

ФИЗИОЛОГИЯ
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 591.111.111.1:599.4:591.543.42(470.2)

МОРФОЛОГИЯ И СОСТАВ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
ПРИ СПЯЧКЕ У ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ (*Chiroptera*, *Vespertilionidae*)
СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ

© 2019 г. Л. Б. Узенбаева*, А. Г. Кижина*, @, В. А. Илюха*, В. В. Белкин*, Е. А. Хижкин*

*Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ “Карельский научный центр РАН”,
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

@E-mail: golubewa81@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.10.2017 г.

После доработки 19.06.2018 г.

Принята к публикации 19.06.2018 г.

Исследованы состав и морфология клеток периферической крови во время спячки у пяти видов отряда рукокрылых *Chiroptera* – водяной ночницы *Myotis daubentonii*, ночницы Брандта *M. brandtii*, усатой ночницы *M. mystacinus*, бурого ушана *Plecotus auritus* и северного кожанка *Eptesicus nilssonii*. Отмечено, что для этих видов характерны невысокий уровень лейкоцитов и преобладание в лейкоформуле нейтрофилов над лимфоцитами. Установлены межвидовые различия в морфологии нейтрофилов, общем количестве, абсолютном и относительном содержании отдельных типов лейкоцитов, а также в размерах площади поверхности эритроцитов. Обнаружено, что особенно отчетливо они выражены между редко встречающимися видами *P. auritus* и *M. mystacinus* и более распространенными видами *M. daubentonii* и *M. brandtii*, а также доминирующим видом *E. nilssonii*.

DOI: 10.1134/S0002332919030135

Изучение эколого-физиологических особенностей у летучих мышей – представителей многочисленного и процветающего отряда рукокрылых *Chiroptera* – имеет важное значение. Летучие мыши, обитающие в холодном и умеренном климате, зимуют, впадая в спячку, а в активном состоянии хорошо приспособлены к длительному и устойчивому полету. Повышенный интерес вызывает относительно высокая продолжительность жизни некоторых видов летучих мышей. По имеющимся в нашем распоряжении данным в среднем она в 3.5 раза больше, чем у нелетающих плацентарных млекопитающих соответствующего размера. Рекорд продолжительности жизни – 38 лет – зарегистрирован у самца *Myotis brandtii* (Wilkinson, South, 2002; Becker *et al.*, 2013).

У зимоспящих млекопитающих при гипотермии обнаружено экстремальное снижение значений многих физиолого-биохимических параметров, и в частности температуры тела, потребления кислорода, метаболизма, частоты дыхания, ритма сердца, артериального давления, скорости кровотока. Кроме того, при спячке отмечено изменение иммунного статуса – уменьшение содержания лейкоцитов, комплемента, снижение фагоцитарной активности, ответа на липополисахариды (ЛПС), а также пролиферации лимфоцитов и

продукции цитокинов и антител (Vouma *et al.*, 2010a). Более того, предположено, что иммунная система влияет на гибернацию (Carey *et al.*, 2003). Так как стратегия выживания при гибернации уникальна, она была предложена в качестве модели для изучения гомеостатических механизмов при низких температурах (Vouma *et al.*, 2010a, 2010b).

Зимняя спячка описана у всех палеарктических и неарктических видов *Chiroptera* (Экологическая..., 1979; Geiser, 2004). У летучих мышей, как и у других зимоспящих, зимой для минимизации ежедневных затрат энергии используется чередование продолжительных периодов гипотермии (96–97% времени спячки) и кратковременных (2–3% времени спячки) пробуждений (Ануфриев, 2008a). В торпидном состоянии они не принимают пищу, но для пополнения водного баланса слизывают воду. Это отличает летучих мышей, как от видов зимоспящих, которые довольствуются только метаболической водой, так и от тех, которые не обладают способностью накопления достаточных запасов жира и просыпаются для потребления воды и пищи (Экологическая..., 1979; Ven-Namo *et al.*, 2013).

Исследование особенностей патогенеза WNS (white-nose syndrome) и анализ причин высокой смертности у летучих мышей при этом заболева-

нии привели к заключению, что изучение иммунитета у зимоспящих только начинается (Wibbelt *et al.*, 2010; Frank *et al.*, 2014). Насколько велика степень отличия иммунитета летучих мышей от иммунитета других видов млекопитающих, остается невыясненным (Stockmaier *et al.*, 2015). Установлено, что в периферической крови у малой бурой ночницы *Myotis lucifugus* количество лейкоцитов и уровень IL-4 (интерлейкин-4) не изменяются на протяжении спячки, тогда как содержание иммуноглобулинов выше в середине гибернационного периода по сравнению с таковым в его начале и конце (Moore *et al.*, 2013).

У некоторых видов летучих мышей при введении ЛПС отсутствуют лихорадка и лейкоцитоз (Stockmaier *et al.*, 2015). Было предположено, что процессы воспаления у зимующей *M. lucifugus* при WNS не возникают вследствие сокращения содержания нейтрофилов, а возможно, и снижения синтеза одного из провоспалительных цитокинов – TNF (tumor necrosis factor) (Vouma *et al.*, 2010a). Летучие мыши, как показало изучение факторов регуляции воспаления у большого бурого кожана *Eptesicus fuscus*, могут иметь уникальный механизм для подавления чрезмерной реакции организма на патоген. При этом у видов могли сформироваться различные стратегии или их комбинации для предотвращения усиления воспалительного ответа (Vanerjee *et al.*, 2017).

По некоторым данным основные причины смертности летучих мышей умеренной зоны – травматические повреждения и инфекционные болезни (Mühldorfer *et al.*, 2011). Комплексными исследованиями, проведенными на 19 европейских видах в 2002–2009 гг., выявлено, что ~12% особей умерли в результате бактериальных, вирусных и паразитарных инфекций. Существует предположение, что риск их распространения возрастает с начала зимнего сезона в связи с увеличением контакта с другими особями, а в конце спячки может быть обусловлен ослаблением иммунитета и голоданием (Mühldorfer *et al.*, 2011).

Гематологические параметры – в определенной мере “зеркало” физиологического состояния организма. Их можно использовать для оценки степени воздействия среды обитания и составления экологического портрета (Козинец и др., 2007). Поэтому целесообразно провести сравнительно-видовые исследования состава и морфологии клеток периферической крови у летучих мышей. В настоящее время сведения о биологии и физиологии летучих мышей, обитающих в условиях Северо-Западной России, немногочисленны. На зимовках в Карелии в подзоне средней тайги встречаются ночницы *M. daubentonii*, *M. brandtii*, *M. mystacinus*, а также *Plecotus auritus* и *E. nilssonii*

(Белкин и др., 2015). Период гибернации продолжается >6 мес. – от начала октября до первой половины апреля. В сообществах летучих мышей как на зимовках, так и в период летней активности установлено абсолютное доминирование *E. nilssonii*. Виды, представляющие род *Myotis*, отличаются от *P. auritus* и особенно от *E. nilssonii* широким выбором микроукрытий, большей конгрегацией особей, узким диапазоном предпочитаемых микроклиматических условий зимовок.

Цель работы – изучение при спячке состава и морфологии клеток периферической крови у пяти видов летучих мышей сем. Vespertilionidae из родов *Myotis* (*M. daubentonii*, *M. brandtii* и *M. mystacinus*), *Plecotus* (*P. auritus*) и *Eptesicus* (*E. nilssonii*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выборочный сбор летучих мышей из искусственных подземных сооружений проведен в Республике Карелия (61–63° с.ш., 30–36° в.д.) по разрешениям Управления охотничьего хозяйства РК (№ 0002-2010, 0001-2011, 00008-2013, 00009-2015, 00011-2015, 00013-2017) с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным (Этическая..., 2005). Отлов животных, находящихся в спячке, проводили с начала октября до середины апреля. Были исследованы образцы крови 60 особей, из которых 10 относились к *M. daubentonii* (6 самок и 4 самца), 5 – к *M. mystacinus* (3 самки и 2 самца), 13 – к *M. brandtii* (7 самок и 6 самцов), 25 – к *E. nilssonii* (18 самок и 7 самцов) и 7 – к *P. auritus* (6 самок и 1 самец). Количественный и качественный объем выборок зависел от разнообразия и соотношения видов на зимовках (Белкин и др., 2015).

Летучих мышей перевозили в лабораторию в отдельных контейнерах при 5°C и относительной влажности воздуха 95% и через 24 ч забивали. Количество лейкоцитов определяли в камере Горяева, лейкоцитарную формулу – на мазках крови, окрашенных по Паппенгейму красителем-фиксатором Мая–Грюнвальда и красителем Романовского (MiniMed, Россия). Исследование проведено с помощью светового микроскопа Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES) и программным обеспечением “Видеотест”. Для подсчета лейкоцитарной формулы на мазках крови визуально определяли типы лейкоцитов, создавали базу их изображений и после сортировки осуществляли передачу данных в MS Excel. Абсолютное количество различных типов лейкоцитов вычисляли, исходя из общего и процентного их содержания. Площадь поверхности эритроцитов измеряли с помощью

методики NCR (nuclear-cytoplasmic ratio), позволяющей определять параметры клеток и внутриклеточных структур. Проводили микроскопическую съемку 10 полей зрения препарата, в автоматическом режиме выделяли изображения эритроцитов, которые попали в кадр, и передавали измерения площади поверхности в MS Excel.

Полученные материалы были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики. Оценку достоверности различий статистических показателей выборок проводили по критериям Стьюдента и Вилкоксона—Манна—Уитни в зависимости от размера групп и нормальности распределения. Работа выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования ФИЦ “КарНЦ РАН”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данные о количестве и составе лейкоцитов, а также о размерах площади поверхности эритроцитов в периферической крови у пяти видов летучих мышей во время зимней спячки представлены в табл. 1 и на рис. 1–3.

На светомикроскопическом уровне форменные элементы крови у летучих мышей имеют свойственную большинству видов млекопитающих морфологию (рис. 1). Эритроциты в основном принадлежат к зрелым формам (рис. 1а), а полихроматофильные (рис. 1б) и с тельцами Жолли (рис. 1в), а также нормобласты (рис. 1г) встречаются очень редко. Из проведенного морфометрического анализа следует, что виды различаются по размерам площади поверхности эритроцитов (табл. 1, рис. 2). Наибольшая площадь поверхности обнаружена у *M. daubentonii*, наименьшая — у *P. auritus*. Между самками и самцами *M. daubentonii*, *M. brandtii* и *E. nilssonii* установлены статистически значимые отличия: у самок площадь поверхности эритроцитов больше, чем у самцов. Для *M. mystacinus* и *P. auritus* достоверность различий не удалось подтвердить в связи с недостаточным числом самцов для проведения статистического анализа.

Палочкоядерные нейтрофилы встречаются редко (рис. 1д–1ж). В сегментоядерных нейтрофилах иногда наблюдаются базофилия цитоплазмы и полисегментированные ядра (рис. 1з), а у самок — половой хроматин (рис. 1и). Доли ядра в сегментоядерных нейтрофилах могут быть соединены между собой очень тонкими филаментами гетерохроматина (рис. 1к).

В морфологии нейтрофилов летучих мышей, несмотря на общие черты, можно отметить межвидовые различия. Они касаются размера цитоплаз-

матической зернистости, ядерно-цитоплазматического соотношения и конфигурации клеточной поверхности. Для *M. daubentonii* характерны крупные нейтрофилы с отчетливо видимой зернистостью (рис. 1з), а у *E. nilssonii* она менее заметна (рис. 1ж). У *M. brandtii* (рис. 1е), *M. mystacinus* (рис. 1к) и *P. auritus* (рис. 1и) редкие и пылевидные гранулы просматриваются не во всех нейтрофилах. У видов из рода *Myotis* нейтрофилы, как правило, имеют обильную цитоплазму и эксцентрично расположенное ядро, а у *M. brandtii* — довольно часто эллипсоидную или неправильную форму и цитоплазматические выросты (рис. 1е).

В эозинофилах присутствуют мелкие гранулы розовато-красного оттенка (рис. 1л–1н), в них часто просматриваются участки дегранулированной цитоплазмы (рис. 1н). Для базофилов характерны крупные светло- и темно-фиолетовые гранулы (рис. 1о, 1п), особенно многочисленные и интенсивно окрашенные у *E. nilssonii* (рис. 1п). Лимфоциты мелкие или средние (рис. 1р–1т), очень редко с азурофильными гранулами (рис. 1т). Моноциты — клетки крупных размеров, иногда с вакуолями, которые в норме обычно не встречаются. Ядро в моноцитах, как и у других видов млекопитающих, полиморфно (рис. 1у, 1ф).

Количество лейкоцитов в крови у исследованных видов низкое, в лейкоформуле преобладают нейтрофилы (табл. 1, рис. 3). Относительное содержание моноцитов находится на достаточно высоком уровне, базофилы и эозинофилы представляют собой самую малочисленную популяцию. Существенных половых различий в количестве лейкоцитов и в содержании отдельных их типов не выявлено. У *P. auritus* по сравнению с остальным видами установлено особенно высокое нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение вследствие изменения клеточных пропорций в сторону повышения содержания нейтрофилов и уменьшения лимфоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гематологические параметры зависят от вида, пола, возраста, физиологического состояния, а также условий среды обитания животных. В периферической крови у исследованных видов летучих мышей при гибернации крайне редко встречаются молодые клетки эритроидного ряда, что свидетельствует об отсутствии существенной активации эритропоэза. В отличие от этого у золотистых хомячков *Mesocricetus auratus* естественный и искусственный гипобиоз сопровождается раздражением костного мозга и появлением в крови эритробластов (Ломако, Пироженко, 2010). Полученные нами данные соответствуют резуль-

Таблица 1. Гематологические параметры у летучих мышей при спячке

Показатель	<i>Myotis daubentonii</i>		<i>M. mystacinus</i>		<i>M. brandtii</i>		<i>Eptesicus nilssonii</i>		<i>Plecotus auritus</i>	
	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы
Лейкоциты, 10 ⁹ /л										
<i>M</i>	3.37	5.43	1.02	1.48	3.4	2.05	3.34	3.38	4.02	2.7
<i>m</i>	0.52	0.88	0.39	0.33	1.12	0.77	0.56	0.82	0.82	—
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л										
палочкоядерные										
<i>M</i>	0.14	0.06	0.06	0.04	0.2	0.09	0.21	0.04	0.19	0.08
<i>m</i>	0.03	0.04	0.05	0.01	0.1	0.05	0.06	0.02	0.09	—
сегментоядерные										
<i>M</i>	1.88	3.01	0.52	0.76	1.7	1.43	1.77	2.13	3.09	1.98
<i>m</i>	0.33	0.46	0.2	0.03	0.52	0.68	0.32	0.82	0.59	—
Лимфоциты, 10 ⁹ /л										
<i>M</i>	1.07	1.95	0.37	0.48	1.68	0.41	1.04	0.97	0.62	0.3
<i>m</i>	0.2	0.67	0.13	0.13	0.62	0.11	0.29	0.12	0.41	—
Моноциты, 10 ⁹ /л										
<i>M</i>	0.18	0.26	0.06	0.13	0.23	0.09	0.23	0.13	0.1	0.32
<i>m</i>	0.05	0.1	0.04	0.09	0.08	0.04	0.05	0.02	0.05	—
Эозинофилы, 10 ⁹ /л										
<i>M</i>	0.01	0.04	0.01	0.05	0.06	0.01	0.02	0.02	0	0.01
<i>m</i>	0.01	0.03	0.01	0.05	0.06	0.01	0.01	0.01	0	—
Базофилы, 10 ⁹ /л										
<i>M</i>	0.09	0.03	0.003	0.02	0	0.01	0.07	0.09	0	0
<i>m</i>	0.03	0.03	0.003	0.01	0	0	0.03	0.02	0	—
Нейтрофилы сегментоядерные/ лимфоциты, усл.ед.										
<i>M</i>	1.76	2.73	1.1	1.69	1.49	3.56	4.75	2.74	14.75	6.68
<i>m</i>	0.22	1.13	0.31	0.42	0.38	1.17	2.21	1.24	6.75	—
Площадь поверхности эритроцита, мкм ²										
<i>M</i>	28.74	28.16*	27.47	25.46	26.67	25.43*	25.51	25.43*	23.48	21.62
<i>m</i>	0.05	0.08	0.07	0.07	0.05	0.05	0.03	0.05	0.04	0.09

Примечание. *M* – среднее значение, *m* – ошибка среднего, “—” – данных нет, * – различия достоверны по сравнению с самками при $P < 0.05$.

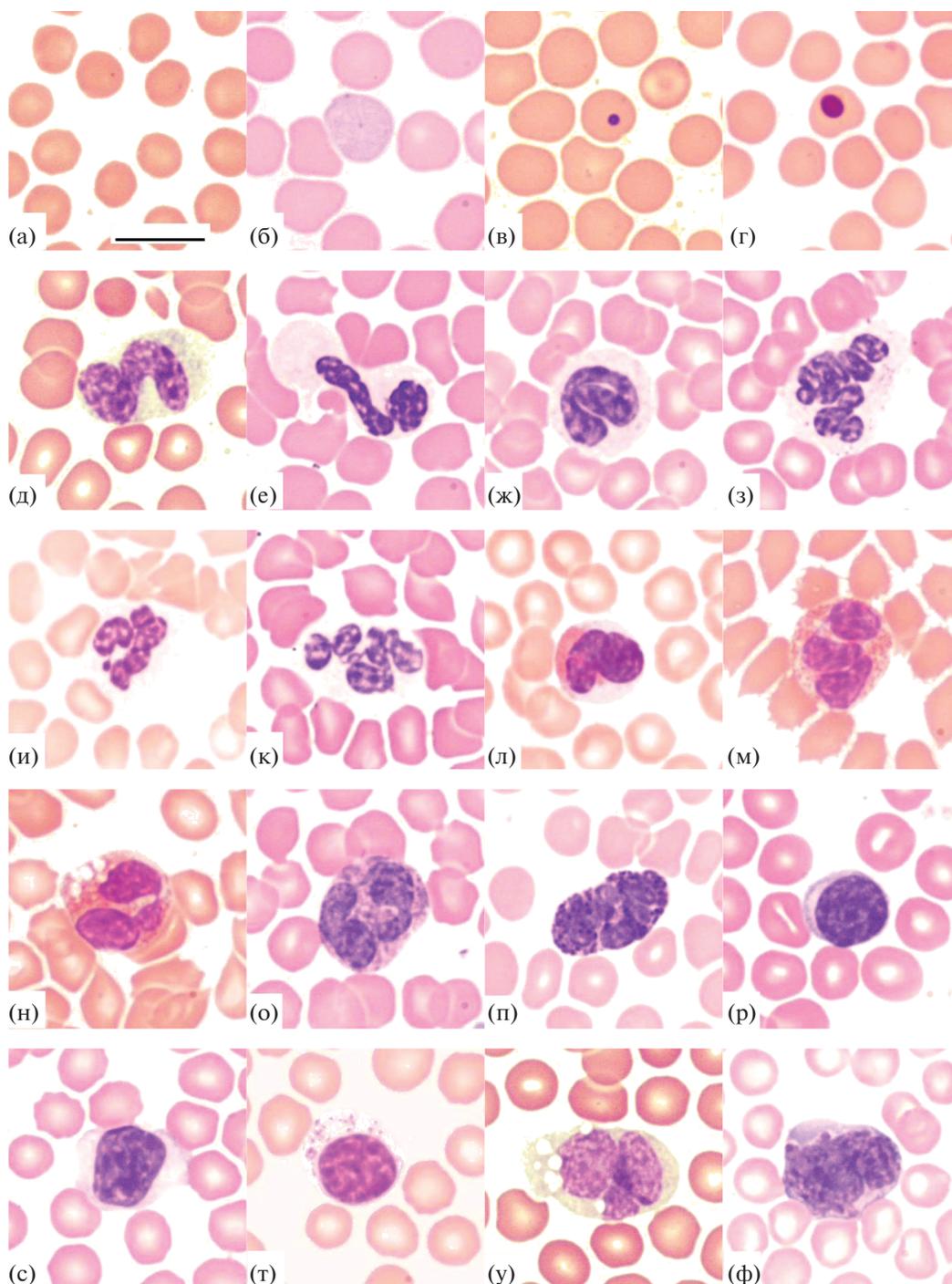


Рис. 1. Эритроциты *Plecotus auritus* (а), *Myotis daubentonii* (б), *M. mystacinus* (в) и *Eptesicus nilssonii* (г); палочкоядерные нейтрофилы *M. daubentonii* (д), *M. brandtii* (е) и *E. nilssonii* (ж); сегментоядерные нейтрофилы *M. daubentonii* (з), *P. auritus* (и) и *M. mystacinus* (к); эозинофилы *M. daubentonii* (л), *M. mystacinus* (м) и *E. nilssonii* (н); базофилы *M. daubentonii* (о) и *E. nilssonii* (п); лимфоциты *M. daubentonii* (р, т) и *E. nilssonii* (с); моноциты *M. daubentonii* (y) и *E. nilssonii* (ф). Масштаб: 10 мкм.

татам исследования, в котором установлено, что эритропоэз в костном мозге у летучих мышей, в частности у *M. mystacinus* и у *P. auritus*, угасает при спячке. Усиление его отмечено в периоды весеннего пробуждения и активной жизни (Иванян, 1966).

У летучих мышей выявлены межвидовые различия в размерах площади поверхности эритроцитов, что может влиять на скорость оборота крови (табл. 1, рис. 2). Так, у лабораторных крыс и мышей меньшему по сравнению с человеком

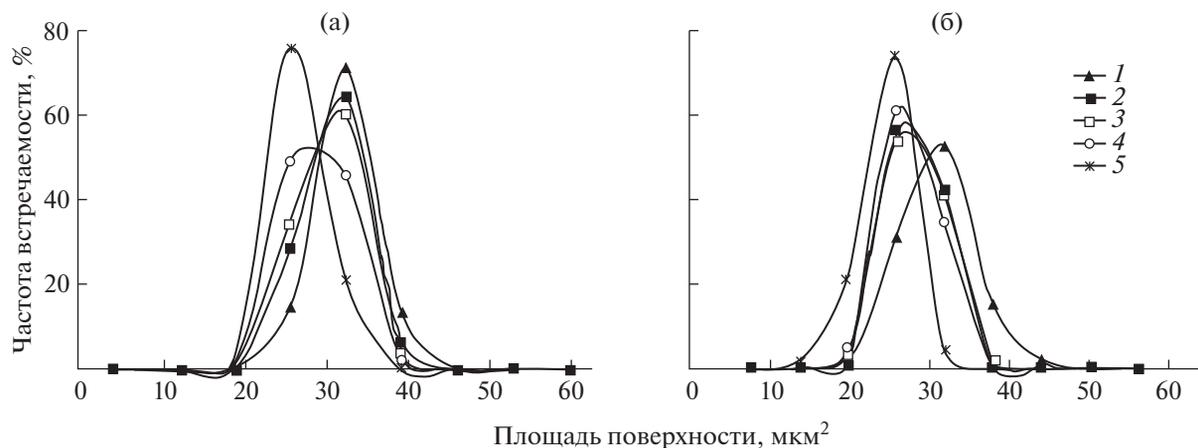


Рис. 2. Распределение эритроцитов по площади поверхности у самок и самцов различных видов летучих мышей при спячке. 1 – *Myotis daubentonii*, 2 – *M. mystacinus*, 3 – *M. brandtii*, 4 – *Eptesicus nilssonii*, 5 – *Plecotus auritus*.

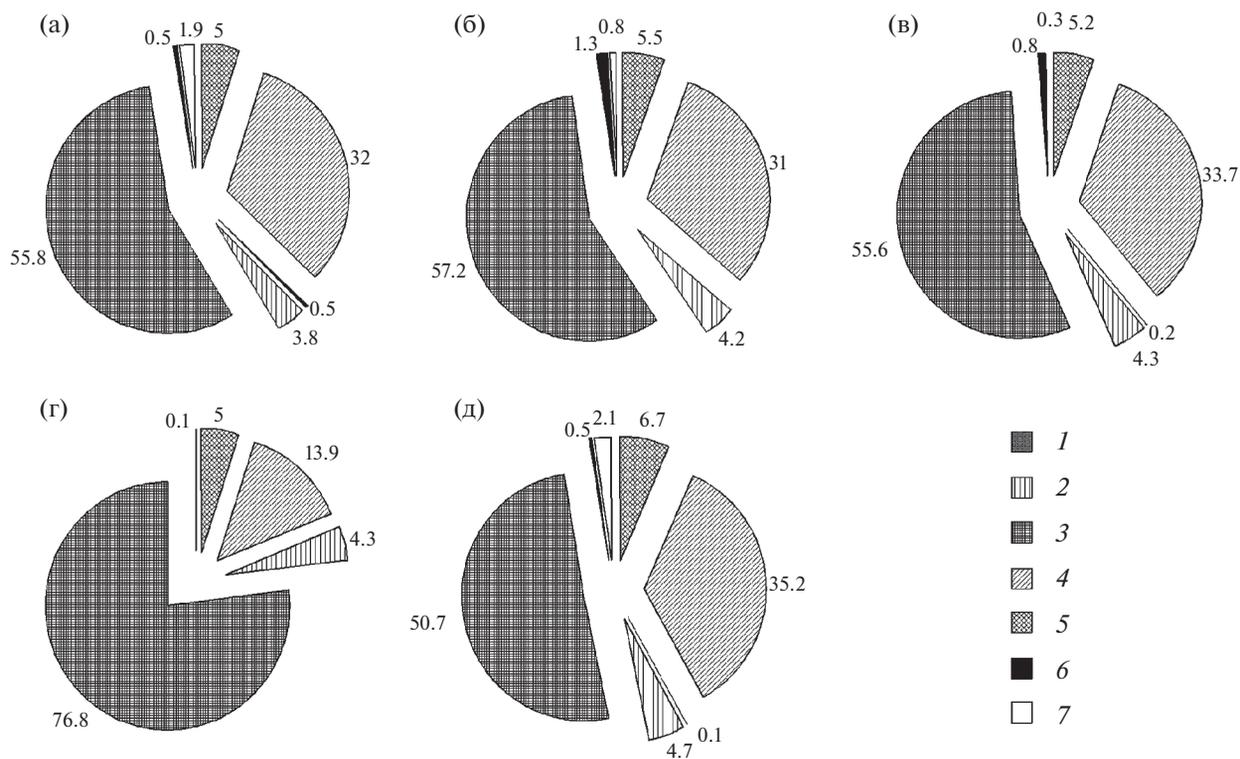


Рис. 3. Относительное содержание различных типов лейкоцитов периферической крови при спячке у летучих мышей. а – *Myotis daubentonii*, б – *M. mystacinus*, в – *M. brandtii*, г – *Plecotus auritus*, д – *Eptesicus nilssonii*. 1 – юные нейтрофилы, 2 – палочкоядерные нейтрофилы, 3 – сегментоядерные нейтрофилы, 4 – лимфоциты, 5 – моноциты, 6 – эозинофилы, 7 – базофилы.

среднему объему эритроцитов соответствуют повышенная микроваскулярная скорость и пониженная вязкость крови (Казеннов и др., 1999). Видовые вариации параметров эритроцитов у летучих мышей можно рассматривать как адаптивные, направленные на эффективное снабжение

тканей кислородом. Известно, что с уменьшением массы тела снижается объем эритроцитов и что более мелкие клетки свойственны млекопитающим с высокой интенсивностью тканевого метаболизма (Экологическая..., 1981; Казеннов и др., 1999). При рассмотрении взаимосвязи рео-

логических свойств эритроцитов с другими физиологическими показателями необходимо учитывать, что исследованные виды летучих мышей при спячке имеют разные массы и температуры тела (Lilley *et al.*, 2014). При этом у них наблюдается свойственная гибернантам депрессия метаболизма (Ануфриев, 2008б), а энергетические потребности резко возрастают в связи с полетами в активные периоды жизни.

Распределение эритроцитов по площади поверхности неодинаково у разных видов и различается у самок и самцов (рис. 2). У *M. daubentonii* кривая распределения сдвинута вправо в сторону увеличения площади, у *P. auritus* она смещена влево вследствие ее уменьшения. Существенные половые различия в площади поверхности эритроцитов обнаружены у *M. daubentonii*, *M. brandtii* и у *E. nilssonii*. Преобладание у самцов *M. daubentonii* большего количества, но более мелких эритроцитов по сравнению с таковыми у самок также описано польскими авторами (Wołk, Bogdanowicz, 1987).

У зимоспящих к концу длительной спячки, несмотря на резкое снижение потребления кислорода и угнетение костно-мозгового эритропоэза, артериовенозная разница остается неизменной и признаки анемии отсутствуют (Экологическая..., 1979). Этому, по-видимому, способствует увеличение продолжительности жизни эритроцитов и сокращение их деструкции (Ануфриев, 2008б). Замедление старения эритроцитов отмечено у вида с нерегулярной короткой спячкой — монгольского хомячка *Allocricetulus curtatus* (Кузнецова и др., 2016). В литературе рассматривался вопрос об удлинении при спячке времени жизни не только эритроцитов, но и лейкоцитов (Inkovaara, Suomalainen, 1973).

Особенности лейкопоэза у летучих мышей, обитающих в умеренном и холодном климате, изучены недостаточно, и поэтому сравнивать полученные нами данные с представленными в других работах сложно (Иванян, 1966; Узенбаева и др., 2015; Albayrak *et al.*, 2016). Согласно результатам наших исследований в содержании лейкоцитов имеются межвидовые различия (табл. 1). Меньше всего лейкоцитов зарегистрировано у *M. mystacinus*, которая среди исследованных видов обладает самой маленькой массой тела (Lilley *et al.*, 2014). Наибольшее их количество выявлено у *M. daubentonii*. Сходные значения содержания лейкоцитов обнаружены у *M. daubentonii*, зимующей в Западной Польше (Wołk, Bogdanowicz, 1987). У прудовой ночницы *M. dasycneme* количество лейкоцитов возрастает от лета к осени (Kovalchuk *et al.*, 2017), а у бодрствующей большой ночницы *M. myotis* оно увеличено по сравнению со спящей (Jaeger, 1963). У *M. mystacinus* и *P. auritus* пониженный уровень лейкоцитов сохраняется в

течение всего года (Иванян, 1966). В определенной степени это может быть связано со способностью летучих мышей даже летом после прекращения двигательной активности снижать температуру тела и впадать в оцепенение.

У многих видов мелких млекопитающих при спячке, а также при искусственном гипобиие содержание лейкоцитов в периферической крови низкое (Ломако, Пироженко, 2010; Vouma *et al.*, 2010a, b, 2013). Установлено, что снижение количества лейкоцитов, ассоциированное с гипотермией, происходит вследствие уникального процесса “исчезновения” их из циркуляции, депонирования в тканях и органах и последующего возвращения в кровеносное русло после пробуждения. Зрелые нейтрофилы преимущественно сохраняются в селезенке, печени, легких, лимфоидных органах или сосудах, а лимфоциты — в лимфоидных органах (Vouma *et al.*, 2010a, 2010b; Havenstein *et al.*, 2016). У *M. mystacinus* и *P. auritus* большое количество крови, депонированное в селезенке в октябре–декабре, уменьшается в феврале, задолго до весеннего пробуждения (Иванян, 1966). Особо важную роль в снижении в периферической крови уровня лейкоцитов у зимоспящих играют обратимая маргинация и адгезия нейтрофилов к стенке сосудов, а не их апоптоз и снижение высвобождения из костного мозга или удержание в селезенке. Эта гипотеза была подтверждена в экспериментах с предварительной обработкой дексаметазоном, который оказывает ингибирующее влияние на маргинацию (Vouma *et al.*, 2010a, 2010b, 2013).

Механизм обратимого возвращения лейкоцитов в периферическую кровь при переходе от гипотермии к нормотермному состоянию недостаточно выяснен. У европейского суслика *Spermophilus citellus* при искусственной гипотермии их уровень снижается примерно на 90%, но уже через 1.5 ч после пробуждения почти полностью возвращается к таковому у активных животных летом (Vouma *et al.*, 2010b). До нормотермного уровня быстро восстанавливается содержание нейтрофилов и моноцитов, а содержание лимфоцитов запаздывает и составляет лишь половину наблюдаемого у животных летом (Vouma *et al.*, 2013). На примере *M. daubentonii* показано, что количество лимфоцитов может зависеть от возрастного состава животных — в шестимесячном возрасте оно выше, чем у взрослых (Wołk, Bogdanowicz, 1987). Кроме того, выявлено, что у млекопитающих содержание лимфоцитов снижается при хроническом стрессе и в течение осенне-зимнего периода при инволюции тимуса. Ингибирующее влияние на пролиферацию лимфоцитов в тимусе у спящих животных оказывает 5'-AMP из бурой жировой ткани (Atanassov *et al.*, 1995).

В некоторых работах установлено, что существуют видоспецифические различия в реакции

на гибернацию. В частности, нет разницы между гибернационным и постгибернационным периодами в количестве лейкоцитов у суслика даурского *S. dauricus* (Hu *et al.*, 2017). У сони-полчка *Glis glis*, грызуна из сем. сониевых, восстановление запасов фагоцитов в крови (нейтрофилов и моноцитов) происходит сравнительно медленно. При этом врожденная иммунная система, представляющая собой первую линию защиты от патогенов, истощается не только при спячке, но и после выхода из нее (Havenstein *et al.*, 2016).

Существует мнение, что, несмотря на то что летучие мыши являются резервуаром для многих патогенов, при спячке возрастание смертности обусловлено истощением жировых запасов, а не хищничеством или паразитарной инфекцией (Kokurewicz, Speakman, 2006). Следовательно, большую роль в поддержании жизнеспособности может играть продолжительность глубокого оцепенения. У *E. nilssonii* в среднем она намного выше (214.8 ± 23.9 ч) по сравнению с таковой у *M. daubentonii* (182.21 ± 25.95 ч) и особенно у *P. auritus* (152.1 ± 9.8 ч) (Ануфриев, 2008а). Интересно, что при WNS, вызываемом *Geomyces destructans*, нарушаются паттерны оцепенения, что приводит к частым пробуждениям и преждевременному расходу запасенного жира. Среди видов из рода кожанов высокой устойчивостью к этой патологии обладает большой бурый кожан *E. fuscus*. У европейских видов из рода ночниц — у *M. daubentonii* и *M. brandtii* — инфекция ограничивается наружным эпидермисом, причем смертельных случаев не отмечено (Frank *et al.*, 2014).

Известно, что длительная экспозиция низкой температуры оказывает стрессирующее влияние на клетки, действуя на стабильность белка, синтез АТФ, активность ключевых регуляторных ферментов, функции мембран и целостность цитоскелета (Carey *et al.*, 2003). При спячке регулярно чередуются периоды чрезвычайного снижения температуры и последующего быстрого разогревания, однако повреждения органов у животных не обнаружено (Bouma *et al.*, 2013). Предполагается, что ослаблению травматического поражения тканей при спячке способствует индукция лейкоцитопении (Yasuma *et al.*, 1997).

В периферической крови летучих мышей небольшая часть нейтрофилов имеет неправильную форму, увеличенный объем цитоплазмы, эксцентрично расположенное ядро, а иногда и псевдоподии. Некоторые из перечисленных признаков, в частности перераспределение органелл и деформированность контура, относятся к морфологическим критериям активации (Тузлуков, 2004). Вероятно, подобные изменения отражают видовые особенности или обусловлены гибернацией. В частности, на морфофункциональное состояние нейтрофилов при спячке может влиять их способ-

ность к миграции и депонированию в органах и тканях. Установлено, что нейтрофилы маргинального пула обладают повышенной активностью, отличающейся от возникающей при воспалении (Yasuma *et al.*, 1997). Полисегментированные нейтрофилы (>5 сегментов в ядре) могут появляться в результате увеличения времени пребывания их в крови и при дефиците V_{12} или фолиевой кислоты.

Для лейкоформулы летучих мышей характерно преобладание нейтрофилов над лимфоцитами (табл. 1, рис. 3). По соотношению различных типов лейкоцитов наиболее близки между собой ночницы *M. daubentonii*, *M. mystacinus*, *M. brandtii*, а также *E. nilssonii*. От них отличается *P. auritus*, представитель рода *Plecotus*, у которого выявлен в среднем наиболее высокий относительный уровень нейтрофилов и низкий уровень лимфоцитов. Объяснить причины этих различий можно с помощью данных об интенсивности гранулоцитопоеза. У *P. auritus* в период ухода на зимовку (октябрь) жировые клетки в костном мозге встречаются редко, в то время как у *M. mystacinus* зафиксированы признаки перерождения (Иванян, 1966).

У летучих мышей обнаружены эозино- и базофилы (Экологическая..., 1979; Wołk, 1985; Wołk, Bogdanowicz, 1987). У *E. nilssonii* и *M. daubentonii* частота появления базофилов выше таковой у других видов, и их даже больше, чем эозинофилов. Возможно, в условиях повышения вязкости и понижения скорости кровотока функциональная активность базофилов возрастает. Значительное уменьшение количества всех типов циркулирующих лейкоцитов, за исключением базофилов, при понижении температуры тела отмечено у крыс Wistar (Bouma *et al.*, 2013).

Хотя нет прямых доказательств того, что базофилы оказывают большое влияние на состояние свертывающей системы во время спячки благодаря наличию в гранулах гепарина, их наряду с тучными клетками можно отнести к факторам, обеспечивающим создание гипокоагулянтности в условиях значительного замедления скорости кровотока. Кроме этого базофилы участвуют в регуляции обмена липидов, которые у гибернантов являются основной формой сохранения энергетических ресурсов (Ануфриев, 2008а). Зависимость количества базофилов от содержания триглицеридов и активация липазы гепарином были описаны ранее (Алмазов и др., 1979). Вероятно, имеются и другие причины, обуславливающие присутствие базофилов в крови летучих мышей при спячке.

Полученные результаты свидетельствуют об общих чертах и видовых особенностях состава периферической крови у летучих мышей при минимализации физиологических функций во время гибернации. Известно, что лейкоциты играют важную роль в поддержании устойчивости орга-

низма при действии различных факторов внешней среды. В частности, на снижение иммунологической реактивности, по-видимому, указывают низкие уровни лейкоцитов всех типов у *M. mystacinus* и лимфоцитов у *P. auritus*. Это соответствует крайне малой численности *M. mystacinus* и *P. auritus*, характерной для северных сообществ. На зимовках относительное обилие *E. nilssonii* составило 64.3%, *M. daubentonii* – 9.4%, *M. brandtii* – 8.9%, *P. auritus* – 6.1%, *M. mystacinus* – 3.8%, ночниц условной группы *M. brandtii*/*M. mystacinus* – 5.6%, а у других ночниц (видовую принадлежность которых точнее определить не удалось) – 1.9% (Белкин и др., 2015; Ильина и др., 2017).

В Карелии по численности лидирует *E. nilssonii*, который по ряду гематологических показателей существенно отличается от редко встречающихся *M. mystacinus* и *P. auritus*. По-видимому, соотношение различных типов лейкоцитов у *E. nilssonii* оптимально для сохранения гомеостаза и устойчивости организма, что способствует продвижению этого вида на Север.

Таким образом, впервые получены сравнительные данные о морфологии и составе клеток периферической крови при гибернации у видов гладконосых летучих мышей *M. daubentonii*, *M. brandtii*, *M. mystacinus*, *P. auritus* и *E. nilssonii*. У исследованных видов отмечены невысокий уровень лейкоцитов и нейтрофильный профиль лейкоформулы. Особенно низкое содержание лейкоцитов наблюдается у *M. mystacinus*, а лимфоцитов, а также наименьшая площадь поверхности эритроцитов – у *P. auritus*, относящихся к редко встречающимся видам в Республике Карелия.

Работа выполнена на средства федерального бюджета (тема № 0221-2017-0052 и № 0221-2017-0046) и программы Президиума РАН № 41 (проект № 0221-2018-0002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алмазов В.А., Афанасьев Б.В., Зарицкий А.Ю., Мамаев Н.Н., Рудакова Т.Л., Фрейдлин И.С., Цвейбах А.С., Шишков А.Л. Физиология лейкоцитов человека. Л.: Наука, 1979. 232 с.
- Ануфриев А.И. Зимовка и зимняя спячка летучих мышей в Якутии // Вестн. ЯГУ. 2008а. Т. 5. № 2. С. 5–8.
- Ануфриев А.И. Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2008б. 158 с.
- Белкин В.В., Панченко Д.В., Тирронен К.Ф., Якимова А.Е., Федоров Ф.В. Экологический статус (Chiroptera) на зимовках в восточной Фенноскандии // Экология. 2015. № 5. С. 1–8.
- Иванян А.К. Сезонная периодика кроветворения у летучих мышей // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1966. Т. 2. № 4. С. 340–346.
- Ильина Т.Н., Башишникова И.В., Белкин В.В., Якимова А.Е. // Тр. КарНЦ РАН. Эксперим. биология. 2017. № 5. С. 79–88.
- Казеннов А.М., Катюхин Л.Н., Маслова М.Н., Барвентенко Н.Н., Скверчинская Е.А., Рустамов Ф.А., Тавровская Т.В. Содержание 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах млекопитающих: межвидовая взаимосвязь с гематологическими и реологическими параметрами клеток // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1999. Т. 35. № 4. С. 332–334.
- Козинец Г.И., Высоцкий В.В., Захаров В.В., Оприщенко С.А., Погорелов В.М. Кровь и экология. М.: Практическая медицина, 2007. 432 с.
- Кузнецова Е.В., Найдено С.В., Суров А.В., Тихонова Н.Б., Козловский Ю.Е., Феоктистова Н.Ю. Сезонные изменения показателей крови у монгольского хомячка *Allocricetulus curtatus* // Изв. РАН. Сер. биол. 2016. № 4. С. 405–411.
- Ломачко В.В., Пирожено Л.Н. Лейкоциты при гипометаболических состояниях // Вісник проблем біол. і мед. 2010. Вип. 3. С. 61–65.
- Тузлуков И.И. Особенности морфологии нейтрофильных лейкоцитов в послеродовом периоде // Рос. мед.-биол. вестн. им. академика И.П. Павлова. 2004. № 3–4. С. 113–118.
- Узенбаева Л.Б., Белкин В.В., Илюха В.А., Кижина А.Г., Якимова А.Е. Особенности состава и морфологии клеток периферической крови у трех видов летучих мышей Карелии в период зимней спячки // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2015. Т. 51. № 4. С. 299–304.
- Экологическая физиология животных. Ч. I. Общая экологическая физиология и физиология адаптаций. Л.: Наука, 1979. 440 с.
- Экологическая физиология животных. Ч. II. Физиологические системы в процессе адаптации и факторы среды обитания. Л.: Наука, 1981. 528 с.
- Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации // Ред. Белоусова Ю.Б. М.: Рос. об-во клин. исследований, 2005. 156 с.
- Albayrak İ., Özcan H.B., Baydemir M. Some hematological parameters in *Myotis myotis* and *Myotis blythii* (Mammalia: Chiroptera) in Turkey // Turk. J. Zool. 2016. V. 40. P. 388–391.
- Atanarova C., Naegeli H.-U., Zenke G., Schneider C., Kramarova L.I., Bronnikov G.E., van Regenmortel M.H.V. // Anti-lymphoproliferative activity of brown adipose tissue of hibernating ground squirrels is mainly caused by AMP // Comp. Biochem. Physiol. 1995. V. 112C. P. 93–100.
- Banerjee A., Rapin N., Bollinger T., Misra V. Lack of inflammatory gene expression in bats: a unique role for a transcription repressor // Sci. Rept. 2017. V. 7. P. 1–14.
- Becker N.I., Encarnação J.A., Tschapka M., Kalko E.K.V. Energetics and life-history of bats in comparison to small mammals // Ecol. Res. 2013. V. 28. P. 249–258.
- Ben-Hamo M., Muñoz-García A., Williams J.B., Korine C., Pinshow B. Waking to drink: rates of evaporative water loss determine arousal frequency in hibernating bats // J. Exp. Biol. 2013. V. 216. P. 573–577.
- Bouta H.R., Carey H.V., Kroese F.G.M. Hibernation: the immune system at rest? // J. Leukoc. Biol. 2010a. V. 88. P. 619–624.
- Bouta H.R., Strijkstra A.M., Boerema A.S., Deelman L.E., Epema A.H., Hut R.A. Kroese F.G.M., Henning R.H.

- Blood cell dynamics during hibernation in the European Ground Squirrel // *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010b. V. 136. P. 319–323.
- Bouma H.R., Dugbartey G.J., Boerema A.S., Talaei F., Herwig A., Goris M., van Buiten A., Strijkstra A.M., Carey H.V., Henning R.H., Kroese F.G.M. Reduction of body temperature governs neutrophil retention in hibernating and nonhibernating animals by margination // *J. Leukoc. Biol.* 2013. V. 94. № 3. P. 431–437.
- Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // *Physiol. Rev.* 2003. V. 83. P. 1153–1181.
- Frank C.L., Michalski A., McDonough A.A., Rahimian M., Rudd R.J., Herzog C. The resistance of a North American bat species (*Eptesicus fuscus*) to White-nose Syndrome (WNS) // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 12. e113958.
- Geiser F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor // *Annu. Rev. Physiol.* 2004. V. 66. P. 239–274.
- Havenstein N., Langer F., Stefanski V., Fietz J. It takes two to tango: Phagocyte and lymphocyte numbers in a small mammalian hibernator // *Brain Behav. Immun.* 2016. V. 52. P. 71–80.
- Hu H., Du F., Fu W., Jiang S., Cao J., Hu S., Wang H.P., Chang H., Goswami N., Gao Y.F. A dramatic blood plasticity in hibernating and 14-day hindlimb unloading Daurian ground squirrels (*Spermophilus dauricus*) // *J. Comp. Physiol. B.* 2017. V. 187. P. 869–879.
- Inkovaara P., Suomalainen P. Studies on the physiology of the hibernating hedgehog. 18. On the leukocyte counts in the hedgehog's intestine and lungs // *Ann. Acad. Sci. Fenn.* 1973. V. 200. P. 1–21.
- Jaeger R. Serologisch-hämatologische und immunologische Untersuchungen an winter-schlafenden Fledermäusen (*Myotis myotis* S.) // *Experientia.* 1963. Bd XIX. № 11. S. 596–598.
- Kokurewicz T., Speakman J.R. Age related variation in the energy costs of torpor in Daubenton's bat: effects on fat accumulation prior to hibernation // *Acta Chiropterol.* 2006. V. 8. № 2. P. 509–521.
- Kovalchuk L., Mishchenko V., Chernaya L., Snitko V., Mikshevich N. Haematological parameters of pond bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825 Chiroptera: Vespertilionidae) in the Ural Mountains // *Zool. Ecol.* 2017. V. 27. № 2. P. 168–175.
- Lilley T.M., Stauffer J., Kanerva M., Eeva T. Interspecific variation in redox status regulation and immune defence in five bat species: the role of ectoparasites // *Oecologia.* 2014. V. 175. P. 811–823.
- Moore M.S., Reichard J.D., Murtha T.D., Nabhan M.L., Pian R.E., Ferreira J.S., Kunz T.H. Hibernating little brown *Myotis* (*Myotis lucifugus*) show variable immunological responses to white-nose syndrome // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 3. P. 1–8.
- Mühldorfer K., Speck S., Kurth A., Lesnik R., Freuling C., Müller T., Kramer-Schadt S., Wibbelt G. Diseases and Causes of Death in European Bats: Dynamics in Disease Susceptibility and Infection Rates // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 12. e29773.
- Stockmaier S., Dechmann D.K.N., Page R.A., O'Mara M.T. No fever and leucocytosis in response to a lipopolysaccharide challenge in an insectivorous bat // *Biol. Lett.* 2015. V. 11. P. 1–4.
- Wibbelt G., Kurth A., Hellmann D., Weishaar M., Barlow A., Veith M., Prüger J., Görföl T., Grosche L., Bontadina F., Zöphel U., Seidl H.P., Cryan P.M., Blehert D.S. White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bats, Europe // *Emerg. Infect. Dis.* 2010. V. 16. № 8. P. 1237–1242.
- Wilkinson G.S., South J.M. Life history, ecology and longevity in bats // *Aging Cell.* 2002. V. 1. P. 124–131.
- Wołk E. Hematology of a hibernating rodent – the northern birch mouse // *Acta Theriol.* 1985. V. 30. № 22. P. 337–348.
- Wołk E., Bogdanowicz W. Hematology of the hibernating bat: *Myotis daubentonii* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1987. V. 88A. № 4. P. 637–639.
- Yasuma Y., McCarron R.M., Spatz M., Hallenbeck J.M. Effects of plasma from hibernating ground squirrels on monocyte-endothelial cell adhesive interactions // *Am. J. Physiol.* 1997. V. 273. P. 1861–1869.

Morphology and Composition of Peripheral Blood Cells During Hibernation in Bats (Chiroptera, Vespertilionidae) of North-West Russia

L. B. Uzenbaeva¹, A. G. Kizhina^{1, #}, V. A. Ilyukha¹, V. V. Belkin¹, and E. A. Khizhkin¹

¹Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia

[#]e-mail: golubewa81@yandex.ru

The composition and morphology of peripheral blood cells during hibernation were studied in five bat species of order Chiroptera—Daubenton's bat *Myotis daubentonii*, Brandt's bat *M. brandtii*, whiskered bat *M. mystacinus*, brown long-eared bat *Plecotus auritus*, Northern bat *Eptesicus nilssonii*. It is noted that these species are characterized by the low level of leukocytes and the prevalence of neutrophils over lymphocytes. Interspecific differences in neutrophil morphology, total number of leukocytes, absolute and relative content of different types of leukocytes, and in the size of erythrocyte surface area were established. These differences were particularly pronounced between the less abundant species—*P. auritus* and *M. mystacinus* and the more common species—*M. daubentonii*, *M. brandtii*, and the dominant species of *E. nilssonii*.