

ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ ЯКУТСКИХ СУСЛИКОВ В ПРЕДГИБЕРНАЦИОННЫЙ ОСЕННИЙ ПЕРИОД

© 2023 г. П.О. Теплова*, #, Н.П. Комелина*, К.И. Лизоркина*, Н.М. Захарова*

*Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», ул. Институтская, 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: p.o.teplova@gmail.com

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 16.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Ранее было показано, что ряд физиологических и биохимических изменений у якутских длиннохвостых сусликов происходит уже в осенний (предгибернационный) период: в головном мозге, сердце, скелетных мышцах и др. В данной работе проанализирован состав клеток периферической крови осенью и впервые обнаружено увеличение общего числа лейкоцитов, в частности, гранулоцитов и уменьшение количества лимфоцитов у якутских сусликов по сравнению с летом; выявлен сдвиг лейкограммы с лимфоцитарной фракции в сторону гранулоцитарной. Показан значительный рост тромбоцитов и тромбокрита с сохранением процентного соотношения зрелых и молодых форм клеток. К сожалению, литературных данных о клеточном составе крови в осенний период подготовки гибернаторов к зимней спячке чрезвычайно мало. Между тем, полученные нами результаты указывают на наличие крайне важных адаптационных изменений лейкоцитов и тромбоцитов у сусликов в этот период. В статье обсуждены возможные причины этих изменений.

Ключевые слова: лейкоциты, тромбоциты, гематология, адаптация, гибернация, суслик.

DOI: 10.31857/S0006302923050125, EDN: PHDDWJ

Гибернация зимоспящих сусликов является уникальной природной моделью для изучения адаптивных механизмов функционирования организма в условиях критически низких температур для выживаемости человека и других теплокровных животных [1]. Естественная спячка гибернаторов представляет собой прерывистый процесс, состоящий из повторяющихся баутов спячки и межбаутных пробуждений. Баут спячки у якутских сусликов длится в среднем 7–14 дней и состоит из входа в торпидное состояние (оцепенение), пребывания в глубоком торпоре и выхода из него. Межбаутная активность (эутермия) после пробуждения составляет от нескольких до 24 часов [2, 3]. При изучении гибернации, как правило, наибольшее внимание уделяется сравнению летнего и зимнего периодов, соответствующих периодам максимальной и минимальной активности зимоспящих, в то время как этологические, морфологические и физиологические перестройки при подготовке к спячке происходят уже в осеннее время. К сожалению, данных, каса-

ющихся предгибернационного (осеннего) периода жизнедеятельности гетеротермных животных в литературе чрезвычайно мало. Между тем, получены убедительные результаты, касающиеся изменений, происходящих у якутских сусликов на органном и организменном уровнях в осенний период: в поведенческой активности, в моноаминергической и опиоидной системах головного мозга, в сердце и скелетных мышцах [4–8]. Данная работа продолжает цикл исследований, касающихся осеннего периода подготовки к зимней спячке.

Известно, что у зимоспящих животных в течение годового цикла происходит ряд физиолого-биохимических изменений, направленных на адекватное обеспечение всех систем организма, как в условиях активной жизнедеятельности, так и в торпоре. Несомненно, важнейшую роль в поддержании гомеостаза организма играет кровь. Целью данного исследования является выявление особенностей адаптационных изменений лейкоцитов и тромбоцитов крови якутских сус-

ликов в осенний период, что расширит не только наше представление об уникальном явлении зимней спячки, но и понимание значимости рассматриваемых форменных элементов в подготовке организма к экстремальным физиологическим изменениям (гипотермии).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Объектом исследования являлись якутские длиннохвостые суслики *Urocitellus undulatus* обоего пола ($N = 50$), взятые в эксперимент во время их летней (июнь–июль, температура в области сердца 38°C , масса 607.0 ± 18.6 гр., $N = 25$) и осенней активности (октябрь, температура в области сердца $37\text{--}38^{\circ}\text{C}$, масса 682.0 ± 15.4 гр., $N = 25$). Диких животных отлавливали в Якутии в августе с дальнейшей транспортировкой в лабораторию. В летний и осенний периоды (до ноября) сусликов содержали в одинаковых условиях: в индивидуальных клетках в специально приспособленных неотапливаемых помещениях с соблюдением естественного фотопериода, при достаточном количестве пищи (зерно, семена подсолнечника, овощи) (*ad libitum*). Забор сусликов осеннего периода проводили в первые две недели октября при ежедневном мониторинге животных, с учетом того, что начало входа в спячку у данного вида приходится на третью декаду октября [9].

Гематологический анализ. Гематологическое исследование цельной крови проводили на многопараметровом ветеринарном автоматическом гематологическом анализаторе BC-2800Vet (Mindray, Китай). Калибровку прибора осуществляли при помощи заводского набора BC-3D (Mindray, Китай). Забор крови всегда осуществляли в утренние часы (10:00–11:00) незамедлительно после декапитации животных. Животных декапитировали после анестезии золетилом (Zoletil, Virbac, Франция, 4 мг/кг внутримышечно). Кровь в объеме 200 мкл отбирали в пробирку с антикоагулянтом $\text{K}_2\text{-EDTA}$, 0,2 мл. Определяли следующие гематологические показатели:

– лейкоцитарные индексы: WBC (общее количество лейкоцитов), $\times 10^9/\text{л}$; LYMPH (лимфоциты), $\times 10^9/\text{л}$; MON (моноциты), $\times 10^9/\text{л}$; GRAN (гранулоциты, суммарно нейтрофилы, базофилы и эозинофилы), $\times 10^9/\text{л}$; LYMPH (лимфоциты), %; MON (моноциты), %; GRAN (гранулоциты), %;

– тромбоцитарные индексы: PLT (тромбоциты), $\times 10^9/\text{л}$; MPV (средний объем тромбоцитов), фл; PDW (ширина распределения тромбоцитов по объему); PCT (тромбокрит), %.

Статистический анализ. Данные представлены в виде среднего значения $\pm m$, где m – стандартная ошибка среднего (SEM, Standard Error of the

Mean). Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.4.1.681 (GraphPad Software Inc., США) и Statistica 10.0.1011 (StatSoft Inc., США). Анализ вида распределения данных проводили с использованием критериев нормальности Колмогорова–Смирнова, Лиллиефорса, а также W -критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения независимых измерений использовали двусторонний непараметрический непарный U -критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Содержание лейкоцитов. Полученные абсолютные и относительные показатели лейкоцитарной фракции крови подробно представлены на рис. 1. Было обнаружено, что осенью общее число лейкоцитов увеличивается почти в полтора раза по сравнению с летним периодом: $(4.90 \pm 0.26) \times 10^9/\text{л}$ и $(3.50 \pm 0.14) \times 10^9/\text{л}$ соответственно. При этом со сменой сезона количественный показатель фракции гранулоцитов возрастает в два раза: с $(1.40 \pm 0.07) \times 10^9/\text{л}$ летом до $(2.90 \pm 0.21) \times 10^9/\text{л}$ осенью, количество лимфоцитов уменьшается в 1.2 раза (с $(1.80 \pm 0.11) \times 10^9/\text{л}$ летом до $(1.50 \pm 0.09) \times 10^9/\text{л}$ осенью), а количество моноцитов достоверно не изменяется (рис. 1а). Также наблюдается изменение соотношения некоторых субпопуляций лейкоцитов (рис. 1б): снижается процентное содержание лимфоцитов – с 53% летом до 35% осенью (на 18%), увеличивается процентное содержание гранулоцитов – с 41% летом до 60% осенью (на 19%).

Данный феномен может говорить о высвобождении нейтрофильных гранулоцитов из костного мозга в кровь. Согласно литературным данным, в активном состоянии костный мозг сусликов содержит больше нейтрофилов ранней стадии (миелобласты и нейтрофильные промиелоциты) и меньше нейтрофилов поздней стадии (нейтрофильные метамиелоциты) [10, 11]. Нейтрофилы отвечают за неспецифическую форму лейкоцитарной защиты. Известно, что в костном мозге млекопитающих содержится запас гранулоцитов,кратно превышающий уровень, циркулирующий в кровяном русле, который задействуется, например, при стрессе [12]. Повышение уровня гранулоцитов может быть связано и с процессом, обратным лейкоцитарной экстравазации – проникновением лейкоцитов за пределы сосудов и временное «хранение» во вторичных лимфоидных (селезенке и лимфоузлах) и прочих (кишечник, легкие) органах [1, 13–17]. Схожие механиз-

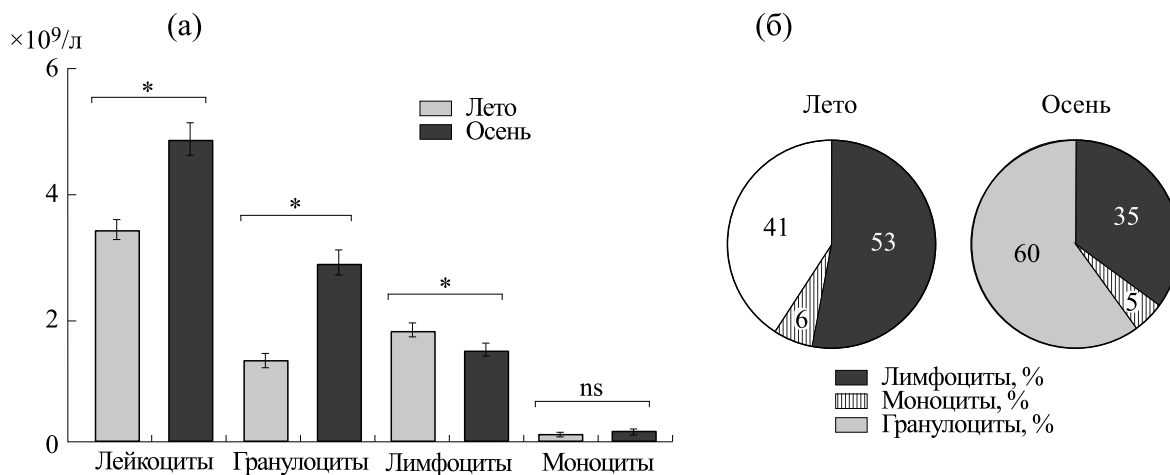


Рис. 1. Лейкоцитарный профиль крови якутских сусликов *Urocitellus undulatus* в период летней и осенней активности. (а) – Абсолютные значения общего количества лейкоцитов и их отдельных фракций, представленные как среднее и стандартная ошибка среднего. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия между выборками ($p < 0.05$), ns – по результатам статистической проверки статистически значимые отличия не обнаружены ($p \geq 0.05$). (б) – Относительное содержание различных видов лейкоцитов (лейкограмма); $n = 25$ для каждого времени года.

мы, вероятно, актуальны и для физиологического увеличения лейкоцитов у гибернарующих животных во время и после пробуждения [1, 18, 19]. Как показано на суслике золотистом (*Callospermophilus lateralis*), временных и энергетических резервов организма для быстрого созревания нейтрофилов в период пробуждения недостаточно вследствие подавления синтеза белка во время гипотермии [11]. Таким образом, можно объяснить потребность организма в данной адаптации в виде увеличенного пула нейтрофилов уже в осенний период.

В отличие от относительно короткоживущих гранулоцитов, время жизни лимфоцитов составляет несколько месяцев [20, 21]. Развивающаяся лимфоцитопения у якутских сусликов может объясняться постепенным снижением активности костного мозга в отношении синтеза этого типа клеток, экстравазацией (например, в кишечник) [22, 23], а также инволюцией тимуса [24]. Лимфоцитопения в осенний период может быть обусловлена и снижением пролиферативной способности Т-лимфоцитов селезенки в это время [25].

Увеличение общего числа лейкоцитов в 1.6 раза осенью недавно обнаружено и у гетеротермных летучих мышей *Myotis dasycneme*, при этом у самок параметр WBC в 2.5 раза выше, чем у самцов [26]. Сезонный лейкоцитоз осенью перед спячкой показан и для других гибернаторов, таких как тарбаган (*Marmota sibirica*) [27] и краснощекий суслик (*Spermophilus erythrogenys*) [28].

Общеизвестными распространенными причинами повышения уровня лейкоцитов являются

стрессовые состояния, травмы, инфекционный и воспалительный ответ организма [29]. Однако, по всей видимости, здесь имеет место именно адаптивная реакция, эволюционно выработанная гибернаторами для подготовки к сезону гипотермии. По нашим данным (в печати), во время торпора у якутского суслика происходит аномальное снижение количества лейкоцитов до критических значений. При пробуждении, наоборот, количество данных кровяных телец стремительно увеличивается; подобное описано и для европейского суслика [1]. Мы полагаем, что осень является важным периодом для обеспечения необходимого клеточного пула лейкоцитов для межбурных пробуждений. Существенное увеличение гранулоцитарной фракции лейкоцитов можно объяснить активацией врожденной иммунной системы с целью клиренса крови от различных патогенов перед зимней спячкой, которая сопровождается затем глубокой иммунодепрессией [11].

Тромбоцитарные показатели. Осенью изменяется также количество тромбоцитов в крови якутских сусликов, подробные результаты представлены на рис. 2. У активных осенних животных выявлено значительное увеличение тромбоцитов по сравнению с летними – $(344.50 \pm 9.90) \times 10^9/\text{л}$ и $(252.20 \pm 13.96) \times 10^9/\text{л}$ соответственно. Аналогичная тенденция сохраняется для тромбоцита: с лета на осень происходит увеличение в 1.4 раза $(0.140 \pm 0.007\%$ и $0.19 \pm 0.005\%$ соответственно). При этом ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW) остается практически неизменной

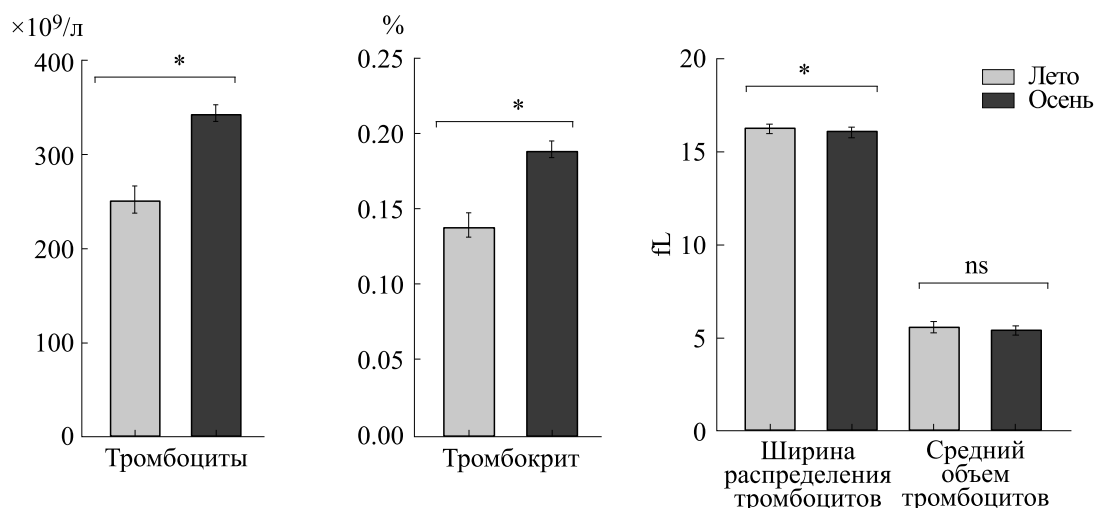


Рис. 2. Количество тромбоцитов в крови якутских сусликов *Uroditellus undulatus* в период летней и осенней активности. Значения представлены как среднее и стандартная ошибка среднего. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия между выборками ($p < 0.05$), ns — по результатам статистической проверки значимые отличия не обнаружены ($p \geq 0.05$); $n = 25$ для каждого времени года.

(16.40 ± 0.09 fL летом и 16.20 ± 0.04 fL осенью), что свидетельствует об общем сохранении процентного соотношения зрелых и молодых фракций тромбоцитов, и дополнительно подтверждается отсутствием достоверных различий показателя MPV (среднего объема тромбоцитов) летом и осенью.

Схожий тромбоцитарный профиль был показан для гетеротермных летучих мышей осенью: наблюдали увеличение общего числа тромбоцитов и тромбокрита в два раза при отсутствии изменений показателя MPV [26].

Возможным механизмом высвобождения тромбоцитов в кровяное русло является их способность к обратимой адгезии, миграции и аккумуляции на стенках кровеносных сосудов, а также в различных органах, как и в случае с лейкоцитарным пулом периферической крови.

Имеются данные о том, что в период торпора тромбоциты не накапливаются в селезенке [19, 30]. Выявлено, что основным местом для хранения тромбоцитов в период зимней спячки являются синусоиды печени [19, 31]. Вероятно, зрелая часть тромбоцитов мигрирует из органов, а фракция молодых образуется путем отшнуровывания тромбоцитов от мегакариоцитов костного мозга таким образом, что соотношение зрелых и молодых форм остается неизменным [32, 33]. Любопытно, что срок жизни меченых тромбоцитов примерно на 50% продолжительнее у спящих сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) по сравнению с не впавшими в спячку [19].

Аналогично ситуации с лейкоцитарными показателями, в период спячки у якутского, а также европейского и тринадцатиполосного суслика [1, 19] происходит аномальное снижение количества тромбоцитов с последующим реактивным увеличением данного параметра до нормальных значений в период межбуждений (материал в печати). Наблюдаемый тромбоцитоз, по-видимому, также связан с подготовкой к периоду гипотермии. Показано, что тромбоциты играют важную роль не только в процессе гемостаза, но и в процессах репарации и адаптации организма к действию на него различных экстремальных факторов (гипоксии, ионизирующей радиации, инфекции, стресса и др.), к которым относится и гипотермия в торпидный период [34].

Из-за подобной адаптивной лабильности гематологических показателей длиннохвостые суслики способны адекватно реагировать на сезонные изменения и благоприятно переживать длительный период зимней спячки (5–8 мес).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами результаты указывают на наличие крайне важных адаптационных изменений лейкоцитов и тромбоцитов у сусликов в осенний период подготовки к зимней спячке. Впервые у якутских сусликов обнаружено увеличение общего числа лейкоцитов, в частности, гранулоцитов и уменьшение количества лимфоцитов осенью по сравнению с летом; выявлен сдвиг лейкограммы с лимфоцитарной фрак-

ции в сторону гранулоцитарной. Показан значительный рост тромбоцитов и тромбокрита с сохранением процентного соотношения зрелых и молодых фракций клеток. Возможный смысл описанных гематологических изменений заключается в заблаговременном клиренсе крови от патогенов, репарации имеющихся внешних и внутренних повреждений, а также накоплении увеличенного пула клеток для последующего распределения в органах во время зимней спячки. Данное исследование еще раз подтверждает важность изучения осеннего периода жизни гетеротермных животных.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме Государственного задания «Механизмы природного и искусственного гипобиоза» (НИОКТР: 122041100276-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с руководящими принципами, установленными Директивой Европейского Совета 2010/63/EU и Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12 августа 1977 г. N 755 "О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных". Протокол был одобрен этическим комитетом Института биофизики клетки РАН (№ 2 от 08.09.2021 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. R. Bouma, A. M. Strijkstra, A. S. Boerema, et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **136**, 319 (2010).
2. N. K. Klichkhanov, E. R. Nikitina, Z. M. Shihamirova, et al., *Front. Physiol.*, **12**, 730657 (2021).
3. S. Popova, A. Ulanova, Y. Gritsyna, et al., *Sci. Reports*, **10**, 15185 (2020).
4. Е. В. Карадулева, И. М. Санталова и Н. М. Захарова, *Биофизика*, **57**, 926 (2014).
5. М. В. Лазарева, К. О. Трапезникова, И. М. Вихлянцева и др., *Биофизика*, **57**, 982 (2012).
6. М. В. Онуфриев, Т. П. Семенова, Е. П. Волкова и др., *Нейрохимия*, **33**, 103 (2016).
7. Т. П. Семенова и Н. М. Захарова, *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **99**, 1265 (2002).
8. Т. П. Семенова, Л. А. Спиридонова и Н. М. Захарова, *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **100**, 1068 (2014).
9. А. И. Ануфриев и И. М. Охлопков, *Экология*, **2**, 125 (2015).
10. J. E. Szilagyi and J. B. Senturia, *Cryobiology*, **9**, 257 (1972).
11. H. R. Bouma, H. V. Carey, and F. G. M. Kroese, *J. Leukoc. Biol.*, **88**, 619 (2010).
12. A. Hidalgo, E. R. Chilvers, C. Summers, et al., *Trends Immunol.*, **40**, 584 (2019).
13. M. Franco, C. Contreras, and R. F. Nespolo, *Comp. Biochem. Physiol. A*, **166**, 338 (2013).
14. Y. Yasuma, R. M. McCarron, M. Spatz, et al., *Am. J. Physiol.*, **273**, 1861 (1997).
15. Г. В. Алексеева и В. М. Юнкер, *Изв. СО АН СССР*, **5** (1), 124 (1974).
16. Г. В. Алексеева, В. М. Юнкер и О.П. Федорова, *Известия СО АН СССР*, 92 (1974).
17. А. И. Ануфриев, *Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии* (СО РАН, Новосибирск., 2008).
18. P. Suomalainen and V. Rosokivi, *Suomalainen Tiedekatemia toimituksia. Sar. A.4: Biologica*, **198**, 1 (1973).
19. E. L. d.Vrij, Thesis of Doctor of Philosophy (University of Groningen, Groningen, 2019).
20. E. Parretta, G. Cassese, A. Santoni, et al., *J. Immunol.*, **180**, 7230 (2008).
21. J. Sprent and D. F. Tough, *Science (New York)*, **265**, 1395 (1994).
22. P. Inkovaara and P. Suomalainen, *Ann. Acad. Sci. Fenn. Biol.*, **200**, 1 (1973).
23. C. C. Kurtz and H. V. Carey, *Develop. Comp. Immunol.*, **31**, 415 (2007).
24. С. Г. Колаева, Е. Г. Новоселова, З. Г. Амерханов и др., *Цитология*, **45**, 628 (2003).
25. Е. Г. Новоселова, А. В. Kulikov, О. В. Glushkova, et al., *Dokl. Biol. Sci.*, **397**, 272 (2004).
26. L. Kovalchuk, V. Mishchenko, and L. Chernaya, *Zoology and Ecology*, **27**, 168 (2017).
27. Л. И. Лешкович, *Изв. Гос. противочумн. ин-та Сибири и Дальнего Востока*, **8**, 70 (1950).
28. В. М. Юнкер, Г. В. Алексеева и Е. В. Фомина, *Ж. эвол. биохим. и физиол.*, **10**, 193 (1974).
29. N. Abramson and B. Melton, *Am. Fam. Physician*, **62**, 2053 (2000).
30. E. L. dVrij, P. C. Vogelaar, M. Goris, et al., *PloS One*, **9**, 603 (2014).
31. E. L. dVrij, H. R. Bouma, M. Goris, et al., *J. Comp. Physiol. B*, **191**, 603 (2021).
32. S. Cooper, S. Lloyd, A. Koch, et al., *J. Comp. Physiol. B*, **187**, 815 (2017).
33. L. Corash, H. Y. Chen, J. Levin, et al., *Blood*, **70**, 177 (1987).
34. B. G. Yushkov, *Bull. Sib. Med.*, **20**, 216 (2021).

Peculiarities of Adaptational Changes in Leukocytes and Platelets of Yakutian Ground Squirrels during the Pre-Hibernation Period in Autumn

P.O. Teplova*, N.P. Komelina*, K.I. Lizorkina*, and N.M. Zakharova*

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Earlier, it was shown that a series of physiological and biochemical changes in Yakutian long-tailed ground squirrels start to happen during autumn (the pre-hibernation period): in the brain, heart, skeletal muscles, etc. This study was conducted to analyze the composition of peripheral blood cells obtained from Yakutian ground squirrels in autumn, and for the first time an increase in the total number of leukocytes, particularly granulocytes, and a decrease in the number of lymphocytes were observed when compared with those obtained in summer; a shift of the leukogram from the lymphocytic fraction to the granulocytic fraction was revealed. Significant increase in a platelet count and thrombocrit with preservation of the percentage ratio of mature and young cell fractions was shown. Still, information on the cellular components of blood during the autumn season when hibernators prepare for winter months of hibernation remains scarce. Nonetheless, the results of our study indicate that there are very significant adaptive changes that occur in leukocytes and platelets of ground squirrels in this period. Possible causes of these changes are discussed.

Keywords: leukocytes, platelets, hematology, adaptation, hibernation, ground squirrel