

DOI: 10.7868/S004445291804004X

**СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ  
ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ (MYOTIS DASYSNEME)  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ  
НИЗКИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ОКОЛОНУЛЕВЫХ ТЕМПЕРАТУР**

© Л. А. Ковальчук,<sup>1</sup> В. А. Мищенко,<sup>1, 2</sup> Н. В. Микшевич,<sup>3</sup>  
Л. В. Черная,<sup>1</sup> М. В. Чибиряк,<sup>1</sup> А. П. Ястребов<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> Федеральный университет им. Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Уральский государственный педагогический университет,  
Екатеринбург, Россия

<sup>4</sup> ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ,  
Екатеринбург, Россия

E-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

**Резюме**

Изучение существующих в природе физиологических и биохимических механизмов толерантности к воздействию низких температур важно для понимания эволюции и экологии гетеротермных животных. В плане формирования гомеостатических механизмов в экстремальных условиях низких температур летучие мыши, эволюционно обладающие высокой экологической пластичностью и стратегией холодоустойчивости в экосистемах целых континентов, остаются наименее изученной группой гетеротермных позвоночных. *Цель работы:* изучить спектр свободных аминокислот в плазме крови рукокрылых в условиях экспериментального воздействия низких положительных и околонулевых температур. *Объекты исследования:* бореальный вид рукокрылых — прудовая ночница (*Myotis dasysneme*), отловлена в зоне массового обитания летучих мышей и базирования их зимних и летних колоний на Среднем Урале в районе расположения Смолинской пещеры (56°28' с. ш., 61°37' в. д.) в период подготовки к зимнему сезону в третьей декаде сентября в 2015 году. Зимует *Myotis dasysneme* в глубине пещеры при температуре от 0 °С до +2 °С. *Результаты.* Качественный состав аминокислотного спектра плазмы крови прудовой ночницы представлен 21 аминокислотой (АК). В модельном эксперименте при температуре 0—2 °С фонд свободных АК рукокрылых (независимо от их половой принадлежности) значимо возрос на 42 % и составил  $1561.4 \pm 112.6$  мкмоль/л ( $p = 0.01$ ). Показано увеличение гликогенных на 34 % ( $p = 0.01$ ) и незаменимых на 80 % ( $p = 0.001$ ) аминокислот в крови охлажденных животных. Обнаружено у рукокрылых (контроль) в осенний период подготовки к зимней спячке и у животных (охлажденных в эксперименте) отсутствие триптофана, что позволяет сделать предположение о его востребованности для синтеза серотонина — биогенного амина, участвующего в поддержании гипотермии и гипометаболизма животных. Исследования свободных аминокислот в плазме крови летучих мышей (*Chiroptera*, *Vespertilionidae*), обитающих на Урале, проводятся впервые.

*Ключевые слова:* летучие мыши, аминокислоты, кровь, гибернация.

**Введение**

Изучение существующих в природе физиологических и биохимических механизмов толерантности к воздействию низких температур важно для понимания эволюции и экологии гетеротермных животных [1, 2]. Ряд исследователей считают, что временная гетеротермия — важный долгосрочный механизм выживания и большинство недавно вымерших млекопитающих, вероятно, не обладали биохимическими механизмами,

способствующими устойчивости и толерантности к отрицательным температурам среды обитания. В ряде исследований [3—6] показано, что у гетеротермных животных с их гибкими энергетическими возможностями ключевая стратегия выживания всюду по их эволюционной истории является определяющей в продлении жизни перед гомойотермными. Отмечая адаптивное преимущество гетеротермных перед гомойотермными в ответ на непредсказуемые условия, исследователи подчеркивают, что использование состояния

гипобиоза, вероятно, дает гетеротермным видам преимущество перед гомойотермными животными и позволяет приспособиться к выживанию в перманентно изменяющейся окружающей среде.

Гибернация, закрепленная в ходе эволюции, является энергосберегающим состоянием, при котором происходит значительное снижение температуры тела, позволяет животным разного филогенетического уровня и различных экологических групп при минимизации жизненных функций выживать в неблагоприятных условиях среды. Потребление кислорода и метаболические процессы снижаются, замедляется частота сердечных сокращений при экстремально низкой температуре тела, колеблющейся у разных видов в пределах от +2 до +4 °C [7], но в некоторых случаях снижающейся до –2 °C [8]. Так, в зимний период европейский суслик впадает в оцепенение с определенной периодичностью разогрева, когда температура тела восстанавливается к эутермическому уровню на несколько часов [9]. По данным авторов [10, 11], у исследованных видов зимоспящих животных, обитающих в зоне Арктики и Субарктики, в период зимней гибернации наблюдается низкий уровень метаболизма при снижении температуры тела близкой к 0 °C у бурундуков, а у длиннохвостых сусликов — до –1 °C ÷ –1.2 °C. Исследования Н. Г. Соломонова с соавторами [12] показали, что длиннохвостый (*Spermophilus undulates*) и арктический (*Spermophilus parryi* Richardson, 1827) суслики в торпидном состоянии имеют температуру тела ниже нуля. Авторы работы [13], демонстрируя молекулярные механизмы регуляции мелких млекопитающих в период длительной зимней гибернации, отмечали падение скорости метаболизма более чем на 90 % и снижение ректальной температуры до 0 °C.

У арктических сусликов при гибернации наблюдалось увеличение в 3–4 раза содержания одного из низкомолекулярных антиоксидантов — аскорбата в плазме крови и спинномозговой ткани к моменту завершения торпора [14]. Вместе с тем было отмечено снижение энзиматической активности в тканях у животных при экстремально низкой температуре тела –2 °C [7, 8]. Несмотря на обширные исследования гибернирующих животных, основные механизмы гипометаболизма по-прежнему являются предметом обсуждения. В исследованиях на насекомых была подтверждена гипотеза о том, что эволюция холодовых стратегий насекомых в экстремально холодном регионе привела к продукции высокоспециализированных молекул, эффективно защищающих клетки от летального замерзания [15]. Морозоустойчивость вида *A. crataegi* основана на продукции глицерина и лед-нуклеирующих белков. В зимний период экстракт гусениц боярышницы, обладающий криопротекторными свойствами, представлен аминокислотами: пролин, аспарагиновая кислота, серин, треонин и глутаминовая аминокислота. Известны исследования М. В. Карановой [16, 17] о роли свободных аминокислот в формировании адаптивных процессов пресноводного моллюска *Limnaea stagnalis* к околонулевым температурам и влияния холодового шока на пул свободных аминокислот прудовой рыбы ротана *Perccottus glehni*. В ряде

работ [18, 19] представлены исследования по сезонной изменчивости свободных аминокислот в тканях пиявок *Hirudo verbana carena*, *Hirudo medicinalis* и в процессе адаптации животных к низким положительным температурам в условиях разных климато-географических зон. Востребованность в аминокислотном фонде у гетеротермных животных в течение торпора резко возрастает, ибо снижение метаболизма влечет за собой нарушения в синтезе белков как на уровне инициации, так и на уровне элонгации.

В последние годы возрос интерес к летучим мышам как к объекту исследования и получена обширная информация о численности, видовом составе, условиях обитания рукокрылых, о биологических ритмах и их биоэнергетике при сезонном и временном гипобиозе [20–23]. Коллектив исследователей [24] представил данные по эколого-физиологической адаптации пяти видов южноамериканских летучих мышей в торпидном состоянии. Ими отмечена высокая активность антиоксидантных ферментов в крови и тканях: содержание  $\alpha$ -токоферола и  $\beta$ -каротина в печени, почках, сердечной и грудной мышцах были на два порядка выше, чем в печени исследованных крыс и мышей. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) крови и действия супероксиддисмутазы (SOD) и каталазы были выше в период гибернации в сравнении с активными животными. Авторы высказали предположение, что летучие мыши имеют эффективную систему антиоксидантной защиты, способной к ежедневной модуляции для устранения окислительных повреждений, связанных с гипоксией-реоксигинацией в период выхода из состояния гипобиоза. Е. П. Антонова с коллегами [23] показала роль системы антиоксидантных ферментов в адаптации гибернирующих рукокрылых. Автор отмечает, что снижение активности каталазы и увеличение активности супероксиддисмутазы в тканях летучих мышей является одним из физиологических механизмов приспособления к периодической гипоксии-реоксигинации в период гибернации.

Тем не менее летучие мыши, эволюционно обладающие высокой экологической пластичностью и определенной стратегией холодоустойчивости в экосистемах целых континентов, до сих пор остаются наименее изученной группой гетеротермных позвоночных в аспекте формирования гомеостатических механизмов в условиях продолжительных околонулевых колебаний температуры среды обитания.

Рукокрылые эндемики (Mammalia Chiroptera: Veshertilionidae) лесных биоценозов Палеарктики обладают важной биологической особенностью — способностью как к перманентным периодам неактивного состояния в течение суток, так и к длительной гибернации во время зимнего периода (5–7 мес). Зоологи отмечают [20], что наиболее массовый бореальный вид рукокрылых на Урале — прудовая ночница (*Myotis dasycneme*) зимует в глубине пещер при температуре от 0 °C до +2 °C в условиях чрезвычайно высокой влажности (90–100 %).

Пристального внимания исследователей удостоились механизмы действия многих биологически активных веществ, гормонов и биогенных аминов, обеспе-

чивающих мобилизацию резервных возможностей организма гетеротермных животных в условиях низких температур. Поскольку свободные аминокислоты и их дериваты, участвуя в процессах синтеза структурных белков и являясь предшественниками биогенных аминов и ряда биологических активных соединений, рассматриваются и с позиций модифицирующего действия их на ключевые метаболические процессы [25], а участие полифункциональных свободных аминокислот в метаболическом обеспечении адаптивного ответа на отрицательные и низкие положительные температуры у животных по-прежнему является предметом обсуждения, то задача нашей работы заключалась в изучении спектра свободных аминокислот в плазме крови рукокрылых в условиях экспериментального воздействия низких положительных и околонулевых температур.

Имеющаяся в литературе информация о метаболизме свободных аминокислот у криотолерантных и холодоустойчивых представителей летучих мышей Chiroptera, Vespertilionidae при воздействии низких положительных и околонулевых температур в период подготовки к гибернации не представлена.

Природно-адаптированные к воздействию низких температур в естественных условиях зимней спячки летучие мыши служат удобной моделью для изучения процессов реактивации жизни после низкотемпературного стресса, которому они подвергаются в природе. Статья посвящена проблемам гибернации, а именно исследованию спектра свободных аминокислот в плазме крови летучих мышей. Следует отметить, что исследования свободных аминокислот в плазме крови летучих мышей (Chiroptera, Vespertilionidae), обитающих на Урале, проводятся впервые.

## Материал и методика

Прудовая ночница (*Myotis dasycneme*, Boie, 1825;  $n = 24$ ) отловлена паутиными сетями в зоне массового обитания летучих мышей и базирования их зимних и летних колоний на Среднем Урале в районе расположения Смолинской пещеры (56°28' с. ш., 61°37' в. д.) в третьей декаде сентября в 2015 году — в период подготовки к зимнему сезону. В период отлова среднесуточная температура воздуха на местности была +10 °С ÷ +12 °С, а в пещере: от 0 °С до +2 °С. В лабораторном эксперименте использованы летучие мыши (*adultus*) из природных популяций без признаков заболеваний. Для стандартизации условий все животные в течение суток находились в холодильном контейнере при температуре +10 °С ÷ +12 °С. Следует отметить, что каждая особь выбирала определенное место в контейнере и в дальнейшем двигательная активность не наблюдалась. Животные находились в состоянии покоя. Опытная группа животных подвергалась гипотермии путем индивидуального помещения животных в холодильную камеру при температуре, адекватной температуре воздуха в пещере (0—2 °С) в течение 6 часов. Отлов и содержание животных, доставленных в лабораторию, осуществляли в соответствии с прави-

лами, принятыми Европейской конвенцией (1986) по защите животных, используемых для экспериментальных и научных целей [26].

Физиологическое состояние животных оценивали по температуре тела (измеряли ректально датчиком электротермометра ТПЭМ-1) и по параметрам основного обмена [регистрировали по потреблению кислорода (мл/г · час) с помощью газоанализатора МН-5130] (Россия). Массу тела исследуемых животных определяли взвешиванием на электронных весах (Acculab PP-200d11) с точностью ± 0.1 г. Забор крови проводили после декапитации животных в стерильные вакуумные пробирки BD Vacutainer с ЭДТА (Англия).

*Глюкозу и триглицериды в плазме крови определяли по стандартным методикам, описанным в приложении к наборам.* Для получения плазмы кровь центрифугировали при 3000 об/мин × 15 мин, 0 °С в рефрижераторной ультрацентрифуге К-23 D (Германия). Глюкозу и триглицериды определяли в плазме крови энзиматическим колориметрическим методом с использованием наборов фирмы «BioSystems» (Испания). Оптическую плотность стандартной пробы и образцов измеряли на спектрофотометре (СФ-50 Ломо Спектр) при длине волны 500 нм. Концентрацию глюкозы в плазме (предел обнаружения 0.0126 ммоль/л) вычисляли по формуле:  $(A_{\text{проба}}/A_{\text{станд}}) \times C_{\text{станд}}$  (5.55 ммоль/л) =  $C_{\text{образца}}$ . Концентрацию триглицеридов в плазме (предел обнаружения 0.018 ммоль/л) вычисляли по следующей формуле:  $(A_{\text{проба}}/A_{\text{станд}}) \times C_{\text{станд}}$  (2.26 ммоль/л) =  $C_{\text{образца}}$ .

*Определение аминокислот и мочевины в плазме крови.* Подготовку образцов к исследованию содержания аминокислот и мочевины в плазме крови животных проводили по стандартной методике [27]. Кровь центрифугировали при 8000 об/мин × 15 мин, 0 °С в рефрижераторной ультрацентрифуге К-23 D. После окончания центрифугирования плазма аспирируется в полиэтиленовую пробирку, где проводится ее депротенизация. Согласно прописи стандартной методики, к 0.5 мл супернатанта (плазмы) добавляется 0.1 мл 30%-ной сульфосалициловой кислоты (ССК). Добавляется 0.2 мл 7%-го гидроксида лития (LiOH) для нейтрализации кислой реакции раствора и 0.1 мл норлейцина ( $C_6H_{13}NO_2$  — 2.5 μмоль/л) [фирма BIOALCHEMA-TEST. PRAHA] — в качестве внутреннего стандарта. Вторично центрифугировали содержимое пробирки при 10000 об/мин × 30 мин, 0 °С. Супернатант (400 μл), подготовленный для проведения анализа, наносили на колонку аминокислотного анализатора.

Концентрацию мочевины и свободных аминокислот (АК) в плазме крови летучих мышей определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии на автоматическом анализаторе ААА-339М (Чехия, Микротехна) при температурах 38, 57 и 64 °С в системе, состоящей из пятиступенчатого градиента литий-цитратного буфера: № 1 — 0.18 *n*, pH 2.90; № 2 — 0.20 *n*, pH 3.1; № 3 — 0.35 *n*, pH 3.35; № 4 — 0.33 *n*, pH 4.05; № 5 — 1.2 *n*, pH 4.9. Колонка: 0.47 × 24.0 см, неподвижная фаза — катионообменная смола Ostion LG FA. Послеколоночная модификация аминокислот

проводилась с нингидрином, интенсивность его окрашивания измеряли при 525 нм. Для каждой серии опытов прописывали хроматограмму стандартной смеси АК из 36 компонентов (0.1  $\mu\text{моль/л}$ ): цистеиновая кислота, таурин, фосфоэтаноламин, мочеви́на (10 $\times$ ), аспараги́новая кислота, гидроксипролин, треонин, серин, аспарагин, глутами́новая кислота, глутамин,  $\alpha$ -аминоади́пиновая кислота, пролин, глицин, аланин, цитруллин,  $\alpha$ -аминома́сляная кислота, валин,  $\frac{1}{2}$  цистин, метионин, цистатионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин,  $\beta$ -аланин,  $\beta$ -аминоизома́сляная кислота,  $\gamma$ -аминома́сляная кислота, этаноламин, аммиак, орнитин, лизин, гистидин, 1-метилгистидин, 3-метилгистидин, аргинин (LaChema, Чехия). В качестве внутреннего стандарта использовали норлейцин (2.5  $\mu\text{моль/л}$ , LaChema, Чехия). Для количественной оценки рассчитывали коэффициент цветности АК (отношение площади пика отдельной аминокислоты к площади пика норлейцина). Концентрацию аминокислот в плазме крови ( $\mu\text{моль/л}$ ) определяли соотношением полученных коэффициентов цветности в пробе и в стандартной смеси. Для каждого исследуемого образца на хроматограмме прописывали весь спектр свободных АК и определяли концентрацию каждой из них в  $\mu\text{моль/л}$  и в % от суммарного содержания. Рассчитывали суммарные концентрации: заменимых АК (ЗАК); незаменимых АК (НАК); гликогенных АК (ГГАК); серосодержащих АК (ССАК); АК с разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ: валин+лейцин+изолейцин); ароматических АК (АРАК: фенилаланин+тирозин).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием лицензионных прикладных программ «Statistica v. 10.0» (StatSoft, Ink) и статистической среды R. При оценке различий групповых средних в выборках определяли  $\bar{X}_{\text{boot}}$  [95 % CI $_{\text{boot}}$ ] — среднее арифметическое и доверительный интервал бутстреп-распределения [28]. При оценке полученных различий в исследуемых группах использовали критерий Tukey's HSD Test, F-критерий Фишера (дисперсионный анализ ANOVA). Многомерный непараметрический дисперсионный анализ (*np*MANOVA) и метод главных компонент (PCA) проведены с помощью статистической среды R (R 3.1.2, пакет «Ade4») [29].

## Результаты и обсуждение

При отсутствии значимых различий по массе тела у животных, участвующих в эксперименте (табл. 1), показано, что у насекомых рукокрылых гомеостаз внутренней среды поддерживается эволюционно закрепившейся стратегией как поведенческих, так и физиологических адаптаций. У летучих мышей в осенний период подготовки к зимней гибернации при экспериментальном охлаждении (0—2 °С) через 6 ч ректальная температура самцов и самок снижается на 4.8 °С ( $p = 0.001$ ), но еще поддерживается в пределах физиологического уровня температуры тела животных в летний период у самцов  $28.8 \pm 1.7$  °С [25.3—32.1] и у самок  $32.2 \pm 0.3$  °С [31.7—33.0] при потреблении кислорода:  $3.9 \pm 0.41$  °С [3.1—4.7] мл/г·ч [30]. Основной

обмен у самцов в торпидном состоянии возрастал в 2.4 раза ( $p = 0.0001$ ) (табл. 1). Отмечен стабильный и достаточно высокий уровень содержания глюкозы в крови самцов. Уровень гликемии самок значительно ниже, чем у самцов ( $p = 0.04$ ). Падение основного обмена у самок ( $p = 0.0001$ ) при действии околонулевых температур сопровождалось тенденцией к снижению содержания глюкозы в крови. Концентрация мочевины в крови экспериментальных животных повышена ( $p = 0.01$ ). Увеличено содержание в крови триглицеридов в 3.7 раза ( $p = 0.05$ ) у самок и в 1.9 раза ( $p = 0.05$ ) у самцов. Значение триглицеридов, как основного источника энергии для нормального функционирования организма в условиях низких температур отмечено и другими исследователями [31] (табл. 1).

Аминокислотный спектр плазмы крови исследованных особей *Myotis dasycneme* представлен 21 АК (табл. 2). Многомерный непараметрический дисперсионный анализ показал, что между самцами и самками отсутствуют значимые различия по суммарной концентрации свободных аминокислот в плазме крови летучих мышей как в контрольной группе, так и при экспериментальном охлаждении (0—2 °С) в течение 6 ч.

В качестве одного из факторов, участвующих в низкотемпературной адаптации летучих мышей в период подготовки к зимней гибернации, выступает пул свободных аминокислот: в плазме крови животных (при 0—2 °С) фонд свободных АК летучих мышей (независимо от их половой принадлежности) возрос на 42 % и составил  $1561.4 \pm 112.6$  мкмоль/л ( $p = 0.01$ ) (табл. 2). Его существенный рост при акклимации к отрицательным температурам свидетельствует о развитии метаболического дисбаланса, обусловленного модификацией заменимых и незаменимых аминокислот как предикторов проявляющихся криопротекторных функций по подготовке животных к пролонгированному периоду низких температур и сохранению энергетических ресурсов [16—19, 32].

Анализ содержаний заменимых и незаменимых АК в плазме крови контрольных осенних летучих мышей и животных в условиях эксперимента не показал значимых различий в концентрациях таурина, аспартата, треонина, серина, аланина, глутамина, цистеина и орнитина ( $p > 0.05$ ) (табл. 2). Следует подчеркнуть доминирующий уровень суммарного содержания аланина, глутамата и таурина в крови летучих мышей как в осенний период подготовки к гипобиозу, так и в состоянии торпора в эксперименте. Уровень этих АК составлял в осенний период 48 % от общего пула свободных аминокислот, а в состоянии гипобиоза в эксперименте — 46 %. Стабильно высокая аккумуляция этих АК дает основание предположить их ролевое участие в процессах, обеспечивающих возможность выживания рукокрылых при низких температурах, что подтверждается и высоким содержанием пула гликогенных АК (34 %) ( $p = 0.01$ ) в крови животных при охлаждении (0—2 °С). Содержание дикарбоновой аминокислоты аспарагина при пониженных температурах (0—2 °С) у самцов снижается до следовых количеств. У самок аспарагин обнаруживается только в следовых количествах (табл. 2).

Таблица 1

**Морфофизиологические параметры *Myotis dasycneme* и биохимические показатели плазмы крови при экспериментальном охлаждении (0—2 °С)**

$\bar{X}_{boot}$ [95 % CI <sub>boot</sub> ]				Источник вариации $p = \Pr( F_{ran}  \geq F_{obs})$	Permutation Two-way ANOVA $p = \Pr( F_{ran}  \geq F_{obs})$  Tukey's Test ( $p < 0.05$ )	
I. <i>Контроль</i>		II. <i>Охлаждение</i>				
1. ♂ ( $n = 6$ )	2. ♀ ( $n = 6$ )	3. ♂ ( $n = 5$ )	4. ♀ ( $n = 5$ )	<i>Exper</i> (1)		
				Пол (2)		
				1×2		
<p align="center">Масса тела, г</p> <p align="center">16.8 [15.5—18]   17.3 [16.3—18.3]</p>				0.61	$\Pr( F_{ran}  \geq F_{obs}) = 0.61$	
<p align="center">рО<sub>2</sub>, мл/г·час</p> <p align="center">5.1 [4.2—6.1]   6.1 [4.8—7.2]   12.2* [10.1—13.9]   1.2*@ [0.7—1.9]</p>				0.63		1—3
<p align="center">Ректальная температура, t °С</p> <p align="center">34.2 [32.4—35.3]   29.4* [27.9—30.6]</p>				0.43		2—4
1. ♂ ( $n = 4$ )	2. ♀ ( $n = 4$ )	3. ♂ ( $n = 6$ )	4. ♀ ( $n = 7$ )	0.14	3—4	
<p align="center">Триглицериды, ммоль/л</p> <p align="center">0.33 [0.22—0.44]   0.23 [0.16—0.3]   0.62* [0.55—0.69]   0.86* [0.68—1.03]</p>				<b>0.0001</b>	$\Pr( F_{ran}  \geq 19.05) = 0.001$	
<p align="center">Глюкоза, ммоль/л</p> <p align="center">4.51 [3.69—5.36]   3.71 [2.67—4.83]   4.6 [3.36—6.01]   2.77*@ [2.32—3.28]</p>				0.2	1—3	
<p align="center">Мочевина, мкмоль/л</p> <p align="center">672.1 [411.4—1017.9]   1897.5* [411.4—1017.9]</p>				<b>0.05</b>	2—4	
1. ♂ ( $n = 5$ )	2. ♀ ( $n = 5$ )	3. ♂ ( $n = 7$ )	4. ♀ ( $n = 7$ )	<b>0.01</b>	3—4	
				0.46	$\Pr( F_{ran}  \geq 12.32) = 0.01$	
				0.21		
				<b>0.04</b>		
				<b>0.01</b>		
				0.41		
				0.57		

Примечание. \* — статистически значимые различия: «Контроль» и «Охлаждение»; 1 и 3, 2 и 4 ( $p < 0.05$ ); @ — половые различия ( $p < 0.05$ );  $\bar{X}_{boot}$  [95 % CI<sub>boot</sub>] — среднее арифметическое и доверительный интервал бутстреп-распределения;  $p = \Pr(|F_{ran}| \geq F_{obs})$  — двухфакторный дисперсионный анализ с перестановочным тестом (рандомизация); *Exper* — фактор «Эксперимент».

Эффект исчезновения триптофана в крови контрольных осенних летучих мышей наблюдается и при пониженных температурах (0—2 °С). По данным, полученным нами ранее, триптофан присутствует в тканях летучих мышей *Myotis dasycneme* в летний период воспроизводства популяции [32]. Отмечено, что содержание триптофана значимо выше в печени сеголеток (в 3 раза), чем у взрослых особей ( $p < 0.05$ ). Гипотермический эффект биогенного амина серотонина (или его предшественника 5-окситриптофана) отмечали исследователи у сусликов [33] и у зимоспящих золотистых хомячков [34]. Вероятно, отсутствие незаменимой аминокислоты триптофана является проявлением одного из механизмов низкотемпературной адаптации в результате его полного расходования на синтез серотонина — биогенного амина — одного из триггеров, активно участвующего в поддержании гипотермии и гипометаболизма животных в осенний период подготовки к зимней спячке [1].

Показано, что в период снижения температуры окружающей среды (0—2 °С) в плазме крови интенсивно аккумулируются незаменимые аминокислоты: глицин в 1.5 раза ( $p = 0.01$ ), валин в 3 раза ( $p = 0.001$ ), метионин в 2.5 раза ( $p = 0.001$ ) (табл. 2). У самцов и самок адаптивно активизируется процесс использования ароматических аминокислот: фенилаланина на 216 % ( $p = 0.002$ ), а у самок — тирозина на 276 % ( $p = 0.01$ ) (предшественников катехоламинов: адреналина и норадреналина, играющих существенную роль в механизмах зимней спячки гетеротермных) (табл. 2). У летучих мышей (при 0—2 °С) в плазме крови возрастает аккумуляция аминокислот с низкой гидрофобностью, участвующих в качестве регуляторов и стимуляторов физиологических функций: лизина в 1.5 раза у самцов и в 2.5 раза у самок ( $p = 0.02$ ), аргинина в 4.5 раза у самок ( $p = 0.003$ ) и гистидина в 2.3 раза у самок и самцов ( $p = 0.001$ ). Подтверждением этому служат публикации по исследованию физиологических стратегий хо-

Таблица 2

## Содержание аминокислот в плазме крови прудовой ночницы при экспериментальном охлаждении (0—2 °С)

АК, мкмоль/л	$\bar{X}_{boot}$ [95 % CI <sub>boot</sub> ]				Permutation Two-way ANOVA ( $p = \Pr( F_{ran}  \geq F_{obs})$ )  Tukey's Test ( $p < 0.05$ )
	I. Контроль ( $n = 9$ )		II. Охлаждение ( $n = 8$ )		
	1. ♂ ( $n = 5$ )	2. ♀ ( $n = 4$ )	3. ♂ ( $n = 4$ )	4. ♀ ( $n = 4$ )	
Cysteic acid	6.5 [3.5—9.5]	14.2 [11—17.4]	47.9 [27.9—65.1]*	17.6 [10.5—27.1]@	<b>1—3; 3—4</b>
Glutamic acid	131.2 [105—159.6]		218.3 [180.7—257.1]*		$\Pr( F_{ran}  \geq 11.49) = \mathbf{0.01}$
Glycine	95 [82.7—110.3]		147 [116.5—179.4]*		$\Pr( F_{ran}  \geq 8.82) = \mathbf{0.01}$
Valine	25.6 [19.1—31.2]		80.6 [58.8—101]*		$\Pr( F_{ran}  \geq 20.75) = \mathbf{0.001}$
Methionine	7.7 [4.8—11]		19.7 [15.1—25.9]*		$\Pr( F_{ran}  \geq 13.89) = \mathbf{0.001}$
Isoleucine	14.5 [9—20.7]	11.3 [9—12.8]	6.4 [4.3—9.7]	21.8 [9.9—39.1]@	<b>3—4</b>
Leucine	25 [19.1—31.6]	16.6 [11.9—21.2]	23.2 [18.6—29.5]	43.4 [22.9—65.1]*	<b>2—4</b>
Tyrosine	13.3 [11—15.6]	13.8 [8.7—17]	14.8 [10.6—20.3]	38.1 [26—50.2]*@	<b>2—4; 3—4</b>
Phenylalanine	11.5 [9.3—13.7]		24.9 [18.1—32.8]*		$\Pr( F_{ran}  \geq 11.62) = \mathbf{0.002}$
Lysine	31.7 [26.4—37.9]	32.9 [27.4—38.3]	46.8 [40.1—53.6]*	81.7 [59.6—104.1]*@	<b>1—3; 2—4; 3—4</b>
Histidine	10.2 [7.8—12.3]		23 [18.2—28]*		$\Pr( F_{ran}  \geq 21.78) = \mathbf{0.001}$
Arginine	22.9 [19—27.4]	15.4 [6.1—32.6]	23.8 [12—36.9]	69.7 [54.2—90.9]*@	<b>2—4; 3—4</b>
Taurine	135.9 [82—210.1]		218.6 [145.6—304.8]		N. S.
Aspartic acid	39 [29.7—48.7]		52.9 [40.9—65.6]		» »
Threonine	75.7 [63.2—82.9]		78.2 [62.7—93.4]		» »
Serine	71 [57—86.4]		87.6 [67.3—107.7]		» »
Glutamine	78 [57.8—98.7]		62.8 [43.1—81.4]		» »
Alanine	265.8 [226.4—303.9]		274.5 [230.8—320.3]		» »
Cysteine	4.4 [1.4—7.9]		2.0 [0.4—3.7]		» »
Ornithine	40.5 [32.6—49.4]		53.3 [44.4—64.1]		» »
Asparagine	2.1 [1.7—2.6]	Следы	Следы	Следы	—
Фонд АК	1099.3 [960.5—1244.8]		1561.4 [1340.5—1782.3]*		$\Pr( F_{ran}  \geq 11.3) = \mathbf{0.01}$

Примечание. \* — статистически значимые различия: «Контроль» и «Охлаждение»; 1 и 3, 2 и 4 ( $p < 0.05$ ); @ — половые различия ( $p < 0.05$ );  $\bar{X}_{boot}$  [95 % CI<sub>boot</sub>] — среднее арифметическое и доверительный интервал бутстреп-распределения;  $p = \Pr(|F_{ran}| \geq F_{obs})$  — двухфакторный дисперсионный анализ с перестановочным тестом (рандомизация) — Permutation Two-way ANOVA; N. S. — нет значимых различий.

лодоустойчивости организмов, где отмечено участие представленных аминокислот в защите клеточных мембран от структурной деградации, вызванной гипотермией [16, 17, 35]. Поскольку пролонгированная гипотермия вызывает возрастание концентрации аминокислот — лизина, гистидина и аргинина, то предположение об их криопротекторном действии в условиях низкоположительных и околонулевых температур вполне обосновано.

Многомерный непараметрический дисперсионный анализ плазмы крови позволил определить и оценить характер и степень содержания метаболических групп свободных аминокислот, модифицирующих основные метаболические потоки в организме летучих мышей в торпидном состоянии (глюконеогенез, липогенез, цикл трикарбоновых кислот) (табл. 3).

На основании представленных результатов и анализа литературных данных впервые показано, что в период подготовки рукокрылых к состоянию гиберна-

ции защита клеточных мембран от структурной деградации, вызванной гипотермией, реализуется за счет участия аминокислот с полярными положительно заряженными радикалами (лизина, аргинина) и гистидина, обеспечивающих возможность выживания животных во время длительного зимнего периода (5—7 мес) при воздействии низких положительных и околонулевых температур, а депривация незаменимой аминокислоты триптофана как биологического прекурсора серотонина способствует формированию адаптивных процессов в организме к пролонгированному воздействию низких температур.

Использование многомерного анализа (Ade4-PCA) для идентификации различий по аминокислотному спектру и основных метаболических групп АК плазмы крови *Myotis dasycneme*, определяющих значимые различия между группами (контроль и охлаждение) летучих мышей при 95%-ном доверительном интервале показало, что 75.2 % общей дисперсии метаболических

Таблица 3

**Содержание метаболических групп аминокислот в плазме крови прудовой ночницы при экспериментальном охлаждении (0—2 °С)**

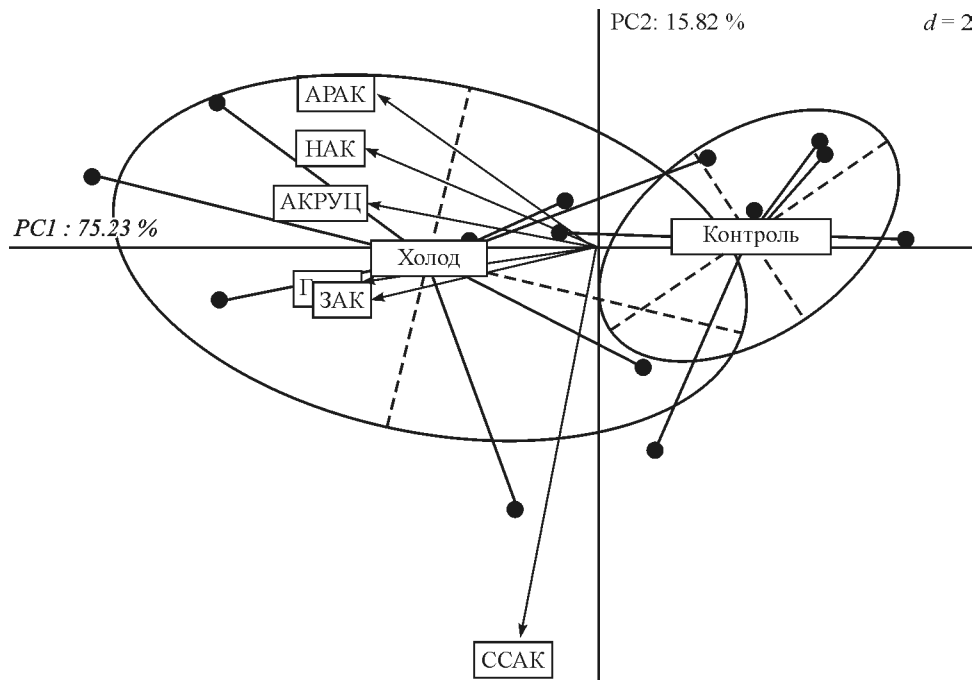
АК, мкмоль/л	Источник вариации и $p = \Pr( F_{\text{ran}}  \geq F_{\text{obs}})$	$\bar{X}_{\text{boot}}$ [95 % CI <sub>boot</sub> ]				Permutation ANOVA ( $p = \Pr( F_{\text{ran}}  \geq F_{\text{obs}})$ )
		I. Контроль (n = 9)		II. Охлаждение (n = 8)		
	Exper (I)	1. ♂ (n = 5)	2. ♀ (n = 4)	3. ♂ (n = 4)	4. ♀ (n = 4)	Tukey's Test ( $p < 0.05$ )
	Пол (2)					
	1×2					
Гликогенные (ГТАК)	<b>0.01</b> 0.08 0.68	821.5 [727.2—915.4]		1092.2 [938.6—1261.5]*		$\Pr( F_{\text{ran}}  \geq 8.06) = 0.01$
Заменимые (ЗАК)	<b>0.04</b> 0.06 0.75	699.3 [618—779.8]		872.3 [749.7—1012]*		$\Pr( F_{\text{ran}}  \geq 4.91) = 0.04$
Незаменимые (НАК)	<b>0.001</b> 0.1 0.06	213.7 [191.3—237.1]		384.8 [316.2—462.1]*		$\Pr( F_{\text{ran}}  \geq 25.59) = 0.001$
Серосодержащие (ССАК)	0.07 0.96 0.11	157.8 [101.5—233.9]		272.4 [187.9—371.8]		Нет значимых различий
С разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ)	<b>0.001</b> 0.49 0.15	59.9 [47.1—73]		127.8 [103.6—151]*		$\Pr( F_{\text{ran}}  \geq 23.47) = 0.001$
Ароматические (АРАК)	<b>0.0003</b> <b>0.04</b> <b>0.01</b>	26.6 [24—30.7]	22.9 [19.9—25.7]	35.7* [30.5—44]	66.9* [48.5—84.1]	1—3 2—4 3—4

Примечание. \* — статистически значимые различия: «Контроль» и «Охлаждение»; 1 и 3, 2 и 4 ( $p < 0.05$ ); @ — половые различия ( $p < 0.05$ );  $\bar{X}_{\text{boot}}$  [95 % CI<sub>boot</sub>] — среднее арифметическое и доверительный интервал бутстреп-распределения;  $p = \Pr(|F_{\text{ran}}| \geq F_{\text{obs}})$  — двухфакторный дисперсионный анализ с перестановочным тестом (рандомизация) — Permutation Two-way ANOVA; Exper — фактор «Эксперимент».

групп аминокислотного фонда плазмы крови рукокрылых приходится на первую главную компоненту (PC1), а 15.8 % — на вторую главную компоненту (PC2) (см. рисунок; табл. 4). По представленным переменным первая главная компонента (PC1) и вторая главная компонента (PC2) обуславливают значимые различия летучих мышей по основным метаболическим группам аминокислот в плазме крови (табл. 4). Альтерация фонда свободных аминокислот в плазме крови животных после 6-часового воздействия 0—2 °С значимо отличалась от осенних контрольных животных. Наибольший вклад в изменчивость АК пула по первой главной компоненте вносят метаболические группы: гликогенные АК, незаменимые АК, аминокислоты с разветвленной углеродной цепью, заменимые и ароматические аминокислоты (табл. 4). По этим переменным в соответствии с первой главной компонентой выделены животные в самостоятельную группу. Необходимо отметить особо высокое удельное содержание незаменимых аминокислот (20.7 %) и их сильную корреляцию с первой главной компонентой (−0.97) (табл. 4). Показан высокий коэффициент корреляции гликогенных аминокислот с PC1 (−0.95). Отмечено высокое процентное содержание серосодержащих

аминокислот метионина и цистеина и их сильная корреляция (−0.9) со второй главной компонентой (PC2) (табл. 4). Анализ (Ade4-PCA) позволил визуализировать значимые различия в аминокислотном спектре плазмы крови летучих мышей *Myotis dasycneme* контрольной группы и группы рукокрылых при экспериментальном охлаждении, подтверждая результаты выше представленного статистического анализа свободных аминокислот.

Таким образом, в результате исследования показано, что стратегия адаптации летучих мышей *Myotis dasycneme*, обитающих в различных экосистемах Уральского региона, к воздействию низких положительных и околонулевых температур реализуется за счет значительной аккумуляции свободных аминокислот и незаменимых АК (глутаминовая АК, аланин и треонин, глицин, валин, метионин, фенилаланин, лизин, аргинин, гистидин) в условиях околонулевых температур, что предполагает криопротекторную роль последних в обеспечении выживания гетеротермных животных во время зимнего периода гибернации. Холодовая резистентность и реактивация жизненных процессов летучих мышей при и после пролонгированного воздействия низких положительных и околонулевых темпера-



Метаболические группы аминокислот (мкмоль/л) плазмы крови летучих мышей *Myotis dasycneme* при экспериментальном охлаждении (0—2 °С) в пространстве первых двух главных компонент.

$PC1$ ,  $PC2$  — оси главных компонент, % — процент дисперсии данных, объясненных главной компонентой; *стрелки* отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями (метаболические группы аминокислот); *эллипсы* представляют собой 95%-ные доверительные области.

тур базируются на физиологических и молекулярных механизмах мобилизации резервных возможностей организма. Полученные материалы позволяют оценить связующую роль свободных аминокислот в интеграции метаболических процессов, сформировавшихся в эволюции рукокрылых, способствующих их высокой резистентности к воздействию околоулевых температур среды обитания в период длительного ги-

побиоза. Полагаем, что представленные результаты позволяют по-новому взглянуть на криопротекторную функцию свободных аминокислот у гетеротермных млекопитающих, что создает предпосылки для прогноза постгипотермических последствий в условиях моделирования и коррекции гипобиотических состояний в медицинских и биотехнологических целях, а также для криобиологии. Природно-адаптированные к воздей-

Таблица 4

**Результаты компонентного анализа метаболических групп аминокислот плазмы крови прудовой ночницы. Коэффициенты корреляции между метаболическими группами аминокислот плазмы крови и основными компонентами:  $PC1$  и  $PC2$  [использован пакет Ade4, стат. среда R]**

Групп АК, мкмоль/л ( $i = 6$ )	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )			Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 \cdot 100) / \lambda_j$ , %)		
	Главные компоненты (Principal components — PC), $j = 1, 2, 3$					
	1	2	3	1	2	3
ГГАК	# <b>-0.95***</b>	-0.07	0.29	# <b>20.06***</b>	0.59	21.79
ЗАК	# <b>-0.92**</b>	-0.09	0.38	# <b>18.61**</b>	0.92	37.19
НАК	# <b>-0.97***</b>	0.18	-0.13	# <b>20.7**</b>	3.47	4.52
ССАК	-0.38	# <b>-0.9***</b>	-0.18	3.24	# <b>86.11***</b>	8.64
АКРУЦ	# <b>-0.94***</b>	0.08	-0.23	# <b>19.5***</b>	0.69	13.6
АРАК	# <b>-0.9**</b>	0.28	-0.24	# <b>17.89**</b>	8.23	14.27
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC			Дисперсия, объясненная PC (%)		
	4.51	0.95	0.39	75.23	15.82	6.57

Примечание. \* —  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$ , \*\*\* —  $p < 0.001$ . # — отмечены аминокислоты, вклад которых в компоненты превышает средний вклад, рассчитываемый как  $1/\text{количество переменных}$ .



вию низких температур в естественных условиях зимней спячки рукокрылые могут служить удобной моделью для изучения процессов реактивации жизни после низкотемпературного стресса.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН и частично поддержана грантом Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» № 12-П-4-1049.

### Список литературы

- [1] Экологическая физиология животных. Часть. I. Общая экологическая физиология и физиология адаптаций / Под ред. А. Д. Слонима. Л., 1979.
- [2] Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution // New York: Oxford University Press. 2002.
- [3] Blanco M. A., Sherman P. W. Maximum longevity of chemically protected and non-protected fishes, reptiles, and amphibians support evolutionary hypotheses of aging // Mech. Ageing Dev. 2005. V. 126. P. 794—803. DOI:10.1016/j.mad.2005.02.006
- [4] Turbill C., Bieber C., Ruf T. Hibernation is associated with increased survival and the evolution of slow life histories among mammals. // Proc. R. Soc. B. 2011. V. 278. P. 3355—3363. DOI:10.1098/rspb.2011.0190
- [5] Geiser F., Westman W., McAllan B. M., Brigham R. M. Development of thermoregulation and torpor in a marsupial: energetic and evolutionary implications // J. Comp. Physiol. B. 2006. V. 176. P. 107—116.
- [6] Nowack J., Stawski C., Geiser F. More functions of torpor and their roles in a changing world // J. Comp. Physiol. B. 2017. DOI: 10.1007/s00360-017-1100-y.
- [7] Breukelen F., Martin S. L. Invited Review: Molecular adaptations in mammalian hibernators: unique adaptations or generalized responses? // J. Appl. Physiol. 2002. V. 92. P. 2640—2647.
- [8] Heldmaier G., Ortman S., Elvert R. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals // Respir. Physiol. Neurobiol. 2004. V. 141. P. 317—329.
- [9] Hut R. A., Barnes B. M., Daan S. Body temperature patterns before, during, and after semi-natural hibernation in the European ground squirrel // J. Comp. Physiol. 2002. V. 172B. P. 47—58.
- [10] Ануфриев А. И., Ахременко А. К. Энергетическая стоимость зимней спячки длиннохвостого суслика // Экология. 1990. № 5. С. 68—72.
- [11] Ануфриев А. И., Ахременко А. К. Зимняя спячка и терморегуляция при температуре ниже нуля // Экология. 1997. № 3. С. 233—235.
- [12] Solomonov N. G., Anufriev A. I., Solomonova T. N. Mechanisms of hibernation in small mammals of Yakutia // Cryobiology. 2010. V. 61. Iss 3. P. 397.
- [13] Storey K. B., Storey J. M. Metabolic rate depression: the biochemistry of mammalian hibernation // Adv. Clin. Chem. 2010. V. 52. P. 77—108.
- [14] Drew K. L., Toien O., Rivera P. M., Smith M. A., Perry G., Rice M. E. Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol. 2002. V. 133. P. 483—492.
- [15] Лу Н. Г. Физиологические механизмы адаптации насекомых к холодному и сухому климату Якутии. Автореф. докт. дис. Казань, 2014.
- [16] Каранова М. В., Гахова Э. Н. Биохимическая стратегия выживания пресноводного моллюска *Limnaea stagnalis* при околоулевых температурах // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2007. Т. 43. С. 258—264.
- [17] Каранова М. В. Влияние острого холодового шока на пулы свободных аминокислот прудовой рыбы ротана *Percocottus glehni* (Eleotridae, Perciformes) // Известия РАН. Сер. Биол. 2011. № 2. С. 153—162.
- [18] Chernaya L. V., Kovalchuk L. A., Nokhrina E. S. Season variability of free amino acids in the tissues of the medical leech (*Hirudo verbana carena*, 1820) // Russ. J. Ecology. 2015. N 46. P. 385—387.
- [19] Chernaya L. V., Kovalchuk L. A., Nokhrina E. S. Role of the tissue Free Amino Acids in adaptation of medicinal leeches *Hirudo medicinalis* L, 1758 to extreme climatic conditions // Doklady Biolog. Sci. 2016. V. 466. P. 42—44.
- [20] Большаков В. Н., Орлов О. Л., Снитко В. П. Летучие мыши Урала. Екатеринбург, 2005.
- [21] Ануфриев А. И., Ревин Ю. В. Биоэнергетика зимней спячки летучих мышей (Chiroptera, Vespertilionidae) в Якутии // Plecotus et al. 2006. V. 9. P. 8—17.
- [22] Stawski C., Willis C. K. R., & Geiser F. The importance of temporal in bats // J. Zoology. 2014. V. 292. P. 86—100. DOI: 10.1111/jzo.12105.
- [23] Антонова Е. П., Илюха В. А., Белкин В. В., Хижкин Е. А., Сергина С. Н., Ильина Т. Н., Якимова А. Е. Энергообеспечение и антиоксидантная защита летучих мышей в период зимней спячки // Ученые записки Орлов. гос. ун-та, 2014. № 7(63). С. 235—236.
- [24] Wilhelm Filho D., Althoff S. L., Dafre A. L., Boveris A. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol Pharmacol. 2007. V. 146(1—2). P. 214—220.
- [25] Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки. Пер. с англ. / М.: Мир, 1974.
- [26] Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург. 18 марта 1986 года). <http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/QueVoulezVous>.
- [27] James L. B. Amino acid analysis: a fall-off in performance // J. Chromatogr. 1997. V. 408. P. 291—295.
- [28] Шитиков В. К., Розенберг Г. С. Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. Тольятти, 2014.
- [29] Chessel D., Dufour A. B., Thioulouse J. The ade4 package-I: One-table methods. // R News. 2004. N 4. P. 5—10.
- [30] Мищенко В. А., Ковальчук Л. А., Черная Л. В., Чибряк М. В. Сезонные особенности основного обмена прудовой ночницы *Myotis dasysneme* (BOIE, 1825) обитающей на Урале. Горные экосистемы и их компоненты // VI Всерос. конф. с межд. участием. Нальчик., 2017. С. 162—164.
- [31] Wang P., Walter R. D., Bhat B. G., Florant G. L., Coleman R. A. Seasonal changes in enzymes of lipogenesis and triacylglycerol synthesis in the goldenmantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) // Comp. Biochem. Physiol. 1997. V. 118. P. 261—267.
- [32] Ковальчук Л. А., Мищенко В. А., Снитко В. П., Черная Л. В. Заменяемые и незаменимые аминокислоты в онтогенезе прудовой ночницы *Myotis dasysneme* (BOIE, 1825) // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 4. С. 1—6.
- [33] Якименко М. А., Попова Н. К. Влияние 5-окситриптофана на сократительный термогенез // Бюл. эксп. биол. и мед. 1976. Т. 81. № 2. С. 230—231.

- [34] Jansky L., Lehouckova M., Vybiral S., Bartunkova R., Stefl B. Effect of serotonin on thermoregulation of a hibernator (*Mesocricetus auratus*) // *Physiol. Bohemoslov.* 1973. V. 22. P. 115—124.
- [35] Anghodogny T., Carpenter J. F., Loomis S. H., Crowe J. H. Mechanisms of interaction of amino-acids with phospholipids-bilayers during freezing // *Biochem. Biophys. Acta.* 1972. V. 274. P. 75—82.

Поступила 12 VI 2017

FREE AMINO ACIDS IN BLOOD PLASMA OF BATS (*MYOTIS DASYCNEME BOIE, 1825*)  
EXPOSED TO LOW POSITIVE AND NEAR-ZERO TEMPERATURES

L. A. Kovalchuk,<sup>1</sup> V. A. Mishchenko,<sup>1, 2</sup> N. V. Mikshevich,<sup>3</sup> L. V. Chernaya,<sup>1</sup>  
M. V. Chibiryak,<sup>1</sup> and A. P. Yastrebov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Yekaterinburg, Russia

<sup>2</sup> Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Eltsin,  
Yekaterinburg, Russia

<sup>3</sup> Ural State Pedagogical University, Yekaterinburg, Russia

<sup>4</sup> Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

ABSTRACT

We report here for the first time the analysis of the blood plasma free amino acid spectrum in bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) exposed to low positive and near-zero temperatures. Pond bats were caught in their mass habitation areas (winter and summer colonies) in the Middle Ural near the Smolinsky cave (N 56°28', E 61°37') during their preparation for the winter season in the third decade of September 2015. In a model experiment at temperatures of 0—2 °C, the plasma pool of free amino acids increased by 42 % (irrespective of sex) up to  $1561.4 \pm 112.6 \mu\text{mol/L}$  ( $p = 0.01$ ). Under these conditions, the cold tolerance strategy of heterothermic animals is implemented via considerable accumulation of glucogenic and essential amino acids (arginine, lysine and histidine) in the blood of chiropterans during their acclimation to low positive temperatures, suggesting a cryoprotective role of these amino acids in survival of animals during long-term (5—7 months) hibernation. The blood plasma in experimental bats was found to lack tryptophan, suggesting its utilization as a substrate in the synthesis of serotonin, a biogenic amine actively involved in the maintenance of hypothermia and hypometabolism in these chiropterans during their fall preparation for hibernation.

*Key words:* bats, amino acids, blood, hibernation.