

УДК 599.745.3 : 591.11.1

## Бактерицидный катионный белок в лейкоцитах морских млекопитающих

Т.В. Минзюк, Н.Н. Кавцевич

*Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН*

**Аннотация.** Выявлены возрастные изменения количества бактерицидного катионного белка (КБ) в лейкоцитах крови дельфинов-афалин, серого и гренландского тюленей. Содержание КБ у исследованных морских млекопитающих ниже, чем у наземных животных. Вероятно, КБ играет в бактерицидной системе гранулоцитов морских млекопитающих второстепенную роль, по сравнению с миелопероксидазой, особенно, на ранних этапах постнатального онтогенеза.

**Abstract.** Age changes of bactericidal cationic protein (CP) amount in blood leucocytes of bottle-nosed dolphins, grey and harp seals have been revealed. Investigated marine mammals have lower CP contents than terrestrial animals. Possibly, CP plays a supporting role in bactericidal system of granulocytes of marine mammals, as compared to myeloperoxidase, especially at early stages of postnatal ontogenesis.

**Ключевые слова:** морские млекопитающие, лейкоциты, неспецифическая резистентность, бактерицидный катионный белок, миелопероксидаза

**Key words:** marine mammals, leucocytes, nonspecific resistance, bactericidal cationic protein, myeloperoxidase

### 1. Введение

Центральным звеном врожденного клеточного иммунитета являются фагоцитирующие лейкоциты (нейтрофильные, эозинофильные и базофильные гранулоциты), основная функция которых в организме – антимикробная защита. Они играют также роль медиаторов воспаления, обладают цитотоксическим, противоопухолевым действием (Пигаревский, 1978; Зайчик, Чурилов, 2002). Обладая широким спектром защитно-приспособительных реакций, лейкоциты участвуют в формировании противоинфекционной неспецифической резистентности организма. Бактерицидная активность лейкоцитов обеспечивается кислородзависимой ферментной системой (миелопероксидаза, синглетный кислород, супероксидный анион, гидроксильный радикал, пероксид водорода, галогены) и кислороднезависимой неферментной системой (катионные белки, лизоцим, трансферрин, лактоферрин, молочная кислота).

Катионные белки (КБ) проявляют бактерицидную активность в анаэробных условиях, что существенно для животных, подвергающихся воздействию гипоксии при нырянии. КБ являются важной составной частью антимикробной защиты организма, а их недостаток 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 иммунитета.

В то же время данных о бактерицидных свойствах лейкоцитов морских млекопитающих в доступной литературе нами не обнаружено. Исследованы показатели фагоцитарных реакций лейкоцитов представителей некоторых видов китообразных и ластоногих. Так, в качестве индикатора неспецифической резистентности определяли активность фагоцитоза в гранулоцитах периферической крови белух (De Guise et al., 1995). Показано, что у новорожденных щенков серых, гренландских и обыкновенных тюленей активность фагоцитоза увеличивается, при этом наиболее интенсивно в период молочного питания, у взрослых же животных показано ее снижение в течение жизни. Авторы (Frouin et al., 2010) связывают это не с уменьшением количества фагоцитов (нейтрофилы и моноциты), а с ослаблением хемотаксиса. Различий в уровне фагоцитарных показателей нейтрофилов между взрослыми гренландскими тюленями и щенками, завершившими ювенильную линьку, не выявлено (Кавцевич, Ерохина, 1996).

В первые два месяца адаптации афалин к условиям неволи функциональная активность фагоцитирующих лейкоцитов значительно понижена (Соколова, 2006). Стресс пленения дельфинов сопровождается снижением фагоцитарных функций лейкоцитов, восстановление которых происходит через 4-6 месяцев (Матишева, Шапунов, 1990).

В настоящей работе мы определяли содержание катионных белков в лейкоцитах дельфинов и тюленей для сравнительной оценки бактерицидных свойств клеток крови у животных в разных условиях обитания.

## 2. Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили:

- черноморская афалина (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) в возрасте от 1 до 16 лет;
- гренландский тюлень (*Pagophilus groenlandicus* Erxleben, 1777) следующих возрастных групп: бельки (возраст 1 неделя), серки (1-1.5 месяца), завершившие молочное питание и ювенильную линьку; серки (3-4 месяца), начавшие самостоятельно питаться рыбой и взрослые животные;
- серый тюлень (*Halichoerus grypus* Fabricius, 1791): новорожденные, питающиеся молоком (2 недели), завершившие молочное питание (1-1.5 месяца), самостоятельно питающиеся рыбой щенки (3-4 месяца) и взрослые животные.

Материал от дельфинов получен в океанариуме г. Севастополя (Украина), от тюленей – в природных условиях и в аквакомплексе ММБИ. Кровь у тюленей брали из внутрипозвоночной вены, у дельфинов – из вен хвостового плавника. Мазки крови изготавливали общепринятым способом, перед окраской фиксировали в метаноле в течение 5 минут. Препараты крови окрашивали прочным зеленым по методике М. Олферта и И. Гешвинда (Бутенко и др., 1974).

Препараты изучали, используя масляную иммерсию (объектив  $\times 100$ , окуляр  $\times 10$ ), с помощью микроскопа Axio Imager M1, оснащенного цифровой видеокамерой AxioCam и программным обеспечением для анализа изображений микрообъектов AxioVision (фирмы Zeiss). При визуальной оценке интенсивности окрашивания клеток (в 100 гранулоцитах в каждом исследованном мазке крови) вычисляли средний цитохимический коэффициент содержания катионного белка (СЦК), определяли также площадь клетки, площадь и оптическую плотность продукта цитохимической реакции. Рассчитывали следующие цитохимические характеристики: показатель заполнения клетки (ПЗК) и интегральный цитохимический показатель (ИЦП) (Славинский, 2000). ПЗК – доля суммарной площади измеряемых структур (окрашенных гранул КБ) в площади клетки; ИЦП – произведение суммарной площади продукта цитохимической реакции в клетке и его оптической плотности, соответствующее количеству окрашенного КБ. Средние значения ПЗК и ИЦП для выборок из 100 гранулоцитов выражали в коэффициенте показателя заполнения клетки ( $\kappa$ ПЗК) и коэффициенте интегрального цитохимического показателя ( $\kappa$ ИЦП).

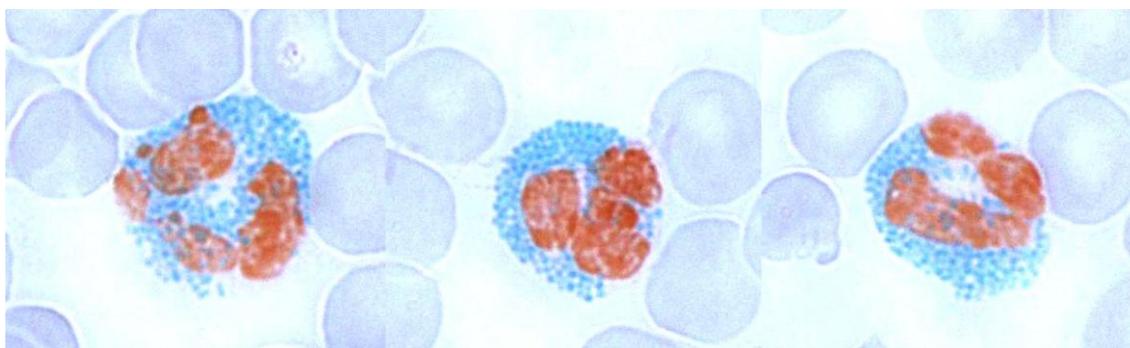


Рис. 1. Катионный белок в гранулоцитах афалины

## 3. Результаты исследования

Катионный белок лейкоцитов тюленей и дельфинов локализован в цитоплазматических гранулах (рис. 1).

Размер гранул, содержащих КБ, у тюленей всех возрастных групп варьирует незначительно ( $p > 0.05$ ) (рис. 2). Средняя площадь одной гранулы у тюленей составляет  $0.26 \text{ мкм}^2$ , у афалин –  $0.29 \text{ мкм}^2$  (у человека –  $0.30 \text{ мкм}^2$ ).

У всех тюленей и дельфинов в пределах одной клетки окрашенные гранулы в среднем одинаковые по размеру, только у щенков серого тюленя, начавших самостоятельно питаться рыбой, встречаются в одной и той же клетке как мелкие ( $0.15 \text{ мкм}^2$ ), так и относительно крупные гранулы (до  $0.53 \text{ мкм}^2$ ) (рис. 3).

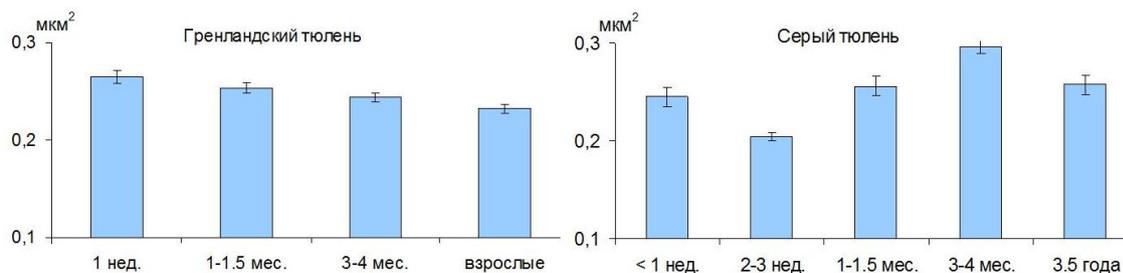


Рис. 2. Размер гранул, содержащих катионный белок, у тюленей

У щенков серого тюленя до 1.5 месяцев и гренландского – до 3-х очень низкое число лейкоцитов, в которых выявляются катионные белки (2-4.5 %) (рис. 4). При этом у 19 % серок гренландского тюленя (возраст 1-1.5 мес.) гранулоциты, содержащие катионные белки, не выявлены. У доношенных детей в первые сутки жизни содержание катионного белка высоко (СЦК = 1.51±0.08), а к концу периода новорожденности его уровень повышается (Дорогова, 1998).

У нормально упитанных щенков гренландского тюленя содержание КБ существенно повышается в возрасте 3-4 месяца ( $p < 0.05$ ), что проявляется в увеличении числа КБ<sup>+</sup> лейкоцитов и содержащихся в них гранул. У серых тюленей уровень КБ достоверно ( $p < 0.05$ ) повысился в период, когда они завершили ювенильную линьку и молочное вскармливание, затем несколько снизился у животных, начинающих самостоятельно питаться рыбой, и снова увеличился во время полового созревания (3.5 года). Согласно представленным данным, становление бактерицидной активности, обусловленной катионными белками, происходит в онтогенезе серых тюленей раньше, чем у гренландских (рис. 4).

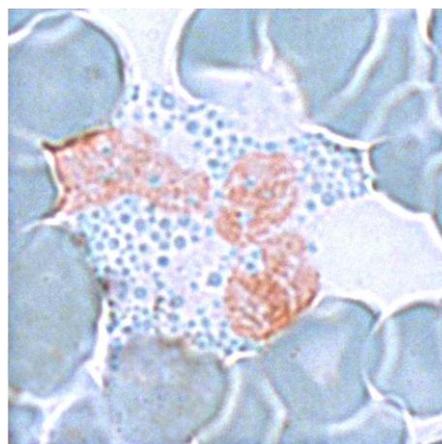


Рис. 3. Катионный белок в нейтрофиле щенка серого тюленя в возрасте 3-4 месяцев

Изучение гренландских тюленей и дельфинов-афалин, содержащихся в условиях неволи в течение длительного времени, показало индивидуальные различия между животными по количеству КБ<sup>+</sup> лейкоцитов. Содержание катионного белка у гренландского тюленя с возрастом изменяется незначительно (СЦК не превышает 0.5) (рис. 5). Самое низкое содержание катионного белка наблюдалось у животного № 3, которое было истощено и в дальнейшем погибло. Это, по-видимому, связано с низким уровнем неспецифической резистентности данного тюленя. Недостаточное содержание антибактериальных компонентов гранулоцитов может приводить к незавершенному фагоцитозу нейтрофилами бактерий в воспалительном очаге и развитию гнойных осложнений (Напольников, 2007).

Уровень КБ взрослых гренландских тюленей в условиях неволи в 2.6 раза ниже (СЦК = 0.17±0.03), чем у диких животных (СЦК = 0.45±0.06).

Количество КБ<sup>+</sup> лейкоцитов у афалины в среднем составляет 35 %. У многих неполовозрелых афалин (в возрасте до 5 лет) содержание КБ в 3 раза выше (рис. 6), чем у тюленей в период полового созревания (рис. 5). У половозрелых дельфинов средние значения коэффициента не изменяются ( $p < 0.01$ ), наблюдается лишь некоторое снижение вариабельности исследуемого показателя (С.V. снижается с 33 % до 24 % у неполовозрелых и половозрелых афалин соответственно).

У всех исследованных представителей морских млекопитающих содержание КБ значительно ниже, чем у животных других видов и человека (рис. 7).

Использованные нами показатели и коэффициенты по-разному характеризуют бактерицидную активность лейкоцитов. Так, ПЗК и ИЦП отражают интенсивность окрашивания и плотность распределения продукта цитохимической реакции в клетке. Но если учесть, что процентное содержание гранулоцитов, дающих положительную реакцию на катионный белок, колеблется у афалин от 9 до 61 % (рис. 8), то при одинаковых или близких показателях ПЗК и ИЦП содержание бактерицидного белка в среднем в гранулоцитах периферической крови будет различно. Поэтому, аналогично расчетам среднего цитохимического коэффициента, нами применены два дополнительных коэффициента.

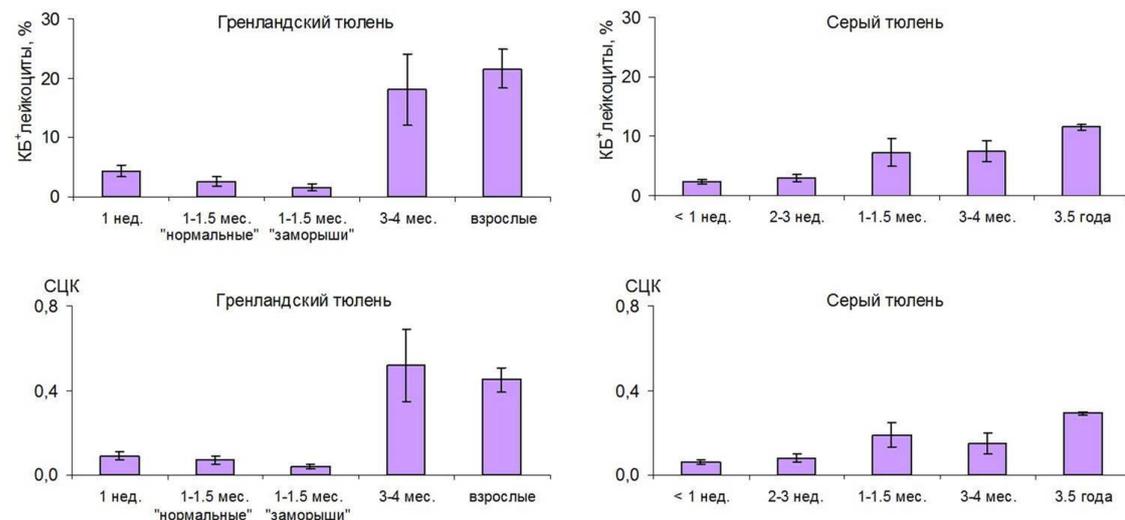


Рис. 4. Содержание катионного белка в гранулоцитах тюленей разного возраста

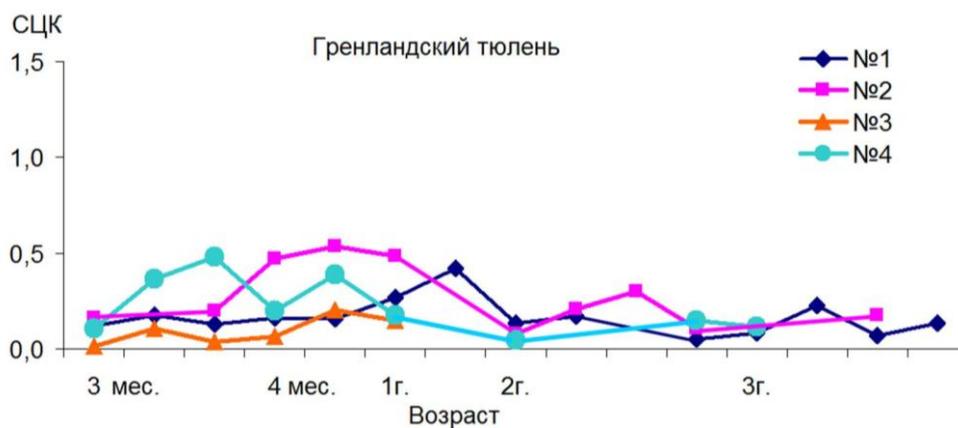


Рис. 5. Возрастные изменения содержания катионного белка у гренландского тюленя в условиях неволи

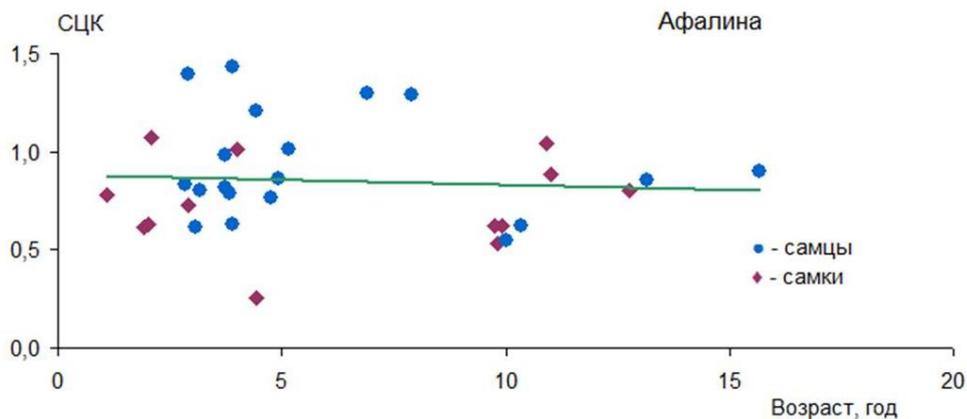


Рис. 6. Возрастные изменения содержания катионного белка у афалин

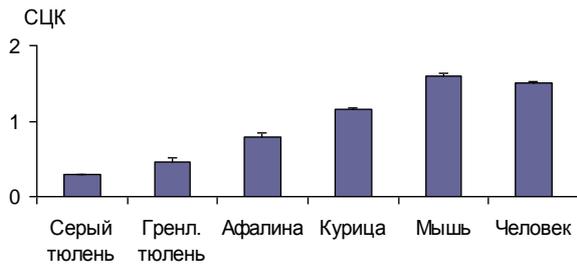


Рис. 7. Содержание катионного белка в гранулоцитах взрослых животных разных видов (курица, мышь и человек по: Клетикова, 2010; Будыка и др., 2009; Стойко, Ермаков, 2004, соответственно)

У самок афалин в возрасте 4-5 лет (рис. 8) при самом высоком значении ПЗК (т.е. интенсивность заполнения цитоплазмы  $KB^+$  лейкоцитов окрашенными гранулами самая высокая) и среднем значении ИЦП наблюдаются самые низкие значения СЦК (рис. 6), кПЗК и кИЦП (рис. 8), что обусловлено низким процентным содержанием  $KB^+$  лейкоцитов у данного животного. Следовательно, при сравнительных исследованиях функционального состояния организма животных на основе различных цветоярких характеристик клеток необходимо рассчитывать дополнительные коэффициенты.

Согласно полученным данным, неполовозрелые самцы афалины отличаются наибольшими колебаниями по СЦК, кПЗК и кИЦП, но средние значения всех рассчитанных показателей с возрастом у всех афалин не изменяются (рис. 8).

Проведенное исследование свидетельствует об определенных изменениях содержания неферментного катионного белка у тюленей и дельфинов в ходе постнатального онтогенеза. В частности, у тюленей содержание катионного белка в гранулоцитах очень низкое, особенно в начальные периоды постнатального онтогенеза. Увеличение КБ у серых тюленей происходит в возрасте 1-1.5 месяцев, у гренландских тюленей – в 3-4 месяца. У взрослых тюленей в условиях неволи содержание КБ ниже, чем у диких животных. Содержание микробицидного белка в гранулоцитах неполовозрелых афалин в 3 раза выше, чем у тюленей в данный возрастной период. У афалин в условиях неволи количество КБ на разных возрастных этапах относительно постоянно. Причиной таких различий, вероятно, является происхождение ластоногих и китообразных от разных предковых форм наземных животных и более длительная эволюция китообразных в водной среде.

Ранее нами установлено (Минзюк, 2011), что детеныши серых тюленей отличаются высокой активностью миелопероксидазы (МПО). Причем, у новорожденных щенков она наибольшая. МПО – компонент антиоксидантной системы, играющей в жизнедеятельности ныряющих животных важнейшую роль – предохраняя их от "окислительного стресса" при гипоксии. В то же время, МПО является одним из основных элементов кислородзависимого ферментного звена бактерицидной системы лейкоцитов. Вероятно, в первые 3-4 месяца жизни тюленей бактерицидная функция лейкоцитов осуществляется, главным образом, при участии миелопероксидазы.

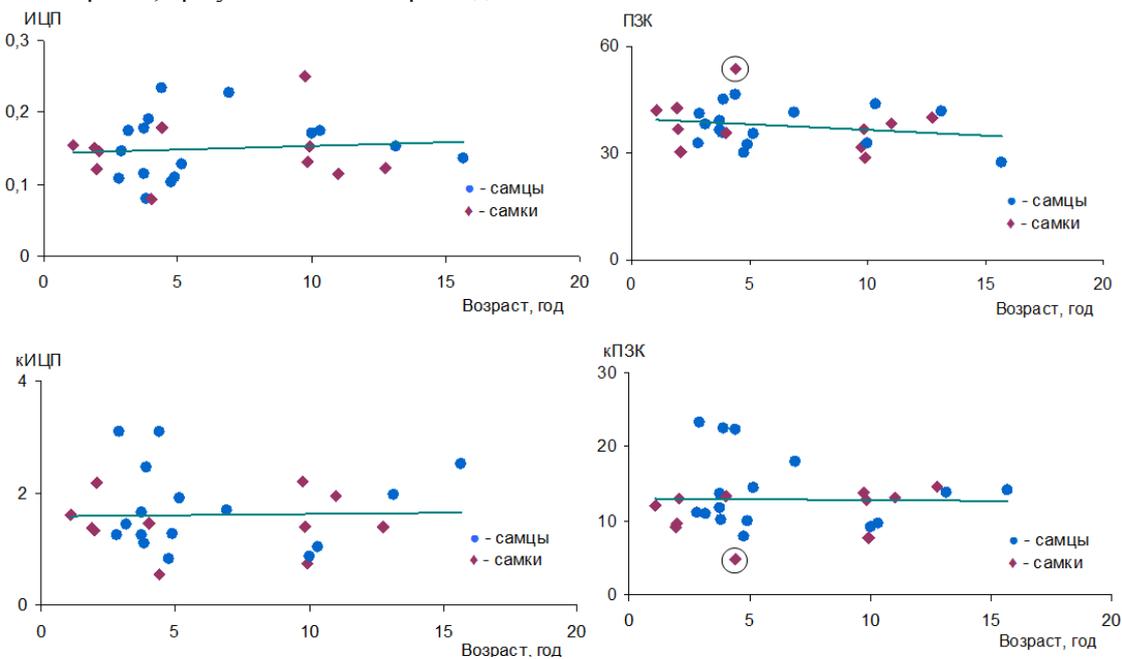


Рис. 8. Возрастные изменения цитохимических показателей активности катионного белка в гранулоцитах крови афалины

#### 4. Заключение

Уровень естественной резистентности организма имеет большое значение в процессах адаптации водных животных к условиям окружающей среды как в раннем постнатальном онтогенезе животных, когда формируется система специфического иммунитета, так и при адаптации к условиям неволи. Бактерицидная активность гранулоцитов может быть оценена по количественным (число гранул и интенсивность их заполнения в клетке) и качественным (цветоярким и размерным) показателям окрашенных неферментных катионных белков. Наибольшие изменения в содержании бактерицидных белков отмечены у животных в начальные периоды постнатального онтогенеза и у неполовозрелых особей, на следующих возрастных этапах содержание белка не меняется. Вероятно, постоянный уровень КБ в гранулоцитах морских млекопитающих свидетельствует о их важной роли в защите организма от инфекций. В то же время КБ служит лишь дополнением бактерицидной системы, главным компонентом которой является миелопероксидаза.

#### Литература

- De Guise S., Flipo D., Boehm J.R. et al.** Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of phagocytosis and respiratory burst with peripheral blood leukocytes using flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 47, N 3-4, p. 351-362, 1995.
- Frouin H., Lebeuf M., Hammill M. et al.** Phagocytosis in pup and adult harbour, grey and harp seals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 134, N 3-4, p. 160-168, 2010.
- Будыка Д.А., Абзаева Н.А., Руднев С.М. и др.** 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, 2009.
- Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П. и др.** Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. *Киев, Наукова думка*, 248 с., 1974.
- Дорогова М.М.** Функциональное состояние нейтрофилов у недоношенных детей в периоде новорожденности. *Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ставрополь*, 1998.
- Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П.** Механизмы развития болезней и синдромов. *СПб., ЭЛБИ-СПб.*, 507 с., 2002.
- Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А.** Биохимические и цитологические исследования морских млекопитающих в Арктике. *Анатомы, КНЦ РАН*, 169 с., 1996.
- Клетикова Л.В.** Содержание катионных белков в гранулоцитах птиц. *Естествознание и гуманизм*, т. 6, № 1, с. 51-52, 2010.
- Матишева С.К., Шапунов В.М.** Влияние стресса пленения на фагоцитарные реакции лейкоцитов крови черноморских дельфинов. *Тез. докл. 10 Всес. совещ. по изуч., охране и рац. исп. морских млекопит., 2-5 окт. 1990 г., г. Светлогорск. М.*, с. 187-188, 1990.
- Минзюк Т.В.** Возрастные изменения бактерицидной активности зернистых лейкоцитов серых тюленей. *Вестник ЮНЦ*, т. 7, № 4, с. 70-73, 2011.
- Напольников Н.В.** Компьютерный анализ антибактериальных систем нейтрофильных лейкоцитов в оценке характера течения острого верхушечного периодонтита. *Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Волгоград*, 23 с., 2007.
- Пигаревский В.Е.** Зернистые лейкоциты и их свойства. *М., Медицина*, 128 с., 1978.
- Славинский А.А.** Критерии функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов, основанные на компьютерном анализе изображения и люминесценции. *Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.*, 38 с., 2000.
- Соколова О.В.** Иммунный статус черноморской афалины (*Tursiops truncatus ponticus* Varabash, 1940) в период адаптации к условиям жизни в неволе. *Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.*, 25 с., 2006.
- Стойко Ю.М., Ермаков Н.А.** Клинические и фармакоэкономические аспекты консервативного лечения хронической венозной недостаточности нижних конечностей. *Хирургия, приложение к Consilium Medicum*, т. 6, № 2, с. 23-26, 2004.