ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2023, том 510, с. 278–282

УДК 599.426: 574.24: 591.111.1

СЕЗОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРУДОВОЙ НОЧНИЦЫ *MYOTIS DASYCNEME* (BOIE, 1825), ОБИТАЮЩЕЙ НА УРАЛЕ

© 2023 г. Л. А. Ковальчук[1,*], В. А. Мищенко[1,2], Л. В. Черная[1], В. П. Снитько[3], академик РАН В. Н. Большаков[1]

Поступило 29.12.2022 г.
После доработки 20.01.2023 г.
Принято к публикации 22.01.2023 г.

Впервые представлен сравнительный анализ иммуногематологических параметров наиболее массового вида фауны рукокрылых Урала прудовой ночницы *Myotis dasycneme* (Boie, 1825) в сезонные периоды их годового жизненного цикла. Многомерный непараметрический дисперсионный анализ показал отсутствие значимых половых различий у летучих мышей по исследованным параметрам красной крови ($p = 0.35$). Установлена половая детерминация ночниц по содержанию в крови лейкоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов ($p < 0.05$). Самцы характеризуются более высоким развитием врожденного иммунитета в летний период года в сравнении с самками ($p < 0.05$). В осенне-зимний период гибернации у самцов и самок наблюдается значительный лимфоцитарный профиль (50.6–53.5%), обеспечивающий иммунный “надзор” и специфически реактивную активацию приобретенного адаптивного иммунного ответа.

Ключевые слова: летучие мыши, лейкоциты, врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет

DOI: 10.31857/S2686738922601072, **EDN:** QGMYNT

Представленная работа продолжает авторский цикл публикаций, посвященных исследованию интегрирующей роли системы крови рукокрылых в формировании адаптивной стратегии, обеспечивающей функциональную устойчивость природных популяций фауны Урала [1–3]. Авторами отмечена видовая специфика иммунной системы и ее защитных или цензорных функций в регуляции физиологических процессов у летучих мышей уральской фауны [2]. Цель исследования: сравнительный анализ сезонной изменчивости иммуногематологических параметров периферической крови прудовой ночницы *Myotis dasycneme* (Boie, 1825).

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия*

[2] *Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия*

[3] *Южно-Уральский федеральный научный центр минералогии и геоэкологии Уральского отделения Российской академии наук, Ильменский государственный заповедник, Миасс, Россия*

**e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru*

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Прудовые ночницы *Myotis dasycneme* (Boie, 1825) отловлены на Южном и Среднем Урале в период 2013–2015 гг. как в районах их массового летнего обитания и выведения потомства, так и в местах концентрации зимующих рукокрылых. Животные отловлены паутинными сетями или сняты вручную со стен зимних убежищ на территории Челябинской области (55°10′04″ с.ш., 60°21′08″ в.д.) в окрестностях озера Малое Миассово и на территории Свердловской области (56°25′44″ с.ш., 61°36′44″ в.д.) как в Смолинской карстовой пещере, так и в ее окрестностях. Исследования на взрослых летучих мышах без признаков заболеваний из природных популяций проведены в сезонные периоды жизненных циклов: летнее воспроизводство популяции (вторая декада июля), осенью в период массовых миграций к местам зимовки (третья декада сентября), зимой в период торпора (третья декада февраля) и весной в период завершения гипобиоза (первая декада апреля). Среднесуточная температура воздуха в местах обитания прудовой ночницы была в апреле от +3°C до +8°C, в июле +21°C... +23°C, осенью +5°C... +7°C. В феврале среднесуточная температура воздуха на местности была от –16°C до –20°C, а в пещере: от 0°C до +2°C в условиях чрезвычайно высокой влажности [4]. Отлов и содержа-

ние летучих мышей ($n = 51$), доставленных в лабораторию, осуществляли в соответствии с правилами по защите животных, используемых для экспериментальных и научных целей [5]. Для стандартизации условий все животные в течение суток находились в прохладном контейнере, где каждая особь выбирала определенное место и в дальнейшем двигательная активность не наблюдалась. Забор крови проводили в стерильные вакуумные пробирки "BD Vacutainer" с ЭДТА (Великобритания). Периферическую кровь (400–800 μl) экспериментальных животных исследовали на гематологическом анализаторе "BC–5800" (Mindray, Китай), определяя 17 показателей крови. Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ "Statistica for Windows V.10.0". Метод главных компонент (PCA) реализован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакет "Ade4") [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По исследованным параметрам красной периферической крови животных многомерный непараметрический дисперсионный анализ показал отсутствие значимых половых различий у летучих мышей ($p = 0.35$), что несомненно отражает универсальность адаптивной реакции самцов и самок на поддержание гомеостаза. Существенные изменения в функциональной активности системы крови у самцов и самок прудовой ночницы выявлены в условиях, связанных с их сезонным жизненным циклом ($p = 0.001$). Все изучаемые параметры красной крови ночниц характеризуются невысокой вариабельностью в период подготовки к зимней спячке и во время гибернации (осень, зима, весна) в сравнении с летними животными. Для концентрации гемоглобина (Hb: 167.9–187.2 г/л, при $p = 0.08$) и связанных с ним показателей: гематокрита (HCT: 47.2–51.5%, при $p = 0.1$), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH: 15.9–17.6 пг, при $p = 0.31$), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC: 343.8–380.3 г/л, при $p = 0.07$), отмечено отсутствие статистически значимых различий во все сезоны годового жизненного цикла животных ($p > 0.05$). Кровь рукокрылых характеризуется высоким уровнем содержания гемоглобина, гематокрита и эритроцитов (RBC = 9.6–11.5 Т/л, при $p = 0.01$), свидетельствуя о высоком уровне дыхательной функции летающих животных [7]. Наблюдаемое в летний период снижение среднего объема эритроцита (MCV) как осенью (на 5% в сравнении, $p = 0.05$), так и зимой, и весной (на 9%, $p = 0.01$) способствует возрастанию скорости поглощения кислорода гемоглобином, повышая качество газообмена. В осенне-зимний период и весной у прудовой ночницы в сравнении с активными летними животными отмечено двукратное повышение циркулирующих в крови тромбоцитов (PLT = 256.2–271.3 Г/л, при $p = 0.001$) и тромбокрита (PCT = 0.16–0.17%, при $p = 0.0002$). Тромбоциты, участвуя в иммунных и аллергических реакциях, формируют первую линию защиты организма от сезонных патогенов при стабильно низких среднесуточных температурах воздуха на местности (от +3°C до +8°C) и в пещере (от 0°C до +2°C) [8, 9]. Лейкоцитарные клетки периферической крови прудовой ночницы, ответственные за проявление реакций, как естественного иммунитета, так и приобретенного адаптивного иммунного ответа [10], подвержены определенным колебаниям в различные сезонные периоды года (табл. 1).

Лимфоциты, как основа гуморального иммунитета, ограничивают распространение инфекций, выполняя функцию иммунного надзора в организме, и отвечают за формирование общего и специфического иммунитета [11, 12]. Показано, что абсолютное содержание лимфоцитов в крови самок во все сезоны значимо выше, чем у самцов летом в 2.0 раза, осенью в 2.3 раза, зимой в 1.7 раза, весной в 1.8 раза ($p < 0.05$) (табл. 1). Количественное содержание моноцитов, продуцирующих провоспалительные цитокины, у самок значимо выше, чем у самцов в летний период в 4.3 раза и в период глубокой зимней спячки в 2.5 раза ($p < 0.05$). У зимующих летучих мышей, находящихся в состоянии гибернации, количество моноцитов возрастает в сравнении с летним сезоном на 166% у самцов и на 100% у самок ($p < 0.05$), что, несомненно, иллюстрирует модуляцию иммунной системы на поддержание адаптивного потенциала животных к патогенному спектру антигенов низкотемпературной среды их обитания [13, 14].

Статистически значимые гендерные различия по эозинофилам отмечены у самок и самцов в весенний период (в 6 раз, при $p < 0.05$) при наличии их незначительных сезонных колебаний годового жизненного цикла ($p = 0.12$). Активация эозинофильного гранулоцитопоэза в крови рукокрылых может свидетельствовать об антитоксической и антимикробной реакции в организме в период завершения гипобиоза и вылета животных из зимовочных пещер. Анализ показал отсутствие в крови животных индикаторов клеточных воспалительных и аллергических реакций замедленного типа: базофильных гранулоцитов (табл. 1). Показаны гендерные и сезонные значимые изменения в крови прудовых ночниц по содержанию гранулоцитарных лейкоцитов (палочкоядерные, сегментоядерные нейтрофилы) в осенний период подготовки животных к гипобиозу, в состоянии торпора зимой и при весеннем пробуждении ($p < 0.05$).

В лимфоцитарно-гранулоцитарном составе крови летом у самок преобладают агранулоциты

Таблица 1. Лейкоцитарный состав периферической крови прудовой ночницы

Показатели	Пол	I. Лето n: ♂ (5)/♀ (5)	II. Осень n: ♂ (7)/♀ (8)	III. Зима n: ♂ (9)/♀ (7)	IV. Весна n: ♂ (5)/♀ (5)	F_{obs} / p©
		$\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$ [95% CI_{boot}]				
Лейкоциты, Г/л	♂	1.64 ± 0.08 [1.49–1.81]	2.33 ± 0.26 [1.89–2.90]	1.20 ± 0.16▲ [0.88–1.51]	2.05 ± 0.27¶ [1.71–2.65]	4.21 / 0.01
	♀	2.84 ± 0.07@ [2.70–2.96]	4.69 ± 0.20*@ [4.34–5.11]	2.20 ± 0.14*▲@ [1.92–2.47]	3.69 ± 0.31*▲¶@ [3.11–4.29]	
Нейтрофилы, Г/л	♂	0.87 ± 0.04 [0.79–0.96]	1.13 ± 0.14 [0.89–1.44]	0.56 ± 0.08▲ [0.40–0.71]	1.06 ± 0.10¶ [0.91–1.29]	3.57 / 0.02
	♀	1.34 ± 0.11@ [1.14–1.55]	2.23 ± 0.11*@ [2.02–2.45]	1.00 ± 0.08▲@ [0.84–1.14]	1.94 ± 0.19*¶@ [1.58–2.31]	
юные, Г/л	♂	0.14 ± 0.05 [0.05–0.24]	0.06 ± 0.02 [0.04–0.10]	0.02 ± 0.004* [0.01–0.03]	0.11 ± 0.01¶ [0.09–0.14]	2.93 / 0.04
	♀	0.07 ± 0.01 [0.05–0.10]	0.09 ± 0.01 [0.07–0.10]	0.08 ± 0.01@ [0.05–0.10]	0.14 ± 0.03 [0.09–0.20]	
палочкоядерные, Г/л	♂	0.40 ± 0.05 [0.31–0.52]	0.46 ± 0.09 [0.32–0.65]	0.18 ± 0.03*▲ [0.12–0.24]	0.42 ± 0.04¶ [0.37–0.50]	3.24 / 0.03
	♀	0.93 ± 0.07@ [0.80–1.07]	0.92 ± 0.08@ [0.78–1.08]	0.32 ± 0.03*▲@ [0.27–0.37]	0.85 ± 0.10¶@ [0.66–1.05]	
сегментоядерные, Г/л	♂	0.32 ± 0.06 [0.19–0.43]	0.61 ± 0.08* [0.45–0.76]	0.36 ± 0.05▲ [0.26–0.45]	0.53 ± 0.06 [0.43–0.66]	5.65 / 0.004
	♀	0.34 ± 0.12 [0.11–0.59]	1.21 ± 0.03*@ [1.14–1.28]	0.60 ± 0.05▲@ [0.49–0.70]	0.95 ± 0.08*▲¶@ [0.81–1.11]	
Лимфоциты, Г/л	♂	0.74 ± 0.06 [0.64–0.87]	1.07 ± 0.10 [0.88–1.29]	0.55 ± 0.07▲ [0.41–0.68]	0.79 ± 0.14 [0.60–1.10]	8.60 / 0.0003
	♀	1.40 ± 0.05@ [1.31–1.49]	2.43 ± 0.13*@ [2.21–2.71]	0.96 ± 0.08*▲@ [0.83–1.12]	1.39 ± 0.11▲¶@ [1.19–1.61]	
Моноциты, Г/л	♂	0.03 ± 0.01 [0.002–0.06]	0.11 ± 0.03 [0.05–0.17]	0.08 ± 0.02 [0.05–0.11]	0.18 ± 0.04*¶ [0.12–0.26]	3.31 / 0.03
	♀	0.13 ± 0.02@ [0.08–0.17]	0.09 ± 0.02 [0.06–0.12]	0.20 ± 0.03▲@ [0.16–0.26]	0.29 ± 0.04*▲ [0.22–0.37]	
Эозинофилы, Г/л	♂	0.01 ± 0.005 [0.002–0.02]	0.02 ± 0.01 [0.01–0.04]	0.02 ± 0.01 [0.01–0.03]	0.01 ± 0.007 [0.00–0.03]	2.08 / 0.12
	♀	0.03 ± 0.01 [0.02–0.05]	0.04 ± 0.01 [0.02–0.05]	0.03 ± 0.01 [0.02–0.05]	0.06 ± 0.01@ [0.05–0.08]	

Примечание: * – статистически значимые сезонные различия: *I* и *II*, *I* и *III*, *I* и *IV* ($p < 0.05$); ▲ – статистически значимые различия: *II* и *III*, *II* и *IV* ($p < 0.05$); ¶ – статистически значимые различия: *III* и *IV* ($p < 0.05$); @ – половые различия ($p < 0.05$); $\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$ – среднее арифметическое и ошибка среднего бутстреп-распределения; [95% CI_{boot}] – доверительный интервал бутстреп-распределения; © – $p = Pr(|Fran| \geq Fobs)$ – двухфакторный дисперсионный анализ с перестановочным тестом (рандомизация).

(54.1%), а у самцов гранулоциты (53.6%) ($p < 0.05$). Репрезентативным показателем усиленного пресса сезонной гипоксической нагрузки на организм и длительного воздействия низких положительных и околонулевых температур (в осенне-зимний период гибернации) является повышенное содержание в крови самцов и самок (50.6–53.6%) агранулоцитов, обеспечивающих иммунный “надзор” и специфическую реактивность организма (адаптивный иммунитет). При этом у животных отмечено отсутствие гендерных различий и по процентному содержанию гранулоцитов в периферической крови (47.1–49.4%, при $p = 0.35$). Весенний процесс пробуждения и выхода из глубокой гипотермии сопровождается значимой реактивностью системы врожденного

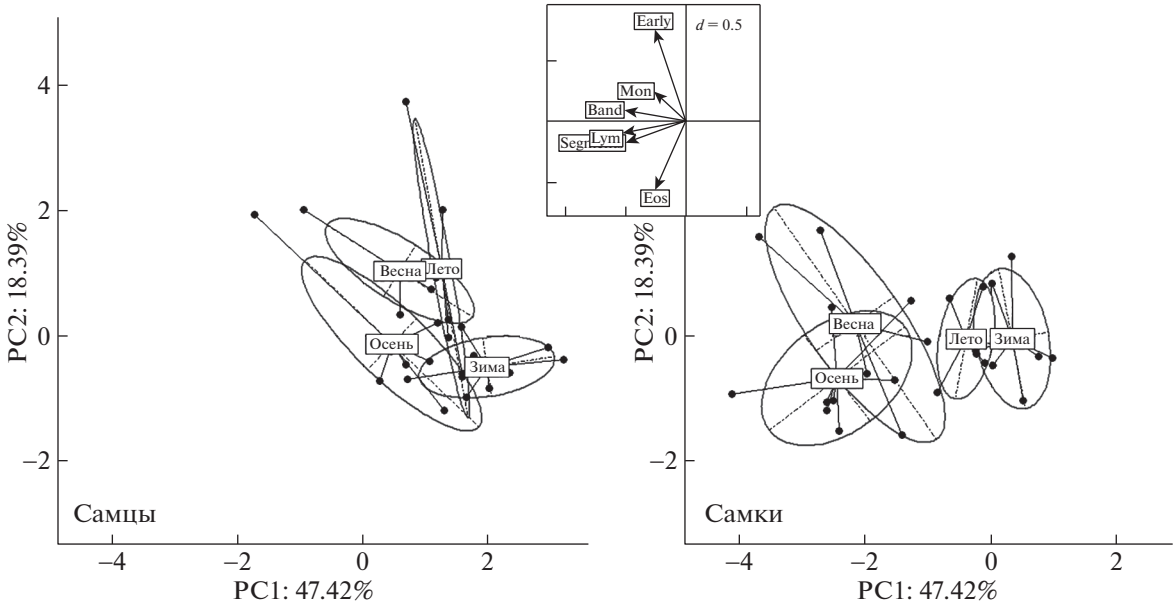

Рис. 1. Параметры лейкоцитарной формулы самцов и самок *Myotis dasycneme* в разные сезоны года (лето, осень, зима, весна) в пространстве первых двух главных компонент. Условные обозначения: PC1, PC2 – оси главных компонент, % – процент дисперсии данных, объясненных главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями (лейкоциты); эллипсы представляют собой 95% доверительные области; early, band, segments, Lym – лимфоциты, Mon – моноциты, Eos – эозинофилы.

иммунитета у самцов и самок (гранулоциты: 53.2–54.2%, соответственно при $p = 0.35$), обеспечивающей неспецифическую срочную защиту организма, в том числе и для предотвращения вирусной инвазии до выработки специфической защиты адаптивной иммунной системой [15].

Методом главных компонент (PCA) визуализирована гендерная и сезонная специфика лейкоцитарного состава крови прудовых ночниц, подтверждая результаты выше представленного статистического анализа (рис. 1). Основной вклад в сезонную изменчивость показателей белой крови по первой главной компоненте, на которую приходится 47.42% общей дисперсии, вносят лимфоциты (28.71%), палочкоядерные (26.54%) и сегментоядерные (24.91%) нейтрофилы. Высокие коэффициенты корреляции отмечены с PC1: 0.90, –0.87, –0.84 (соответственно, при $p < 0.001$). Согласно вкладу этих параметров по PC1 отмечена пространственная дифференциация исследованных особей на две сезонные группы лето+зима и осень+весна, наиболее ярко выраженная у самок.

По PC2, с которой сильно коррелируют показатели белой крови – юные нейтрофилы (0.80), эозинофилы (–0.60), сформированы сезонные группы животных. Значимый вклад во вторую компоненту, на которую приходится 18.39% общей дисперсии параметров белой крови, отмечен для юных нейтрофилов (57.51%) и эозинофилов (32.27%) при достаточно высоких коэффициентах корреляции с PC2. Показано, что более 40% общей дисперсии данных определяются показателями белой крови, скореллированными в нашем анализе с PC1, и около 20% – скореллированными с PC2. Представленная вариабельность параметров крови вызвана изменениями физиологического состояния животных и экстремальными условиями, обусловленными их сезонными жизненными циклами. Наряду с едиными закономерностями, выявленными в путях поддержания гомеостаза, показана и определенная разнонаправленность в мобилизации механизмов аварийного регулирования лимфоидной системы крови самцов и самок летучих мышей.

Таким образом, впервые представлен сравнительный анализ сезонной изменчивости иммуногематологических параметров периферической крови прудовой ночницы *Myotis dasycneme* (Boie, 1825), обитающей на Урале. Полученные референтные иммуногематологические параметры позволяют расширить и систематизировать имеющиеся сведения об адаптивных механизмах системы крови летучих мышей на сезонные стрессы среды и могут быть использованы для осуществления долговременного мониторинга при решении задач сохранения популяций летучих мышей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государ-

ственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН (№ 122021000091-2).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Отлов и содержание животных в лаборатории осуществляли с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, используемым для экспериментальных и научных целей [5].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mishchenko V.A., Kovalchuk L.A., Bolshakov V.N., et al.* Comparative analysis of the amino acid spectrum of blood plasma in Chiroptera (*Vespertilio murinus* L., 1758 and *Myotis dasycneme* B., 1825) in the fauna of the Ural Mountains // Doklady Biological Sciences. 2018. V. 481. № 1. P. 157–159.
2. *Ковальчук Л.А., Мищенко В.А., Черная Л.В.,* и др. Особенности иммуногематологических параметров перелетного (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) и оседлого (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) видов рукокрылых фауны Урала // Доклады РАН. Науки о жизни. 2021. Т. 501. № 6. С. 543–546.
3. *Ковальчук Л.А., Мищенко В.А., Черная Л.В.,* и др. Оценка сезонной изменчивости спектра свободных аминокислот плазмы крови бореального вида фауны рукокрылых Урала – прудовой ночницы *Myotis dasycneme* (Boie, 1825) // Доклады РАН. Науки о жизни. 2022. Т. 507. С. 63–67.
4. *Большаков В.Н., Орлов О.Л., Снитько В.П.* Летучие мыши Урала. Екатеринбург, 2005.
5. *Yarri D.* The Ethics of Animal Experimentation. Oxford: Oxford Univer Press. 2005.
6. *Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J.* The age4 package-I: One-table methods / R News. 2004. № 4. P. 5–10.
7. *Bandouchova H., Zukal J., Linhart P., et al.* Low seasonal variation in greater mouse-eared bat (*Myotis myotis*) blood parameters // PLoS One. 2020. V. 15 (7): e0234784.
8. *Черешнев В.А., Шмагель К.В.* Иммунология: учебник для вузов. М.: Центр стратегического партнерства. 2014.
9. *Хаитов Р.М.* Иммунология: структура и функции иммунной системы. М.: ГЭОТАР – Медиа. 2013.
10. *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. V. 22. P. 760–772.
11. *Schountz T.* Immunology of Bats and Their Viruses: Challenges and Opportunities // J. Viruses. 2014. V. 6 (12). P. 4880–4901.
12. *Baker M.L., Schountz T., Wang L.F.* Antiviral Immune Responses of bats: A Review // Zoonoses and Public Health. 2013. V. 60 (1). P. 104–116.
13. *Coico R., Sunshine G., Benjamini E.* Immunology. A Short Course. Hoboken. NJ: Wiley-Liss Publications. 2003.
14. *Zimmerman L.M., Bowden R.M., Vogel L.A.* A vertebrate cytokine primer for eco-immunologists // Functional Ecology. 2014. V. 28. P. 1061–1073.
15. *Koyama S., Ishii K.J., Coban C.,* et al. Innate immune response to viral infection // Cytokine. 2008. Sep. V. 43 (3). P. 336–341.

SEASONAL VARIABILITY OF IMMUNOHEMATOLOGICAL PARAMETERS OF PERPHERAL BLOOD OF THE BAT *MYOTIS DASYCNEME* (BOIE, 1825) LIVING IN THE URALS

L. A. Kovalchuk[a,#], V. A. Mishchenko[a,b], L. V. Chernaya[a], V. P. Snit'ko[c], and Academician of the RAS V. N. Bolshakov[a]

[a] *Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Plant and Animal Ecology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia*

[b] *Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections of the SSC VB "Vector" Rospotrebnadzor, Yekaterinburg, Russia*

[c] *South Ural Federal Scientific Centre of Mineralogy and Environmental Geology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ilmen Reserve, Miass, Russia*

[#]*e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru*

A comparative analysis of the immunohematological parameters of bats from fauna of the Urals *Myotis dasycneme* (Boie, 1825) in seasonal periods of their annual life cycle is presented for the first time. Multivariate nonparametric analysis of variance showed the absence of significant gender differences in bats according to the studied parameters of red blood ($p = 0.35$). The sexual determination of bats was established by the content of leukocytes, band neutrophils and segments neutrophils, lymphocytes in the blood ($p < 0.05$). Males are characterized by a higher development of innate immunity in the summer compared to females ($p < 0.05$). In the autumn-winter hibernation period, males and females have a significant lymphocytic profile (50.6–53.5%), providing immune "supervision" and specifically reactive activation of the acquired adaptive immune response.

Keywords: bats, leukocytes, innate immunity, adaptive immunity