общепринятым гематологическим методикам от каждого животного готовили по два мазка (окраска по Романовскому–Гимзе). Готовые мазки просматривали с иммерсией, при увеличении $\times 1600$, с дифференцированным подсчётом лейкоцитарной формулы. Полученные экспериментальные данные обрабатывали непараметрическими методами с расчётом критериев Краскела–Уоллеса (H), Манна–Уитни (U) и Дэнна (Z), в пакете прикладных программ «Statistica» [7]. За величину статистической значимости принимали $\alpha=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, при дифференцировке лейкоцитов белой крови рептилий возникают определённые трудности, связанные с многовариантными формами зернистости в гранулоцитах и наличием несегментированных или нечётко сегментированных ядер [9]. В приготовленных мазках крови мы выявляли клетки как гранулоцитарного ряда (гетерофилы, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), так и агранулоцитарного (моноциты и лимфоциты). Особенностью крови рептилий является присутствие гетерофильных миелоцитов, имеющих характерную структуру специфических гранул в цитоплазме и относительно крупное ядро. Гетерофилы считаются наиболее реактивными лейкоцитами в крови рептилий и обладают высокой фагоцитарной активностью. Нейтрофильные миелоциты отличаются более мелкой «пылевидной» зернистостью. Ядро неправильной формы, смещено от центра к границам клетки. Базофильные гранулоциты рептилий отличаются от остальных клеток наличием многочисленных специфических гранул овальной или округлой формы, с неоднородной структурой. Обращает на себя внимание и разнообразие форм эозинофильных гранулоцитов [9].

Было выявлено, что у обоих изученных видов ужей (*N. tessellata* и *N. natrix*) преобладающими

Романова Елена Борисовна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры экологии, romanova@bio.unn.ru; Николаев Вадим Юрьевич, аспирант, darthtiger@yandex.ru; Бакиев Андрей Геннадьевич, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, herpetology@list.ru; Клёнина Анастасия Александровна, старший лаборант, аспирант, colubrida@yandex.ru

клетками лейкоцитарного ряда в периферической крови животных являлись лимфоциты. Их доля у обоих изученных видов составляла более 50% (табл. 1).

Таблица 1. Лейкоцитарная формула периферической крови ужа обыкновенного *N. natrix* и ужа водяного *N. tessellata*

Показатель	<i>N. natrix</i> (n=15)	<i>N. tessellata</i> (n=43)
	2012 г.	
Гетерофилы, %	10,00±0,72	10,74±0,44
Нейтрофилы, %	9,47±0,62	9,60±0,41
Эозинофилы, %	4,87±0,49	5,77±0,34
Базофилы, %	8,13±0,97	6,93±0,48
Моноциты, %	9,00±0,56	9,35±0,48
Лимфоциты, %	58,53±1,23	57,60±0,75
2013 г.		
Показатель	<i>N. natrix</i> (n=14)	<i>N. tessellata</i> (n=42)
Гетерофилы, %	11,07±0,74	11,12±0,56
Нейтрофилы, %	11,93±0,78	11,69±0,59
Эозинофилы, %	8,07±0,63	6,57±0,30
Базофилы, %	4,79±0,59	5,81±0,42
Моноциты, %	9,21±1,17	9,19±0,49
Лимфоциты, %	54,93±1,39	55,62±1,10

Таблица 2. Лейкоцитарная формула крови ужа обыкновенного (*N. natrix*), 2012 г.

Группа	Показатель лейкограммы, %					
	Гетерофилы	Нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы	Моноциты	Лимфоциты
1. Самцы n=8	10,88±1,09	10,00±0,71	5,38±0,65	5,63±0,78	9,88±0,72	58,25±1,86
2. Самки n=5	9,20±1,16	7,80±1,07	4,80±0,86	11,00±1,38	8,00±0,89	59,20±2,46
<i>Статистические показатели: критерий Манна–Уитни (U); уровень значимости (p)</i>						
U_{1-2}	0,82	1,48	0,51	2,64	1,53	0,02
p	≅1,00	0,428	≅1,00	0,03	0,37	≅1,00

Примечание: жирным шрифтом выделены значимые различия

Таблица 3. Лейкоцитарная формула крови ужа обыкновенного (*N. natrix*), 2013 г.

Группа	Показатель лейкограммы, %					
	Гетерофилы	Нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы	Моноциты	Лимфоциты
1. Самцы n=8	12,75±0,82	12,63±1,18	8,00±0,80	4,50±0,82	7,88±1,19	54,25±1,60
2. Неполовозрелые особи n=6	8,83±0,60	11,00±0,89	8,17±1,14	5,17±0,91	11,00±2,13	55,83±2,57
<i>Статистические показатели: критерий Манна–Уитни (U); уровень значимости (p)</i>						
U_{1-2}	2,65	0,84	0,06	0,45	0,52	0,52
p	0,01	0,40	0,95	0,65	0,61	0,61

Примечание: жирным шрифтом выделены значимые различия

Таблица 4. Лейкоцитарная формула крови ужа водяного (*N. tessellata*), 2012 г.

Группа	Показатель лейкограммы, %					
	Гетерофилы	Нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы	Моноциты	Лимфоциты
1. Самцы n=11	11,00±0,92	9,36±0,54	4,91±0,46	7,00±1,04	9,91±0,77	57,82±1,54
2. Самки n=7	10,29±1,13	9,71±0,81	6,71±0,97	5,86±1,01	10,14±1,30	57,29±2,63
3. Неполовозрелые особи n=25	10,76±0,57	9,68±0,63	5,88±0,48	7,20±0,64	8,88±0,67	57,60±0,88
<i>Статистические показатели: критерий Краскела–Уоллеса (H); уровень значимости (p)</i>						
H	0,27	0,08	3,46	1,24	1,93	0,02
p	0,87	0,95	0,18	0,54	0,38	0,99

Сравнительный анализ лейкоцитарных формул, полученных для каждого вида ужей, по критерию Манна–Уитни (U) не выявил значимых межвидовых различий ни по одному из показателей. Так, по данным 2012 г. значения U и p составили: для гетеро-

филов $U=293,50$, $p=0,61$; для нейтрофилов $U=316,50$, $p=0,92$; для эозинофилов $U=279,0$, $p=0,50$; для базофилов $U=278,00$, $p=0,43$; для моноцитов $U=316,50$, $p=0,92$; для лимфоцитов $U=246,50$, $p=0,18$.

Представляло интерес оценить внутривидовые (половые и возрастные) различия в лейкоцитарных показателях каждого из двух видов ужей.

У ужа обыкновенного по данным 2012 г. выявлены статистически значимые различия по количественному содержанию гранулоцитов в крови самок и самцов. У самок, по сравнению с самцами, в периферической крови выше доля базофильных гранулоцитов ($U_{1-2}=2,64; p=0,03$) (табл. 2).

Сравнение лейкоцитарных формул ужа обыкновенного ($n=14$) в 2013 г., показало, что у неполовозрелых особей ($n=6$) по сравнению с самцами ($n=8$) меньше относительное содержание гетерофилов в периферической крови ($U_{1-2}=2,65; p=0,01$) (табл. 3).

В лейкоцитарных формулах ужа водяного не выявлены значимые различия ни внутри выборки 2012 г. (табл. 4), ни внутри выборки 2012 г. (табл. 5).

Таблица 5. Лейкоцитарная формула крови ужа водяного (*N. tessellata*), 2013 г.

Группа	Показатель лейкограммы, %					
	Гетерофилы	Нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы	Моноциты	Лимфоциты
1. Самцы $n=12$	11,25±0,85	11,00±0,55	6,50±0,42	5,25±0,74	9,67±0,64	56,33±1,56
2. Самки $n=14$	11,29±1,42	11,64±1,08	7,43±0,54	6,64±0,82	8,36±0,93	54,64±2,62
3. Неполовозрелые особи $n=16$	10,88±0,57	12,25±1,19	5,88±0,49	5,50±0,63	9,56±0,88	55,94±1,40
<i>Статистические показатели: критерий Краскела–Уоллеса (H); уровень значимости (p)</i>						
<i>H</i>	0,41	0,25	4,15	1,22	1,52	0,20
<i>p</i>	0,81	0,88	0,13	0,54	0,47	0,90

Таблица 6. Интегральные гематологические показатели лейкограмм обыкновенного и водяного ужей, 2012 г.

Группа	Лейкоцитарный индекс [3]	Индекс сдвига лейкоцитов [4]
Уж обыкновенный (<i>N. natrix</i>)	1. Самцы	6,07±0,54
	2. Самки	8,32±1,47
<i>Статистические показатели: критерий Манна–Уитни (U); уровень значимости (p)</i>		$U_{1-2}=1,37; p\geq 1,00$
Уж водяной (<i>N. tessellata</i>)	3. Самцы	6,46±0,51
	4. Самки	6,17±0,61
	5. Неполовозрелые особи	6,78±0,57
<i>Статистические показатели: критерий Данна (Z); уровень значимости (p)</i>		$Z_{3-4}=0,16; p\geq 1,00$ $Z_{3-5}=0,70; p\geq 1,00$ $Z_{4-5}=0,77; p\geq 1,00$ $Z_{1-3}=0,19; p\geq 1,00$ $Z_{2-4}=0,47; p\geq 1,00$

Таблица 7. Интегральные гематологические показатели лейкограмм обыкновенного и водяного ужей, 2013 г.

Группа	Лейкоцитарный индекс [3]	Индекс сдвига лейкоцитов [4]
Уж обыкновенный (<i>N. natrix</i>)	1. Самцы	4,62±0,51
	2. Неполовозрелые особи	5,24±0,47
<i>Статистические показатели: критерий Манна–Уитни (U); уровень значимости (p)</i>		$U_{1-2}=0,37; p\geq 1,00$
Уж водяной (<i>N. tessellata</i>)	3. Самцы	5,33±0,41
	4. Самки	5,34±0,60
	5. Неполовозрелые особи	5,31±0,59
<i>Статистические показатели: критерий Данна (Z); уровень значимости (p)</i>		$Z_{3-4}=0,22; p\geq 1,00$ $Z_{3-5}=0,19; p\geq 1,00$ $Z_{4-5}=0,04; p\geq 1,00$ $Z_{1-3}=0,98; p\geq 1,00$ $Z_{2-4}=0,54; p\geq 1,00$

Сопоставление результатов за два года выявило значимые различия по содержанию в крови рептилий гранулоцитов. У самок (2012) по сравнению с самцами ужа обыкновенного (2013) выше доля базофильных гранулоцитов, а у самок (2013) ужа во-

дяного по сравнению с самцами (2012) ужа водяного выше доля эозинофильных гранулоцитов.

В развитии защитных реакций организма основную роль играют лейкоциты, и поэтому изменение лейкоцитарной формулы крови может служить по-

казателем качества среды [5, 6, 8, 10 и др.]. Кроме того, сезонное перераспределение лейкоцитарного состава, по-видимому, способствует выживанию животных в неблагоприятных условиях среды. Так, ранее были выявлены сезонные различия по четырём типам лейкоцитов (моноцитам, гетерофилам, базофилам и эозинофилам) в крови обыкновенных ужей, отловленных весной, летом и осенью в Оренбургской области и Пермском крае [1].

Для оценки быстроты и характера реагирования лейкоцитарного клеточного ряда удобно пользоваться интегральными гематологическими показателями, к которым относятся лейкоцитарные индексы. Достоинством этих индексов является возможность перевода лейкоцитарных формул в числовые показатели, отражающие степень интоксикации организма. Мы рассчитали лейкоцитарный индекс интоксикации [3], представляющий собой отношение процентной доли лимфоцитов к процентной доле нейтрофильных гранулоцитов и индекс сдвига лейкоцитов [4], под которым понимают соотношение гранулоцитов и агранулоцитов.

По нашим данным интегральные гематологические индексы значимых различий между анализированными выборками не выявили (табл. 6, 7), следовательно, степень выраженности иммунофизиологического процесса внутри вида у самцов и самок и неполовозрелых особей была одинаковой. Анализ лейкоцитарных формул двух видов ужей, обитающих на территории национального парка «Самарская Лука», собранных во второй половине сезона активности, значимых межвидовых различий не выявил, что может быть обусловлено большой генетической близостью этих видов. Межполовые различия выявлены в лейкограммах выборок ужа обыкновенного по содержанию гранулоцитарных клеток, выполняющих определенные функции в поддержании иммунного статуса организма в изменяющихся условиях внешней среды.

Авторы признательны к.б.н. Н.М. Акуленко (Киев) и д.б.н. В.К. Шитикову (Тольятти) за прочтение рукописи и сделанные замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьёва А.С. Сравнительная характеристика периферической крови змей Волжского бассейна // Актуальные проблемы герпетологии и токсинологии: Сб. науч. тр. Вып. 10. Тольятти, 2007. С. 25-30.
2. Галактионов В.Г. Проблемы эволюционной иммунологии // Медицинская иммунология. 2004. Т. 6, № 3-5. С. 159-170.
3. Гаркави Л.Х., Квакуна Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции на резистентность организма. Ростов-на-Дону: АЗНИИРХ, 1977. 224 с.
4. Житенева Л.Д., Рудницкая О.А., Калужная Т.И. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб. Ростов-на-Дону: АЗНИИРХ, 1997. 149 с.
5. Лобода Е.И. Морфологические и цитохимические особенности клеток белой крови у представителей некоторых видов холоднокровных позвоночных // Вестн. зоологии. 1998. Т. 32, № 3. С. 5-57.
6. Пескова Т.Ю. Адаптационная изменчивость земноводных в антропогенно загрязненной среде: Дис. ... д-ра биол. наук. Тольятти, 2004. 284 с.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2006. 312 с.
8. Романова Е.Б. Гематологические аспекты механизмов адаптации природных популяций зеленых лягушек в условиях антропогенного средового стресса // Актуальные проблемы герпетологии и токсинологии: Сб. науч. тр. Вып. 8. Тольятти, 2005. С. 169-176.
9. Соколова Ф.М., Павлов А.В., Юсупов Р.Х. Гематология пресмыкающихся. Методическое пособие к курсу герпетологии, большому практикуму и семинарам. Казань: Казан. ун-т, 1997. 31 с.
10. Чернышова Э.В., Старостин В.И. Периферическая кровь лягушек рода *Rana* – тест-система для оценки окружающей среды // Изв. РАН. Сер. биол. 1994. № 4. С. 656-660.
11. Cooper E.L. Comparative immunology. Engle Wood Cliffs, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1976. 422 p.
12. Cuchens M.A., Clem L.W. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. IV. Evidence for T-like and B-like cells in reptiles // Dev. Comp. Immunol. 1979. V. 3. P. 465-475.
13. Dabrowski Z., Sano Martins I.S., Tabarowski Z. et al. Haematopoiesis in snakes (Ophidia) in early postnatal development // Cell. Tissue Res. 2007. V. 328. P. 291-299.

THE LEUKOGRAM OF GRASS SNAKE (*Natrix natrix*) AND DICED SNAKE (*N. tessellata*) IN NATIONAL PARK «SAMARSKAYA LUKA»

© 2014 Romanova E.B.¹, Nikolaev V.Yu.¹, Bakiev A.G.², Klenina A.A.²

¹Nizhny Novgorod's Lobachevsky State University, Nizhny Novgorod

²Institute of Ecology of the Volga River Basin of RAS, Togliatti

The identification and evaluation of the qualitative composition of the leukocyte cell number in the peripheral blood of the grass snake (*Natrix natrix*) and diced snake (*N. tessellata*) habitated in the National Park «Samarская Лука» were studied. At the interspecific level leukogram's significant differences were not found. In the blood of the grass snake intraspecific differences of leukograms were found in content of basophiles (males – females) and heterophiles (males – immatures).

Key words: *Natrix natrix*, *Natrix tessellata*, WBC, reptiles, peripheral blood, immune status.