

УДК 599.426: 577.112.3: 574.24

ОЦЕНКА СЕЗОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ СПЕКТРА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОРЕАЛЬНОГО ВИДА ФАУНЫ РУКОКРЫЛЫХ УРАЛА – ПРУДОВОЙ НОЧНИЦЫ *Myotis dasycneme* (VOIE, 1825)

© 2022 г. Л. А. Ковальчук^{1,*}, В. А. Мищенко^{1,2}, Л. В. Черная¹,
В. П. Снитыко³, академик РАН В. Н. Большаков¹

Поступило 14.07.2022 г.
После доработки 06.08.2022 г.
Принято к публикации 10.08.2022 г.

Впервые представлен сравнительный анализ содержания свободных аминокислот в плазме крови у представителя рукокрылых фауны Урала *Myotis dasycneme* (Voie, 1825) в сезонные периоды их годового жизненного цикла. В плазме крови прудовой ночницы отмечен полный спектр незаменимых аминокислот: треонин, валин, лизин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, аргинин, гистидин, триптофан. Значительная аккумуляция метаболически активного глюкостероидного аланина в крови прудовых ночниц в осенний (в 2.5 раза) и зимний (в 2.2 раза) периоды свидетельствует о его роли низкотемпературного адаптогена.

Ключевые слова: прудовая ночница, свободные аминокислоты, сезонная изменчивость

DOI: 10.31857/S2686738922060154

Летучие мыши (Chiroptera) представляют исключительный интерес для исследователей в значительной степени как животные, обладающие стратегией выживания, связанной с их экологическими особенностями [1–5]. Среди них можно назвать у некоторых видов фауны России значительные сезонные перелеты. У других видов – длительные (несколько месяцев) зимовки в пределах летних территорий обитания. Авторами отмечена вариабельность параметров крови рукокрылых, вызванная изменениями физиологического состояния и экстремальными особенностями пространственного размещения населения оседлых летучих мышей, обусловленными их сезонным жизненным циклом [6, 7]. Проведены исследования с целью оценки сезонной изменчи-

вости аминокислотного спектра плазмы крови бореального зимующего вида фауны рукокрылых Урала прудовой ночницы (*Myotis dasycneme* Voie, 1825).

Прудовая ночница отловлена в области высокой численности рукокрылых и в местах размещения их колоний (летних и зимовочных) на Южном и Среднем Урале в период 2013–2015 гг. Животные отловлены паутинными сетями на территории Челябинской области в окрестностях озера Малое Миассово (55°10'04" с.ш., 60°21'08" в.д.), а на территории Свердловской области в окрестностях Смолинской пещеры (Каменский район) и в самой пещере (56°25'44" с.ш., 61°36'44" в.д.). Этот вид был выбран неслучайно. На Урале прудовые ночницы имеют широкое распространение: на территории Пермского края – это сравнительно редкий вид, в Челябинской, Курганской областях – обычный вид. На территории Свердловской области – это широкораспространенный вид, занесенный в Красную книгу Свердловской области как “уязвимый вид”, III категория [8]. Уязвимость прудовой ночницы заключается в больших скоплениях особей на зимовках в Уральских пещерах – так в Смолинской пещере в некоторые годы зимовало более 1500 животных, в Аракаевской – более 200 [9]. Большинство пещер с зимовками активно посещаются туристами, и без специально охраняемого статуса этих пещер в них может происходить

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

гибель животных из-за беспокойства во время спячки.

Исследования взрослых летучих мышей (*adultus*) без признаков заболеваний из природных популяций проведены летом (вторая декада июля – период воспроизводства популяции), осенью (третья декада сентября в период завершающей стадии подготовки к зимнему сезону), зимой (третья декада февраля в период продолжительного гипобиоза) и весной (первая декада апреля в завершающий период гипотермии и оцепенения). По данным зоологов, в спячку животные впадают в последней декаде сентября – начале октября, и первые пробуждения отмечены в третьей декаде апреля [9]. В период отлова среднесуточная температура воздуха на местности была в апреле от +3°C до +8°C, в июле +21°C...+23°C, в сентябре +5°C...+7°C. В феврале среднесуточная температура воздуха на местности была от –16°C до –20°C. Прудовая ночница зимует в глубине пещеры при температуре от 0°C до +2°C в условиях чрезвычайно высокой влажности: 90–100% [9].

Отлов и содержание животных ($n = 65$), доставленных в лабораторию, осуществляли с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей [10]. Физиологическое состояние животных оценивали по температуре тела (измеряли ректально датчиком электротермометра ТПЭМ-1) и по параметрам основного обмена (регистрали по потреблению кислорода (мл/г час) с помощью газоанализатора МН-5130 (Россия)). Массу тела исследуемых животных определяли взвешиванием на электронных весах (Acculab PP-200dl1) с точностью ± 0.1 г. Забор крови (400–800 мкл) осуществляли после декапитации животных в стерильные охлажденные вакуумные пробирки “BD Vacutainer” с ЭДТА (Великобритания). Плазму получали центрифугированием крови в рефрижераторной ультрацентрифуге К-23 D (Германия) в течение 15 мин при 3000 об/мин. Триглицериды определяли в плазме крови энзиматическим колориметрическим методом с использованием наборов фирмы “BioSystems” (Испания). Содержание свободных аминокислот (АК) определяли методом ионообменной хроматографии на анализаторе ААА-339М (Microtechna, Чехия). Выполнен анализ 946 аминокислотных проб.

Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ “Statistica v. 10.0”. Метод главных компонент (РСА) реализован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакеты “Vegan” и “Ade4”) [11].

Фонд свободных аминокислот плазмы крови исследованных особей *M. dasycneme* представлен 22 АК и их дериватами. Отмечен полный спектр

незаменимых АК: треонин, валин, лизин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, аргинин, гистидин, триптофан. Многомерный непараметрический анализ показал отсутствие значимых гендерных различий у рукокрылых по суммарной концентрации 14 свободных АК в сезонные периоды их годового жизненного цикла (табл. 1).

Фонд свободных АК в плазме крови самцов и самок снижается в ряду времен года: лето \geq осень \geq зима $>$ весна ($p = 0.0001$) (табл. 1). В аминокислотном спектре плазмы не обнаружены пролин и цитруллин. Триптофан (осень-зима) и аспарагин (осень-зима-весна) определены в следовых количествах в период продолжительной гибернации летучих мышей. Максимальные концентрации свободных АК: 1420.5 ± 143.4 мкмоль/л в плазме крови наблюдались летом – в период размножения и активного набора массы тела (14.7 ± 0.2 г) рукокрылых. Осенью, в третьей декаде сентября при подготовке насекомоядных рукокрылых к продолжительной гибернации, продолжающейся более полугода, в их крови отмечено снижение уровня аминокислотного обмена на 23% (табл. 1).

При этом ректальная температура самцов прудовой ночницы повышается на 20% по сравнению с летним периодом, тогда как у самок она остается стабильной. В осенний период у животных показана повышенная интенсивность основного обмена (5.6 ± 0.4 мл/г час, $p = 0.001$). Активация основного обмена в 1.6 раза по сравнению с летним периодом отмечена и у летучих мышей в состоянии гипобиоза зимой. В третьей декаде февраля в период длительного гипобиоза у животных наблюдается на 25%, а у весенних особей – на 33% падение массы тела относительно осенних животных ($p = 0.0001$). В заключительный период гибернации, продолжающийся более шести месяцев (первая декада апреля), в крови весенних особей отмечено минимальное содержание фонда свободных АК: 681.3 ± 46.4 мкмоль/л ($p = 0.0002$). Ректальная температура у самок поддерживается на уровне показателей зимних животных $26.5 \pm 2.8^\circ\text{C}$ ($p = 0.52$), но у самцов в первой декаде апреля она снижается до $15.5 \pm 0.8^\circ\text{C}$.

Содержание в крови триглицеридов, ответственных за липидный обмен в зимний период торпора, возрастает у самок в 3 раза и у самцов в 1.7 раза ($p = 0.04$) в сравнении с осенним периодом. Полученные данные подтверждают, что протяженные во времени экстремальные условия среды предполагают срочное вовлечение энергетической и пластической систем в процессы адаптации и аварийного регулирования, и участие в данных условиях АК играют решающую роль. Доминирующими аминокислотами в летний период у летучих мышей являются аланин, глутамин, глицин и сульфаминокислота таурин.

Таблица 1. Сезонная динамика аминокислот в плазме крови *M. dasycneme* (самцы+самки)

АК, %	I. Лето (n = 9)	II. Осень (n = 9)	III. Зима (n = 15)	IV. Весна (n = 10)	F _{obs} p [©]
	$\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$ [95% CI _{boot}]				
Taurine	8.0 ± 1.2 [5.9–10.3]	11.7 ± 2.2 [7.7–16.4]	9.5 ± 0.6 [8.4–10.8]	32.8 ± 3.1* [▲] [26.6–38.6]	35.5 0.0001
Aspartic acid	4.9 ± 0.4 [4.2–5.6]	3.6 ± 0.4 [2.8–4.4]	2.7 ± 0.3* [2.1–3.3]	2.7 ± 0.5* [1.8–3.7]	6.2 0.003
Threonine	4.7 ± 0.4 [3.9–5.5]	6.7 ± 0.4* [5.9–7.6]	5.7 ± 0.4 [5.1–6.5]	3.2 ± 0.5* [¶] [2.3–4.1]	10.2 0.0002
Serine	4.9 ± 1.0 [3.2–7.0]	6.6 ± 0.9 [5.2–8.5]	5.9 ± 0.5 [5.0–7.0]	3.5 ± 0.7* [¶] [2.3–4.8]	2.8 0.05
Glutamine	9.1 ± 0.5 [8.2–10.0]	6.9 ± 0.7* [5.7–8.2]	6.7 ± 0.3* [6.1–7.3]	8.2 ± 0.8 [6.7–9.8]	3.9 0.01
Alanine	9.8 ± 0.9 [8.1–11.6]	24.4 ± 1.5* [21.5–27.4]	20.7 ± 1.4* [18.2–23.4]	10.5 ± 1.3* [¶] [8.2–13.9]	25.3 0.0001
Valine	3.6 ± 0.6 [2.3–4.7]	2.3 ± 0.3 [1.8–2.8]	2.5 ± 0.2 [2.1–2.8]	3.6 ± 0.3* [¶] [2.9–4.2]	3.6 0.02
Isoleucine	1.6 ± 0.2 [1.3–2.0]	1.2 ± 0.1 [1.0–1.5]	0.9 ± 0.1* [▲] [0.7–1.0]	0.8 ± 0.1* [▲] [0.6–1.0]	9.3 0.0002
Leucine	2.5 ± 0.3 [1.9–3.2]	2.0 ± 0.2 [1.5–2.4]	2.5 ± 0.2 [2.2–2.9]	1.9 ± 0.2 [1.6–2.4]	2.1 0.13
Tyrosine	1.6 ± 0.2 [1.2–2.1]	1.2 ± 0.1 [1.0–1.4]	1.7 ± 0.1* [▲] [1.5–2.0]	1.0 ± 0.3 [¶] [0.5–1.6]	3.3 0.03
Tryptophan	2.3 ± 0.4 [2.5–4.1]	следы	следы	1.7 ± 0.3* [1.2–2.3]	40.3 0.0001
Lysine	5.6 ± 0.4 [4.7–6.4]	3.0 ± 0.3* [2.5–3.6]	4.7 ± 0.4* [▲] [4.1–5.5]	4.7 ± 0.4* [▲] [3.9–5.5]	6.3 0.002
Histidine	1.0 ± 0.3 [0.6–1.5]	0.9 ± 0.1 [0.7–1.1]	1.5 ± 0.1* [▲] [1.3–1.8]	1.1 ± 0.1 [0.9–1.4]	3.6 0.02
Arginine	2.4 ± 0.4 [1.6–3.4]	1.9 ± 0.3 [1.2–2.5]	2.5 ± 0.3 [2.0–3.1]	следы	13.2 0.0001
ГГАК, гликогенные АК	66.2 ± 1.5 [63.3–69.2]	75.1 ± 1.8* [71.3–78.5]	68.0 ± 1.1* [▲] [65.8–70.2]	46.4 ± 3.1* [▲] [40.6–52.8]	34.3 0.0001
Фонд АК, мкмоль/л	1420.5 ± 143.4 [1158.6–1720.6]	1098.3 ± 72.1 [963.6–1241.4]	914.1 ± 43.5* [829.7–1000.0]	681.3 ± 46.4* [▲] [586.9–767.6]	12.9 0.0001

* – статистически значимые 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 ($p < 0.05$); $\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$ – среднее арифметическое и ошибка среднего бутстреп-распределения; [95% CI_{boot}] – доверительный интервал бутстреп-распределения; [©] – $p = \Pr(F_{ran} \geq F_{obs})$ – двухфакторный дисперсионный анализ с перестановочным тестом (рандомизация).

Их суммарный пул (571 мкмоль/л) составляет 40% от общего фонда свободных АК (табл. 1).

Осенью при подготовке летучих мышей к периоду гibernации отмечается значительная аккумуляция гликогенных АК (75.1% от фонда АК), связанных с межклеточным обменом белков, жиров и углеводов, и, соответственно, участвующих в механизмах низкотемпературной адаптации. Следует отметить в фонде АК прудовых ночниц

возрастание процентного содержания аланина осенью перед началом зимнего гипобиоза до 24.4% и в зимний период до 20.6%. Значительная аккумуляция метаболически активного гликопластического аланина в крови прудовой ночницы в осенний (в 2.5 раза) и зимний (в 2.2 раза) периоды активизирует скорость синтеза гликогена и глюкозы из других источников, что позволяет предполагать криопротекторную роль аминокис-

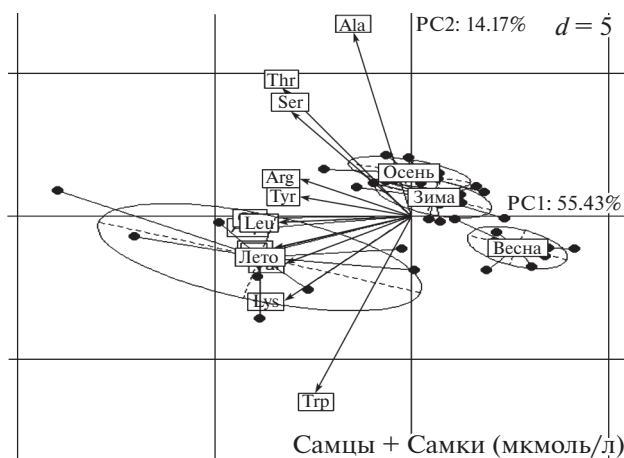


Рис. 1. Свободные аминокислоты плазмы крови (мкмоль/л) самцов и самок прудовой ночницы в разные сезоны (весна, лето, осень, зима) года в пространстве первых двух главных компонент. PC1, PC2 – оси главных компонент, % – процент дисперсии данных, объясненных главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент 1 и 2 с исходными показателями (аминокислоты); эллипсы представляют собой 95% доверительные области.

лоты в условиях низкоположительных и околонулевых температур среды обитания. Весной при выходе животных из гипобиоза в плазме крови отмечали снижение в общем фонде свободных АК пула глюкогенных АК до 46.4%. Однако на фоне снижения общего фонда свободных АК в плазме крови прудовой ночницы в завершающий весенний период гибернации обращает на себя внимание статистически значимое 4-х кратное возрастание таурина – АК, обладающей антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами ($p = 0.0003$). Достаточно интенсивная аккумуляция сульфаминокислоты таурина весной существенно компенсирует снижение пулов таких АК, как аланин в 1.9 раза, валин в 2.3 раза, аспарат в 4.0 раза, треонин в 3.3 раза, глутамин в 2.2 раза, глицин в 4.9 раза ($p = 0.001$). Серосодержащим АК и их дериватам принадлежит связующая роль в интеграции основных метаболических процессов, что связано не только с энергетическим обменом и участием в синтезе нуклеиновых кислот, коллагена и других белков, но и с обеспечением клеточного и гуморального иммунитета в предстоящий период активного летнего роста и развития в условиях сезонной акклимации. Результаты исследования показали, что у летучих мышей, находящихся в состоянии гибернации, практически отсутствуют половые различия по количественной структуре аминокислотного спектра, что, несомненно, указывает на единство обменных процессов самцов и самок, направленных на поддержание гомеостаза в условиях дли-

тельного воздействия низких положительных и околонулевых температур.

Анализ данных методом главных компонент (РСА) позволил визуализировать сезонную изменчивость аминокислотного спектра в плазме крови прудовой ночницы, подтверждая результаты представленного выше статистического анализа (рис. 1). Анализ сезонной динамики свободных АК (мкмоль/л) в плазме крови прудовой ночницы показал, что 55.43% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту PC1 и 14.17% – на вторую PC2. По первой главной компоненте показана сезонная вариабельность содержания АК плазмы крови летучих мышей и их дифференциация на три сезонных группы животных: летняя, осенняя+зимняя и весенняя. Выявлены высокие коэффициенты корреляции с PC1 и значимый вклад в компоненту восьми АК: глицина (10.47%), изолейцина (10.34%), аспарагиновой кислоты (10.21%), глутамина (9.53%), лейцина (8.91%), треонина (8.33%), лизина (8.18%), валина (8.07%). Вторая главная компонента PC2, с которой коррелируют аланин (0.76), триптофан (–0.74), треонин (0.53), сформировала три сезонные группы: весенняя, летняя, осенняя+зимняя. Значимый вклад в компоненту отмечен для аланина (31.68%), триптофана (29.33%), треонина (15.40%) при достаточно высоких коэффициентах корреляции с PC2 (рис. 1).

Таким образом, впервые представлен сравнительный анализ содержания свободных аминокислот в плазме крови у представителей рукокрылых фауны Урала *Myotis dasycneme* (Voie, 1825) в сезонные периоды их годового жизненного цикла. Результаты исследований подтверждают регуляторную роль свободных аминокислот в формировании адаптивной стратегии, обеспечивающей устойчивость популяционного гомеостаза прудовой ночницы в условиях перманентно меняющегося температурного режима сравнительно короткого уральского лета и продолжительной холодной зимы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного 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, используемых для экспериментальных и научных целей [10].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Voigt C.C., Kingston T. (eds) Bats in the Anthropocene: Conservation of bats in a Changing World. Springer International Publishing, 2016.
2. Zukal J., Pikula J., Bandouchova H. Bats as bioindicators of heavy metal pollution: history and prospect // Mammalian Biology. 2015. V. 80 (3). P. 220–227.
3. Russo D., Ancillotto L. Sensitivity of bats to urbanization: a review // Mammalian Biology. 2015. V. 80 (3). P. 205–212.
4. Breed A.C., Field H.E., Smith C.S., et al. Bats Without Borders: Long-Distance Movements and Implications for Disease Risk Management // EcoHealth. 2010. V. 7. P. 204–212.
5. Первушина Е.М., Замшина Г.А., Николаева Н.В., и др. Трофические связи насекомоядных рукокрылых на юге Среднего Урала // Вестник Удмуртского университета. Серия биология. Науки о Земле. 2011. № 3. С. 65–74.
6. Kovalchuk L., Mishchenko V., Chernaya L., et al. Haematological parameters of pond bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825, Chiroptera: Vespertilionidae) in the Ural Mountains // Zoology and Ecology. 2017. V. 27. № 2. P. 168–175.
7. 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.
8. Красная книга Свердловской области: животные, растения, грибы / отв. ред. Н.С. Корытин. Екатеринбург: ООО Мир, 2018.
9. Большаков В.Н., Орлов О.Л., Снитко В.П. Летучие мыши Урала. Екатеринбург, 2005.
10. Yarrri D. The Ethics of Animal Experimentation. Oxford: Oxford University Press. 2005.
11. Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J. The age4 package-I: One-table methods / R News. 2004. № 4. P. 5–10.

ASSESSMENT OF SEASONAL VARIABILITY OF THE SPECTRUM OF FREE AMINO ACIDS IN THE BLOOD PLASMA OF THE BOREAL BAT SPECIES (*MYOTIS DASYCNE ME* BOIE, 1825) OF THE URAL FAUNA

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, Russian Federation

^b Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections of the SSC VB "Vector" Rosпотребнадзор, Yekaterinburg, Russian Federation

^c South Ural Federal Scientific Centre of Mineralogy and Environmental Geology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ilmen Reserve, Miass, Russian Federation

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

For the first time, a comparative analysis of the content of free amino acids in the blood plasma of a representative of the bat fauna of the Urals, *Myotis dasycneme* (Boie, 1825), in seasonal periods of their annual life cycle are presented. The blood plasma of the pond bats contains a full spectrum of essential amino acids: threonine, valine, lysine, leucine, isoleucine, methionine, phenylalanine, arginine, histidine, tryptophan. A significant accumulation of metabolically active glucoplastic alanine in the blood of *M. dasycneme* in the autumn (2.5 times) and winter (2.2 times) periods indicates its role as a low-temperature adaptogen.

Keywords: pond bats, free amino acids, seasonal variability