

## АДАПТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ В ГОДОВОМ ЦИКЛЕ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ СУСЛИКОВ *UROCITELLUS UNDULATUS*

© 2024 г. П. О. Теплова<sup>1</sup>\*, Н. П. Комелина<sup>1</sup>, А. Е. Егоров<sup>2</sup>,  
К. И. Лизоркина<sup>1</sup>, Н. М. Захарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, Россия

<sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

\* e-mail: p.o.teplova@gmail.com

Поступила в редакцию 10.12.2023

После доработки 21.12.2023

Принята к публикации 25.12.2023

В работе исследованы изменения всех форменных элементов крови длиннохвостых сусликов *Urocitellus undulatus* ( $n = 100$ ) в разные периоды их жизнедеятельности. Гематологический анализ проводили на ветеринарном автоматическом анализаторе: измерялись лейкоцитарные, тромбоцитарные и эритроцитарные показатели летом (нормотермия, июнь – июль), осенью (подготовительный период, октябрь), в зимний торпидный (гипотермия, декабрь – февраль) и зимний активный период (эутермия, кратковременные пробуждения между баутами гипотермии, декабрь – февраль). Показано, что общее количество тромбоцитов и лейкоцитов сусликов осенью по сравнению с летом увеличилось на ~40%. В торпидный период тромбо- и лейкоцитов в крови сменились экстремальной тромбоцитопенией (снижение на ~90%) и лейкопенией (~80%), затрагивающей все субпопуляции лейкоцитов. При кратковременных зимних пробуждениях показатели быстро достигали “летних” значений, за исключением несколько увеличенного среднего объема тромбоцитов. С приближением осени наблюдался незначительный эритроцитоз (~10%), что в совокупности с изменениями остальных параметров может свидетельствовать о незначительной осенней гипоксии. В период торпора и во время зимней эутермии эритроцитарные показатели практически не отличались от контрольных летних значений, однако при этом как в осенний период подготовки к сезону спячки, так и во время ее обнаружено наличие атипичных форм эритроцитов. Полученные результаты обсуждаются в контексте адаптации форменных элементов крови длиннохвостого суслика к экстремальным условиям зимней спячки и ценны для исследования адаптивных способностей гомойотермных животных и человека.

**Ключевые слова:** длиннохвостый суслик, гипотермия, гибернация, гематология, физиологическая адаптация, гипоксия, гемостаз.

**DOI:** 10.31857/S0044452924020012, **EDN:** XBAOSR

### ВВЕДЕНИЕ

Гетеротермия является широко распространенной адаптивной стратегией энергосбережения у некоторых видов животных и характеризуется прерыванием нормальных биологических функций [1]. Уникальной особенностью гетеротермов является устойчивость к колебаниям температуры тела [2, 3], которые сопровождаются глубоким физиологическим ремоделированием при каждом сезонном переходе с целью приспособления организма к экстремальным условиям окружающей среды [4].

Длиннохвостые суслики *Urocitellus undulatus* являются облигатными гибернаторами – считается, что они впадают в спячку независимо от доступно-

сти пищи и воды, температуры окружающей среды и фотопериода, и что данный процесс регулируется эндогенными циркадными ритмами [5]. В торпоре эти грызуны способны в сотни раз замедлять частоту сердечных сокращений и дыхательных движений, а температура их тела может опускаться до околонулевых значений. [6]. Очевидно, что столь сильные изменения в организме сусликов в течение годового цикла жизнедеятельности проявляются во многих физиолого-биохимических характеристиках, включая состояние форменных элементов крови. Например, в торпидном состоянии при резком снижении метаболизма, сопутствующей брадикардии и значительном снижении скорости кровотока, животные

не подвергаются тканевой гипоксии, тромбозу и инфекциям [7]. Это связывают с константностью эритроцитарных показателей и резко выраженной лейко- и тромбоцитопенией, достигающей 90% для разных видов сусликов [8, 9].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Животные.** Работа выполнена на длиннохвостых сусликах *Urocitellus undulatus* (с 2019 по 2023 г.). Использовали животных обоего пола ( $n = 100$ , 59 самцов и 41 самка) массой тела  $633 \pm 18$  г следующих групп: “летняя активность” (нормотермия, сезонный контроль, температура в области сердца  $38^\circ\text{C}$ , июнь – июль,  $n = 25$ ); “осенняя активность” (предгибернационный период, температура в области сердца  $36\text{--}37^\circ\text{C}$ , октябрь,  $n = 25$ ); “торпор/оцепенение” (гипотермия, температура в области сердца  $0.5\text{--}5^\circ\text{C}$ , декабрь – февраль,  $n = 25$ ); “зимняя активность” (эутермия, периодически повторяющиеся временные промежутки (не более суток) между периодами гипотермии, ИВА, взятие материала через 5–14 ч после пробуждения, температура в области сердца  $35\text{--}37^\circ\text{C}$ , декабрь – февраль,  $n = 25$ ).

Сусликов отлавливали в конце августа в местах их природного обитания (долина реки Лена, Якутия) и доставляли в лабораторию механизмов природного и искусственного гипобиоза ИБК РАН (Пушино, Московская область). До конца октября животных содержали в индивидуальных клетках в специально приспособленном неотапливаемом помещении с соблюдением естественного фотопериода, при достаточном количестве пищи (зерно, семена подсолнечника, овощи) и гнездового материала (*ad libitum*). Эксперименты на сусликах летнего периода проводили преимущественно в июне, осеннего – в первые две недели октября при ежедневном мониторинге животных [10]. В ноябре клетки с сусликами переносили в темное помещение с температурой  $0\text{--}2^\circ\text{C}$  до окончания гибернационного периода (апрель).

Для мониторинга баутов в период спячки часть сусликов индивидуально размещали в находящиеся в холодильной камере деревянные ящики ( $20 \times 20 \times 25$  см), в дно которых был установлен термистор (чувствительность,  $0.2^\circ\text{C}$ ). Во время спячки температура подстилки достигала  $0\text{--}4^\circ\text{C}$ , тогда как при кратковременных периодах эутермии повышалась до  $14^\circ\text{C}$ . Для провокации пробуждения животных извлекали из ящика в середине баута (5–6 сутки гипотермии) и переносили в помещение с температурой воздуха  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ . Момент открывания глаз (через 3–5 ч) оценивали как окончательное пробуждение животного. Температуру сердечной мышцы у всех групп животных точно измеряли с использованием датчика RET-3 (Physitemp, США,  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ) сразу после вскрытия грудной клетки [11].

**Методика забора крови и проведения гематологического анализа.** Взятие цельной крови проводили с 10.00 до 11.00 ч незамедлительно после декапитации животных. Активных животных предварительно подвергали легкому наркозу (Zoletil, Virbac, Франция, 4 мг/кг, внутримышечно). Биоматериал собирали в пластиковую капиллярную микропробирку (0.2 мл) с антикоагулянтом (K2-EDTA) для подсчета форменных элементов крови (Greiner Bio-One, Австрия). Подсчет осуществляли на ветеринарном гематологическом анализаторе BC-2800Vet (Mindray, Китай) с помощью реагентов ДиаВетТест (Диакон ДС, Россия), согласно протоколу изготовителя. Калибровку прибора осуществляли при помощи заводского набора BC-3D (Mindray, Китай). Определяли следующие гематологические показатели:

- лейкоцитарные: 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),  $\times 10^9/\text{л}$ ;
- тромбоцитарные: PLT (общее количество тромбоцитов),  $\times 10^9/\text{л}$ ; MPV (средний объем тромбоцитов), фл; PDW (ширина распределения тромбоцитов по объему), %; PCT (тромбокрит), %;
- эритроцитарные: RBC (общее количество эритроцитов),  $\times 10^{12}/\text{л}$ ; HGB (концентрация гемоглобина), г/л; HCT (гематокрит), %; MCV (средний объем эритроцита), фл; MCH (среднее содержание гемоглобина в эритроците), пг; MCHC (средняя концентрация гемоглобина в эритроците), г/л; RDW (ширина распределения эритроцитов), %.

**Статистический анализ.** Данные представлены в виде диаграммы размаха (box plot) при уровне значимости доверительного интервала  $p < 0.05$ . Статистический анализ выполняли в программах Statistica 10.0.1011 (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism 9.4.1.681 (GraphPad Software Inc., США). Анализ вида распределения данных проводили с использованием критериев нормальности Колмогорова-Смирнова и W-критерия Шапиро – Уилка. Различия между сезонами по гематологическим показателям анализировали с помощью одностороннего дисперсионного анализа Крускала – Уоллиса, для последующего попарного сравнения разных групп использовали U-критерий Манна – Уитни для независимых выборок. Для предварительной обработки данных и их визуализации применяли метод главных компонент (PCA) по всем 15 измеренным гематологическим показателям. Обработку проводили с использованием языка программирования R (версия 4.3.0) в среде RStudio (версия 2023.06.0+421).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метод главных компонент [12] позволил нам провести предварительный анализ данных и визуализировать межгрупповые различия гематологиче-

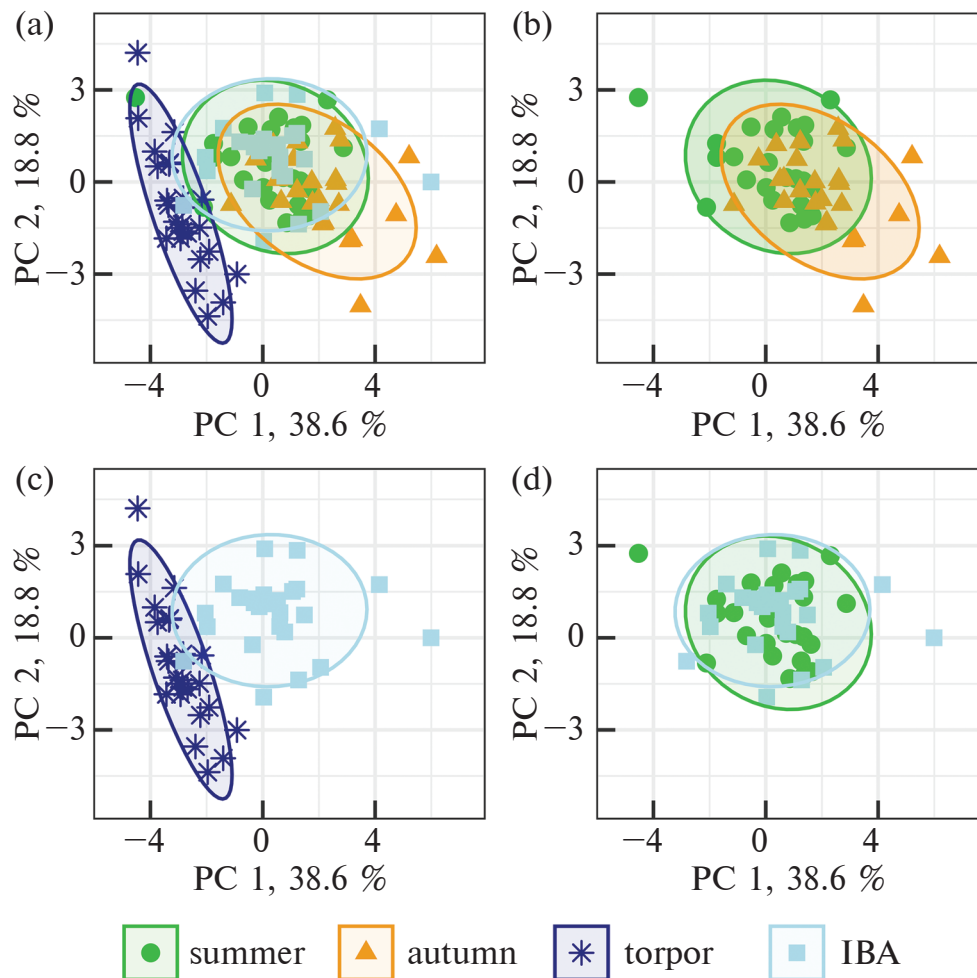
ского профиля в течение годового цикла жизнедеятельности *U. undulatus*. Две главных компоненты (PC1 и PC2) описывают около 60% вариации исходных данных (рис. 1). Хорошо видно, что группы животных зимнего активного (ИВА) и летнего периодов существенно отличаются от группы торпидных сусликов (рис. 1a, c), меньше отличий наблюдается между летними и зимними активными животными (рис. 1a, b) против осенней группы сусликов, в то время как группа ИВА практически не отличима от летних животных (рис. 1d).

Также заметно, что за разделение на группы ответственна переменная PC1, тогда как переменная PC2, скорее, отвечает за внутригрупповую вариацию данных. Какие же исходные переменные (гематологические показатели крови) ответственны за подобное разделение на кластеры животных? Для ответа на это вопрос рассмотрим совместно рис. 1 и рис. 2. Видно, что кластер точек, соответ-

ствующий показателям крови – WBC, PLT, PCT, Gran, вносит наибольший вклад в переменную PC1, а кластер HGB, RBC, HCT в переменную PC2. Кроме того, можно сделать вывод, что показатели PDW, MPV, MCHC выше для группы животных зимнего торпидного периода в сравнении с другими группами, а показатели WBC, PLT, PCT, Gran, наоборот, ниже.

Для более детального анализа были построены диаграммы размаха (box plot).

На рис. 3 представлены результаты, показывающие сезонную динамику содержания лейкоцитов в крови длиннохвостых сусликов. Ранее нами уже были обнаружены изменения, происходящие в осенний период подготовки к спячке, а именно: увеличение общего числа лейкоцитов на 40% и гранулоцитов на 107% с одновременным снижением лимфоцитов на 20% [13]. В зимний торпидный период наблюдается лейкопения (снижение на 78%),



**Рис. 1.** Сезонные различия длиннохвостых сусликов *Urocitellus undulatus* (по показателям крови) в пространстве главных компонент PC1 и PC2. В процентах указана вариация изначальных переменных, объясняемых соответствующей главной компонентой. (a) – все группы животных, (b) – сравнение летних и осенних животных, (c) – сравнение животных в торпоре и при зимней активности, (d) – сравнение летних и зимних активных сусликов. Обозначения точек: зеленый круг – летние животные, оранжевый треугольник – группа осень, синяя звезда – суслики в торпоре, голубой квадрат – ИВА, зимняя активность. Каждая точка описывает одного суслика по 15 гематологическим индексам,  $n = 25$  для каждой группы (см. методы).

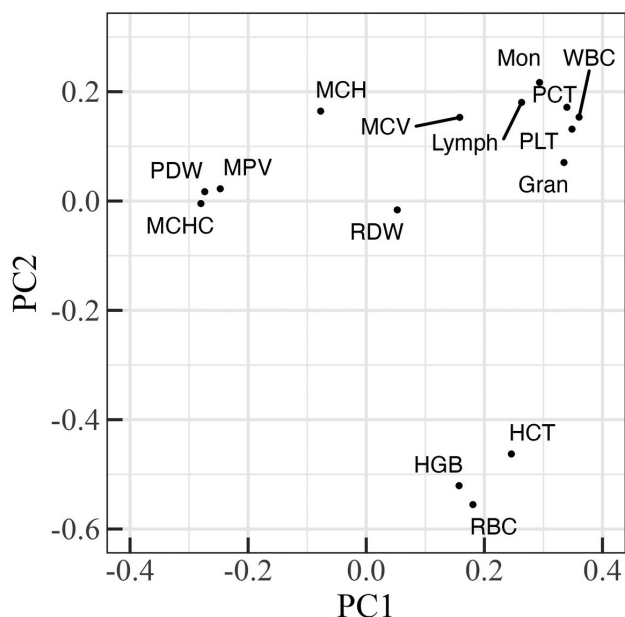


Рис. 2. График нагрузок, полученный в результате анализа методом главных компонент показателей крови длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus*.

затрагивающая все субпопуляции лейкоцитов: лимфоцитов (на 63%), моноцитов (на 78%) и гранулоцитов (на 82%). Снижение показателей происходит до экстремально низких, околонулевых значений. При этом статистически значимых отличий показателей белых клеток крови между животными в период летней и зимней активности обнаружено не было.

Динамика изменений тромбоцитарных показателей в годовом цикле жизнедеятельности длиннохвостых сусликов представлена на рис. 4. В осенний период показано увеличение количества тромбоцитов и тромбокрита на 36% [13], которое сменяется ярко выраженной тромбоцитопенией (снижение

на 88%) в период зимней спячки. В торпидном состоянии обнаружено увеличение ширины распределения тромбоцитов по объему и среднего объема тромбоцитов (на 16% по сравнению с летом). После пробуждения количество тромбоцитов статистически не отличается от летних значений, как и в случае с лейкоцитами. Средний объем тромбоцитов при этом немного снижается по сравнению с торпором, однако все еще превышает летние показатели.

Рис. 5 подробно отражает сезонные изменения эритроцитарных показателей в периферической крови длиннохвостых сусликов. Самые многочисленные статистически значимые изменения произошли в группе осенних животных, которые находились на стадии подготовки к спячке. В этот период наблюдалось увеличение количества эритроцитов (на 8%), повышение концентрации гемоглобина (на 8%), увеличение гематокрита (в 1.1 раз), среднего объема эритроцита (на 3%), а также ширины распределения эритроцитов (в 1.2 раза). Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, наоборот, незначительно снизилась (на 2.5%).

В торпоре средний объем эритроцита уменьшился на 6%, что ниже летних значений (на 3%). Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, наоборот, увеличилась с осени (на 6%) с превышением летних значений (на 4%). Ширина распределения эритроцитов у торпидных животных уменьшилась по сравнению с осенними (в 1.1 раз), но не достигла летних значений (1.2 раза). При зимней активности данный параметр снова немного увеличивается и это единственный показатель, который сколько-нибудь отличается у активных зимних и летних сусликов. По результатам дисперсионного анализа среднее содержание гемоглобина в эритроците в течение годового цикла достоверно не изменялось, потому параметр МСН не отображен на рис. 5.

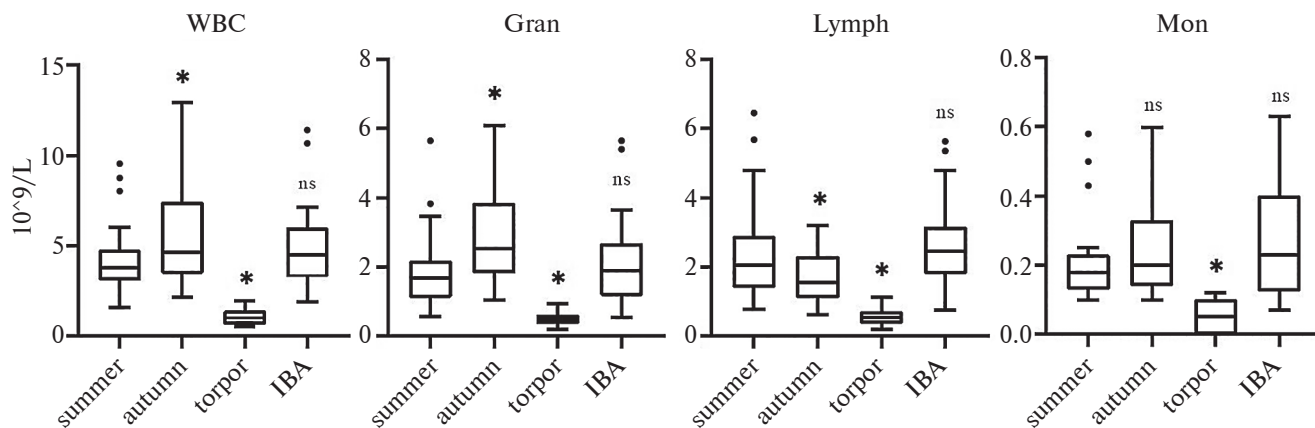
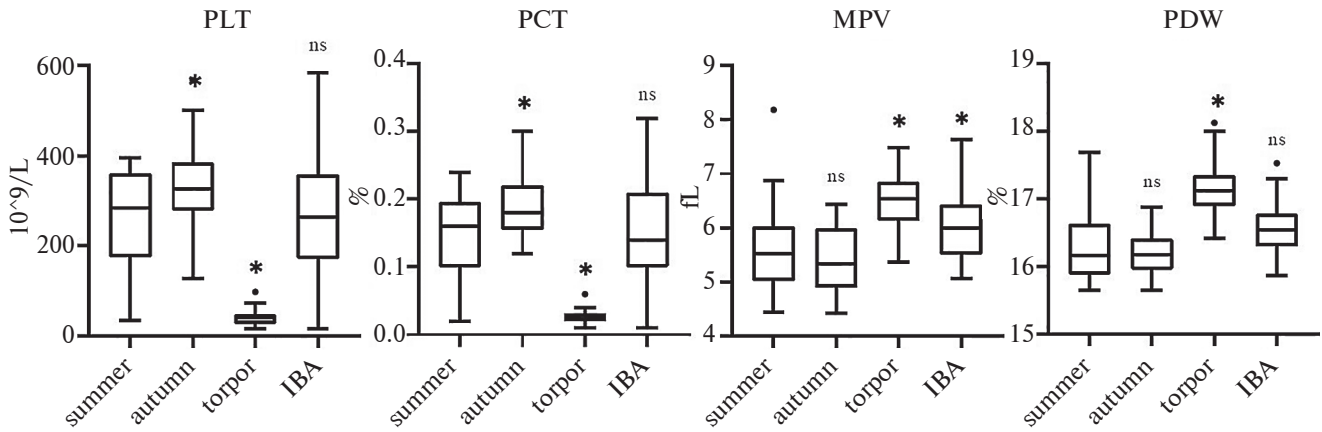
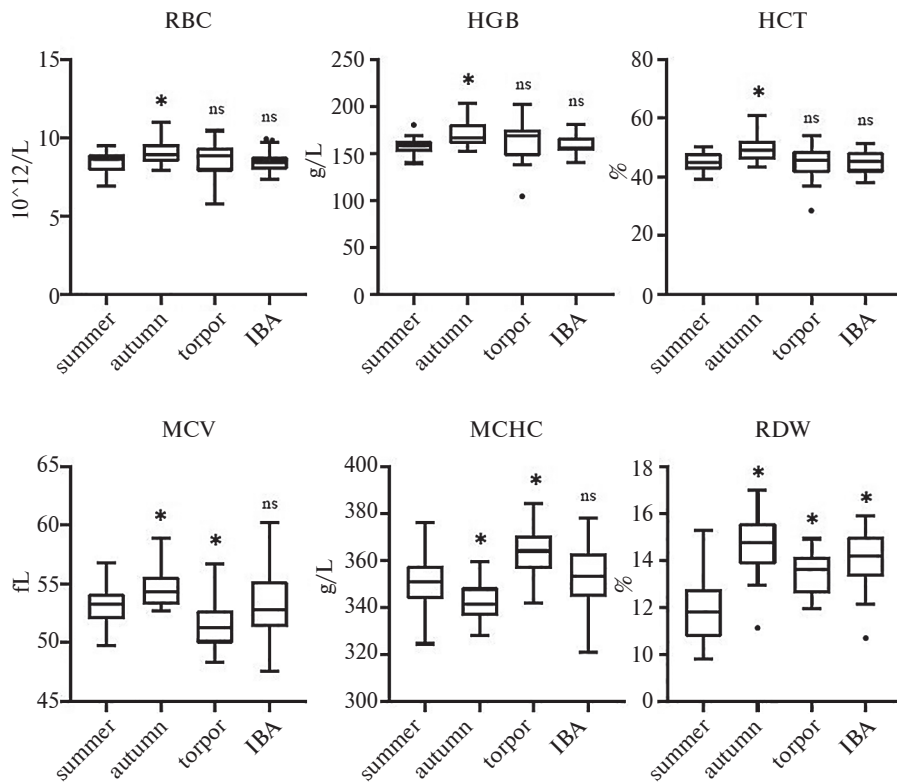


Рис. 3. Сезонные изменения лейкоцитарного пула в периферической крови сусликов *U. undulatus* ( $n = 25$  для каждого времени года). Значения представлены в виде диаграммы размаха (box plot), где • – выбросы, \* – статистически значимые различия с группой “лето” ( $p < 0.05$ , здесь и далее U-критерий Манна–Уитни), ns – по результатам статистической проверки достоверных отличий не обнаружено ( $p \geq 0.05$ ). WBC – лейкоциты; Mon – моноциты; Lymph – лимфоциты; Gran – гранулоциты (суммарно нейтрофилы, базофилы и эозинофилы).



**Рис. 4.** Сезонные изменения тромбоцитов в периферической крови сусликов *U. undulatus* ( $n = 25$  для каждого времени года). Значения представлены в виде диаграммы размаха (box plot), где • – выбросы, \* – статистически значимые различия между группами ( $p < 0.05$ ), ns – по результатам статистической проверки достоверных отличий не обнаружено ( $p \geq 0.05$ ). PLT – количество тромбоцитов; PCT – тромбокрит; MPV – средний объем тромбоцитов; PDW – ширина распределения тромбоцитов по объему.



**Рис. 5.** Сезонные изменения эритроцитарных показателей в периферической крови сусликов *U. undulatus* ( $n = 25$  для каждого времени года). Значения представлены в виде диаграммы размаха (box plot), где • – выбросы, \* – статистически значимые различия между группами ( $p < 0.05$ ), ns – по результатам статистической проверки достоверных отличий не обнаружено ( $p \geq 0.05$ ). RBC – эритроциты; HGB – концентрация гемоглобина; HCT – гематокрит; MCV – средний объем эритроцита; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; RDW – ширина распределения эритроцитов.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Важно отметить, что благодаря накоплению данных, за несколько лет коллективу авторов впервые удалось получить столь широкую выборку результатов гематологического анализа для диких сусликов *U. undulatus* (25 животных в каждой группе).

*Адаптации лейкоцитов*

Феномен угнетения врожденного иммунитета за счет экстремальной лейкопении во время торпора (максимальное снижение до 90 % по сравнению с активным летним состоянием) показан для европейского хомяка (*Cricetus cricetus*), монгольского хомяка (*Allocricetulus curtatus*), обыкновенного ежа (*Erinaceus*

*europaeus L.*), европейского суслика (*Spermophilus citellus*), арктического суслика (*Urocitellus parryi*), 13-полосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*), бурого медведя (*Ursus arctos*) [8, 9, 14–19] и согласуется с нашими данными, полученными для длиннохвостого суслика (*Urocitellus undulatus*). Лейкопения затрагивает все субпопуляции лейкоцитов гибернаторов (рис. 3) и объясняется преимущественно процессом “маргинализации” клеток. Известно, что существует 2 взаимозаменяемых пула лейкоцитов: циркулирующие в крови и “маргинальные”, находящиеся в органах [20, 21]. В пользу данной гипотезы имеются исследования, показавшие, что в период гибернации (по сравнению с летним периодом и при пробуждении) количество лейкоцитов в некоторых органах повышается: в легких в основном аккумулируются нейтрофилы, а в кишечнике – лимфоциты [8, 19, 22, 23]. Одновременно с этим костный мозг сусликов в торпоре содержит меньше клеток, что говорит о невозможности синтезировать лейкоциты в нужном объеме *de novo* при пробуждении [24, 25], поскольку по общеизвестным данным, в костном мозге млекопитающих срок синтеза, например, нейтрофилов занимает несколько дней [26], а период зимней эутермии у суслика *Urocitellus undulatus* длится от 2 до 24 ч. Лимфопения объясняется также снижением синтеза клеток не только в костном мозге, но и в тимусе, обратимая инволюция которого, по-видимому, начинается уже в период осенней подготовки к спячке [13, 27].

Осень также является крайне важным адаптационным периодом в годовом цикле гибернаторов. В это время, вероятно, происходит обновление иммунных клеток, а также обеспечение необходимого пула лейкоцитов для последующих пробуждений. Существует гипотеза об активации врожденного иммунитета с целью клиренса (очистения) крови от патогенов перед и после спячки, поскольку в торпоре животные находятся в выраженном иммунодепрессивном состоянии [8]. Данная гипотеза согласуется с полученными нами данными о повышении общего числа лейкоцитов осенью за счет гранулоцитарной субпопуляции (рис. 3). Как уже было сказано ранее, увеличенный пул клеток затем доставляется на “хранение” во вторичные лимфоидные (селезенка, лимфоузлы) и прочие (кишечник, легкие) органы путем экстравазации [13]. Этот же механизм, по-видимому, позволяет гетеротермным животным быстро восстанавливать лейкоцитарный пул клеток до летних значений при зимних пробуждениях (ИВА).

Все вышеописанное наводит на предположение о том, что срок жизни лейкоцитов у гетеротермных животных может быть длиннее, чем у гомойотермных (как уже показано для эритроцитов и тромбоцитов) [7, 28], однако данная гипотеза нуждается в проведении дополнительных исследований. Недавно показано, что нейтрофилы обладают метаболиче-

ской пластичностью: в условиях голодания или из-за ограниченной доступности глюкозы клетки способны к метаболизму жирных кислот, которые являются основным источником энергии в спячке [29].

#### Адаптации тромбоцитов

Количественный анализ тромбоцитов в годовом цикле жизнедеятельности сусликов *U. undulatus* показал схожую с лейкоцитами картину. В подготовительный осенний период обнаруженный тромбоцитоз, вероятно, тоже связан с процессами клиренса крови, а также с репарацией возможных повреждений и накоплением клеток для последующего запаса в органах, преимущественно в синусоидах печени [7, 30, 31]. При этом осенью сохраняется процентное соотношение зрелых и молодых фракций тромбоцитов, о чем говорят практически не изменившиеся показатели MPV и PDW. Вероятно, равновесие объясняется тем, что одновременно происходят 2 события: фракция молодых тромбоцитов образуется путем отшнуровывания от мегакариоцитов костного мозга, а зрелая часть клеток мигрирует из органов [13]. Показано, что повышенная выработка тромбоцитов может являться частью иммунного ответа в ранней острой фазе, наряду с повышением нейтрофильных гранулоцитов [31]. Похожий тромбоцитарный профиль показан для летучих мышей, однако литературы, описывающей гемостатическую систему гибернаторов в осенний период, критически мало [32].

В торпидный период у длиннохвостого суслика нами зафиксирована ярко выраженная тромбоцитопения (снижение почти на 90%, рис. 4), схожая картина описана для европейского (*Spermophilus citellus*) и 13-полосного сусликов (*Ictidomys tridecemlineatus*) и является общей адаптацией для облигатных гибернаторов [7, 9]. Снижение количества тромбоцитов и факторов свертывания необходимо для того, чтобы обеспечить защиту гибернирующего животного от тромбообразования в условиях гипотермии, неподвижности и замедленного сердцебиения [7, 33]. В нашем эксперименте обнаружено, что соотношение зрелых и молодых фракций тромбоцитов в торпоре сдвигается в сторону преобладания молодых форм клеток (о чем говорит увеличение MPV и PDW, рис. 4). Данный феномен может быть связан с повышением плоидности мегакариоцитов и/или с увеличенным сроком жизни тромбоцитов именно гибернирующих видов животных [7, 31, 34, 35].

При пробуждении количество тромбоцитов суслика быстро возвращается к летним значениям (рис. 4), высвобождаясь из резервов органов. Физиологический смысл столь быстрого восстановления заключается в нормализации системы свертываемости крови для предотвращения кровотечений [7]. Средний объем тромбоцитов (MPV) остается не-

много увеличенным у активных зимних сусликов, что может говорить о незавершенном процессе восстановления системы гемостаза, а также миграции предшественников тромбоцитов из костного мозга в кровотоки [34, 36]. Напрашивается проведение дополнительных исследований размеров и форм клеток, т.к. данные параметры напрямую влияют на функциональную активность тромбоцитов. Например, известно, что при охлаждении и спячке тромбоциты способны обратимо изменять свою форму, это может являться адаптацией, защищающей клетки от повреждений при низких температурах [7].

В целом, все вышеописанные клеточные события указывают на сбалансированное (предусмотрительное) функционирование физиологических систем гемостаза и иммунного ответа.

#### *Адаптации эритроцитов*

Обсуждая изменения эритроцитарных показателей, важно отметить, что система красной крови является крайне стабильной и константной, а срок жизни самих эритроцитов исчисляется месяцами [37]. Поэтому даже небольшие изменения красных кровяных телец сусликов в осенний период подготовки к спячке, очевидно, тоже носят адаптационный характер. Только осенью происходит небольшое увеличение гематокрита, количества эритроцитов и концентрации гемоглобина в периферической крови (рис. 5). В свою очередь, увеличение гематокрита и размеров эритроцитов (наряду со скоростью кровотока, деформируемостью эритроцитов и лейкоцитов) оказывает прямое влияние на усиление процессов маргинализации лейкоцитов и тромбоцитов [38–43]. Небольшое увеличение количества эритроцитов с лета на осень отмечено у малого (*Spermophilus pygmaeus*) и крапчатого сусликов (*Spermophilus suslicus*) [44], количественное увеличение эритроцитов и гематокрита – у 13-полосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*) [45]. Кроме этого, нами показано, что осенью у длиннохвостого суслика (*Urocitellus undulatus*) возрастает количество эритроцитов атипичных форм, о чем свидетельствует увеличение параметра RDW в 1.2 раза. Осенью наличие нетипичных форм красных кровяных клеток, а также небольшое увеличение более крупных (молодых) эритроцитов (MPV) может объяснять незначительное снижение средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) при общей увеличенной концентрации гемоглобина в крови (рис. 5). В целом, по совокупности всех измеренных нами эритроцитарных показателей можно говорить о не ярко выраженной гипоксии, и как следствие, можно сделать предположение о компенсаторном повышении уровня кислорода в тканях в ответ на эту гипоксию [37, 46]. Данный цикл биологических событий, вероятно, также является адаптацией организма

к предстоящей зимней спячке. Мы предполагаем, что это может быть связано с увеличенной потребностью тканей в кислороде в осенний период, что требует дополнительных исследований.

В торпоре количество эритроцитов у животных в нашем эксперименте стабилизируется до летних значений, что согласуется с данными, полученными для европейского суслика (*Spermophilus citellus*) при сравнении летнего активного и зимнего торпидного состояний [9]. Аналогичная стабилизация отмечена для гематокрита и концентрации гемоглобина. Среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН) в течение годового цикла остается неизменным, что также свидетельствует о высокой стабильности системы красной крови. Постоянство количества эритроцитов и уровня гемоглобина играет важную роль в годовом цикле гетеротермных животных, т.к. периоды пробуждения у них гораздо короче (часы), чем скорость гемопоэза (недели) [37, 47]. Сами пробуждения облигатных гибернаторов также являются энергозатратным процессом, требующим повышенного количества кислорода [48]. При этом в торпоре процентное содержание атипичных форм эритроцитов остается повышенным, и лишь немного уменьшается по сравнению с осенью. Данный феномен можно объяснить способностью эритроцитов гибернаторов не просто менять форму как у гомойотермов [37], а практически складываться пополам для облегченного продвижения по суженым сосудам вследствие гипотермии [45]. Возрастание количества нормальных клеток по сравнению с осенним периодом дополнительно подтверждается небольшим снижением среднего объема эритроцитов (MCV) и увеличением средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) (рис. 5). Во время спячки для длиннохвостых сусликов также показано замедление старения клеток красной крови и практически полное отсутствие их деструкции (по содержанию билирубина как продукта распада гемоглобина) [47]. Увеличенная продолжительность жизни эритроцитов более, чем в 2 раза (до 160 суток) показана для гибернирующих хомячков по сравнению с хомячками, не впадающими в торпор [15, 28, 47]. Помимо этого, эритроциты круглогодично выполняют защитную функцию за счет бактерицидного механизма оксигитолиза (окисление поверхности мембран), а также наличия иммуноглобулинов в составе мембран [33, 49], что имеет особо важное значение при иммунодепрессии во время торпора.

У зимних активных сусликов практически все эритроцитарные показатели возвращаются к летним параметрам. Исключение составляет ширина распределения эритроцитов по объему (RDW), которая описывает неоднородность клеточной популяции (рис. 5). По-видимому, снижение температуры тела сусликов даже на 1 °С уже осенью может способствовать обратимому изменению формы части

эритроцитов. На примере малого суслика (*Spermophilus pygmaeus*) доказано, что эритроциты гибернаторов играют важную роль в устранении окислительного стресса в процессе пробуждения [50].

Полученные результаты говорят о том, что кислородная емкость крови исследованных животных остается высокой на протяжении годового цикла жизнедеятельности и поддерживается как количественными, так и качественными перестройками в составе периферической крови.

Таким образом, нами показано, что важнейшие адаптивные изменения в крови гетеротермных сусликов *Urocyon undulatus* затрагивают все виды форменных элементов и начинаются осенью, задолго до наступления спячки. Полученные данные важны для оценки и коррекции адаптивных способностей гомойотермных животных и человека.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.М.З., П.О.Т.), сбор данных (Н.П.К., Л.К.И.), обработка данных (П.О.Т., Н.П.К., А.Е.Е.), написание и редактирование манускрипта (П.О.Т., Н.М.З.).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с руководящими принципами, установленными Директивой Европейского Совета 2010/63/EU и Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12 августа 1977 г. № 755 “О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных”. На проведение экспериментов с сусликами получено разрешение комиссии по биоэтике Института биофизики клетки РАН Пушкинского научного центра биологических исследований Российской академии наук, протокол 3/062019 от 13.06.2019.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме Государственного задания “Механизмы природного и искусственного гипобиоза” НИОКТР: 122041100276–0.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franco M, Contreras C, Nespolo R (2013) Profound changes in blood parameters during torpor in a South American marsupial. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 166: 338–342. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.07.010>

2. Drew KL, Harris MB, LaManna JC, Smith MA, Zhu XW, Ma YL (2004) Hypoxia tolerance in mammalian heterotherms. *J Exp Biol* 207: 3155–3162. <https://doi.org/10.1242/jeb.01114>
3. Bieber C, Lebl K, Stalder G, Geiser F, Ruf T (2014) Body mass dependent use of hibernation: why not prolong the active season, if they can? *Functional Ecology* 28: 167–177. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12173>
4. Landes J, Pavard S, Henry P-Y, Terrien J (2020) Flexibility Is Costly: Hidden Physiological Damage from Seasonal Phenotypic Transitions in Heterothermic Species. *Front Physiol* 11: 985. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00985>
5. Mohr S, Bagriantsev S, Gracheva E (2020) Cellular, Molecular, and Physiological Adaptations of Hibernation: The Solution to Environmental Challenges. *Annu Rev Cell Dev Biol* 36: 315–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-012820-095945>
6. Ануфриев АИ (2013) Экологические механизмы температурных адаптаций млекопитающих и зимующих птиц Якутии. Изд-во СО РАН, Новосибирск [Anufriyev AI (2013) Ecological mechanisms of temperature adaptations in mammals and wintering birds of Yakutia. Izd-vo SO RAN. Novosibirsk. (In Russ)].
7. DeVrij EL, Bouma HR, Henning RH, Cooper ST (2023) Hibernation and hemostasis. *Front Physiol* 14: 1207003. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1207003>
8. Bouma HR, Carey HV, Kroese FGM (2010) Hibernation: the immune system at rest? *J Leukoc Biol* 88: 619–624. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310174>
9. Bouma HR, Strijkstra AM, Boerema, Deelman LE, Epema AH, Hut RA, Kroese FG, Henning RH (2010) Blood cell dynamics during hibernation in the European Ground Squirrel. *Vet Immunol Immunopathol* 136: 319–323. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.03.016>
10. Ануфриев АИ, Охлопков ИМ (2015) Зимняя спячка трех видов Sciuridae в Якутии с температурой тела ниже нуля. *Экология* 2: 125–133. [Anufriyev AI, Okhlopov IM (2015) Hibernation of three species of Sciuridae in Yakutia with body temperature below zero. *Ekologiya* 2: 125–133. (In Russ)]
11. Захарова НМ (2014) Некоторые особенности разогрева гибернирующих сусликов *Spermophilus undulatus* при вызванном пробуждении. *Фундамент исслед* 6: 1401–1405. [Zakharova NM (2014) Some features of warming of hibernating ground squirrels *Spermophilus undulatus* during induced awakening. *Fundament* 6: 1401–1405. (In Russ)].
12. (2007) *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. Elsevier.
13. Теплова ПО, Комелина НП, Лизоркина КИ, Захарова НМ (2023) Особенности адаптационных изменений лейкоцитов и тромбоцитов якутских сусликов в предгибернационный осенний период. *Биофизика* 68: 926–931. [Teplova PO, Komelina NP, Lizorkina KI, Zakharova NM (2023) Characteristics of adaptation changes in leukocytes and platelets of Yakutian ground squirrels in the autumn period before hibernation. *Biofizika* 68: 926–931. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0006302923050125>



14. *Kuznetsova EV, Feoktistova NY, Naidenko SV, Surov AV, Tikhonova NB, Kozlovskii JuE* (2016) Seasonal Changes in Blood Cells and Biochemical Parameters in the Mongolian Hamster (*Allocricetulus curtatus*). *Izv Akad Nauk Ser Biol*: 405–411.
15. *Reznik G, Reznik-Schüller H, Emminger A, Mohr U* (1975) Comparative studies of blood from hibernating and non-hibernating European hamsters (*Cricetus cricetus* L). *Lab Anim Sci* 25: 210–215.
16. *Suomalainen P, Rosokivi V* (1973) Studies on the physiology of the hibernating hedgehog. 17. The blood cell count of the hedgehog at different times of the year and in different phases of the hibernating cycle. *Ann Acad Sci Fenn Biol* 198: 18.
17. *Tøien Ø, Drew KL, Chao MI, Rice ME* (2001) Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R57283. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.2.R572>
18. *Frerichs KU, Kennedy C, Sokoloff L, Hallenbeck JM* (1994) Local cerebral blood flow during hibernation, a model of natural tolerance to “cerebral ischemia”. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 193–205. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.26>
19. *Sahdo B, Evans AL, Arnemo JM, Fröbert O, Särndahl E, Blanc S* (2013) Body temperature during hibernation is highly correlated with a decrease in circulating innate immune cells in the brown bear (*Ursus arctos*): a common feature among hibernators? *Int J Med Sci* 10: 508–514. <https://doi.org/10.7150/ijms.4476>
20. *Iadocicco K, Monteiro LH, Chaui-Berlinck JG* (2002) A theoretical model for estimating the margination constant of leukocytes. *BMC Physiol* 2: 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-2-3>
21. *Colditz IG* (1985) Margination and emigration of leukocytes. *Surv Synth Pathol Res* 4: 44–68. <https://doi.org/10.1159/000156964>
22. *Inkovaara P, Suomalainen P* (1973) Studies on the physiology of the hibernating hedgehog. 18. On the leukocyte counts in the hedgehog's intestine and lungs. *Ann Acad Sci Fenn Biol* 200: 121.
23. *Kurtz CC, Carey HV* (2007) Seasonal changes in the intestinal immune system of hibernating ground squirrels. *Dev Comp Immunol* 31: 415–428. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.003>
24. *Yasuma Y, McCarron RM, Spatz M, Hallenbeck JM* (1997) Effects of plasma from hibernating ground squirrels on monocyte-endothelial cell adhesive interactions. *Am J Physiol* 273: R1861–R1869. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.6.R1861>
25. *Аксенова ГЕ, Логвинович ОС, Афанасьев ВН, Лизоркина КИ* (2023) Параметры клеточного цикла и активность орнитиндекарбоксилазы в красном костном мозге гибернирующих сусликов *Urocitellus undulatus*. *Биофизика* 68: 964–972. [*Aksenova GE, Logvinovich OS, Afanas'ev VN, Lizorkina KI* (2023) Parametry kletocznego cikla i aktivnost' ornitindekarboksilazy v krasnom kostnom mozge giberniruyushchih suslikov *Urocitellus undulatus*]. *Cell cycle parameters and ornithine decarboxylase activity in red bone marrow of hibernating ground squirrels Uro-*
- citellus undulatus*]. *Biofizika* 68: 964–972. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0006302923050174>
26. *Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L* (2019) The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol* 40: 584–597. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013>
27. *Novoselova EG, Kulikov AV, Glushkova OV, Cherenkov DA, Smirnova GN, Arkhipova LV* (2004) Effect of the Transplanted Thymus of Hibernating Ground Squirrels on the Age-Related Thymus Involution in Rats. *Dokl Biol Sci* 1–6: 272–273.
28. *Brock MA* (1960) Production and life span of erythrocytes during hibernation in the golden hamster. *Am J Physiol* 198: 1181–1186. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1960.198.6.1181>
29. *Kumar S, Dikshit M* (2019) Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease. *Front Immunol* 10: 2099 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02099>
30. *DeVrij EL, Bouma HR, Goris M, Weerman U, de Groot AP, Kuipers J, Giepmans BNG, Henning RH* (2021) Reversible thrombocytopenia during hibernation originates from storage and release of platelets in liver sinusoids. *J Comp Physiol B* 191: 603–615. <https://doi.org/10.1007/s00360-021-01351-3>
31. *Koupenova M, Livada AC, Morrell CN* (2022) Platelet and Megakaryocyte Roles in Innate and Adaptive Immunity. *Circ Res* 130: 288–308. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319821>
32. *Kovalchuk LA, Mishchenko VA, Chernaya LV, Snit'ko VP, Bolshakov VN* (2022) Assessment of Seasonal Variability of the Spectrum of Free Amino Acids in the Blood Plasma of the Boreal Bat Species (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) of the Ural Fauna. *Dokl Biochem Biophys* 507: 268–272. <https://doi.org/10.1134/S1607672922060060>
33. *Reddick RL, Poole BL, Penick GD* (1973) Thrombocytopenia of hibernation. Mechanism of induction and recovery. *Lab Invest* 28: 270–278.
34. *Corash L, Chen HY, Levin J, Baker G, Lu H, Mok Y* (1987) Regulation of thrombopoiesis: effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood* 70: 177–185.
35. *Winkelmann M, Pfitzer P, Schneider W* (1987) Significance of polyploidy in megakaryocytes and other cells in health and tumor disease. *Klin Wochenschr* 65: 1115–1131. <https://doi.org/10.1007/BF01734832>
36. *Yang S, Wang L, Wu Y, Wu A, Huang F, Tang X, Kantawong F, Anuchapreeda S, Qin D, Mei Q, Chen J, Huang X, Zhang C, Wu J* (2022) Apoptosis in megakaryocytes: Safeguard and threat for thrombopoiesis. *Front Immunol* 13: 1025945. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1025945>
37. *Corrons JLV, Casafont LB, Frasnado EF* (2021) Concise review: how do red blood cells born, live, and die? *Ann Hematol* 100: 2425–2433. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04575-z>
38. *Cooper S, Sell S, Nelson L, Hawes J, Benrud JA, Kohlnhofer BM, Burmeister BR, Flood VH* (2016) Von Willebrand factor is reversibly decreased during torpor in 13-lined ground squirrels. *J Comp Physiol B* 186: 131–139. <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0941-5>

39. Fedosov DA, Gompper G (2014) White blood cell margination in microcirculation. *Soft Matter* 10: 2961–2970. <https://doi.org/10.1039/c3sm52860j>
40. Fitzgibbon S, Spann AP, Qi QM, Shaqfeh ESG (2015) In vitro measurement of particle margination in the microchannel flow: effect of varying hematocrit. *Biophys J* 108: 2601–2608. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.013>
41. Pretini V, Koenen MH, Kaestner L Fens MHAM, Schiffelers RM, Bartels M, Van Wijk R (2019) Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Front Physiol* 10: 945. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>
42. Tokarev AA, Butylin AA, Ataullakhanov FI (2011) Platelet adhesion from shear blood flow is controlled by near-wall rebounding collisions with erythrocytes. *Biophys J* 100: 799–808. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.3740>
43. Израилова ГР, Халилов РА, Адиева АА (2014) Современные подходы к исследованию гипотермии. *Фундамент исслед* 11:1046–1058. [Izrailova GR, Khalilov RA, Adiyeva AA (2014) Current approaches to hypothermia research. *Fundament Issled* 11: 1046–1058. (In Russ)].
44. Передрий НС (1973) Сезонные изменения гематологических показателей у сусликов популяций юга Украины. *Вестн зоол* 2: 21–25. [Peredriy NS (1973) Seasonal variation of haematological indices in ground squirrel populations of the south of Ukraine. *Vestnik Zool* 2: 21–25. (In Russ)].
45. Spurrier WA, Dawe AR (1973) Several blood and circulatory changes in the hibernation of the 13-lined ground squirrel, *Citellus tridecemlineatus*. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 44: 267–282. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(73\)90479-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(73)90479-9)
46. Бурых ЭА, Сороко СИ (2014) Компенсаторная роль системы кровообращения при острой гипоксической гипоксии у человека. *Экол чел* 7:30–36. [Burykh EA, Soroko SI (2014) Compensatory role of the circulatory system in acute hypoxic hypoxia in humans. *Hum Ecol* 7: 30–36. (In Russ)].
47. Ануфриев АИ (2008) Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии, Новосибирск. [Anufriyev AI (2008) Mechanisms of winter hibernation in small mammals of Yakutia. Novosibirsk. (In Russ)].
48. Ma YL, Zhu X, Rivera PM, Tøien Ø, Barnes BM, LaManna JC, Smith MA, Drew KL (2005) Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1297–R1306. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00260.2005>
49. Reid ME, Mohandas N (2004) Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin Hematol* 41: 93–117. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2004.01.001>
50. Klichkhanov NK, Nikitina ER, Shihamirova ZM, Astaeva MD, Chalabov SI, Krivchenko AI (2021) Erythrocytes of Little Ground Squirrels Undergo Reversible Oxidative Stress During Arousal from Hibernation. *Front Physiol* 12: 730657. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.730657>

## ADAPTIVE VARIABILITY OF BLOOD-FORMING ELEMENTS IN THE ANNUAL LIFE CYCLE OF GROUND SQUIRRELS *UROCITELLUS UNDULATUS*

P. O. Teplova<sup>a, #</sup>, N. P. Komelina<sup>a</sup>, A. Y. Yegorov<sup>b</sup>, K. I. Lizorkina<sup>a</sup>, and N. M. Zakharova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

<sup>b</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

<sup>#</sup> e-mail: p.o.teplova@gmail.com

In this study, changes in all blood formed elements of long-tailed ground squirrel *Urocitellus undulatus* ( $n=100$ ) during different periods of their life activity were investigated. The hematological analysis was performed on an automatic veterinary analyser: a indices of leukocytes, platelets and erythrocytes were measured in summer (normothermia, june-july), autumn (preparatory period, october), winter torpid (hypothermia, december-february) and winter active periods (IBA, euthermia, short awakenings between hypothermia stages, december-february). It was shown that the total counts of platelets and leukocytes of ground squirrel increased by ~40% in autumn compared to summer. During the torpor period, thrombocytosis and leukocytosis were replaced by extreme thrombocytopenia (~90%) and leukopenia (~80%). On awakening, the indices reached “summer” values, except for a slightly increased mean platelets volume. In autumn, an insignificant erythrocytosis (~10%) was observed, which, together with changes in other parameters, could indicate an unexpressed autumn hypoxia. In torpor and in winter euthermia, the erythrocyte indices were no difference with summer control values; however, the presence of atypical forms of erythrocytes was detected both in the autumn period of preparation for hibernation and during hibernation. The results are discussed in the context of the adaptation of the blood-forming elements of the ground squirrel to the extreme conditions of hibernation and are valuable for the study of the adaptive abilities of homoeothermic animals and humans.

**Keywords:** ground squirrel, hypothermia, hibernation, hematology, physiological adaptation, hypoxia, hemostasis.