

УДК 599.745.3:591.111.1

## ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ГРЕНЛАНДСКИХ ТЮЛЕНЕЙ

© 2020 г. Н. Н. Кавцевич<sup>1,\*</sup>, И. А. Ерохина<sup>1</sup>, Т. В. Минзюк<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН Г. Г. Матишовым

Поступило 12.05.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принято к публикации 10.07.2020 г.

В работе исследовали фагоцитарные и цитохимические показатели лейкоцитов периферической крови взрослых гренландских тюленей и щенков 1.5-месячного возраста. В образцах крови определяли фагоцитарное число – долю фагоцитирующих лейкоцитов и фагоцитарную активность – среднее число поглощенных частиц латекса на один лейкоцит. Различий между группами тюленей по средним значениям этих показателей не было выявлено. При корреляционном анализе у взрослых тюленей была обнаружена достоверная связь фагоцитарной активности лейкоцитов с содержанием в них гликогена ( $r = 0.89$ ). Содержание катионного бактерицидного белка (КБ) в лейкоцитах взрослых животных было в 10–12 раз выше этого показателя у щенков. Корреляция между КБ и числом эозинофилов в крови у взрослых особей оказалась высокой ( $r = 0.88$ ). Кроме того, у половозрелых тюленей содержание эозинофилов значительно больше, чем у щенков. Отмеченные особенности могут обеспечивать более высокую эффективность фагоцитоза и уничтожения поглощенных бактерий у взрослых тюленей по сравнению со щенками, несмотря на высокий уровень показателей первой, поглотительной, фазы фагоцитоза у последних.

**Ключевые слова:** морские млекопитающие, иммунитет, гренландский тюлень, фагоцитоз

**DOI:** 10.31857/S2686738920060116

Среди проблем современной эволюционной иммунологии одной из наиболее существенных является исследование соотношения между неспецифическим (врожденным) и специфическим (приобретенным) иммунитетом [1]. Проблема оценки эффективности механизмов резистентности к воздействию неблагоприятных факторов актуальна не только для содержащихся в неволе и редких, но и для промысловых видов морских млекопитающих, численность которых существенно снижается из-за интоксикаций и эпизоотий [2, 3]. Давно сформулированная гипотеза [4] о существовании особенностей системы иммунитета у китообразных и ластоногих, обусловленных эволюцией в чистой, не содержащей патогенных микроорганизмов суши, океанической среде, и обеспечивающих недостаточную иммунологическую резистентность в современных условиях, до настоящего времени не подтверждена. Высокий уровень заболеваемости морских млекопитающих связывают с влиянием загрязне-

ния среды их обитания на здоровье, в том числе на систему иммунитета.

Фагоцитоз – наиболее древний клеточный механизм, обеспечивающий, наряду с гуморальными факторами, неспецифическую защиту от патогенных микроорганизмов. Неспецифические иммунологические реакции развиваются значительно быстрее, чем специфические. Это существенно для водных животных, находящихся в постоянном контакте со средой, в которой могут присутствовать патогенные микроорганизмы и ксенобиотики [5].

Сведения о бактерицидных функциях лейкоцитов морских млекопитающих немногочисленны. Так, установлена прямая зависимость фагоцитарной активности лейкоцитов крови детенышей северного морского котика от интенсивности инвазии *Uncinaria lucasi* [6]. Для дельфинов известно, что стресс, развивающийся у животных после отлова и помещения их на судно для транспортировки, сопровождается снижением фагоцитарных функций лейкоцитов, восстановление которых происходило только через 4–6 месяцев [7]. Общее количество лизосом и их число, содержащих катионные бактерицидные белки, уменьшается после отлова, транспортировки и в первые дни пребывания дельфинов в

<sup>1</sup> Мурманский морской биологический институт  
КНЦ РАН, Мурманск, Россия

\*e-mail: kavtsevitsch2015@yandex.ru

бассейне [8]. Определены некоторые показатели фагоцитоза лейкоцитов белух [9], обыкновенно, серого и гренландского тюленей [10].

Центральным звеном врожденного клеточно-иммунитета являются фагоцитирующие лейкоциты. Они играют также роль медиаторов воспаления, обладают цитотоксическим, противоопухолевым действием [11]. Бактерицидная активность лейкоцитов обеспечивается кислород-зависимой системой (включающей миелопероксидазу, синглетный кислород, супероксидный анион, гидроксильный радикал, пероксид водорода, галогены) и кислород-независимой неферментной системой (включающей катионные белки, трансферрин, лактоферрин и молочную кислоту). Катионные белки (КБ) являются важной составной частью антимикробной защиты организма, а их недостаток приводит к резкому снижению неспецифической резистентности [12]. КБ проявляют бактерицидную активность в анаэробных условиях, что существенно для водных млекопитающих, подвергающихся воздействию гипоксии при нырянии.

О соотношении и взаимодействии реакций специфического и неспецифического иммунитета можно судить, исследуя их развитие в онтогенезе животных. Неспецифическая резистентность играет важную роль в обеспечении выживания щенков тюленей, поскольку система специфического иммунитета у млекопитающих после рождения еще только формируется. В настоящей работе мы определяли показатели фагоцитоза и некоторые цитохимические параметры лейкоцитов гренландских тюленей разного возраста.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал для исследования получен на зверобойном промысле в пос. Койда Архангельской обл. от щенков после ювенильной линьки (возраст 1–1.5 мес), серок, и взрослых животных. Выделяли группы: “нормальные” – хорошо упитанные детеныши весом 30–35 кг и “недокормленные” или “заморыши” – 10–15 кг.

Исследование фагоцитарных реакций проводили, используя наборы реактивов и методику, применяющиеся в клинических исследованиях человека. В качестве объекта фагоцитоза использовали частицы латекса диаметром 0.5–0.6 мкм. 0.05 мл взвеси частиц ( $2.5 \times 10^7$ ) в сбалансированном буферном солевом растворе Хенкса смешивали с 0.1 мл гепаринизированной крови и 0.05 мл раствора Хенкса или 0.05 мл 0.00025% продигозана. Образцы инкубировали 1 ч при 37°C, периодически, каждые 5 мин, встряхивая пробирки. Таким методом определяется эффективность начальной, поглотительной фазы фагоцитоза, по-

скольку латекс клеткой не переваривается. Подсчет числа частиц латекса проводили в 100 лейкоцитах. Определяли фагоцитарное число (ФЧ) – процент фагоцитирующих клеток и фагоцитарную активность (ФА) – среднее число поглощенных частиц латекса на один лейкоцит. Резервные возможности фагоцитоза оценивали по величине индекса стимуляции (ИС) фагоцитарных реакций продигозаном (липополисахарид *Bacillus prodigiosum*). Применяли также окрашивание мазков крови по Романовскому-Гимза и цитохимические методики: выявление гликогена, бактерицидных катионных белков [13]. Рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК).  $СЦК = (A_1 \times 1 + A_2 \times 2 + A_3 \times 3) / 100$ , где А – число лейкоцитов с различным количеством выявляемого вещества. Препараты исследовали с масляной иммерсией (объектив 100×, окуляр 10×).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При окрашивании мазков крови тюленей по методу Романовского-Гимза типирование лейкоцитов, как правило, однозначно. В исследованных образцах крови тюленей, как и у многих видов наземных млекопитающих, включая представителей отряда хищных, филогенетически наиболее близких к настоящим тюленям, преобладали нейтрофилы. Взрослые животные отличались от щенков значительно более высоким числом эозинофильных лейкоцитов. Содержание гликогена в лейкоцитах взрослых тюленей и щенков было одинаково, а уровень катионного белка значительно выше (табл. 1).

Как свидетельствуют данные, приведенные в табл. 2, различия между средними значениями для групп тюленей по всем показателям оказались статистически недостоверными ( $p > 0.05$ ). Это согласуется с результатами опубликованного исследования обыкновенного, серого и гренландского тюленей: фагоцитарная активность лейкоцитов новорожденных животных и взрослых самок одинакова, в конце периода лактации у щенков она выше, чем у их матерей, затем постепенно снижается [10]. Однако индивидуальные колебания показателей фагоцитоза у гренландских тюленей велики, в особенности, по степени возрастания ФА у щенков-заморышей после стимуляции продигозаном.

При корреляционном анализе были выявлены существенные связи между некоторыми цитохимическими и фагоцитарными показателями. Продемонстрирована высокая корреляция между содержанием гликогена и фагоцитарной активностью лейкоцитов у взрослых тюленей, в отличие от щенков (рис. 1). Исследование лейкоцитов, стимулированных продигозаном, дало сходный результат:  $r = 0.90$ ,  $r = 0.14$ ,  $r = 0.41$

**Таблица 1.** Лейкоцитарная формула крови и цитохимические показатели лейкоцитов гренландских тюленей (M ± SE)

Группа тюленей	Типы лейкоцитов, %					ГЛ		КБ	
	Н	Э	Б	М	Л	СЦК	ГЛ+	СЦК	КБ+
Взрослые, <i>n</i> = 10	53.8 ± 3.6	19.3 ± 2.6	0.1 ± 0.1	2.7 ± 0.4	24.1 ± 4.2	1.57 ± 0.08	90.0 ± 2.2	0.45 ± 0.07	21.7 ± 2.9
Серки, <i>n</i> = 10	60.8 ± 5.8	1.6 ± 0.6	0.2 ± 0.1	9.0 ± 0.1	28.4 ± 6.6	1.33 ± 0.09	86.9 ± 1.9	0.06 ± 0.01	2.7 ± 0.5
“Недокормленные”, <i>n</i> = 10	61.3 ± 4.0	2.0 ± 0.4	0.2 ± 0.1	10.1 ± 1.1	26.4 ± 4.4	1.26 ± 0.10	82.4 ± 3.6	0.03 ± 0.01	1.7 ± 0.5

Примечание. ГЛ – гликоген, КБ – катионный белок, СЦК – средний цитохимический коэффициент, ГЛ<sup>+</sup> – % лейкоцитов, содержащих гликоген, КБ<sup>+</sup> – % лейкоцитов, содержащих КБ. Н – нейтрофилы, Э – эозинофилы, Б – базофилы, М – моноциты, Л – лимфоциты.

**Таблица 2.** Показатели фагоцитарной активности лейкоцитов гренландских тюленей (M ± SE, в скобках – пределы колебания показателей). ФЧ – фагоцитарное число, процент фагоцитирующих клеток, ФА – фагоцитарную активность, среднее число поглощенных частиц латекса на один лейкоцит

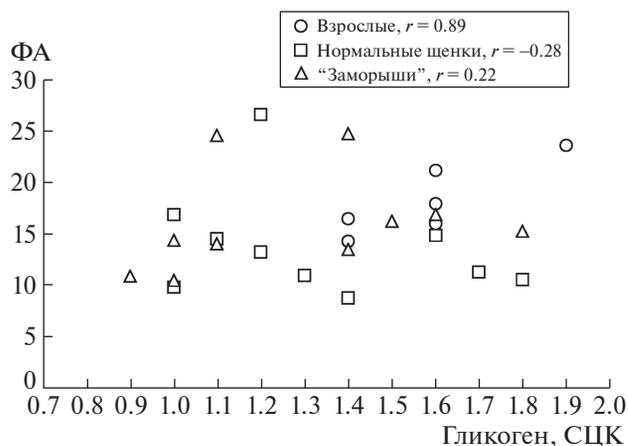
Группы тюленей	ФЧ			ФА		
	спонт.	стимул.	ИС <sub>1</sub> , %	спонт.	стимул.	ИС <sub>2</sub> , %
Взрослые, <i>n</i> = 6	58.5 ± 6.7 (32–74)	68.34 ± 5.8 (41–80)	17.7 (0–25.4)	18.2 ± 1.4 (14.2–23.5)	22.7 ± 2.3 (14.2–31.6)	25.0 (0–54.1)
Серки, <i>n</i> = 10	61.3 ± 4.4 (36–86)	70.6 ± 4.5 (58–86)	15.1 (0–72.6)	13.7 ± 1.6 (8.7–26.5)	16.2 ± 1.8 (10.0–25.5)	18.3 (0–31.2)
“Недокормленные”, <i>n</i> = 10	49.5 ± 5.0 (30–68)	56.2 ± 5.4 (29–79)	13.5 (0–45.7)	16.0 ± 1.6 (10.4–24.7)	20.6 ± 2.0 (13.5–31.5)	28.2 (0–110)

(взрослые, нормальные щенки и щенки-заморыши соответственно).

Кроме того, была выявлена достоверная корреляция резерва фагоцитарной активности (ИС<sub>2</sub>) и относительного количества гликогена нейтрофилов у нормальных щенков ( $r = 0.68$ ,  $p < 0.05$ ), в отличие от заморышей ( $r = 0.15$ ) и взрослых ( $r = 0.32$ ). Фагоцитоз – энергозависимый процесс. Различное содержание гликогена (и особенности его обмена) обеспечивает разную энергетическую базу для фагоцитоза и других функций клеток. У истощенных, длительно голодающих щенков тюленей высокий уровень гликогена, вероятно, не является предпосылкой эффективного фагоцитоза. Запасы гликогена у них – резерв, расходуемый в последнюю очередь, а для обеспечения жизненно важных функций используется энергия, получаемая из подкожного жира и белков.

У взрослых тюленей была выявлена высокая корреляция числа эозинофилов и лейкоцитов, в которых присутствует бактерицидный катионный белок (рис. 2). По-видимому, именно с эозинофилами связана реализация фагоцитарной функции у водных млекопитающих. Высокий уровень фагоцитарной активности, который продемонстрировали лейкоциты щенков гренландских тюленей обеспечили именно нейтрофильные лейкоциты. Однако содержание бактерицид-

ного катионного белка в этих клетках было крайне низким, и, следовательно, уничтожение поглощенных бактерий происходило, по-видимому, недостаточно эффективно. У тюленей, начавших самостоятельное кормление (возраст – 3–3.5 месяца), число эозинофилов возрастало до 7–40% [14]. При этом содержание бактерицидного катионного белка повышалось до уровня

**Рис. 1.** Корреляция фагоцитарной активности (ФА) и содержания гликогена в лейкоцитах гренландских тюленей (СЦК – средний цитохимический коэффициент).

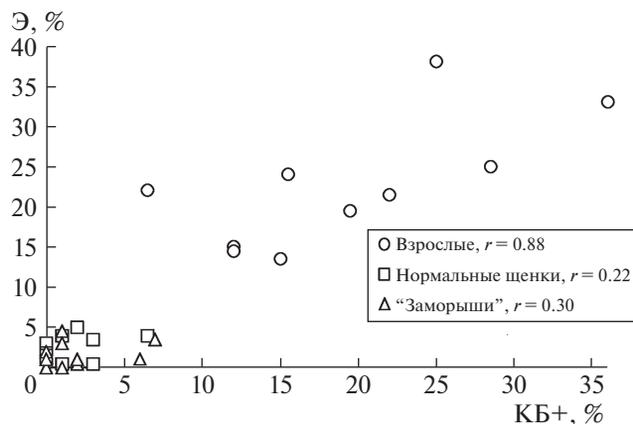


Рис. 2. Соотношение числа эозинофилов (Э) и лейкоцитов, содержащих бактерицидный катионный белок (КБ+).

взрослых животных. Вероятно, становление фагоцитарной системы происходит именно на данном этапе онтогенеза гренландских тюленей.

Для всей группы исследованных тюленей выявлена достоверные корреляции между ФЧ после стимуляции лейкоцитов продигиозаном и числом эозинофилов и клеток, содержащих катионный белок ( $r = 0.94$  и  $r = 0.99$  соответственно). Это, наряду с эозинофилией у взрослых тюленей, позволяет предположить, что ведущая роль в фагоцитарных и, вероятно, других реакциях неспецифического иммунитета тюленей принадлежит эозинофилам.

Гренландский тюлень — наиболее многочисленный вид ластоногих в северном полушарии, играющий значительную роль в экосистемах арктических морей. Состояние популяций морских млекопитающих в значительной степени определяется уровнем загрязнения среды обитания, влияющим на функционирование клеточных и гуморальных механизмов иммунной резистентности организмов. Детеныши тюленей могут быть особенно уязвимыми по отношению к воздействию различных патогенных факторов. Полученные в данной работе результаты целесообразно дополнить, исследуя как специфические, так и неспецифические реакции иммунитета тюленей различного возраста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галактионов В.Г. // Медицинская иммунология. 2004. Т. 6. № 3–5. С. 159–170.
2. Harwood J., Reijnders F. // New Sci. 1988. V. 119. № 1634. P. 28–29.
3. Хураськин Л.С., Захарова Н.А., Кузнецов В.В. и др. // Морские млекопитающие Голарктики. М., 2002. С. 276–278.

4. Cavagnolo R. // Develop. Comp. Immunol. 1979. V. 3. № 2. P. 245–257.
5. Desforges W., Sonne C., Levin M. et al. // Environment International. 2016. V. 86. P. 126–139.
6. Букина Л.А. / IX Всесоюз. совещ. по изучению, охране и рациональному использованию морских млекопитающих, 9–14 сентября 1986 г., г. Архангельск: Тез. докл. Архангельск, 1986. С. 60–61.
7. Матишова С.К., Шапунов В.М. Влияние стресса пленения на фагоцитарные реакции лейкоцитов крови черноморских дельфинов / X Всесоюз. совещ. по изучению, охране и рациональному использованию морских млекопитающих, 2–5 октября 1990 г., г. Светлогорск: Тез. докл. М., 1990. С. 187–188.
8. Швацкий А.Б., Радыгин Г.Ю., Живкова Е.П. и др. / X Всесоюз. совещ. по изучению, охране и рациональному использованию морских млекопитающих, 2–5 октября 1990 г., г. Светлогорск: Тез. докл. М., 1990. С. 328–329.
9. De Guise S., Flipo D., Boehm J.R. et al. // Veterinary Immunology and Immunopathology. 1995. V. 47. № 3–4. P. 351–362.
10. Frouin H., Lebeuf M., Hammill M. et al. // Veterinary Immunology and Immunopathology. 2010. V. 134. № 3–4. P. 160–168.
11. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Механизмы развития болезней и синдромов. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2002. 507 с.
12. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. М.: Медицина, 1978. 128 с.
13. Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П. и др. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. Киев: Наукова думка, 1974. 248 с.
14. Кавцевич Н.Н. Морфологические и цитохимические особенности клеток крови морских млекопитающих в связи с адаптацией к среде обитания. Дисс. ... докт. биол. наук. Мурманск, 2011. 243 с.

**PHAGOCYtic ACTIVITY OF LEUKOCYTES IN HARP SEALS****N. N. Kavtsevich<sup>a,\*</sup>, I. A. Erokhina<sup>a</sup>, and T. V. Minzyuk<sup>a</sup>**<sup>a</sup> *Murmansk Marine Biological Institute, Kola Science Center, Russian Academy of Sciences, Murmansk, Russian Federation*<sup>#</sup>*e-mail: kavtsevitch2015@yandex.ru*

Presented by academician of the RAS G.G. Matishov

Phagocytic and cytochemical parameters of peripheral blood leukocytes in adult and 1.5 months old pups harp seals were studied. Phagocytic number, proportion of phagocytic leukocytes, and phagocytic activity, average number of absorbed latex particles per leukocyte, were determined. Differences between groups of seals by average values of these indicators have not been revealed. A correlation analysis revealed a reliable relationship between the phagocytic activity of leukocytes and their glycogen content in adult seals ( $r = 0.89$ ). Content of cationic bactericidal protein (CP) in leukocytes of adult animals was 10–12 times higher than in pups. Correlation of CP and eosinophil count in adults was high ( $r = 0.88$ ). Adult had significantly more eosinophils than pups. The noted features can provide higher efficiency of phagocytosis and destruction of absorbed bacteria in adult seals as compared to pups, despite the high level of indicators of the first, absorbing, phase of phagocytosis in the latter.

*Keywords:* marine mammals, immunity, harp seal, phagocytosis