

УДК 599.745.3:591.11.1

## К оценке функционального состояния лейкоцитов крови дельфинов афалин

*Т.В. Минзюк, Н.Н. Кавцевич*

Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН (ФГБУН «ММБИ КНЦ РАН»),  
г. Мурманск  
E-mail: minzyuk@mail.ru

В статье представлены результаты морфофункционального исследования клеток крови дельфинов афалин. Определяли соотношение лейкоцитов различных типов, уровень бактерицидного катионного белка (КБ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) в гранулоцитах афалин разного возраста. Относительное число содержащих КБ лейкоцитов у дельфинов составляет 35%, фосфатазоположительных клеток — 78%. Во всех возрастных группах животных отмечены высокая плотность заполнения цитоплазмы и интенсивность окрашивания гранул, содержащих КБ и ЩФ. Количество катионных белков у исследованных морских млекопитающих значительно ниже, чем у наземных животных, но в 2–3 раза выше, чем у исследованных ранее молодых тюленей. В то же время у молодых афалин (2–5 лет) варибельность этого показателя выше, чем у взрослых животных (7–16 лет). Активность щелочной фосфатазы лейкоцитов афалин репродуктивного возраста и неполовозрелых животных одинакова, но она существенно выше у беременных самок по сравнению с небеременными. Заметных возрастных особенностей по содержанию бактерицидных катионных белков и активности щелочной фосфатазы в лейкоцитах дельфинов не выявлено. Однако среднее значение последнего показателя у дельфинов значительно выше, чем у исследованных в данном отношении наземных млекопитающих. Полученные результаты могут быть использованы в сравнительных эколого-физиологических исследованиях морских и наземных животных.

**Ключевые слова:** афалина, кровь, лейкоциты, катионный белок, щелочная фосфатаза.

### ВВЕДЕНИЕ

Лейкоциты являются центральным звеном врождённого клеточного иммунитета. Они играют роль медиаторов воспаления, обладают цитотоксическим, противоопухолевым действием, но их основная функция — антимикробная защита [Пигаревский, 1978; Зайчик, Чурилов, 2002]. Функциональные возможности гранулоцитов связаны с наличием большого количества ферментов и основных белков (щелочная фосфатаза, неферментные катионные белки, миелопероксидаза, неспецифическая

эстераза, НАДФН-оксидаза), содержащихся в цитоплазме клеток.

Катионные белки являются важной составной частью антимикробной защиты организма, а их дефицит в гранулоцитах приводит к резкому снижению неспецифической резистентности [Пигаревский, 1978]. Уровень естественной резистентности организма имеет большое значение в процессах адаптации животных к условиям окружающей среды, особенно в раннем постнатальном онтогенезе животных, когда формируется система специфического имму-

нитета. КБ проявляют бактерицидную активность в анаэробных условиях, что существенно для животных, подвергающихся воздействию гипоксии при нырянии.

Щелочная фосфатаза принимает активное участие в обменных процессах нуклеиновых кислот, белков и липидов [Шубич, Нагоев, 1980]. Активность этого фермента в плазме крови у гренландского тюленя и тюленя-хохлача по сравнению с наземными млекопитающими выше во все возрастные периоды [Voily et al., 2006]. Показатели ферментативной активности щелочной фосфатазы отражают состояние окислительной системы клеток крови, уровень катаболических процессов в лейкоцитах. В то же время сведения о внутриклеточном содержании щелочной фосфатазы лейкоцитов у морских млекопитающих в литературе отсутствуют.

В настоящей работе мы определяли содержание бактерицидных катионных белков и щелочной фосфатазы в лейкоцитах дельфинов афалин разного возраста.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования — черноморские афалины (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) в возрасте от 1 года до 20 лет. Материал от дельфинов получен в океанариуме г. Севастополь. Кровь брали из вен хвостового плавника иглой для подкожных инъекций длиной 30 и диаметром 1,2 мм в пробирку с гепарином, мазки изготавливали общепринятым способом. Катионный белок окрашивали прочным зелёным по методике М. Олферта и И. Гешвинда [Бутенко и др., 1974], щелочную фосфатазу выявляли по Л.С. Кэплову [Karpow, 1955].

Окрашенные препараты изучали, используя масляную иммерсию (объектив  $\times 100$ , окуляр  $\times 10$ ), с помощью микроскопа Axio Imager M1, оснащённого цифровой видеокамерой AxioCam и программным обеспечением AxioVision фирмы Zeiss. При определении содержания КБ и ЦФ в гранулоцитах крови вычисляли средний цитохимический коэффициент (СЦК).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Катионный белок лейкоцитов дельфинов локализован в цитоплазматических гранулах (рис. 1). Средняя площадь одной гранулы у афалин составляет  $0,29 \text{ мкм}^2$  (у человека —  $0,30 \text{ мкм}^2$ ). Во всех возрастных группах афалин преобладают гранулоциты с яркоокрашенными и интенсивно заполняющими цитоплазму гранулами, в которых содержится катионный белок.

Относительное число содержащих катионный белок лейкоцитов (КБ<sup>+</sup>) у афалин в среднем составляет 35%. У неполовозрелых дельфинов содержание КБ в 2–3 раза выше, чем у тюленей в данный возрастной период [Минзюк, 2011]. У половозрелых дельфинов (7–16 лет) средний уровень КБ существенно не отличается от такового более молодых животных ( $p < 0,01$ ), наблюдается лишь некоторое снижение вариабельности исследуемого показателя (рис. 2), коэффициент вариации снижается с 33% у неполовозрелых до 24% у половозрелых афалин.

У всех исследованных нами представительней морских млекопитающих содержание КБ значительно ниже, чем у человека и назем-

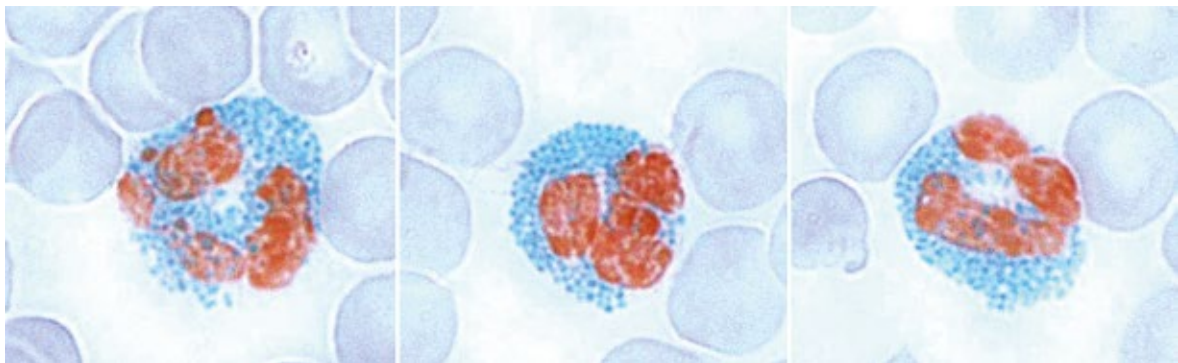


Рис. 1. Катионный белок в лейкоцитах афалин

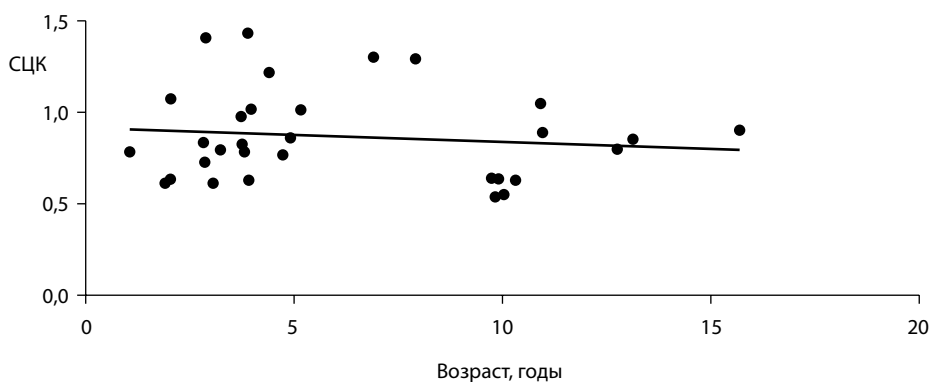


Рис. 2. Содержания катионного белка в лейкоцитах афалин разного возраста

ных животных других видов. Так, содержание КБ (в условных единицах, СЦК) составило:  $0,29 \pm 0,01$  — серый тюлень;  $0,45 \pm 0,06$  — гренландский тюлень [Минзюк, 2011];  $0,63 \pm 0,18$  — морской заяц [Минзюк и др., 2015];  $1,50 \pm 0,02$  — человек [Стойко, Ермаков, 2004];  $1,60 \pm 0,03$  — мышь [Будыка и др., 2009];  $1,36 \pm 0,01$  — курица [Клетикова, 2010] и  $0,77 \pm 0,07$  — афалина.

Наибольшее колебание количества бактерицидных белков отмечено у неполовозрелых афалин, на последующих возрастных этапах оно остается относительно постоянным.

В фосфатазоположительных лейкоцитах периферической крови афалин наблюдается диффузно-гранулярное распределение фермента (рис. 3). Гранулы мелкие, но интенсивность их окрашивания высока у афалин всех исследованных возрастных групп. У афалин старше семи лет в 42% случаев встречаются лейкоциты, содержащие на клеточной мембране крупные фосфатазоположительные гранулы

неправильной формы. Щелочная фосфатаза является мембранным гликопротеидом, располагается вблизи мембраны клеток или встроена в неё. Установлено, что 70% ЩФ содержится в секреторных пузырьках, которые перемещаются к плазматической мембране после стимуляции нейтрофилов [Morgan et al., 1997] и у больных острыми бактериальными инфекциями [Karlsson et al., 1995].

У исследуемых дельфинов в возрасте от 2 до 20 лет среднее количество фосфатазоположительных клеток составляет 78%, значение СЦК —  $2,23 \pm 0,03$  (рис. 4). Это заметно выше показателей взрослых клинически здоровых наземных животных: корова —  $2,09 \pm 0,23$  [Лукашик, интернет-ресурс]; мышь —  $1,59 \pm 0,16$  [Тимченко и др., 2010]; крыса —  $1,89 \pm 0,04$  [Овсянников и др., 2012] и человек —  $0,29 \pm 0,03$  [Стойко, Ермаков, 2004]. Повышение активности щелочной фосфатазы в лейкоцитах наблюдается у детей в период быстрого роста, у женщин в последнем триме-

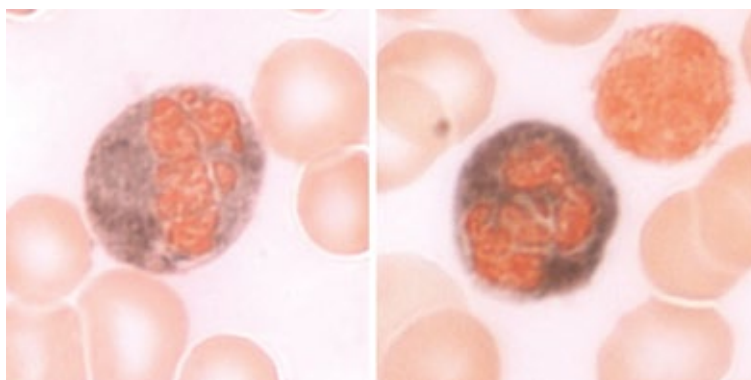


Рис. 3. Щелочная фосфатаза в лейкоцитах афалин

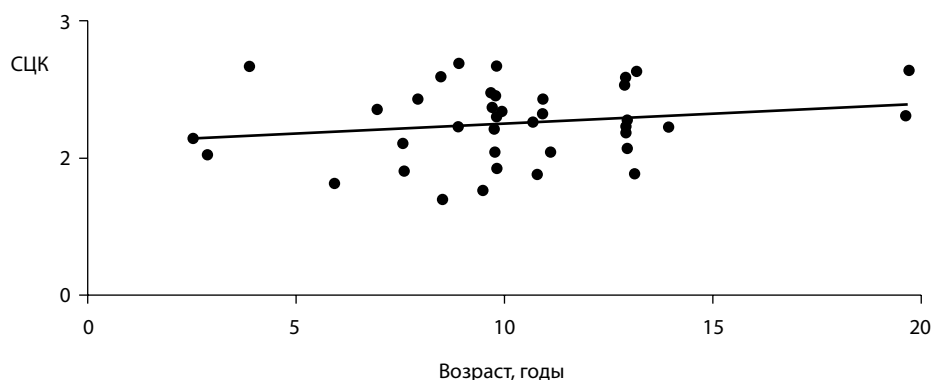


Рис. 4. Содержание щелочной фосфатазы в лейкоцитах афалин

стре беременности. Согласно полученным нами результатам активность щелочной фосфатазы лейкоцитов афалин репродуктивного возраста и неполовозрелых животных одинакова.

Исследование 4 беременных самок афалин показало, что среднее количество лейкоцитов, содержащих щелочную фосфатазу, высоко на всем протяжении беременности — 84,3%. У одной особи в последнем триместре беременности число ЦФ-положительных клеток составляло 100%. У женщин во время беременности активность ЦФ повышена, а при угрозе прерывания беременности — на 18% выше, чем при физиологическом её течении. Беременность рассматривается как вариант воспалительного процесса, протекающего на фоне повышенной готовности циркулирующих нейтрофилов к выполнению всех присущих им защитных функций [Колесник и др., 2009].

Активность щелочной фосфатазы нейтрофилов крови высокопродуктивных коров в течение 2–3 месяцев в период лактации очень низкая: СЦК = 0,25–0,27, а у завершивших лактацию —  $2,09 \pm 0,23$  [Лукашик, интернет-ресурс]. У одной из самок афалин после родов, завершившихся рождением доношенного детёныша, содержание щелочной фосфатазы ниже (СЦК = 1,97), чем у небеременных и беременных самок. Таким образом, у беременных афалин наблюдается повышенный уровень щелочной фосфатазы в гранулоцитах в сравнении с небеременными самками репродуктивного возраста. В то же время СЦК щелочной фосфатазы в данной группе животных лишь на 9% выше (СЦК =  $2,51 \pm 0,03$ ), чем в среднем у половозрелых самок.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённый анализ функционального состояния лейкоцитов крови на основе цитохимических параметров клеток показал, что содержание КБ и ЦФ у афалин в разные возрастные периоды различается незначительно. Пребывание дельфинов в однородной водной среде, по-видимому, обеспечивает в среднем одинаковый уровень содержания белков и ферментов в циркулирующих гранулоцитах афалин независимо от их возраста. Высокая плотность заполнения цитоплазмы и интенсивность окрашивания гранул, содержащих КБ и ЦФ, свидетельствует об их важной роли в выполнении гранулоцитами клеточных защитных функций дельфинов. Полученные нами результаты могут быть использованы в медико-биологических и сравнительных эколого-физиологических исследованиях морских и наземных млекопитающих.

### ЛИТЕРАТУРА

- Будыка Д.А., Абзаева Н.А., Руднев С.М., Иванова Г.Ф., Фисун А.А., Гостищева С.Е., Бондаренко А.И. 2009. Бактерицидная активность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови белых мышей, привитых против чумы, и в различных схемах инфицирования чумной инфекцией // Проблемы особо опасных инфекций. Т. 100. С. 50–56.
- Бутенко Э.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П. 1974. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. Киев: Наукова думка. 248 с.
- Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. 2002. Механизмы развития болезней и синдромов. СПб.: ЭЛБИ-СПб. 507 с.

- Клетикова Л.В. 2010. Содержание катионных белков в гранулоцитах птиц // *Естествознание и гуманизм*. Т. 6. № 1. С. 51–52.
- Колесник Н.В., Качанова Ж.С., Кузьменко В.А. 2009. Функциональное состояние циркулирующих нейтрофилов крови женщин с физиологическим течением беременности и при угрозе её невынашивания (Запорожский промышленный регион) // *Вісник Запорізького національного університету*. № 2. С. 104–110.
- Лукашик Г.В. *Способ определения кетоза у высокопродуктивных коров* // *Инновации в животноводстве*. ЮФ НУБиП Украины «КАТУ». Доступно через: <https://studydoc.ru/doc/2095301/sposob-opredeleniya-ketoza-u-vysokoproduktivnyh-korov>.
- Минзюк Т.В. 2011. Возрастные изменения бактерицидной активности зернистых лейкоцитов серых тюленей // *Вестник ЮНЦ*. Т. 7. № 4. С. 70–73.
- Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н., Светочев В.Н. 2015. Новые данные о клеточном составе крови морского зайца // *Доклады АН*. Т. 462. № 6. С. 727–729.
- Овсянников В.Г., Бойченко А.Е., Николаев В.Е., Бордюшков Ю.Н., Алексеев В.В., Алексеева Н.С. 2012. Онтогенетические особенности изменения фагоцитарной активности лейкоцитов при острой боли // *Современные проблемы науки и образования*. № 2. Доступно через: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=5846>. 08.05.2017.
- Пигаревский В.Е. 1978. *Зернистые лейкоциты и их свойства*. М.: Медицина. 128 с.
- Стойко Ю.М., Ермаков Н.А. 2004. Клинические и фармакоэкономические аспекты консервативного лечения хронической венозной недостаточности нижних конечностей // *Хирургия, приложение к Consilium Medicum*. Т. 6. № 2. С. 23–26.
- Тимченко Л.Д., Затона Е.Г., Походенко М.В. 2010. Ферментативная активность нейтрофилов лабораторных крыс в репродуктивном периоде онтогенеза при повреждении покровных тканей под влиянием нового биологически активного препарата на основе эмбрионально-яичной массы // *Вестник МГОУ. Серия Естественные науки*. № 1. С. 71–75.
- Шубич М.Г., Нагоев Б.С. 1980. *Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии*. М.: Медицина. 224 с.
- Boily F., Beaudoin S., Measures L.N. 2006. Hematology and serum chemistry of harp (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*) during the breeding season, in the Gulf of St. Lawrence, Canada // *J. Wildlife Diseases*. V. 42. № 1. P. 115–132.
- Kaplow L.S. 1955. A histochemical procedure for locating and evaluating leucocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and bone marrow // *Blood*. V. 10. P. 1023–1029.
- Karlsson A., Khalfan L., Dahlgren C. et al. 1995. Neutrophil alkaline phosphatase activity increase in bacterial infections is not associated with a general increase in secretory vesicle membrane components // *Infect. Immun*. V. 63. № 3. P. 911–916.
- Morgan C.P., Sengelov H., Whatmore J. et al. 1997. ADP-ribosylation-factor-regulated phospholipase D activity localizes to secretory vesicles and mobilizes to the plasma membrane following N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of human neutrophils // *Biochem. J*. V. 325. № 3. P. 581–585.

## REFERENCES

- Budyka D.A., Abzaeva N.A., Rudnev S.M., Ivanova G.F., Fisun A.A., Gostishcheva S.E., Bondarenko A.I. 2009. Baktericidnaya aktivnost polimorfno-yadernyh lejkocitov krvi belyh myshej, privityh protiv chumy, i v razlichnyh skhemah inficirovaniya chumnoj infekciej [The bactericidal activity of polymorphonuclear white blood cells of white mice vaccinated against the plague, and in various schemes of infection with plague infection] // *Problemy osobo opasnyh infekcij*. T. 100. S. 50–56.
- Butenko Z.A., Gluzman D.F., Zak K.P. 1974. *Citohimiya i ehlektronnaya mikroskopiya kletok krvi i krovotvornyh organov* [Cytochemistry and electron microscopy of blood cells and hematopoietic organs]. Kiev: Naukova dumka. 248 s.
- Zajchik A. Sh., Churilov L.P. 2002. *Mekhanizmy razvitiya boleznej i sindromov* [Mechanisms of development of diseases and syndromes]. SPb.: EHLBI-SPB. 507 s.
- Kletikova L.V. 2010. Soderzhanie kationnyh belkov v granulocitah ptic [The content of cationic proteins in granulocytes of birds] // *Eestestvoznanie i gumanizm*. T. 6. № 1. S. 51–52.
- Kolesnik N.V., Kachanova Zh.S., Kuzmenko V.A. 2009. Funkcionalnoe sostoyanie cirkuliruyushchih nejtrofilov krvi zhenshchin s fiziologicheskim techeniem beremennosti i pri ugroze eyo nevyynashivaniya (Zaporozhskij promyshlennyj region) [Functional condition of circulating blood neutrophils of women with physiological pregnancy and threat of miscarriage (Zaporozhye industrial region)] // *Visnik Zaporizkogo nacionalnogo universitetu*. № 2. S. 104–110.
- Lukashik G.V. *Sposob opredeleniya ketoza u vysokoproduktivnyh korov* [Method for determination of ketosis in highly productive cows // *Innovations in animal husbandry*] // *Innovacii v zhivotnovodstve*. YuF NUBiP Ukrainy KATU. Internet resource <https://studydoc.ru/doc/2095301/sposob-opredeleniya-ketoza-u-vysokoproduktivnyh-korov>.

- Minzyuk T.V.* 2011. Vozrastnye izmeneniya baktericidnoj aktivnosti zernistyh lejkocitov seryh tyulenej [Age changes of bactericidal activity of granular white blood cells of gray seals] // Vestnik YuNC. T. 7. № 4. S. 70–73.
- Minzyuk T.V., Kavcevich N.N., Svetochev V.N.* 2015. Novye dannye o kletochnom sostave krovi morskogo zajca [New data on the cellular composition of the blood of the sea hare] // Doklady AN. T. 462. № 6. S. 727–729.
- Ovsyannikov V.G., Bojchenko A.E., Nikolaev V.E., Bordjushkov Ju.N., Alekseev V.V., Alekseeva N.S.* 2012. Ontogeneticheskie osobennosti izmeneniya fagocitarnoj aktivnosti lejkocitov pri ostroj boli [Ontogenetic features of changes in phagocytic activity of leukocytes in acute pain] // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. № 2. // (<https://science-education.ru/ru/article/view?id=5846>). 08.05.2017.
- Pigarevskij V.E.* 1978. Zernistye lejkocity i ih svojstva [Granular leukocytes and their properties]. M.: Medicina. 128 s.
- Stojko Yu.M., Ermakov N.A.* 2004. Klinicheskie i farmakoeconomicheskie aspekty konservativnogo lecheniya hronicheskoj venoznoj nedostatochnosti nizhnih konechnostej [Clinical and pharmacoeconomic aspects of conservative treatment of chronic venous insufficiency of lower extremities] // Hirurgiya, prilozhenie k Consilium Medicum. T. 6. № 2. S. 23–26.
- Timchenko L.D., Zatona E.G., Pohodenko M.V.* 2010. Fermentativnaya aktivnost nejtrofilov laboratornyh krysv v reproduktivnom periode ontogeneza pri povrezhdenii pokrovnyh tkanej pod vliyaniem novogo biologicheskogo aktivnogo preparata na osnove ehmbriionalno-yaichnoj massy [Enzymatic activity of neutrophils in laboratory rats in the reproductive period of ontogenesis with damage to integumentary tissues under the influence of a new biologically active drug based on embryonic-egg mass] // Vestnik MGOU. Seriya Estestvennye nauki. № 1. S. 71–75.
- Shubich M.G., Nagoev B.S.* 1980. Shchelochnaya fosfataza lejkocitov v norme i patologii [Alkaline phosphatase of leukocytes in norm and pathology]. M.: Medicina. 224 s.

Поступила в редакцию 21.03.2017 г.  
Принята после рецензии 13.04.2017 г.

## On estimation of bottle-nosed dolphins blood leucocytes functional state

*T.V. Minzyuk, N.N. Kavtsevich*

Murmansk marine biological institute (FSBSI «MMBI KSC RAS»), Murmansk

The article presents results of morphofunctional study of bottlenose dolphins blood cells. Ratios of leukocytes of different types, level of bactericidal cationic protein (CP) and alkaline phosphatase (AP) in bottlenose dolphins of different ages were determined. The relative number of leukocyte containing CP in dolphins is 35%, phosphatase-positive cells — 78%. In all age groups of animals high density of cytoplasm filling and the intensity of staining of granules containing CB and AP were noted. Amount of cationic proteins in studied marine mammals is considerable lower than in terrestrial animals, but 2–3 times higher than in the young seals studied earlier. At the same time, in young bottlenose dolphins (2–5 years) the variability of this parameter is higher than in adult animals (7–16 years). Activity of alkaline phosphatase of leukocytes of reproductive aged dolphins and immature animals is the same, but it is significantly higher in pregnant than in non-pregnant females. There are no noticeable age features for the content of bactericidal cationic proteins and activity of alkaline phosphatase in leukocytes of dolphins. However, the average value of the last parameter in dolphins is much higher than in terrestrial mammals studied in this respect. Obtained results can be used in comparative environmental physiology studies of marine and terrestrial animals.

**Key words:** bottlenose dolphin, blood, leukocytes, cationic protein, alkaline phosphatase.