

Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Звенигородская биологическая станция им. С.Н. Скадовского
Зоологический институт РАН
Биологическая станция «Рыбачий»

**Энергетика и годовые циклы птиц
(памяти В.Р. Дольника)**

**Energetics and annual cycles of birds
(in memory of V.R. Dolnik)**

Материалы международной конференции

**Звенигородская биологическая станция МГУ,
24–29 сентября 2015 г.**

**Товарищество научных изданий КМК
Москва ❖ 2015**

КОНЦЕНТРАЦИЯ КОРТИКОСТЕРОНА В КРОВИ И ЛЕЙКОЦИТАРНАЯ ФОРМУЛА КАК ПОКАЗАТЕЛИ ДОЛГОВРЕМЕННОГО СТРЕССА У ВОРОБЬИНЫХ ПТИЦ ВО ВРЕМЯ СЕЗОННЫХ МИГРАЦИЙ

А.Л. Цвей¹, Ю.А. Лощагина^{1,2}

¹ Биологическая станция “Рыбачий” Зоологического института РАН,

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

CORTICOSTERONE AND LEUCOCYTE PROFILE AS MEASURES OF LONG-TERM STRESS IN PASSERINES DURING MIGRATION

A.L. Tsvey¹, J.A. Loshchagina²

¹ Biological Station Rybachy, Zoological Institute RAS,

² Moscow State University

e-mail: arseny@ac6198.spb.edu

Кортикостерон, основной глюкокортикоид птиц (Harvey et al., 1984), влияет как на поведение, так и на различные физиологические функции (Wingfield, 2003). Концентрацию этого гормона в крови часто используют как показатель физиологического стресса (Romero, 2004). В природе птицы постоянно сталкиваются с действием непредсказуемых факторов среды (напр., распределением корма, силой конкурентных отношений и др.). Поведенческие и физиологические ответы на такие воздействия обеспечиваются реактивностью системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники, конечным гормоном которого является кортикостерон (Ramenofsky et al., 2012). При этом концентрация кортикостерона в крови является крайне лабильным параметром. В ответ на непосредственное стрессовое событие (например, встречу с хищником) концентрация кортикостерона начинает резко возрастать уже через 2–3 мин (Schwabl et al., 1991), достигает пика через 20–30 мин, после чего обычно уменьшается (Wingfield et al., 1997). Такой резкий выброс кортикостерона приводит к увеличению его концентрации в крови по сравнению с базовым уровнем, который отражал физиологическое состояние организма в данной экологической обстановке. Действие многих как внешних, так и внутренних факторов, длящихся длительное время (интенсивные нагрузки, недостаток корма, социальные взаимоотношения и др.) могут приводить к хроническому увеличению базовой концентрации кортикостерона в крови (Wingfield, Romero, 2001; Davis et al., 2008), поэтому этот показатель часто используют для характеристики величины длительного стресса (Romero, 2004). Так обнаружено, что у глухарей и тетеревов в

Альпах концентрация метаболитов кортикостерона в помете достоверно связана с величиной рекреационной нагрузки (Arlettaz et al., 2007; Thiel et al., 2011).

Помимо концентрации кортикостерона для характеристики общего физиологического состояния и величины долговременного стресса часто используют лейкоцитарную формулу (Davis et al., 2008). Лейкоцитарная формула может зависеть от многих факторов, таких как наличие воспалительного процесса, интенсивность физической нагрузки, количество энергетических резервов, доступность корма и т.д. (Davis et al., 2008). Общее количество лейкоцитов, а также соотношение разных типов лейкоцитарных клеток, связано с концентрацией циркулирующих глюкокортикоидов. Увеличение концентрации кортикостерона приводит к уменьшению количества лимфоцитов и увеличению количества гетерофилов в крови. Наиболее информативным показателем, учитывающим изменения количества обоих типов клеток является отношение гетерофилов к лимфоцитам (Н:L ratio; Davis et al., 2008). Для воробьиных есть свидетельства, что Н:L ratio увеличивается в миграцию (Owen, Moore, 2006), при транспортировке (Groombridge et al., 2004), инфекции (Lobato et al., 2005) и радиоактивном заражении (Camplani et al., 1999). Однако до сих пор нет однозначных данных, насколько быстро изменяется лейкоцитарная формула в ответ на внешнее воздействие и как долго эти изменения сохраняются. Предположительно изменения лейкоцитарной формулы длятся дни и недели (Davis et al., 2008), что делает этот показатель адекватным индикатором долговременно стресса, который, возможно, может отражать экологические условия, предшествующие поимке птицы. На домашних курицах показано, что воздействие различных стрессоров приводит к увеличению концентрации кортикостерона и Н:L ratio. При этом через 7 дней концентрация кортикостерона снижалась, а отношение гетерофилов к лимфоцитам оставалось повышенным (McFarlane et al., 1989). На диких птицах, тем более на воробьиных птицах во время миграции, одновременно измерения величины адренкортикальной реакции и изменения лейкоцитарной формулы, в ответ на стрессовое воздействие не проводилось.

Целью данного исследования было изучить динамику изменения концентрации кортикостерона в крови и лейкоцитарной формулы в ответ на действие долговременного стрессора у зарянки (*Erithacus rubecula*) во время сезонных миграций. Зарянка — многочисленная насекомоядная птица из отряда Воробьинообразных, совершающая миграции в пределах Европы. Птиц отлавливали на Биологической станции «Рыбачий» (Куршская коса Балтийского моря), помещали в индивидуальные клетки в лаборатории и регулярно брали пробы крови для определения концен-

трации кортикостерона и лейкоцитарной формулы. Отлов и помещение птиц в клетку можно рассматривать как стрессовое воздействие умеренной силы.

Эксперимент проводили весной и осенью 2014 г. Зарянок (по 8 особей в каждый сезон) отлавливали на полевом стационаре «Фрингилла» в большие ловушки «Рыбачинского» типа. Отлов проводили утром до восхода солнца, когда зарянки заканчивают ночной миграционный полет и приземляются. Биотоп вокруг ловушек мало используется этим видом в течение дневных кормовых перемещений (Цвей, 2008), поэтому отловленные птицы с большой вероятностью были транзитными. В течение трех минут после отлова у птиц были взяты пробы крови для определения базовой концентрации кортикостерона и приготовлены парные мазки крови для подсчета лейкоцитарной формулы. В течение часа после отлова птицы были окольцованы, измерены и помещены в индивидуальные клетки в лаборатории. Пища (мучные черви) и вода были доступны птицам *ad libitum*. Птицы содержались на естественном фотопериоде и при естественных колебаниях температуры. Эксперимент длился 12 дней. Утром каждого 4 дня у птиц брали пробу крови для определения базовой концентрации кортикостерона, делали парные мазки крови и измеряли массу тела.

Индекс энергетического состояния (масса тела, учитывающая структурный размер птицы) при отлове не отличался весной и осенью (*t*-test, $t = 0,11$, $p = 0,91$). Динамика изменения массы также была сходна в оба сезона (Repeated-measures ANOVA, взаимодействие факторов дня эксперимента и сезона, $F_{(1,14)} = 1,5$, $p = 0,24$). Индекс энергетического состояния достоверно увеличивался на четвертый день эксперимента (Planned comparisons, $F_{(1,14)} = 9,56$, $p = 0,008$), после чего изменения были статистически не достоверны в силу высокой вариации между особями.

Весной базовая концентрация кортикостерона при отлове ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $38,3 \pm 15,6$ нг/мл) была вдвое выше, по сравнению с осенью ($15,6 \pm 6,3$ нг/мл, *t*-test, $t = 3,8$, $p = 0,002$). В оба сезона базовая концентрация кортикостерона в крови значительно понижалась к четвертому дню (Repeated-measures ANOVA, Bonferroni Post Hoc test, $p = 0,02$) и оставалась пониженной до конца эксперимента (различия между четвертым, восьмым и двенадцатым днями эксперимента, все $p > 0,05$). После четвертого дня эксперимента наблюдались незначительные сезонные отличия в динамике исследуемого показателя (взаимодействие факторов дня эксперимента и сезона, $F_{(3,42)} = 5,2$, $p = 0,004$). Сезонные отличия в базовой концентрации кортикостерона сохранялись на двенадцатый день эксперимента ($\text{mean} \pm \text{SD}$, весна: $18,0 \pm 7,4$ нг/мл, осень: $9,3 \pm 2,6$ нг/мл; Planned comparisons, $F_{(1,14)} = 9,7$, $p = 0,008$).

Общее количество лейкоцитов при отлове весной ($M_e = 36$ лейкоцита на 10000 эритроцитов) было выше, чем осенью ($M_e = 29$), однако различия статистически не достоверны (Mann-Whitney U-test, $U = 17,0$, $z = -1,58$, $p = 0,12$). На четвертый день эксперимента количество лейкоцитов снижалось (весна, $M_e = 22$; осень, $M_e = 28$) и в дальнейшем практически не изменялось. Значительная часть уменьшения общего числа клеток объясняется снижением количества лимфоцитов, но также, вопреки ожиданию, уменьшением количества гетерофилов у части птиц. На двенадцатый день эксперимента медиана равнялась 18 лейкоцитам на 10000 эритроцитов в оба сезона. Отношение гетерофилов к лимфоцитам при отлове было выше весной ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $0,29 \pm 0,24$), чем осенью ($0,18 \pm 0,14$), однако различия не достоверны (t-test: $t = 1,1$, $p = 0,29$). Отношение гетерофилов к лимфоцитам достоверно не изменялось в течение эксперимента (Repeated-measures ANOVA, фактор дня эксперимента, $F_{(3,42)} = 0,76$, $p = 0,53$). Анализ динамики этого показателя у отдельных птиц показывает, что наибольшая вариация наблюдается в течение первых четырех дней эксперимента. У шести птиц из 16 (38%) наблюдалось значительное увеличение отношения гетерофилов к лимфоцитам, что было связано с увеличением количества гетерофилов. У остальных птиц отношение гетерофилов к лимфоцитам либо не изменялось, либо незначительно снижалось. На восьмой и двенадцатый дни эксперимента отношение гетерофилов к лимфоцитам возвращалось к значениям при отлове (двенадцатый день, $\text{mean} \pm \text{SD}$, весна: $0,35 \pm 0,24$, осень: $0,19 \pm 0,25$, t-test: $t = 1,3$, $p = 0,23$). Осенью наблюдался недостоверный положительный тренд между базовой концентрацией кортикостерона в крови при отлове и отношением гетерофилов к лимфоцитам ($r_{sp} = 0,45$, $p = 0,11$), свидетельствующий о связи между двумя показателями. Недостоверность связана с небольшим объемом выборки и значительной начальной вариацией исследуемых признаков. Для весны подобного тренда обнаружено не было.

В результате исследования впервые для воробьиных птиц была описана динамика базовой концентрации кортикостерона и лейкоцитарной формулы в ответ на действие долговременного стрессора умеренной силы в сезоны весенней и осенней миграции. Отлов и помещение птиц в клетки не блокировали миграционного поведения: большинство особей проявляли ночную локомоторную активность и увеличивали массу тела. Весной базовая концентрация кортикостерона в крови была значительно выше по сравнению с осенью, и эта разница сохранялась в течение всего эксперимента. Это, по-видимому, отражает общее увеличение базовой концентрации кортикостерона весной, и не связано со значительными сезонными отличиями в силе действия стрессовых факторов, предшествующих поимке (Romero, 2002). Вопреки предположению концентрация кортикостерона в крови достоверно снижалась в течение эксперимента.

Данный результат может объясняться отрицательной регуляцией концентрации кортикостерона, когда высокая концентрация этого гормона, выделившаяся в ответ на отлов, блокирует дальнейший выброс кортикостерона в кровь (Romero, 2004; Суг, Romero, 2007). Также, возможно, зарянки быстро адаптируются к экспериментальным условиям, которые с определенного момента не воспринимаются как стрессовые. Результаты эксперимента показывают, что долговременный стресс не всегда приводит к увеличению базовой концентрации кортикостерона в крови и этот показатель не может служить адекватным показателем величины долговременного стресса у воробьиных птиц во время сезонных миграций. Мы обнаружили, что единственным показателем, который изменялся в течение всего эксперимента, было общее количество лейкоцитов. Поэтому именно динамику общего числа лейкоцитов в крови предположительно можно использовать для оценки величины долговременного стресса. При этом следует учитывать возможные отличия между сезонами и разными годами. Несмотря на сезонные отличия концентрации кортикостерона в крови при отлове, не было отличий в отношении гетерофилов к лимфоцитам, что может свидетельствовать о частично независимой регуляции этих признаков весной и осенью (см. также: Buehler et al., 2012). Положительный тренд между базовой концентрацией кортикостерона в крови при отлове и отношением гетерофилов к лимфоцитам осенью при отсутствии такой связи для весны усиливает данное предположение. Относительно низкие значения отношения гетерофилов к лимфоцитам в оба сезона могут свидетельствовать о низком уровне долговременного стресса у экспериментальных птиц при отлове (Davis et al., 2008). Вопреки предположению мы не обнаружили достоверного изменения отношения гетерофилов к лимфоцитам в течение эксперимента. Это было связано с тем, что в течение эксперимента уменьшалось не только количество лейкоцитов, но у большинства птиц и количество гетерофилов. Возможно, увеличение количества гетерофилов происходит при действии более интенсивных стрессоров, либо в течение первых дней эксперимента и снижается к четвертому дню. Таким образом, результаты эксперимента не выявили длительных изменений отношения гетерофилов к лимфоцитам на действие долговременного стрессора умеренной силы. Также остается выяснить, были ли изменения исследуемых показателей связаны с динамикой их энергетического состояния.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№№ 13-04-00490-а и 14-34-50045-мол_нр) и участия ЗИН РАН (гостема № 01201351182).

Список литературы

Цвей А.Л., 2008. Стратегии миграции зарянки *Erethacus rubecula* в восточной Прибалтике. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: ЗИН РАН. 24 с.

- Arlettaz R., Patthey P., Baltic M., Leu T., Schaub M., Palme R., Jenni-Eiermann S., 2007. Spreading free-riding snow sports represent a novel serious threat for wildlife // Proc. R. Soc. B. Vol. 274. P. 1219–1224.
- Buehler D.M., Vézina F., Goymann W., Schwabl I., Versteegh M., Tieleman B.I., Piersma T., 2012. Independence among physiological traits suggests flexibility in the face of ecological demands on phenotypes: Lack of relationships among individual physiological traits // J. Evol. Biol. Vol. 25. P. 1600–1613.
- Camplani A., Saino N., Møller A.P., 1999. Carotenoids, sexual signals and immune function in barn swallows from Chernobyl // Proc. R. Soc. B. Vol. 266. P. 1111–1116.
- Cyr N.E., Romero M.L., 2007. Chronic stress in free-living European starlings reduces corticosterone concentrations and reproductive success // Gen. Compar. Endocrinol. Vol. 151. P. 82–89.
- Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists // Funct. Ecol. Vol. 22. P. 760–772.
- Groombridge J.J., Massey J.G., Brunch J.C., Malcolm T.R., Brosius C.N., Okada M.M., Sparklin B., 2004. Evaluating stress in a Hawaiian honeycreeper, *Paroreomyza montana*, following translocation // J. Field Ornithol. Vol. 75. P. 183–187.
- Harvey S., Phillips J.G., Rees A., Hall T.R., 1984. Stress and adrenal function // J. Exp. Biol. Vol. 232. P. 633–645.
- Lobato E., Moreno J., Merino S., Sanz J.J., Arriero E., 2005. Haematological variables are good predictors of recruitment in nestling pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) // Ecoscience. Vol. 12. P. 27–34.
- McFarlane J.M., Curtis S.E., Simon J., Izquierdo O.A., 1989. Multiple concurrent stressors in chicks 2. Effects on hematologic, body composition, and pathologic traits // Poultry Science. Vol. 68. P. 510–521.
- Owen J.C., Moore F.R., 2006. Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes // Condor. Vol. 108. P. 389–398.
- Ramenofsky M., Cornelius J.M., Helm B., 2012. Physiological and behavioral responses of migrants to environmental cues // J. Ornithol. Vol. 153. P. 181–191.
- Romero L.M., 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates // Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 128. P. 1–24. — 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research // Trends Ecol. Evol. Vol. 19. P. 249–255.
- Schwabl H., Bairlein F., Gwinner E., 1991. Basal and stress-induced corticosterone levels of garden warblers, *Sylvia borin*, during migration // J. Comp. Physiol. B. Vol. 161. P. 576–580.
- Thiel D., Jenni-Eiermann S., Palme R., Jenni L., 2011. Winter tourism increases stress hormone levels in the Capercaillie *Tetrao urogallus* // Ibis. Vol. 153. P. 122–133.
- Wingfield J.C., 2003. Control of behavioural strategies for capricious environments // Anim. Behav. Vol. 66. P. 807–816.
- Wingfield J.C., Hunt K., Breuner C.W., Dunlap K., Fowler G.S., Freed L., Lepson J., 1997. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology // Clemmons J.R., Buchholz R. (Eds.). Behavioral Approaches to Conservation in the Wild. Cambridge: Cambridge Univ. Press. P. 95–131.
- Wingfield J.C., Romero L.M., 2001. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates // McEwen B.S., Goodman H.M. (Eds.). Handbook of Physiology. Section 7: The Endocrine System, Coping with the Environment: Neural and Endocrine Mechanisms. New York: Oxford Univ. Press. Vol. 4. P. 211–234.