

УДК 599.4:591.111:57.02

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПЕРЕЛЕТНОГО (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) И ОСЕДЛОГО (*Myotis dasycneme* Voie, 1825) ВИДОВ РУКОКРЫЛЫХ ФАУНЫ УРАЛА

© 2021 г. Л. А. Ковальчук^{1,*}, В. А. Мищенко¹, Л. В. Черная¹, академик РАН В. Н. Большаков¹

Поступило 19.08.2021 г.
После доработки 03.09.2021 г.
Принято к публикации 03.09.2021 г.

Впервые представлены результаты сравнительного анализа гематологических параметров рукокрылых из природных популяций Уральского региона: у прудовой ночницы (*Myotis dasycneme* Voie, 1825) – оседлый вид и у двухцветного кожана (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) – перелетный вид. Показаны значимые различия по содержанию в крови лейкоцитов ($p = 0.05$), эритроцитов и тромбоцитов ($p = 0.001$) и установлены межвидовые различия в лейкограммах как по содержанию гранулоцитов ($p = 0.04$), так и агранулоцитов ($p = 0.05$). Для мигрирующих *V. murinus* характерен значительный вклад неспецифической защитной системы крови (54.9%) в адаптивные реакции организма. У прудовой ночницы выраженный лимфоцитарный профиль (58.5%) свидетельствует об активации приобретенного адаптивного иммунитета. Двухцветные кожаны в сравнении с прудовыми ночницами характеризуются более высоким уровнем врожденного иммунитета.

Ключевые слова: летучие мыши, гранулоциты, лимфоциты

DOI: 10.31857/S2686738921060068

Изучение механизмов адаптации рукокрылых представляет особый интерес в связи с их уникальными биологическими характеристиками: приспособление к активному полету, сезонные миграции и впадение в зимнюю спячку, сопровождающееся физиологической гипотермией и состоянием торпора. Фауна летучих мышей Урала изучена достаточно полно [1]. Однако при значительном фактическом материале по их биологии и экологии основная информация о функциональных возможностях системы крови насекомых летающих летучих мышей, обеспечивающих адаптивную стратегию оседлых и перелетных видов, явно ограничена [2–4].

Представленная статья посвящена проблемам формирования адаптивной стратегии летучих мышей в поддержании гомеостаза животных при воздействии перманентно изменяющихся факторов среды. Сравнительный анализ иммуногематологических параметров двух видов экологически контрастных насекомых летающих летучих мышей из природных популяций Уральского региона:

прудовой ночницы и двухцветного кожана проводится впервые.

Животные отловлены паутинными сетями в зонах массового обитания летних колоний на территории Челябинской области (55°00′55″ N, 60°09′30″ E) в июле 2014 г. В качестве объектов исследования были взяты многочисленные и широко распространенные на Урале виды летучих мышей: двухцветный кожан *Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758 (мезофильный перелетный вид) отловлен на побережье оз. Большой Кисегач, прудовая ночница *Myotis dasycneme* Voie, 1825 (бореальный оседлый и зимующий вид) – в окрестностях оз. Малое Миассово. Прудовая ночница в основном зимует в пещерах, начиная со второй половины сентября до начала мая при температурах от 0 до +2°C в условиях чрезвычайно высокой влажности. Двухцветный кожан в мае месяце прилетает на Южный Урал в места выведения потомства, а во второй половине августа мигрирует на расстояние несколько тысяч километров в юго-западном направлении к местам зимовки [1]. Животных без признаков заболеваний доставляли в лабораторию в отдельных контейнерах в день отлова. Экспериментальные группы ($n = 9$) представлены сеголетками (*subadultus*). Содержание рукокрылых осуществляли согласно международным принципам Хельсинкской декларации [5].

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

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

Таблица 1. Показатели периферической крови летучих мышей. Среднее арифметическое (X_{Mboot}), ошибка среднего (SE_{boot}) и доверительный интервал ([95% CI_{boot}]) бутстреп-распределения

Показатели	Прудовая ночница	Двухцветный кожан	<i>p</i>
Эритроциты (RBC), Т/л	5.7 ± 0.4 [5.0–6.3]	9.2 ± 0.6* [8.1–10.6]	0.001
Лейкоциты, Г/л	3.3 ± 0.5 [2.4–4.4]	5.9 ± 0.8* [4.1–7.6]	0.05
Гемоглобин (HGB), г/л	101.5 ± 5.6 [89.8–110.5]	127.1 ± 8.1 [111.8–142.8]	0.08
Гематокритный показатель (HCT), %	29.9 ± 1.9 [25.6–32.9]	33.3 ± 1.5 [30.6–36.5]	0.29
Средний объем эритроцита (MCV), фл	52.3 ± 0.5 [51.6–53.4]	36.8 ± 1.1* [34.7–39.1]	0.001
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	17.8 ± 0.2 [17.4–18.2]	13.9 ± 0.4* [13.2–14.8]	0.001
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), г/л	340.9 ± 4.7 [333.0–350.3]	379.5 ± 7.3* [365.0–394.2]	0.001
Тромбоциты (PLT), г/л	213.1 ± 28.0 [160.5–265.5]	476.3 ± 26.1* [421.2–522.0]	0.001
Средний объем тромбоцитов (MPV), фл	6.6 ± 0.1 [6.4–6.9]	5.2 ± 0.2* [4.8–5.5]	0.001
Тромбокрит (PCT), %	0.1 ± 0.0 [0.1–0.2]	0.3 ± 0.0* [0.2–0.3]	0.02

Примечание: * – статистически значимые различия между группами, ANOVA с перестановочным тестом, $p \leq 0.05$.

Плазму получали центрифугированием крови в рефрижераторной ультрацентрифуге K-23D (Германия) в вакутайнерах “Bekton Dickinson BP” (Великобритания) с ЭДТА в течение 15 мин при 3000 об/мин. Показатели периферической крови определяли на гематологическом анализаторе “BC-5800” (Mindray, Китай). Лейкоцитарную формулу подсчитывали в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе (на 100 лейкоцитов). У экспериментальных животных исследовано 17 показателей периферической крови. Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ “Statistica v. 10.0”. Метод главных компонент (PCA) реализован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакеты “Vegan” и “Ade4”) [6].

Исследование периферической крови показало, что у двухцветного кожана содержание эритроцитов в 1.6 раза выше, чем у прудовой ночницы ($p = 0.001$) (табл. 1), что при повышенной средней концентрации гемоглобина в эритроците, по-видимому, является отражением эффективного кислородного режима во время длительных перелетов. Этому способствует и уменьшение в крови среднего объема эритроцитов в 1.4 раза ($p = 0.001$), а также двукратное повышение количества тромбоцитов ($p = 0.001$) и тромбокрита ($p = 0.02$) в периферической крови перелетного вида в сравнении с показателями крови прудовых ночниц.

Исследователи рассматривают активацию тромбоцитопоэза при физических нагрузках, действии низких температур и гипоксии, воздействии антропогенных, биотических стресс-факторов в качестве эффекторов иммунной системы [7]. Тромбоциты, участвуя в иммунных и аллергических реакциях наряду с макрофагами, нейтрофилами и эозинофилами, формируют первую ли-

нию защиты организма от патогенов. У двухцветного кожана в сравнении с прудовой ночницей содержание лейкоцитов превышает в 1.8 раза ($p = 0.05$) (табл. 1). Лейкоциты поддерживают гомеостаз, формируя кровяной и тканевой барьеры против микробной, вирусной и паразитарной инфекций.

Метод главных компонент (PCA) позволил визуализировать видовую изменчивость показателей периферической крови двухцветного кожана и прудовой ночницы (рис. 1). Анализ показал, что 77.95% общей дисперсии параметров красной крови и тромбоцитов приходится на первую главную компоненту (PC1) и 12.63% – на вторую (PC2). Наибольший вклад в межвидовую изменчивость показателей красной крови по PC1 вносят эритроциты (13.49%), средний объем эритроцита (13.01%), тромбоциты (12.99%), тромбокрит (12.17%), среднее содержание гемоглобина (11.88%), а их значимые коэффициенты корреляции с PC1 составляют -0.97 , -0.96 , -0.95 , -0.92 , 0.91 – соответственно ($p = 0.001$).

Первая главная компонента по этим переменным четко выделяет в самостоятельные группы оседлый (ПН) и перелетный (ДК) виды (рис. 1). Вторая главная компонента PC2 сильно коррелирует (-0.70) с гематокритным показателем (вклад 43.20%), и в меньшей степени – с гемоглобином (вклад 18.86%), что также подтверждает неоднородность особей исследованных двух экологически контрастных видов по данным показателям.

Лейкоцитарный состав крови рукокрылых представлен гранулоцитами (нейтрофилы: юные, палочкоядерные, сегментоядерные и эозинофилы) и агранулоцитами (моноциты и лимфоциты) (табл. 2).

Лимфоциты, как основа гуморального иммунитета, ограничивают распространение инфекций, участвуя в адекватном иммунологическом ответе организма [8]. У оседлого вида *M. dasycneme* следует отметить высокое содержание лимфоцитов (56.0%), обеспечивающих значительную эффективность клеточного иммунитета ($p = 0.04$). Показательна активная неспецифическая защита организма от токсических воздействий, вирусных и бактериальных инфекций у перелетного вида – двухцветного кожана, что обеспечивается повышенным уровнем нейтрофилов ($p = 0.01$) (табл. 2).

Межвидовых различий в лейкограммах исследуемых животных как по содержанию моноцитов ($p = 0.38$), так и по содержанию эозинофилов ($p = 0.39$) не выявлено, что свидетельствует об идентичности адаптивных механизмов исследуемых широко распространенных видов рукокрылых уральской фауны. Известно, что моноциты, выполняя фагоцитарную роль, продуцируют эндогенные регуляторы иммунного ответа – провоспалительные цитокины [7, 9]. Эозинофилы, активно циркулирующие в крови у прудовой ночницы и у двухцветного кожана, обеспечивают противогельминтную иммунную защиту организма. Необходимо отметить, что у летучих мышей, как и у всех позвоночных, лейкоцитарные клетки периферической крови ответственны за проявление реакций врожденного (естественного) иммунитета, так и адаптивного (приобретенного) иммунного ответа [8, 9].

Показаны значимые межвидовые различия летучих мышей по содержанию гранулоцитов и агранулоцитов, отражающих взаимосвязь эффекторных механизмов иммунной системы животных. В лимфоцитарно-гранулоцитарном составе периферической крови прудовой ночницы преобладают агранулоциты (58.5%), обеспечивающие иммунный надзор и специфическую реактивность организма (адаптивный иммунитет).

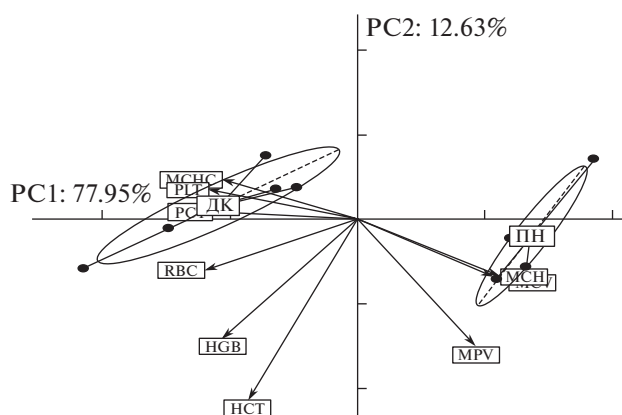


Рис. 1. Показатели красной крови двух видов летучих мышей в пространстве первых двух главных компонент. PC1, PC2 – оси главных компонент, % – процент дисперсии данных, объясненных главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями; эллипсы представляют собой 95% доверительные области; ПН – прудовая ночница, ДК – двухцветный кожан.

У мигрирующего двухцветного кожана преобладают гранулоциты (54.9%), формирующие неспецифическую линию защиты при активации естественного врожденного иммунитета. Именно эта врожденная иммунная система защиты быстрее и эффективнее реагирует на широкий спектр биотических и абиотических факторов среды обитания по сравнению с адаптивными приобретенными ответами. Мигрирующие двухцветные кожаны характеризуются более высоким уровнем врожденного иммунитета в сравнении с прудовой ночницей.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют впервые оценить гематологические параметры двухцветного кожана и прудовой ночницы, иллюстрируя видовую специфику эффекторных механизмов иммунной си-

Таблица 2. Лейкоцитарный состав периферической крови летучих мышей. Среднее арифметическое ($X_{M\text{boot}}$), ошибка среднего (SE_{boot}) и доверительный интервал ($[95\% CI_{\text{boot}}]$) бутстреп-распределения

Показатели	Прудовая ночница	Двухцветный кожан	p
Нейтрофилы, %	$39.8 \pm 1.4 [37.0-42.5]$	$54.0 \pm 3.3^* [47.2-60.2]$	0.01
• юные, %	$2.5 \pm 1.1 [0.5-4.8]$	$8.0 \pm 1.3^* [5.2-10.4]$	0.05
• палочкоядерные, %	$26.0 \pm 3.2 [18.8-30.0]$	$24.6 \pm 3.0 [18.8-30.6]$	0.77
• сегментоядерные, %	$11.2 \pm 2.9 [6.0-16.8]$	$21.4 \pm 2.5^* [17.6-27.0]$	0.05
Лимфоциты, %	$56.0 \pm 1.8 [52.3-59.0]$	$43.4 \pm 3.1^* [37.6-49.2]$	0.04
Моноциты, %	$2.5 \pm 0.8 [0.8-3.8]$	$1.6 \pm 0.8 [0.4-3.4]$	0.38
Эозинофилы, %	$1.3 \pm 0.4 [0.5-2.0]$	$1.0 \pm 0.3 [0.4-1.6]$	0.39
Гранулоциты, %	$41.0 \pm 1.8 [37.5-44.5]$	$54.9 \pm 3.4^* [48.0-61.4]$	0.04
Агранулоциты, %	$58.5 \pm 2.1 [54.5-62.5]$	$44.9 \pm 3.5^* [38.6-52.0]$	0.05

Примечание: * – статистически значимые различия между группами, ANOVA с перестановочным тестом, $p \leq 0.05$.

стемы животных, обусловленную в свою очередь эколого-физиологическими особенностями оседлых и перелетных видов летучих мышей из природных популяций Уральского региона.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы искренне признательны с.н.с. Южно-Уральского федерального научного центра минералогии и геоэкологии УрО РАН, к.б.н. В.П. Снитко за помощь в отлове животных.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Отлов и содержание животных в лаборатории осуществляли согласно международным принципам Хельсинкской декларации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Большаков В.Н., Орлов О.Л., Снитко В.П.* Летучие мыши Урала. Екатеринбург, 2005.
2. *Kovalchuk L., Mishchenko V., Chernaya L., et al.* Haematological parameters of pond bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825, Chiroptera: Vespertilionidae) in the Ural Mountains // *J. Zoology and Ecology*. 2017. V. 27. № 2. P. 168–175.
3. *Узмбаева Л.Б., Кижина А.Г., Илюха В.А., и др.* Морфология и состав клеток периферической крови при спячке у летучих мышей (Chiroptera, Vespertilionidae) северо-запада России // *Известия РАН. Серия Биологическая*. 2019. № 4. С. 419–428.
4. *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. № 6. P. 157–159.
5. *Yarri D.* The Ethics of Animal Experimentation. Oxford: Oxford University Press. 2005.
6. *Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J.* The ade 4 package-I: One-table methods // *R News*. 2004. № 4. P. 5–10.
7. *Черешнев В.А., Шмагель К.В.* Иммунология. М.: изд-во Центр стратегического партнерства, 2014.
8. *Davis F.R., Maney D.L., Maers J.C.* The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists // *Functional Ecology*. 2008. V. 22. P. 760–772.
9. *Coico R., Sunshine G., Benjamini E.* Immunology. A Short Course. Hoboken, NJ: Wiley-Liss Publications. 2003.

FEATURES OF IMMUNOHEMATOLOGICAL PARAMETERS OF MIGRATORY (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) AND RESIDENT (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) BAT SPECIES OF THE URAL FAUNA

L. A. Kovalchuk^{a, #}, V. A. Mishchenko^a, L. V. Chernaya^a, 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, Russian Federation

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

For the first time, the results of a comparative analysis of hematological parameters of bats from natural populations of the Ural region are presented: the pond bat (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) has a resident species and the two-colored bat (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) has a migratory species. Significant differences in the content of white blood cells ($p = 0.05$), red blood cells and platelets ($p = 0.001$) were shown. Interspecific differences were found in the leukograms of the studied bats both in the content of granulocytes ($p = 0.04$) and agranulocytes ($p = 0.05$). For migrating *V. murinus* is characterized by a significant contribution of the nonspecific protective system of the blood (54.9%) to the adaptive reactions of the body. In the pond bat, a pronounced lymphocytic profile (58.5%) indicates the activation of acquired adaptive immunity. Two-colored bats leathers in comparison with pond bats are characterized by a higher level of innate immunity.

Keywords: bats, peripheral blood, granulocytes, lymphocytes