

Кавцевич Николай Николаевич

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК
КРОВИ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В СВЯЗИ С АДАПТАЦИЕЙ К
СРЕДЕ ОБИТАНИЯ

03.03.01 – физиология

03.02.04 – зоология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Петрозаводск – 2011

Работа выполнена в Мурманском морском биологическом институте Кольского
научного центра Российской академии наук

Научный консультант:

Доктор биологических наук

Муравейко Владимир Матвеевич

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук

Илюха Виктор Александрович

Доктор биологических наук, профессор

Микряков Вениамин Романович

Доктор ветеринарных наук, профессор

Крячко Оксана Васильевна

Ведущая организация:

Мурманский государственный технический университет

Защита диссертации состоится " 24 " ноября 2011 года

на заседании диссертационного совета ДМ212.087.02 при Карельской
государственной педагогической академии по адресу: 185680, г. Петрозаводск, ул.
Пушкинская, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельской государственной
педагогической академии

Автореферат разослан " _____ " 2011 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат медицинских наук, доцент

А.И. Малкиель

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Естественная среда обитания морских млекопитающих постоянно ухудшается в результате загрязнения океана. Все усложняющиеся условия проживания, вопросы сохранения здоровья целых популяций животных привели в настоящее время биологическую науку к осознанию необходимости детального изучения процессов адаптации к меняющимся условиям окружающей среды. Заболевания и гибель содержащихся в океанариумах животных являются важнейшими факторами, препятствующими разведению водных млекопитающих. 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 распространяющихся в последние годы интоксикаций и эпизоотий (Бобовникова и др., 1986; Алмквист и др., 1987; Harwood, Rejnders, 1988; Хураськин и др., 2002).

Особенности строения и функционирования системы крови и лимфоидной системы могут играть существенную роль в патогенезе заболеваний у морских млекопитающих, эволюционировавших в чистой океанической среде, не содержащей патогенных микроорганизмов суши (Сыкало, 1982; Arvey, 1976; Savagnolo, 1979; Vaiker, 1984). В то же время, лимфоидная система китообразных и ластоногих, как и система крови в целом, изучены недостаточно для определения их функциональных возможностей.

Помимо клинической диагностики, кровь и органы гемопоэза являются объектами для исследования организмов разного филогенетического уровня, обитающих в различных экологических условиях. В этом отношении морфологические и функциональные характеристики отдельных гемопоэтических ростков в каждом классе и отряде позвоночных имеют существенные различия (Заварзин, 1985; Горышина, Чага, 1990; Галактионов, 2005). С таких позиций, интерес к сравнению наземных и водных млекопитающих связан с тем, что они обитают в разных средах, а это, несомненно, отразилось на механизмах кроветворения и иммунной защиты.

Несмотря на значительные успехи исследований плазмы и клеток крови в норме и при патологии, заболеваемость и смертность мелких китообразных и ластоногих остаются на высоком уровне. Основной причиной этого являются вирусные, бактериальные и грибковые инфекции (Захарова, Дралкин, 1985; Воронков, 1990, 1992; Денисенко, 2003; Денисенко, Соколова, 2008; Шестопалов и др., 2010; Raethel, 1962; Ridgway, 1975; Cordes, 1982; Pilleri, 1983; Murmann et al., 1984; Daniel, 1985; Schumacher et al., 1990).

Большая часть исследований крови, связанных с проблемами токсикологии и заболеваний морских млекопитающих, выполняется биохимическими методами, изучение клеток играет, как правило, подчиненную, вспомогательную роль. Данные о морфофункциональных характеристиках, качественном и количественном составе клеток крови в научной литературе немногочисленны.

Результаты исследований, осуществленных на неоднородных по возрасту, полу и условиям обитания группах морских млекопитающих разных видов не дают возможности сформировать единое представление об адаптивных

изменениях в организме, происходящих в новых для него экологических условиях, раскрыть механизмы этих изменений. Мало изучены вопросы, связанные с влиянием ноогенных условий на клеточный иммунитет, а работы, посвященные исследованию этой проблеме в период адаптации к неволе вообще единичны (Романов, Сергиевская, 1989; Швацкий и др.1990, Романов, 1991; Матишева, Шапунов, 1990; Соколова, 2002, 2006). Отсутствуют комплексные исследования, позволяющие оценить связь адаптивных изменений, развивающихся на клеточном и субклеточном уровне, с регуляторными влияниями организма.

В экспериментальных и клинических исследованиях установлено, что определение клеточного состава крови по морфологическим и цитохимическим признакам позволяет не только определять, но и прогнозировать состояние систем специфического и неспецифического иммунитета и организма в целом (Соколов и др.,1975; Голубева и др., 1978; Исаева, 1980; Комиссарова, 1983; Нарциссов, 1984, 1988; Робинсон и др., 1986; Гольдберг, Новицкий, 1986; Нагоев, 1988; Летягин, Шурлыгина, 1987).

Проведение комплексных исследований с изучением морфологии и метаболизма клеток крови морских млекопитающих различных видов дает возможность выяснить механизмы приспособительных изменений, связанных с водной средой обитания, происходящих на клеточном уровне, а также при адаптации к новым экологическим условиям и при различных физиологических и патологических состояниях.

Цель исследования. Выявить характер и закономерности изменений качественного и количественного состава клеток периферической крови представителей китообразных и ластоногих по морфологическим и цитохимическим признакам в связи со спецификой среды обитания, а также в различные периоды адаптационного процесса в условиях неволи.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

1. Провести сравнительный цитологический и цитохимический анализ, дать характеристику особенностей клеток крови дельфинов и тюленей.
2. Определить возрастные особенности клеточного состава крови тюленей.
3. Выяснить структуру популяции лимфоцитов периферической крови дельфинов афалин для поиска критериев оценки состояния лимфоидной системы, ее зависимость от физиологического статуса животных. Выявить изменения гематологических показателей при адаптации дельфинов и тюленей к условиям неволи.
4. Определить цитологические и цитохимические показатели при воздействии различных иммуномодулирующих и экстремальных факторов на дельфинов и тюленей.

Научная новизна результатов работы. Впервые в природных условиях и у адаптирующихся к неволе тюленей выявлено уравнивание на определенных этапах индивидуального развития числа лимфоцитов и нейтрофилов – "физиологический перекрест" лейкоцитарной формулы крови, обусловленный формированием системы специфического иммунитета. Установлено, что изменения клеточного состава крови у тюленей на ранних этапах адаптации к

условиям неволи (3 недели) в значительной степени обусловлены стрессом. После 10-12 месяцев адаптации цитохимическая структура популяции лимфоцитов крови стабилизируется.

Впервые проведено сравнительное морфологическое и морфометрическое исследование районов организаторов ядрышка лимфоцитов периферической крови представителей морских млекопитающих девяти видов. Создана основа для оценки изменений в важнейшей части генома, связанной с синтезом белков, в онтогенезе, при заболеваниях, различных физиологических состояниях у китообразных и ластоногих. Показано, что активность ядрышкового аппарата лимфоцитов серого и гренландского тюленей снижается с возрастом, отражая интенсивность развития лимфоидной системы в различные периоды раннего постнатального онтогенеза.

Показано, что лимфоциты дельфинов афалин различаются по количеству и характеру внутриклеточного распределения окрашенных продуктов цитохимических реакций на неспецифическую эстеразу, сукцинатдегидрогеназу, НАДН- и НАДФН-тетразолий редуктазы, гликоген, нуклеиновые кислоты, в состав популяции лимфоцитов периферической крови афалин входят две группы клеток – с высокой и с низкой активностью неспецифической эстеразы и дегидрогеназ, аналогичные выявляемым у наземных млекопитающих. Установлено, что корреляции между цитохимическими характеристиками популяции лимфоцитов афалин соответствуют особенностям внутриклеточных метаболических процессов. Найдено, что состав популяции лимфоцитов по активности неспецифической эстеразы и сукцинатдегидрогеназы, сила и направленность корреляций параметров распределения лимфоцитов по активности этих ферментов и числа гликогенсодержащих лимфоцитов различны у здоровых, больных инфекционными заболеваниями, адаптированных и не адаптированных к условиям неволи афалин.

Впервые проведено комплексное исследование морфологических и структурно-метаболических показателей клеточного состава крови в процессе систематического наблюдения за группами морских млекопитающих, пребывающих в различных условиях. Показаны пути адаптации, связанные с водным образом жизни, сходные у китообразных и ластоногих.

Практическая и теоретическая значимость работы. Результаты изучения механизмов формирования экологически обусловленного уровня резистентности организма дельфинов и тюленей могут быть использованы для разработки профилактических мероприятий, методов контроля адаптации иммунной системы в новых условиях проживания. Полученная информация позволяет понять и оценить предпосылки формирования иммунодефицитных проявлений, достаточно часто встречающихся в условиях загрязнения воздушной и водной среды обитания, расширить представления об эволюции системы крови. Результаты работы могут использоваться при объяснении механизмов изменений, происходящих на клеточном уровне, как при адаптации человека и животных к новым условиям обитания, так и для лучшего понимания механизмов специфических и неспецифических адаптационных реакций.

Полученные материалы используются при чтении лекционных курсов и проведении практических занятий для студентов биологического факультета Мурманского государственного технического университета.

Основные положения, выносимые на защиту. 1. Период становления костномозгового кроветворения у детенышей тюленей занимает относительно большую часть постнатального онтогенеза, чем у наземных млекопитающих. Это, вероятно, обусловлено меньшим количеством костного мозга у ластоногих и мелких китообразных, обладающих в связи с водным образом жизни более легким скелетом.

2. Структура популяции лимфоцитов по морфологическим и цитохимическим признакам адекватно отражает изменения, происходящие в системе крови дельфинов и тюленей с возрастом, при изменениях иммунологического статуса и воздействии экстремальных факторов. Показатели клеточного состава крови и структурно-метаболического статуса лимфоцитов могут быть использованы для оценки течения процесса адаптации и зависят от регуляторных влияний целостного организма на различных его этапах.

3. Морфологическое и цитохимическое изучение клеток крови дельфинов и тюленей позволяет различать особей, по-разному реагирующих на воздействие иммуномодулирующих и экстремальных факторов. Неадаптированные к условиям неволи афалины отличаются от адаптированных высоким уровнем корреляций между параметрами распределения лимфоцитов по активности неспецифической эстеразы, сукцинатдегидрогеназы и содержания гликогена, т.е., более высокой метаболической активностью лимфоидной системы. Резкие колебания состава лимфоцитов при состояниях, сопровождающихся иммунодепрессией, можно рассматривать как косвенное доказательство сниженной иммунологической реактивности морских млекопитающих в современной среде обитания.

Апробация материалов диссертации. Результаты работы докладывались и обсуждались на 8 и 9 Всесоюзных совещаниях по изучению, охране и рациональному использованию морских млекопитающих (Астрахань, 1982; Архангельск, 1986); I съезде анатомов, гистологов, эмбриологов Белоруссии (Минск, 1984); Всесоюзной конференции по физиологии морских животных (Мурманск, 1989); Международном симпозиуме по изучению морских млекопитающих (Тромсø, Норвегия, 1994); евро-американском конгрессе по изучению млекопитающих (Santiago de Compostela, Испания, 1998); VI и VII съездах Териологического общества РАН (Москва, 1999, 2003); международных научно-технических конференциях "Наука и образование" (Мурманск, 2005, 2007); I Съезде физиологов СНГ (Сочи, 2005); 13 Международном совещании по эволюционной физиологии (СПб, 2006); Международной научно-практической конференции "Морские биотехнические системы. Биологические и технические аспекты" (Ростов-на-Дону, 2008); II международной конференции "Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных" (Саранск, 2009); 4 международном симпозиуме "Современные проблемы и методы экологической физиологии и патологии млекопитающих, введенных в зоокультуру" (Петрозаводск, 2009); на I-VI конференциях "Морские

млекопитающие Голарктики" (Архангельск, 2000; Иркутск, 2002; Коктебель, 2004; Санкт-Петербург, 2006; Одесса, 2008; Калининград, 2010).

Публикации. Всего по теме диссертации опубликовано 96 научных работ, в том числе 15 в ведущих научных журналах, перечень которых утвержден ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 242 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы "Материалы и методы исследования", 4-х глав с результатами исследований и их обсуждением, заключения, выводов, списка литературы, включающего 409 источников, из которых 206 на русском языке, содержит 77 рисунков и 32 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ КРОВИ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (обзор литературы)

Показано, что, несмотря на многолетний опыт изучения плазмы и клеток крови биохимическими и иммунологическими методами как в природных условиях, так и в условиях неволи, целостное представление об адаптационных возможностях морских млекопитающих отсутствует. Детальные исследования морфологии, свойств и функций клеток крови этих животных единичны. В результате анализа данных литературы, свидетельствующих о высокой диагностической и прогностической ценности комплексного применения морфологических и цитохимических методов, обосновываются цель и задачи исследования.

На основании анализа литературных данных представлены сведения о различных формах патологии у морских млекопитающих. Рассмотрены результаты исследований, посвященных проблеме оценки и охраны здоровья китообразных и ластоногих. Подчеркивается, что необходим переход с ретроспективно-констатационного на прогностическое направление исследований.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования: дельфин афалина (*Tursiops truncatus*), обыкновенная морская свинья (*Phocoena phocoena*), белуха (*Delphinapterus leucas*), гренландский (*Phoca groenlandica*) и серый (*Halichoerus grypus*) тюлени, тюлень-хохлач (*Cystophora cristata*), морской заяц (*Erignatus barbatus*), кольчатая нерпа (*Phoca hispida*), северный морской котик (*Callorhinus ursinus*). Материалы были получены в дельфинарии г. Севастополя (после 1991г. – Государственный океанариум Украины), на морской биологической станции ИПЭЭ РАН (пос. Малый Утриш); в аквариальном комплексе ММБИ; во время береговых экспедиций на острова побережья Мурмана и на зверобойном промысле (пос. Чапома Мурманской области, пос. Койда Архангельской области).

Общее число исследованных животных составило: афалина – 55; белуха – 2; обыкновенная морская свинья – 6; гренландский тюлень – 256; серый тюлень – 36; тюлень-хохлач – 13; кольчатая нерпа – 5; морской заяц – 2; северный морской котик – 1.

Методики исследования. Кровь у дельфинов и белух брали при помощи стерильной иглы для подкожных инъекций длиной 30 мм и диаметром 1.2 мм по методике, описанной С. Риджвеем и соавторами (Ridgway et al., 1970). Взятие крови у тюленей осуществляли из внутривенной (экстрадуральной) вены (Geraci, Smith, 1975) при помощи иглы для спинномозговой пункции в шприц с гепарином, удерживая тюленя в неподвижном состоянии 2-3 мин.

Изготовленные общепринятым способом мазки цельной крови и лейкоцитарного концентрата окрашивали смесью Романовского. Применяли также следующие цитохимические методики. Выявление ферментов: неспецифической эстеразы (Müller et al., 1975, в модификации) – для оценки состояния лизосомного аппарата; сукцинатдегидрогеназы (Quaglino, Nayhoe, 1960; Нарциссов, 1969) как ключевого фермента цикла Кребса; НАДН- и НАДФН-тетразолий редуктаз (Novikoff, Masek, 1958) – в качестве показателей общей интенсивности окислительных процессов в клетке. Выявляли также гликоген (McManus, 1946; Hochkiss, 1948), суммарное количество нуклеиновых кислот при окрашивании смесью галлоцианин-хромовые квасцы (Boer, Sarnaker, 1956), белки районов организаторов ядрышка (Howell, Black, 1980). Препараты исследовали при увеличении 1000 (объектив $\times 100$, окуляр $\times 10$). Морфометрическое исследование лимфоцитов проводили на компьютерных анализаторах изображений "Omnicon" (США, модель FAS-2) и AxioVision, версия 4.5 (Германия, CarlZeiss Vision). Мерой активности ферментов и содержания нуклеиновых кислот служила интегральная оптическая плотность, активности ядрышек – относительная площадь районов организаторов ядрышка.

Математические методы анализа результатов. Обработку полученных результатов проводили при помощи пакетов программ Statsoft Statistica V6.0, Excel, Systat 5W. При статистических оценках и сравнениях клеточного состава крови по морфологическим и цитохимическим признакам использовали стандартные параметрические и непараметрические методы (Урбах, 1963). Для оценки структуры популяции лимфоцитов по цитохимическим признакам использовали следующие характеристики: средняя (M); среднеквадратичное отклонение (S); коэффициент вариации (V); показатели асимметрии (A_s) и эксцесса (E_x), энтропия (H), информационная избыточность (R). $H = -\sum P \times \log P$, где P – относительная частота клеток в данном классе гистограммы; $R = ((H_m - H)/H_m) \times 100$, где H_m – энтропия, максимально возможная для гистограммы с данным числом классов – при равенстве частот всех классов, H – действительная энтропия гистограммы. Информационный анализ проводили в соответствии с методическими рекомендациями А.С. Леонтьюка и соавторов (1981).

В качестве показателей для оценки особенностей клеточного состава крови при сравнении групп животных и отдельных особей применяли критерии Колмогорова-Смирнова, χ^2 , Стьюдента. При анализе субпопуляционного состава лимфоцитов использовали методы аппроксимации распределений нормальными, гауссовыми (Урбах, 1963; Bhattacharia, 1969). Достоверность значений статистических параметров и сходства-различия при статистических сравнениях оценивали при уровнях значимости 0.95 и 0.99.

Глава 3 МОРФОЛОГИЯ И ЦИТОХИМИЯ КРОВИ ДЕЛЬФИНОВ И ТЮЛЕНЕЙ

3.1 Морфологическая характеристика различных типов клеток крови дельфинов и тюленей

В окрашенных по Романовскому-Гимза мазках крови афалин, обыкновенных морских свиней и белух наиболее многочисленный тип лейкоцитов – нейтрофилы. Гранулоцитарный профиль лейкоцитарной формулы крови характерен и для тюленей. Однако в некоторые периоды раннего постэмбрионального развития у серых, гренландских и тюленей хохлачей, как и у ряда исследованных в данном отношении наземных животных, число лимфоцитов достигает уровня нейтрофилов либо превышает его. Цитоплазма нейтрофильных гранулоцитов тюленей, как правило, окрашивается менее интенсивно, чем у дельфинов. Гранулы слабо различимы. Такая же особенность окрашивания по Романовскому-Гимза свойственна нейтрофилам наземных хищных млекопитающих – собак и кошек (Риган и др., 2000). Большинство гранулоцитов тюленей имеют сегментированные или палочковидные ядра. Однако у новорожденных и кормящихся молоком серых и гренландских тюленей в значительном числе встречаются юные, т.е., низкодифференцированные клетки гранулоцитарного ряда, метамиелоциты. Метамиелоциты присутствуют также у дельфинов афалин, как больных, так и здоровых.

В мазках крови серых тюленей встречаются клетки с сегментированным ядром и розовыми цитоплазматическими гранулами неправильной формы с размытыми границами, "гетерофилы". Их число у обследованных серых тюленей составляет 0-2.5% от всех гранулоцитов. Такие лейкоциты выявляются у собак (Риган и др., 2000). Гетерофилы – обычный компонент крови сиреновых (Bossart, Bigger, 1994; Bossart et al., 2001). Они дают положительную реакцию на миелопероксидазу (МПО), подобно нейтрофилам человека, собаки, кошки и лошади (Kiehl, Schiller, 1994).

Сопоставление результатов морфологического исследования и выявления миелопероксидазы в мазках крови серых тюленей свидетельствует, что гетерофилы серых тюленей также МПО–положительны. Это позволяет отнести их к нейтрофильному ряду. Другой заметной особенностью состава крови серых тюленей является наличие гигантских тромбоцитов, обычного компонента крови кошек, вне зависимости от состояния животных (Риган и др., 2000).

Среди гранулоцитов тюленей встречаются клетки с ядрами необычной формы: отдельные сегменты соединены друг с другом нитями хроматина, сходящимися в одной точке (рис. 1), а не последовательно, как у человека, лабораторных и сельскохозяйственных животных (Никитин, 1956; Кудрявцев и др., 1969; Абрамов, 1985; Риган и др., 2000). Это, вероятно, является одной из особенностей дифференцировки части клеток миелоидного ростка кроветворения у тюленей. Выявлены также лейкоциты, представляющие, по-видимому, предшествующую стадию дифференцировки (рис. 1г).

У дельфинов и белух клетки с характерными признаками базофильных гранулоцитов не обнаружены. В мазках крови тюленей они присутствуют, однако не во всех случаях. Ядро этих клеток, как правило, не сегментировано, по размеру они больше нейтрофилов и зозинофилов. По литературным данным, их число у

ластоногих невелико: 0–2 % (Medway, Geracy, 1964; Ridgway et al., 1970; Богданова, Лебедев, 1971; Monte, Pilleri, 1979; Engelhardt, 1979), а у китообразных они, как правило, не выявляются.

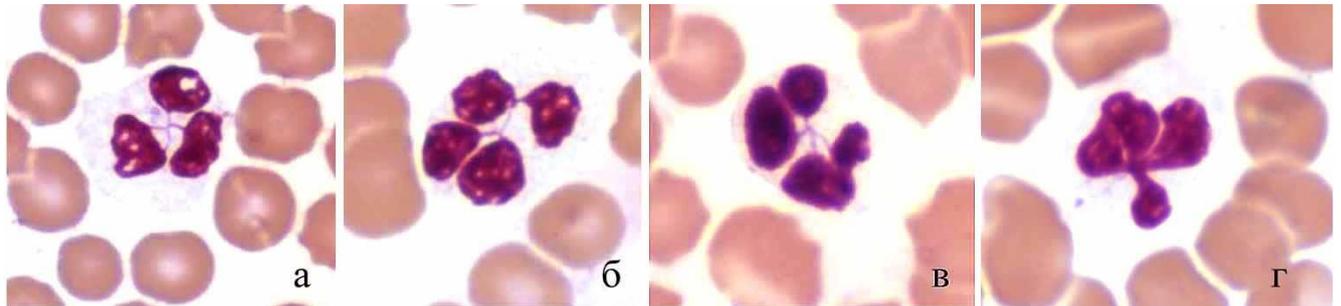


Рис. 1. Лейкоциты тюленей с ядрами необычной формы. Масляная иммерсия, объектив 100×.

Среди лимфоидных клеток дельфинов, белух и тюленей наиболее часты типичные малые лимфоциты с узким ободком базофильной цитоплазмы. Некоторые из лимфоцитов дельфинов и тюленей имеют необычную форму ядра: 2 выемки на одном полюсе и третья, менее глубокая, – на другом (рис. 2д).

Кроме типичных малых и средних лимфоцитов как у здоровых дельфинов, так и у афалин с кожными и респираторными инфекциями присутствуют лимфоциты больших размеров с признаками активации. Ядра этих клеток округлые, реже почковидные, хроматин рыхлый, цитоплазма сильно базофильна (рис. 2е, ж).

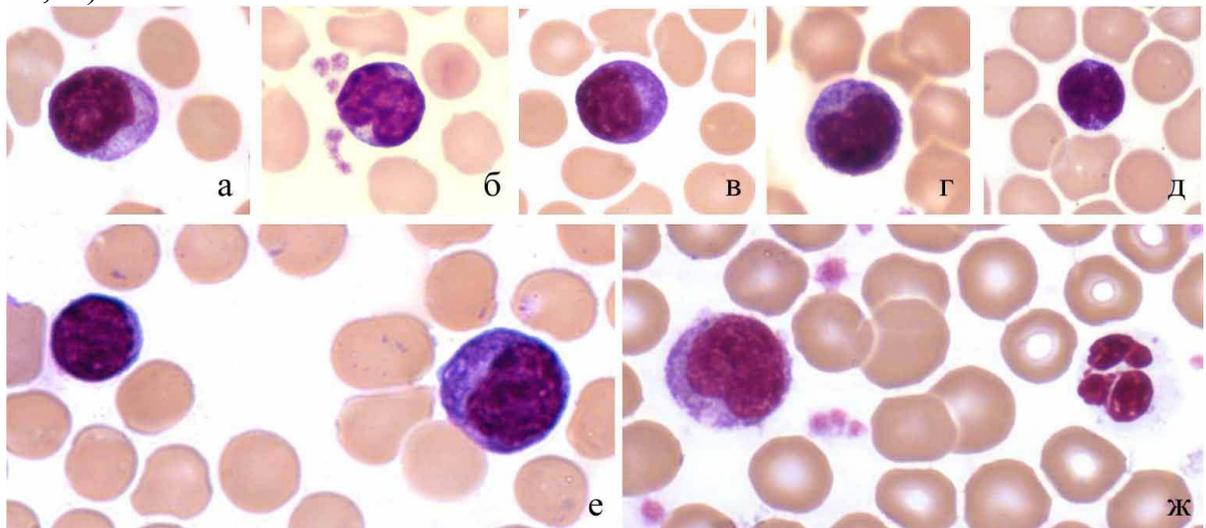


Рис. 2. Лимфоциты серого тюленя: а-д – малые лимфоциты; е – малый и большой лимфоциты; ж – большой лимфоцит и нейтрофил. Масляная иммерсия, объектив 100×.

Большие лимфоциты выявлены у всех исследованных детенышей тюленей. Небольшое количество таких клеток (2-5%) встречается и у взрослых гренландских тюленей. У некоторых щенков гренландского тюленя ("заморышей" и "нормальных") число больших лимфоцитов повышено (20-25%). Больные пневмонией белухи и обыкновенные морские свиньи в начале отравления нефтепродуктами также отличались повышенным (15-20%) содержанием больших лимфоцитов.

В цитоплазме части средних лимфоцитов различимы азурофильные метакроматически окрашенные гранулы, часто очень мелкие, на пределе разрешающей способности светового микроскопа. Их число колеблется от единиц до десятков. Азурофилией (на электронно-микроскопическом уровне – осмиофилией) обладают лимфоциты, осуществляющие естественную, не индуцированную иммунизацией, цитотоксичность против опухолевых и инфицированных вирусами клеток (Малыгин, 1985). Такие клетки, "большие гранулярные лимфоциты" (БГЛ), выявлены нами у всех представителей изучаемых видов дельфинов и тюленей. БГЛ, вероятно, являются предшественниками Т-лимфоцитов в эволюции системы иммунитета позвоночных (Jams, 1988). Соотношение БГЛ, других субпопуляций лимфоцитов, а также гранулоцитов и моноцитов может быть использовано как показатель, отражающий потенциальный уровень клеточных защитных реакций различной степени специфичности.

Моноциты дельфинов, морских свиней и белух отличаются большим разнообразием по величине клетки, форме, плотности и относительным размерам ядра. Часть их содержит в цитоплазме мелкие азурофильные гранулы. В типичных случаях ядро бобовидное, подковообразное или неправильной формы с одной или несколькими лопастями. Некоторые моноциты небольших размеров сходны с лимфоцитами (рис. 3).

Тем не менее, судя по структуре хроматина и характеру окрашивания цитоплазмы, принадлежность этих клеток к моноцитарному ряду более вероятна. Подобные трудности при различении моноцитов и лимфоцитов китообразных отмечают Т. Монт и Г. Пиллери (Monte, Pilleri, 1979).

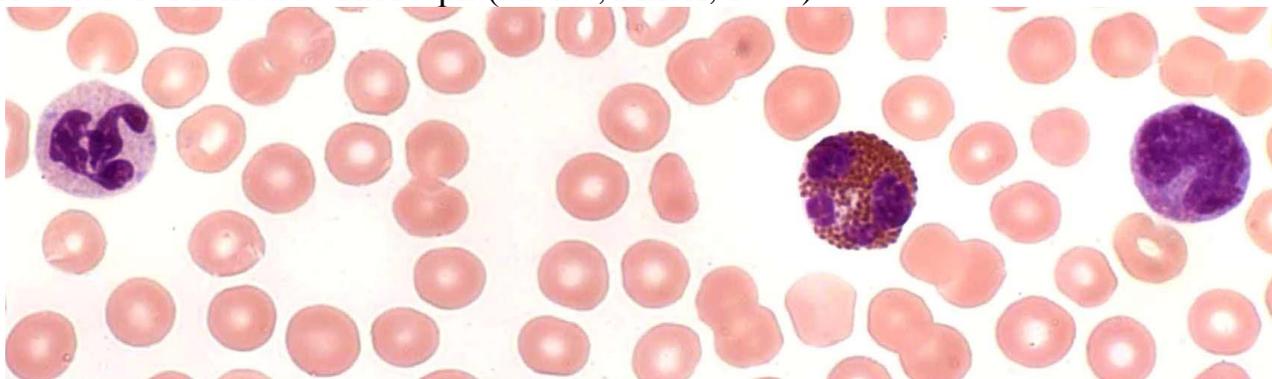


Рис. 3. Лейкоциты афалин: нейтрофил, эозинофил и моноцит. Масляная иммерсия, объектив 100×.

Моноциты тюленей менее разнообразны по морфологии ядра. Как правило, это клетки больших размеров (больше гранулоцитов), с многолопастным светлым ядром неправильной формы. В цитоплазме этих клеток зачастую присутствуют вакуоли диаметром 0.5-2 мкм.

В крови тюленей присутствуют предшественники эритроцитов, базофильные и полихроматофильные нормоциты. Особенно часто они встречаются у новорожденных животных. В мазках крови последних содержатся также предшественники нормоцитов, пронормоциты. И для бельков, и для серок тюленей характерны анизоцитоз и гипохромность эритроцитов. Костномозговое кроветворение новорожденных тюленей находится на стадии становления. Кроме

того, тюлени в течение голодания после молочного вскармливания и ювенильной линьки не получают железа, витамина В₁₂ и других веществ, необходимых для нормального кроветворения. Это может обусловить и анизоцитоз эритроцитов, и наличие в периферической крови нормоцитов. Оксифильные и полихроматофильные нормоциты а также гипохромные эритроциты постоянно встречаются также в мазках крови взрослых дельфинов.

1.2 Цитохимические реакции в лейкоцитах морских млекопитающих

Неспецифическая эстераза. Лейкоциты изученных китообразных и ластоногих различаются интенсивностью и характером реакции на неспецифическую эстеразу (НЭ). Гранулоциты афалин, морских свиней и белух в большинстве случаев проявляют реакцию в виде слабой диффузной окраски (рис. 4г), иногда эстеразоотрицательны. Наиболее высока активность фермента в моноцитах. Продукт реакции распределен в них диффузно, закрывая часть ядра, которое выглядит как более светлая область на коричневом фоне (рис. 4м).

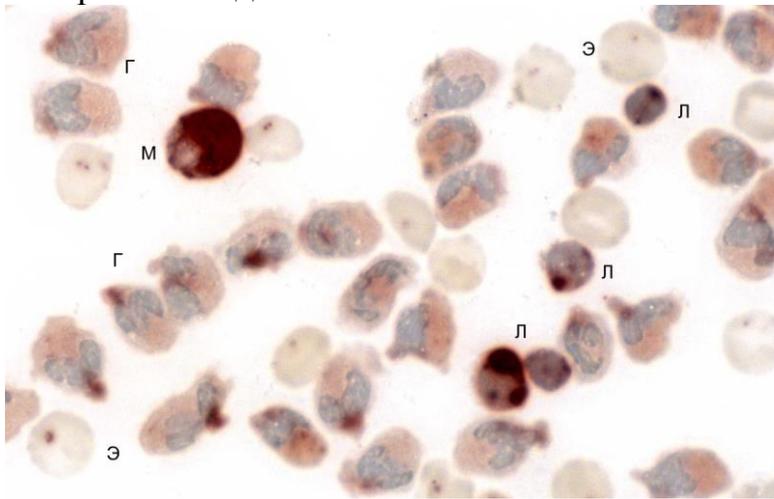


Рис. 4. Неспецифическая эстераза в клетках крови афалины: Л – лимфоциты; М – моноцит; Г – гранулоциты; Э – эритроциты. Лейкоцитарный концентрат, масляная иммерсия, объектив 100×.

В моноцитах НЭ находится в клеточной мембране, в то время как в лимфоцитах она связана главным образом с лизосомами

и лишь изредка обнаруживается на мембране клетки (Bozdeh, Bainton, 1981; Boesen, 1984).

В гранулоцитах тюленей, в отличие от дельфинов и белух, активность НЭ, как и в моноцитах, высока. Она проявляется в виде диффузных отложений окрашенного продукта реакции, часто закрывающих часть ядра. Характерно, что гранулоциты норки и песца также имеют высокую активность НЭ (Uzenbaeva, 1989). Это представляет интерес, поскольку предками тюленей были древние хищные.

Лимфоциты разнообразны по размерам, форме, числу и локализации зон, содержащих окрашенный продукт реакции. Число последних варьирует от 1 до 20 и более в одном лимфоците. Величина гранул колеблется в широких пределах: от долей до нескольких микрометров. Наиболее крупные из них располагаются напротив выемки в ядре, где у лимфоцитов находится основная масса цитоплазмы.

При визуальном микроскопическом исследовании различимы два типа реакции на НЭ: "гранулярная" (рис. 5в) и "парануклеарная" (рис. 5г). Тип эстеразной реакции лимфоцитов, при котором часть цитоплазмы напротив

выемки в ядре заполнена окрашенным ее продуктом, обозначают как "глобулярный" (Treves, Ali-Khan, 1983), "крупногранулярный" (Уманский и др., 1981), "парануклеарный". Мы применяем термины, использованные авторами, представившими ультраструктурные и иммунологические характеристики лимфоцитов с различными типами эстеразной реакции (Ferrarini et al., 1980; Zicca et al., 1981). Реакцию парануклеарного типа на неспецифическую эстеразу, бета-глюкуронидазу и кислую фосфатазу проявляют нулевые клетки, Т-лимфоциты-супрессоры и киллеры. Гранулярная реакция характерна для Т-клеток-хелперов и части В-лимфоцитов.

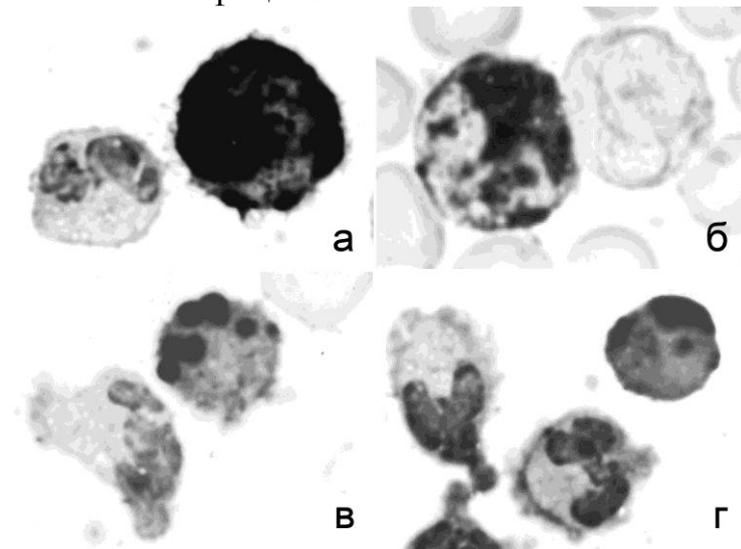


Рис. 5. Особенности распределения окрашенного продукта эстеразной реакции в клетках крови дельфинов: а и б – в моноцитах и гранулоцитах; в и г – в лимфоцитах и гранулоцитах. б – ядра не окрашены, а, в, г – ядра окрашены толуидиновым синим. Масляная иммерсия, объектив 90×.

Оба типа локализации окрашенного продукта эстеразной реакции выявлены нами в мазках

крови и лейкоцитарного концентрата афалин, обыкновенной морской свиньи, белухи, серого и гренландского тюленей, морского зайца, кольчатой нерпы, тюленя-хохлача, северного морского котика.

Дегидрогеназы. При использовании в реакционной смеси в качестве красителя (акцептора электронов) нитро-тетразолия синего (Novikoff, Masek, 1958; Quaglino, Nayhoe, 1960) наблюдается окрашивание в виде диффузных отложений и отдельных гранул. Последний тип реакции характерен для сукцинатдегидрогеназы (СДГ). В реакциях на НАДН- и, в особенности, НАДФН-тетразолий редуктазу преобладает диффузная окраска. Эти различия вполне объяснимы известными данными биохимии о внутриклеточной локализации и функциях окислительных ферментов (Ленинджер, 1985).

Характер реакции на СДГ с пара-нитротетразолием фиолетовым при ее выявлении по методу Р.П. Нарциссова (1969) для визуальной количественной оценки активности дегидрогеназ отличается от описанного выше. Весь продукт реакции сосредоточен в отдельных гранулах одинакового размера.

Гликоген. В отличие от прочих лейкоцитов, окрашивающихся диффузно, содержащие гликоген (ШИК-положительные) лимфоциты афалин, морских свиней и белух содержат гранулы ярко-красного цвета.

Такой тип реакции характерен для лимфоцитов человека и других наземных млекопитающих (Бутенко и др., 1974; Кисляк, Ленская, 1978; Хейхоу, Кваглино, 1983). Гранулы чаще всего одиночные, изредка образуют замкнутое

кольцо вокруг ядра. По форме они, как правило, округлые, но бывают и овальными а также неправильной формы.

Только у 48 из 205 щенков гренландского тюленя обнаружены содержащие гликоген лимфоциты (1-2%). Это можно было бы объяснить отрицательным энергетическим балансом детенышей во время голодания после молочного вскармливания. Однако взрослые гренландские тюлени также имеют невысокое число лимфоцитов, дающих положительную реакцию на гликоген (1-5%). У людей до одного года значения этого показателя составляют 33-84%, от 16 до 35 лет – 16-32%, от 36 до 60 лет – 6-26% (Лецкий, 1973). В лимфоцитах взрослых особей и щенков серого тюленя и кольчатых нерп, половозрелых самца и самки морских зайцев, северного морского котика гликоген нами не выявлен. Лимфоциты собак также, как правило, ШИК-отрицательны (Бутенко и др., 1974). *Белки районов организаторов ядрышка (ЯОРАg)*. Белки ядрышек, участвующие в процессах биосинтеза и созревания пре-рРНК, окрашиваются солями серебра (Срокер, 1990). Число и размеры ЯОРАg лимфоцитов крови – видоспецифичные признаки. Они изменяются при нарушениях в соответствующих участках генома и патологических состояниях (Maug et al., 1983). В лейкоцитах исследованных представителей китообразных и ластоногих выявляются от 1 до 4-х ЯОР. Это согласуется с результатами цитогенетическими исследований: кариотип соматических клеток исследуемых видов морских млекопитающих содержит 2 пары хромосом с организаторами ядрышка (Arnason, 1974, 1981). Лимфоциты, моноциты и гранулоциты дельфинов и тюленей различаются по размерам, форме, числу и локализации ЯОРАg (рис. 6).

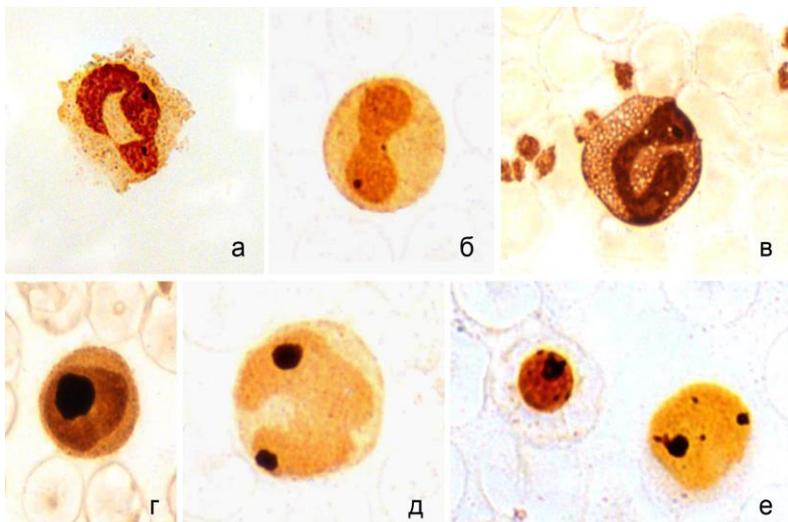


Рис. 6. Окрашенные серебром районы организаторов ядрышка в клетках крови серого тюленя: а, б – сегментоядерный и палочкоядерный гранулоциты; в – эозинофил; г – лимфоцит; д – моноцит; е – нормоцит и лимфоцит.

Таким образом, клетки крови дельфинов и тюленей проявляют высокий уровень гетерогенности по цитохимическим признакам. Особенно разнообразна картина реакции на неспецифическую эстеразу: лимфоциты различаются размерами, формой, числом и локализацией окрашенного продукта реакции. Среди них присутствуют клетки, обладающие морфологическими и цитохимическими особенностями, по которым у наземных млекопитающих различаются лимфоциты наземных млекопитающих с различными иммунологическими свойствами и функциями. Эти характеристики отражают,

по-видимому, и функциональную разнородность лимфоцитов морских млекопитающих.

3.3 Количественный анализ структуры популяции лимфоцитов крови афалин по цитохимическим признакам

Форма распределения лимфоцитов афалин по активности ферментов и содержанию нуклеиновых кислот разнообразна. Встречаются как одно-, так и многовершинные гистограммы. Лишь 16 из 126 распределений близки к нормальным по низким значениям показателей асимметрии и эксцесса ($P=0.99$). Характерно, что среди распределений лимфоцитов по активности НЭ близких к нормальным не оказалось.

Положительные асимметрия и эксцесс свидетельствуют, что в популяции лимфоцитов крови афалин присутствует большая группа клеток с относительно низкими значениями цитохимических признаков и что группы лимфоцитов, различающиеся по цитохимическим характеристикам, сильно перекрываются (табл. 1). Вариабельность распределения по суммарному содержанию ДНК и РНК ниже, чем по активности ферментов, оно обладает наименьшей асимметрией. По-видимому, лимфоциты периферической крови афалин, как и исследованных в данном отношении видов наземных млекопитающих, различаются, главным образом, количеством РНК. Последнее подтверждается тем, что распределения лимфоцитов после обработки РНК-азой, в отличие от необработанных, унимодальны и сдвинуты влево.

Таблица 1 Статистические параметры суммарных распределений лимфоцитов афалин по активности ферментов и содержанию нуклеиновых кислот.

№	Реакции	Количество клеток	$M \pm m$, усл.ед.	V, %	As	Ex
1.	НЭ	2188	1.71 ± 0.03	69.6 ± 1.5	1.300 ± 0.052	1.390 ± 0.104
2.	СДГ	2700	0.75 ± 0.01	67.9 ± 1.3	1.075 ± 0.047	1.354 ± 0.094
3.	НАДНр	2700	1.60 ± 0.02	60.1 ± 1.1	1.018 ± 0.047	0.917 ± 0.094
4.	НАДФНр	2600	1.35 ± 0.02	66.3 ± 1.3	1.144 ± 0.048	1.198 ± 0.096
5.	ДНК+РНК	2400	5.08 ± 0.02	17.1 ± 0.3	0.598 ± 0.050	1.320 ± 0.100

Исходя из того, что гетерогенность по цитохимическим признакам рассматривается как проявление метаболических различий между субпопуляциями лимфоцитов с различными иммунологическими функциями, мы провели попарное сравнение гистограмм распределения лимфоцитов по различным признакам и по каждому из признаков в отдельности – с суммарными распределениями по критерию Колмогорова-Смирнова (λ). По общему числу сходных гистограмм (при определении степени сходства как по каждому признаку, так и между признаками) больные афалины отличаются и от здоровых, и от беременных (36.5%, 49.5% и 49.7%, соответственно, $P=0.99$).

Суммарные гистограммы различаются (сравнение по критерию хи-квадрат, $p < 0.001$). Численность же лимфоцитов в классах со значениями, большими средних, наоборот, одинакова ($p < 0.01$) в 9 случаях из 10 (табл. 2).

Разложение суммарных распределений на нормальные составляющие по В.Ю. Урбаху (1963), показало, что число клеток с высокой (выше средней)

активностью ферментов равно: НЭ – 13.1%; СДГ – 11.0%; НАДНр – 13.6%; НАДФНр – 13.1%. Средние этих групп лимфоцитов выше средних суммарных распределений в 1.9-2.4 раза. Сходный результат был получен при анализе субпопуляционного состава лимфоцитов человека и лабораторных животных по активности дегидрогеназ (Катосова, 1971; Михайлова и др., 1972; Соколов и др., 1975; Нарциссов, 1978; Робинсон и др., 1986).

Таблица 2 Сопряженность суммарных частот лимфоцитов с высокими значениями цитохимических признаков (нумерация признаков согласно табл. 1)

Пары признаков, χ^2									
1-2	1-3	1-4	1-5	2-3	2-4	2-5	3-4	3-5	4-5
1.35	8.15	3.00	0.87	3.20	0.37	0.04	1.35	3.78	0.64

Более точное определение числа и параметров нормальных компонент в составе суммарных распределений проведено по методу Ч. Бхаттачариа (Bhattacharya, 1967). Оно оказалось неодинаковым для различных признаков: от трех для НАДНр до шести для СДГ. Тем не менее, лимфоциты составляют две группы: многочисленную, с относительно низкими значениями средних и малочисленную из одного (в случае НЭ – из двух) нормального распределения со средней, выше общей средней в 2.5-3.4 раза для ферментов и в 1.4 раза – для нуклеиновых кислот. Таким образом, по крайней мере, часть лимфоцитов периферической крови афалин обладают одновременно высокими или низкими значениями нескольких параметров. Это, по данным литературы, различает Т- и В-лимфоциты у ряда видов животных.

Два основных дифференцировочных типа лимфоцитов (Т- и В-клетки) представлены множеством субпопуляций и клонов, стимуляция которых происходит при различных специфических воздействиях. Поэтому, для выяснения направленности и силы связей между цитохимическими признаками в популяции лимфоцитов в целом мы вычисляли коэффициенты линейной корреляции статистических и информационных параметров гистограмм распределения лимфоцитов, с различной степенью обобщения отражающих разнообразие клеток. Как существенные, приняты значения коэффициентов корреляции, достоверные при $P=0.95$ и $P=0.99$ (рис. 7, пунктирные и сплошные линии, соответственно).

По числу и силе корреляционных связей друг с другом цитохимические признаки неравноценны. Наибольшее число статистически значимых коэффициентов корреляции друг с другом имеют НАДН₂ и НАДФН₂-тетразолий редуктазы как ферментные системы, выполняющие функцию окисления коферментов-переносчиков электронов для энергозависимых биохимических реакций. В силу общности функции ферментов, а также наличия непосредственной метаболической связи между НАД и НАДФ, существенные корреляции между параметрами распределений по НАДНр и НАДФНр многочисленны.

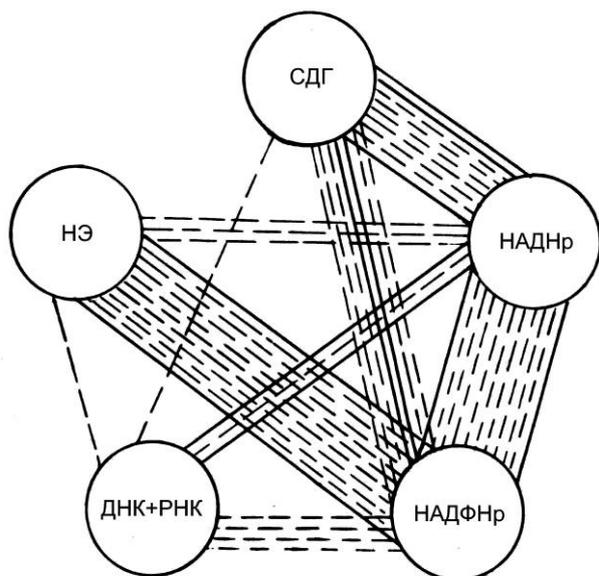


Рис. 7 – Корреляции между цитохимическими признаками лимфоцитов афалин

Характерно также, что из 9 корреляций распределений по содержанию НК 7 приходится на НАДнр и НАДФнр, поскольку синтез РНК, не прекращающийся в циркулирующих лимфоцитах, является энергозависимым процессом. Деятельность сукцинатдегидрогеназы непосредственно связана с НАД и НАДФ, что отражается в прочных корреляционных связях ее с параметрами распределения по активности НАДн- и НАДФн-

дегидрогеназ. Из 15 существенных корреляций НЭ 11 приходится на НАДФнр. Это отражает зависимость окислительно-восстановительных процессов в цитоплазме клетки от состояния ферментов лизосом. Промежуточным же переносчиком электронов в цитоплазматическом матриксе является НАДФн₂ (Ленинджер, 1985).

Наибольшее число существенных корреляций имеет НАДФн-тетразолий редуктаза. Согласно принципам метода корреляционных плеяд (Терентьев, 1959), НАДФнр может играть роль признака-индикатора в данном комплексе цитохимических признаков.

Несмотря на существование у морских млекопитающих особенностей обмена веществ, связанных с водным образом жизни, направленность и сила корреляций между параметрами, отражающими состав популяции лимфоцитов афалин по цитохимическим признакам, соответствует принятой общей схеме внутриклеточных метаболических процессов.

Глава 4 ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КРОВИ ТЮЛЕНЕЙ

4.1 Серые тюлени

Определение лейкоцитарной формулы крови щенков серых тюленей различных возрастных групп позволило выявить существенные различия между ними у животных, закончивших молочное вскармливание, соотношения числа нейтрофилов (С) и лимфоцитов (Л) близко к 1 (рис. 8). К возрастным особенностям состава крови относится уравнивание в определенные периоды количества лимфоцитов и нейтрофилов, "физиологический перекрест". У человека это явление отмечается на 4-е сутки после рождения и в 4 года (Бобова и др., 2003). Позднее окончательно устанавливается нейтрофильный профиль крови. Периоды сближения числа нейтрофилов и лимфоцитов известны у лошадей, крупного рогатого скота, кроликов, свиней, кур (Любин, Конова, 2005; Бессарабов и др., 2009).

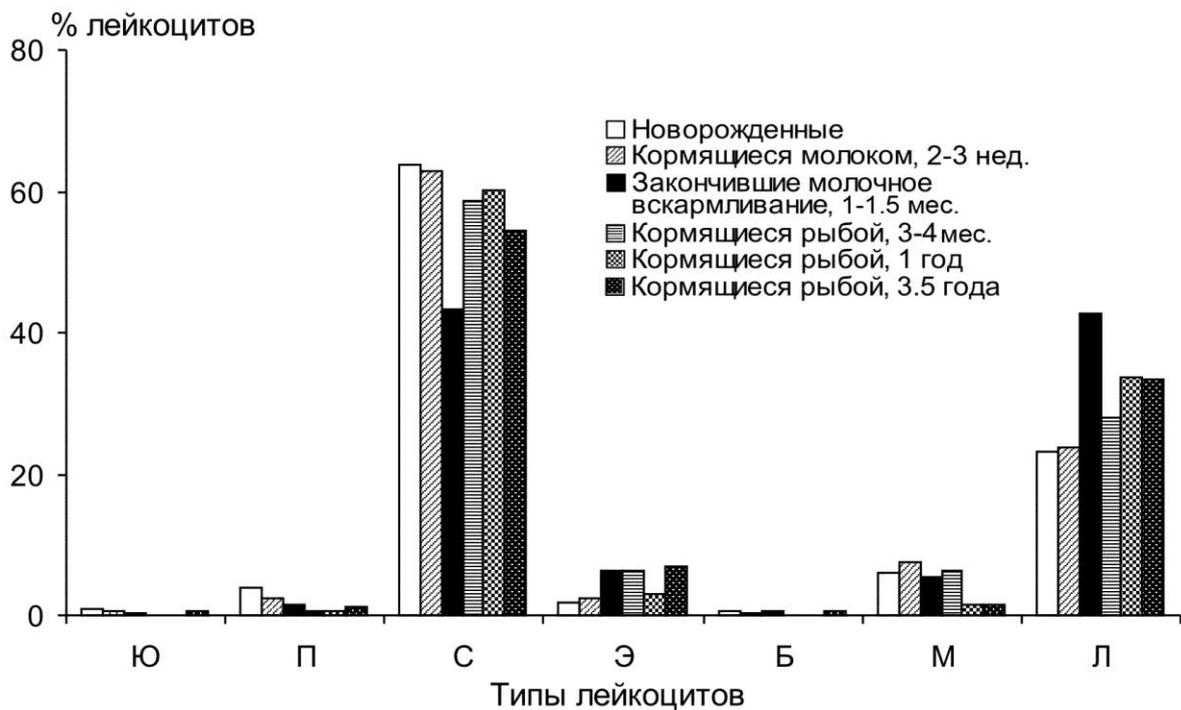


Рис. 8. Соотношение лейкоцитов различных типов у серых тюленей разного возраста.

Неспецифическая эстераза (НЭ) при коротком периоде окрашивания (2 часа) выявляется лишь в части лимфоцитов тюленей. У ряда видов млекопитающих: человека (Kulenkampff et al., 1977), обезьяны (Kato, Kurihara, 1980), овцы (Dixon, Moriarty, 1980), быка (Yang et al., 1979), мыши (Müller et al., 1975), крысы и кошки (Dockrell et al., 1978) а также обыкновенной жабы, *Bufo bufo* (Garavini, 1981), большинство эстеразоположительных лимфоцитов – Т-клетки. У серых тюленей число эстеразоположительных лимфоцитов значительно повышается к периоду начала самостоятельного питания (табл. 2), что, вероятно, связано с развитием иммунной системы, дифференцировкой Т-лимфоцитов. У новорожденных человека количество Т-клеток и эстеразоположительных лимфоцитов возрастают в первые недели жизни (Lassila, Alanen, 1982). При длительном периоде окрашивания (21 час) НЭ выявляется во всех лимфоцитах тюленей и дельфинов. Число гранул окрашенного продукта в реакции на НЭ (показатель уровня активности лизосомного аппарата клетки) снижается во время начала самостоятельного питания, а затем возрастает. Число лимфоцитов с парануклеарной эстеразной реакцией (ПН) (у человека это "нулевые" клетки, Т-супрессоры и "киллеры") также падает, а затем повышается, оставаясь, тем не менее, на более низком уровне, чем у новорожденных и кормящихся молоком детенышей ("бельки").

Среднее число ЯОРАg в одном лимфоците у тюленей, кормящихся рыбой (табл. 3), ниже, чем у остальных ($p=0.001-0.05$). Изменение величины отношения площади ЯОРАg к площади ядра также свидетельствует о снижении с возрастом активности организаторов ядрышка ($p<0.01$).

Таблица 2 Показатели лейкоцитов крови щенков серых тюленей ($M \pm m$)

№	Группы тюленей	ЯОРАg	НЭ, г/кл	ПН, %	НЭ ⁺ , %	Лф, %	Лкц $\times 10^9$
1	Новорожденные, n=8	1.52 \pm 0.05	2.87 \pm 0.27	19.0 \pm 3.6	44.0 \pm 2.8	23.3 \pm 2.2	11.5 \pm 1.3
2	Бельки, 2-3 нед., n=12	1.64 \pm 0.05	3.01 \pm 0.14	19.8 \pm 1.9	57.9 \pm 2.7	23.9 \pm 2.1	10.4 \pm 0.9
3	Серки, 1-1.5 мес., n=8	1.49 \pm 0.04	3.34 \pm 0.22	14.9 \pm 1.6	64.8 \pm 2.9	42.6 \pm 5.1	6.3 \pm 0.4
4	Кормящиеся рыбой, 3-4 мес., n=6	1.15 \pm 0.01	2.23 \pm 0.18	9.2 \pm 1.3	83.3 \pm 2.4	28.1 \pm 2.4	7.5 \pm 0.6
5	Кормящиеся рыбой, 1 год, n=4	1.05 \pm 0.01	2.80 \pm 0.04	10.2 \pm 1.5	96.7 \pm 0.5	33.7 \pm 4.7	11.3 \pm 0.8
6	Кормящиеся рыбой, 3.5 года, n=2	1.14 \pm 0.03	2.56 \pm 0.15	14.5 \pm 2.5	92.0 \pm 5.0	34.2 \pm 7.3	6.0 \pm 0.2

Примечание. ЯОРАg – среднее число окрашенных серебром районов организаторов ядрышка в одном лимфоците; НЭ – среднее число эстеразоположительных гранул в лимфоците; НЭ⁺ – число эстеразоположительных лимфоцитов; ПН – процент лимфоцитов с парануклеарным типом эстеразной реакции; Лф – относительное число лимфоцитов; Лкц – абсолютное число лейкоцитов в 1 л крови.

Таблица 3 Статистические параметры распределений лимфоцитов серых тюленей по величине отношения площади ЯОРАg к площади ядра

Группы тюленей	$M \pm m$	As	Ex	C.V., %
1	0.127 \pm 0.001	0.707	0.887	24.7
2	0.134 \pm 0.001	0.275	0.001	28.1
3	0.122 \pm 0.001	0.351	0.404	25.2
4	0.104 \pm 0.001	0.723	1.043	25.9
5	0.099 \pm 0.002	0.447	0.166	33.9
6	0.088 \pm 0.002	1.064	1.875	32.1

В первых 3-х группах тюленей а также в 5-й показатель эксцесса, т.е. "крутизна" распределения ниже, чем в 4-й и 6-й, что может быть обусловлено существованием в организме тюленей множества субпопуляций лимфоцитов, значительно различающихся по активности организаторов ядрышка.

Таким образом, после рождения, в течение лактации и затем после завершения молочного вскармливания, во время ювенильной линьки происходят значительные изменения лейкоцитарного состава крови детенышей серых тюленей. Представленные данные свидетельствуют, что у щенков серого тюленя становление клеточного иммунитета наиболее интенсивно происходит в первые 1.5 месяца жизни. В возрасте 3-4-х месяцев, когда животные начинают самостоятельно питаться рыбой, процессы пролиферации и дифференцировки лимфоидных клеток, осуществляющих реакции специфического иммунитета, замедляются.

4.2 Гренландские тюлени

В мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза, у гренландских тюленей, как и у многих видов наземных млекопитающих (Кудрявцев и др.,

1969), включая представителей отряда хищных, филогенетически наиболее близких к настоящим тюленям, численно преобладают нейтрофилы (табл. 4).

Таблица 4 Лейкоцитарная формула крови гренландских тюленей ($M \pm m$), %

Группа тюленей	Н	Э	Б	М	Л
1987 г.					
Серки, n = 12	68.5±3.2	3.5±0.4	1.0±0.3	9.6±0.8	17.4±2.5
1989 г.					
Серки, n = 10	65.2±4.4	4.1±1.5	0	5.3±1.0	25.4±4.1
1990 г.					
Серки, n = 11	63.6±2.3	2.0±0.3	0.3±0.2	4.5±0.8	29.6±2.9
1991 г.					
Серки, n = 65	64.2±1.2	1.8±0.2	2.2±0.3	7.8±0.5	24.0±1.2
Серки-заморыши, n = 21	64.8±2.6	1.5±0.4	2.4±0.6	8.6±0.9	22.7±2.5
1992 г.					
Серки, n = 10	60.8±5.8	1.6±0.6	0.2±0.1	9.0±0.1	28.4±6.6
Серки-заморыши, n = 10	61.3±4.0	2.0±0.4	0.2±0.1	10.1±1.1	26.4±4.4
Взрослые, n = 10	53.8±3.6	19.3±2.6	0.1±0.1	2.7±0.4	24.1±4.2
1994 г.					
Серки, n = 14	81.0±1.5	1.2±0.4	0.1±0.1	8.1±1.2	9.6±1.1
Серки-заморыши, n = 16	80.0±2.7	0.4±0.2	0.3±0.1	9.8±1.7	9.5±2.1
Хохлуши-заморыши, n = 11	81.4±7.4	0.6±0.3	0.2±0.1	10.6±1.6	7.2±2.2
1998 г.					
Бельки, n = 20	41.4±3.2	3.0±0.5	0.7±0.2	8.0±1.1	46.9±2.7
1999 г.					
Бельки, n = 45	40.7±3.0	1.7±0.3	0.7±0.2	4.6±0.8	52.3±2.8

Щенки 1994 года рождения имеют более низкое, чем детеныши предыдущих лет, относительное число лимфоцитов. Такие же сдвиги в лейкоцитарной формуле крови наблюдались у северных морских котиков при адаптации к неволе (Занина, Занин, 1990) и сивучей при 20-дневном голодании (Коваль и др., 1986). Мы не исключаем, что одной из причин этих различий может быть то, что от времени окончания молочного вскармливания до взятия крови у различных особей в разные годы прошло неодинаковое время. Однако отмеченную особенность формулы крови имеют как серки, нормально перелинявшие и нормально упитанные, так и серки-заморыши, и заморыши-хохлуши. В отличие от ушастых, у настоящих тюленей период голодания во время ювенильной линьки и некоторое время после нее является естественным. Кроме того, по количеству гликогена в гранулоцитах щенки разного возраста различаются незначительно (табл. 5). В 1991–1993 годах у щенков гренландских тюленей обнаружено ежегодное увеличение степени носительства микобактерий, представляющих потенциальную угрозу здоровью тюленей (Соколов и др., 1994). Состояние здоровья потомства зависит и от возраста самок, участвовавших в размножении, число молодых среди которых в 1980-е годы снизилось и продолжает падать (Тимошенко, 1998). Различия по средним значениям показателей лейкоцитарной формулы крови могут быть следствием воздействия любого из упомянутых факторов либо результатом их суммарного влияния.

Бельки имеют более высокое, чем остальные тюлени, число лимфоцитов. Такая особенность состава крови, наиболее вероятно, обусловлена активной пролиферацией лимфоцитов, связанной с развитием иммунной системы новорожденных. Об этом, в частности, свидетельствует повышенная активность организаторов ядрышка, являющаяся показателем потенциальных возможностей клеток синтезировать белки. Лимфоцитов, дающих положительную реакцию на неспецифическую эстеразу, у бельков гренландских, так же как и у серых тюленей, значительно меньше, чем у серок и взрослых (табл. 5).

Таблица 5 Цитохимические показатели гренландских тюленей различного возраста

Группы тюленей	НЭ ⁺ лимфоциты, %	ЯОРАg	Гликоген, у.е.
Бельки 1 нед.	32.4±1.6	1.53±0.03	1.60±0.15
"Заморыши" 1–1.5 мес.	77.5±4.4	1.30±0.03	1.67±0.06
Серки 1–1.5 мес.	67.4±6.1	1.25±0.02	1.70±0.08
Серки 3.5–4 мес.	72.0±6.4	1.21±0.03	1.79±0.13
Взрослые	84.7±2.2	1.17±0.06	1.53±0.06

Уровень эозинофилов, выявленный нами у взрослых гренландских тюленей, оказался необычно высоким (6.5–36.0%) по сравнению с данными литературы для ластоногих различных видов и наземных млекопитающих. В крови тюленей, как настоящих, так и ушастых, содержание этих лейкоцитов невелико – от нуля до нескольких процентов (Ridgway, 1972, Engelhardt, 1979). Эозинофилия – известная особенность крови китообразных (Monte, Pilleri, 1979). Наиболее вероятной причиной её возникновения считают паразитарные инвазии (Ridgway, 1972). Однако гельминтозы чрезвычайно распространены и среди ластоногих (Mirmann et al., 1984). Повышение же количества эозинофилов в периферической крови наблюдается при аллергических реакциях различного происхождения. Роль аллергенов могут играть и вещества, выделяемые гельминтами, и различные другие ксенобиотики. При стрессе число эозинофилов, наоборот, падает (Андреев, 1979). Этим можно объяснить различия в клеточном составе крови между взрослыми тюленями, застреленными на промысле, и щенками, которых удерживали при взятии крови в течение нескольких минут, что достаточно для начала стресс-реакции. По-видимому, низкое число эозинофилов, выявляемое у тюленей, является во многих случаях результатом стресса при взятии крови.

У тюленей-сеголетков (возраст 3–4 мес.), мигрировавших не в северную часть Баренцева моря, к кромке льдов, основной район кормления гренландских тюленей, а в Кандалакшский залив Белого моря, где весной нет достаточного для них количества корма, содержание эозинофилов составило 16.6±5.4%. Детеныши млекопитающих, переходя после молочного вскармливания на самостоятельное питание, неизбежно получают с пищей (в качестве пищи) вещества, с которыми они ранее не контактировали, и реагируют на них как на аллергены. Однако не ясно, естественны ли отмеченные гематологические особенности для начинающих питаться морскими организмами детенышей тюленей, либо они – следствие того, что переход к самостоятельному питанию был неравномерным из-за отсутствия в Белом море весной достаточного количества корма.

Возрастные изменения средних размеров районов организаторов ядрышка у гренландских тюленей менее значительны, чем у серых (0.086 ± 0.001 , 0.095 ± 0.001 , 0.093 ± 0.001 , 0.082 ± 0.001 у бельков, серок, серок-заморышей и взрослых, соответственно). Однако распределения по относительной площади ЯОРАg существенно ($p < 0.01$) различаются (рис. 9).

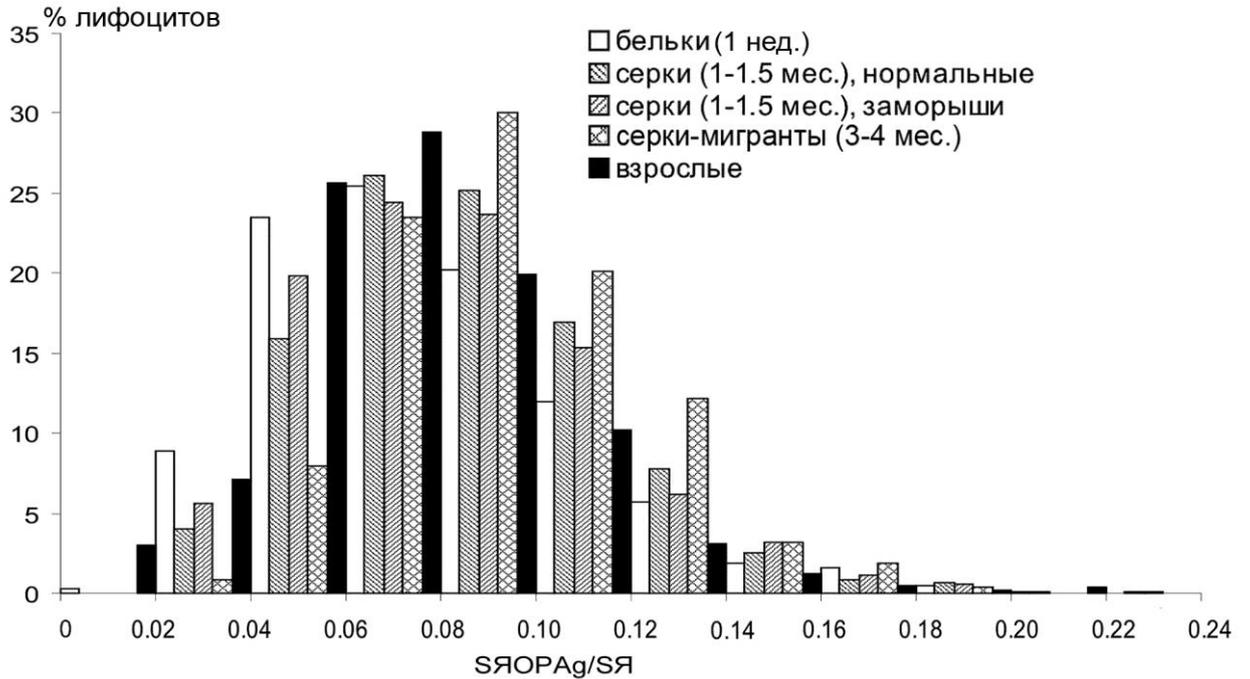


Рис. 9 Распределения лимфоцитов гренландских тюленей по относительной площади ЯОРАg.

Наибольшую относительную площадь ЯОР имеют голодающие щенки-мигранты (0.104 ± 0.001). По видимому, это обусловлено тем, что во время голодания тюленей белки являются одним из источников получения энергии (Nordøy, Blix, 1991; Nordøy, 1992), и их интенсивная утилизация в этом качестве приводит к повышению активности системы синтеза белка.

Исследование фагоцитоза нейтрофилов. Фагоцитарное число нейтрофилов гренландских тюленей (табл. 6) в большинстве случаев не выходит за пределы колебания этого показателя у здоровых людей (30–80 %) (Дуглас, Куи, 1983). Различия между средними для групп тюленей по всем показателям статистически незначительны ($p > 0.05$). Это согласуется с результатами 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 (Frouin et al., 2010).

Одинаковый уровень фагоцитарных показателей нейтрофилов у взрослых тюленей и щенков и более низкое число эстеразоположительных лимфоцитов у последних можно рассматривать как свидетельство того, что система фагоцитоза у детенышей тюленей, завершивших ювенильную линьку, находится на более высокой стадии зрелости, чем система специфического иммунитета.

Таблица 6 Показатели фагоцитарной активности лейкоцитов гренландских тюленей ($M \pm m$, в скобках – пределы колебания показателей)

Группы тюленей	ФЧ			ФИ		
	Спонт.	Стимул.	ИС ₁ , %	Спонт.	Стимул.	ИС ₂ , %
Взрослые, n = 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, n = 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)
Заморыши, n = 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)

Примечание. ФЧ – фагоцитарное число, % фагоцитирующих нейтрофилов; ФИ – фагоцитарный индекс, среднее число поглощенных частиц латекса на 1 нейтрофил; ИС – индекс стимуляции продигиозаном.

4.3 Детеныши тюленя хохлача

Хохлачам свойствен ряд особенностей, отличающих их от настоящих тюленей других видов. К ним относятся: ювенильная линька во время внутриутробного развития, самый короткий среди млекопитающих период лактации (около 4-х дней), раннее половое созревание – самки хохлача становятся половозрелыми в 2-3 года (Бурдин и др., 2009). Это позволяет также ожидать у этих тюленей более быстрого постнатального развития различных систем организма, включая систему кроветворения.

Однако это предположение не подтвердилось. Очевидно, клеточный состав крови детенышей тюленей определяется другими, более значимыми факторами. У всех исследованных животных встречаются юные формы клеток – метамиелоциты, оксифильные нормоциты (предшественники эритроцитов, содержащие ядро) и ретикулоциты (эритроциты с остатками ядер). В значительном количестве присутствуют палочкоядерные (низкодифференцированные) формы лейкоцитов – в среднем 11.1±1.2%, что больше, чем у щенков гренландского и серого тюленей в данный возрастной период (3.8±0.3 и 1.6±0.3%, соответственно). Число лимфоцитов выше числа сегментоядерных нейтрофилов (табл. 7).

Средняя величина ЯОРАg/Я у гренландских тюленей и хохлачей возраста 1-1.5 мес. различается незначительно (0.095±0.001 и 0.099±0.001, соответственно) у серого тюленя она гораздо выше (0.122±0.001). Однако число клеток с четырьмя районами организаторов ядрышка у хохлача – 3.8%, а у представителей других исследованных нами в данном отношении видов тюленей они встречаются очень редко (0-0.5%). Среднее число ЯОРАg в одном лимфоците у тюленей одинакового возраста (1-1.5 мес.) составило: 1.29±0.05 (гренландский тюлень); 1.31±0.05 (серый тюлень); 1.91±0.08 (хохлач).

Согласно полученным результатам, изменения в составе лейкоцитарной формулы крови у хохлача, серого и гренландского тюленей подчинены ряду общих закономерностей. Так, высокое содержание нейтрофилов в крови новорожденных сменяется уменьшением его в первые дни или месяцы жизни и нарастанием их числа в более позднем возрасте.

Таблица 7 Лейкоцитарная формула крови хохлачей различных возрастных групп (M±m)

Группы тюленей	Типы лейкоцитов, %						
	Ю	П	С	Э	Б	М	Л
1*, ≤ 4 дня n = 9	н.д.	58±8		4±3	0	10±4	27±8
2**, 1-1.5 мес., n=13	0.4±0.2	11.1±1.2	37.9±2.2	7.5±1.6	1.9±0.4	3.5±0.8	37.7±2.4
3*, взрослые самцы, n=5	н.д.	79±3.0		7±2	2±1	3±2	10±3
4*, взрослые самки, n=6	н.д.	76±2		6±2	3±2	8±3	9±3

Примечание.* Залив Св. Лаврентия, 11-13 марта 2001г. (по: Voily et al., 2006); ** Гренландское море 25 апреля - 3 мая 2009г. (собственные данные).

Для новорожденных и взрослых тюленей хохлача характерен нейтрофильный профиль крови. После завершения молочного вскармливания происходит уменьшение относительного числа сегментоядерных нейтрофилов и повышение – лимфоцитов, т.е. "физиологический перекрест" лейкоцитарной формулы крови. Это явление отмечено нами у "бельков" гренландского тюленя, т.е. детенышей, питающихся молоком матери. У серых тюленей он установлен в возрасте 1-1.5 месяцев (т.е., после завершения молочного питания). Щенки же гренландского тюленя после завершения молочного кормления и ювенильной линьки уже имеют нейтрофильный профиль крови. Высокий уровень сегментоядерных нейтрофилов в первые дни и месяцы жизни обусловлен поступлением с молоком матери гормонов и рассматривается как приспособление, обеспечивающее неспецифическую защиту организма от инфекций в раннем онтогенезе. Повышение же относительного числа лимфоцитов связывают с интенсивной пролиферацией лимфоидных клеток развивающейся системы специфического иммунитета. Синтез белка в клетках формирующейся системы иммунитета детенышей тюленей более интенсивен, чем у взрослых, что проявляется в большем числе ЯОР циркулирующих лимфоцитов. Видовой и, возможно, индивидуальный уровень параметров активности ядрышек устанавливается лишь при половом созревании (раздел 5.3).

ГЛАВА 5 ИЗМЕНЕНИЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ АДАПТАЦИИ ДЕЛЬФИНОВ И ТЮЛЕНЕЙ К УСЛОВИЯМ НЕВОЛИ

5.1 Особенности состава крови адаптированных и неадаптированных к условиям неволи дельфинов афалин

Лейкограмма афалин, как большинства китообразных, (McNeil, 1975; Monte, Pilleri, 1979) и ряда наземных млекопитающих, имеет гранулоцитарный профиль. Количество эозинофилов высоко, часто превышает относительное число лимфоцитов. Базофилы отсутствуют. Между исследованными группами афалин выявлены различия по числу некоторых типов лейкоцитов (табл. 8). Число лимфоцитов у больных животных ниже, чем у здоровых ($p < 0.01$).

Сравнение по нескольким параметрам свидетельствует о существенных различиях между группами афалин (табл. 9).

Таблица 8 Лейкоцитарная формула крови афалин ($M \pm m$, пределы колебания)

Группы афалин	Типы лейкоцитов, %					
	НС	С	Э	Б	М	Л
Здоровые адаптированные	1.4±0.5 0–5.0	49.2±4.5 24.0–71.0	22.2±2.6 9.0–38.0	0	2.4±0.3 0–4.0	24.7±3.5 11.0–48.0
Здоровые неадаптированные	3.3±2.2 0–18.0	51.4±7.8 29.0–86.0	17.8±5.0 0–40.0	0	2.1±0.6 0–4.5	25.5±3.9 8.0–42.0
Больные неадаптированные	3.1±1.1 1–9.0	60.6±5.7 45.0–85.0	20.6±4.5 0.5–36.0	0	1.4±0.5 0–3.5	14.4±2.1 8.5–22.0

Таблица 9 Параметры суммарных распределений лимфоцитов афалин различных групп по цитохимическим признакам (средняя±стандартная ошибка)

№	Группы дельфинов	НЭ					СДГ				ШИК ⁺
		ПН, %	Число гранул				Число гранул				
			М	V, %	As	Ex	М	V, %	As	Ex	
1	Здоровые адаптированные	31.1 ±1.0	2.72 ±0.05	76.1 ±1.8	1.69 ±0.06	2.52 ±0.11	21.46 ±0.33	45.3 ±1.2	0.88 ±0.08	0.96 ±0.16	26.7 ±1.0
2	Здоровые неадаптированные	30.9 ±1.3	1.85 ±0.03	60.2 ±1.6	1.65 ±0.07	2.43 ±0.14	21.25 ±0.36	42.1 ±1.4	0.75 ±0.10	0.42 ±0.20	19.9 ±1.3
3	Больные неадаптированные	36.5 ±1.1	2.04 ±0.03	63.1 ±1.3	1.44 ±0.05	2.13 ±0.11	18.60 ±0.32	54.1 ±1.4	1.31 ±0.07	2.00 ±0.15	22.6 ±1.0

Примечание. ПН – лимфоциты с парануклеарной реакцией на неспецифическую эстеразу; М – средняя, V – коэффициент вариации (%), As и Ex – показатели асимметрии и эксцесса, соответственно, ШИК⁺ – содержащие гликоген лимфоциты (%).

Согласно результатам корреляционного анализа (рис. 10, показаны корреляции, достоверные при $P \geq 0.95$), наиболее высок уровень скоррелированности характеристик распределения лимфоцитов у здоровых неадаптированных животных. Причем, корреляции (за исключением связи энтропии распределения по активности НЭ и показателя эксцесса по активности СДГ) свидетельствуют об однонаправленности изменений субпопуляционного состава лимфоцитов по активности обоих ферментов. Увеличение среднего числа эстеразоположительных гранул и разнообразия лимфоцитов по этому параметру сопряжено с возрастанием гетерогенности лимфоцитов по активности СДГ (снижается Ex). Сближение субпопуляций с различной активностью ферментов (возрастает Ex), упрощение распределения по активности СДГ (увеличивается R) связано с повышением числа ШИК-положительных лимфоцитов. Знак корреляций соответствует ходу процессов, происходящих при стимуляции лимфоцитов: сначала возрастает активность ферментов лизосом и митохондрий, затем снижается количество гликогена (Хейхоу, Кваглино, 1983)

Корреляция Гликоген-СДГ здоровых, здоровых адаптированных и неадаптированных афалин также свидетельствует о зависимости числа гликогенсодержащих лимфоцитов от уровня их разнообразия по активности СДГ: чем он выше (снижаются As, Ex, R), тем ниже содержание ШИК-положительных лимфоцитов. У больных животных существенных корреляций числа ШИК-положительных лимфоцитов и параметров распределения лимфоцитов по активности СДГ не выявлено. Это может быть связано с пониженной

эффективностью утилизации гликогена в их клетках, учитывая, что средний уровень активности СДГ у больных афалин снижен.

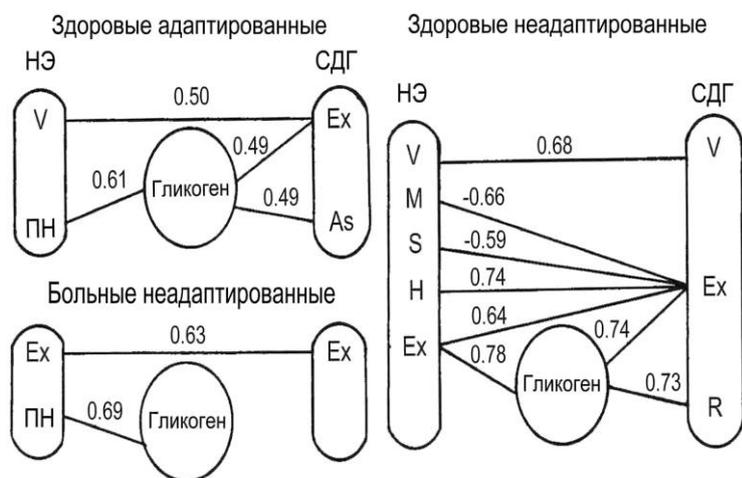


Рис. 10 Корреляции между параметрами распределений лимфоцитов афалин: ПН – лимфоциты с парануклеарной реакцией на неспецифическую эстеразу; М – средняя; S – среднее квадратичное отклонение; V – коэффициент вариации; As и Ex – показатели асимметрии и эксцесса, соответственно; Н – энтропия; R – информационная избыточность.

Корреляции для всей группы животных слабые ($r=0.3-0.4$), несмотря на статистическую их достоверность ($p<0.05$). Исключение составляет связь числа лимфоцитов с парануклеарной эстеразной реакцией (ПН) и ШИК-положительных лимфоцитов ($r=0.57$). Она значительна также у здоровых адаптированных и больных дельфинов. Это, а также сниженная активность СДГ и повышенный процент ПН лимфоцитов у больных животных может свидетельствовать о низкой метаболической активности ПН лимфоцитов афалин.

Увеличение силы корреляций между показателями активности гидролаз и дегидрогеназ лимфоцитов выявлено при аутоиммунных и некоторых профессиональных заболеваниях (Соколов и др., 1975; Робинсон и др., 1986). В то же время, установлено, что животные, отличающиеся высоким уровнем корреляций энзиматических характеристик лимфоцитов, выживают после введения стафилококкового токсина (Катосова и др., 1975). Возрастание силы корреляций метаболических параметров лимфоцитов происходит в ранние сроки после введения антигена при экспериментальной иммунизации (Михайлова и др., 1972). В первые месяцы неволи у дельфинов из-за резкого увеличения обсемененности их микроорганизмами развивается состояние, рассматриваемое как предболезнь (Биркун, 1986). Согласно представленным результатам, оно характеризуется значительными сдвигами в системе иммунитета, проявляющимися в усилении сопряженности процессов активации ферментов лизосом и митохондрий и утилизации гликогена в лимфоцитах. Однако у дельфинов в неволе, в среде с высоким содержанием микроорганизмов, при неблагоприятном влиянии других факторов (стресс, гиподинамия, корм, отличающийся от природного), процессы иммуногенеза часто оказываются недостаточно эффективными.

Выявленные особенности состава лимфоцитов крови по цитохимическим признакам могут быть использованы для контроля течения процесса адаптации дельфинов к условиям неволи и его коррекции препаратами, влияющими на функции и метаболизм лимфоидных клеток. При этом показателем уровня адаптации является степень приближения значений цитохимических параметров и

корреляций между ними у адаптирующихся животных к таковым у здоровых адаптированных дельфинов.

5.2 Начальный этап адаптации гренландских тюленей к условиям неволи

Период адаптации морских млекопитающих после отлова и помещения их в неволю может длиться от нескольких недель до нескольких месяцев (Белькович, Гуревич, 1971; Ridgway, 1972; Asper, 1975). Первые недели после отлова считают критическими и во многом определяющими выживаемость и дальнейшую жизнь животных в неволе (Ridgway, 1972).

Общее число лейкоцитов у щенков тюленей в течение периода наблюдения варьировало незначительно: 8.2 ± 1.1 , 7.5 ± 1.6 и 7.9 ± 1.3 тыс./мкл (3-й, 10-й и 18-й дни в неволе, соответственно). Процент же лимфоцитов достоверно ($p < 0.05$) упал к третьему дню, а к 18-му снизился в 3 раза по сравнению с контролем (12 интактных щенков такого же возраста, 1-1.5 мес.) и величиной этого показателя у взрослых животных. Достоверное снижение числа эозинофилов наблюдалось в 10-й день (рис. 17). Такие же сдвиги в лейкоцитарной формуле крови происходили у сивучей при адаптации к неволе (Занина, Занин, 1990) и 20-дневном голодании (Коваль Е.З. и др., 1986). Неадаптированные к неволе афалины в первые 3 недели после отлова также имели сниженный уровень лимфоцитов по сравнению с адаптированными здоровыми дельфинами ($9.50 \pm 4.48\%$ против $20.25 \pm 2.42\%$) (Соколова, 2004). В третий и десятый дни снизился уровень гликогена, а наиболее резкое падение числа эстеразоположительных лимфоцитов отмечено в 10 день (рис. 11).

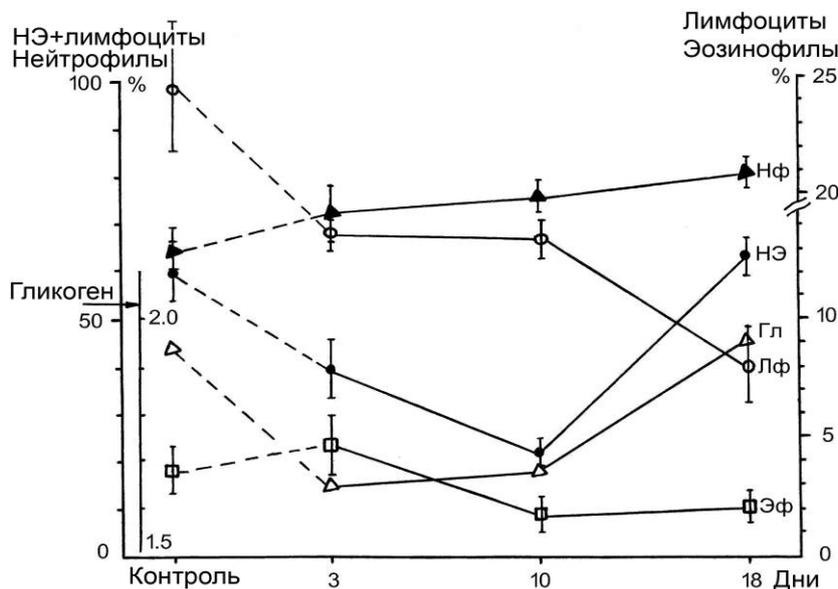


Рис. 11 Изменения показателей лейкоцитов щенков гренландских тюленей в первые дни содержания в океанариуме: Нф – нейтрофилы; НЭ – эстеразоположительные лимфоциты; Гл – гликоген в лейкоцитах (усл. ед.); Лф – лимфоциты; Эф – эозинофилы.

После того, как щенки начали активно питаться, привыкли к ваннам, в которых они находились, и присутствию людей (18 день пребывания в океанариуме), значения среднего уровня гликогена и числа эстеразоположительных (НЭ⁺) лимфоцитов восстановились до исходных величин.

Анализ состава лимфоцитов по размеру, форме и числу эстеразоположительных гранул показал, что в первые дни пребывания в океанариуме у щенков существенно ($p < 0.01$) снизилось число клеток с

парануклеарным типом реакции, достигнув величины взрослых животных (табл. 10).

Таблица 10 Показатели активности неспецифической эстеразы и организаторов ядрышка гренландских тюленей

Показатель	Группы животных, периоды исследования				
	Контроль	3-й день	10-й день	18-й день	Взрослые
ПН	52.7±2.0	26.5±2.5	34.2±2.4	24.4±6.5	14.9±2.2
ЭГ	4.10±0.27	3.33±0.21	3.04±0.15	3.14±0.26	3.19±0.22
As	0.867±0.071	0.936±0.087	0.792±0.087	0.861±0.087	1.379±0.077
Ex	0.639±0.141	0.600±0.173	0.529±0.173	0.971±0.173	1.998±0.155
ЯОРАg	1.25±0.02	1.45±0.04	1.36±0.06	1.37±0.06	1.17±0.06

Примечание. ПН – число лимфоцитов (%) с парануклеарной реакцией на НЭ; ЭГ – среднее число эстеразоположительных гранул в 1 лимфоците; As Ex – показатели асимметрии и эксцесса распределения по числу НЭ⁺ гранул; ЯОРАg – среднее число окрашенных серебром ЯОР.

В это же время (3-й день в неволе) увеличилась активность организаторов ядрышка, а число эстеразоположительных гранул, отражающее уровень активности лизосомного аппарата клетки, снизилось. Впоследствии рассматриваемые показатели не отличались ($p>0.05$) от показателей взрослых тюленей, за исключением повысившегося в 10-й день процента ПН лимфоцитов.

Наиболее вероятной причиной резкого падения числа НЭ⁺ лимфоцитов был стресс, развившийся после транспортировки и помещения животных в ванны. Об этом свидетельствует повышение концентрации глюкозы в плазме крови, сопровождавшее снижение числа эозинофилов (Ерохина, Кавцевич, 1998). При стрессе часть зрелых, дифференцированных Т-лимфоцитов мигрирует в костный мозг, и в популяции клеток крови увеличивается число незрелых, не завершивших дифференцировку лимфоцитов (Юшков и др., 1999). При общей тенденции – снижении числа эстеразоположительных лимфоцитов к 10-му дню пребывания в неволе с последующим его повышением в 18-й день, выявились также индивидуальные особенности изменений этого показателя. В частности, у 2-х тюленей отмечено последовательное возрастание процента Э⁺ лимфоцитов.

5.3 Изменения цитологических и цитохимических параметров крови гренландских тюленей при длительном содержании в неволе

4 щенка-сеголетка гренландского тюленя в возрасте 3.5-4 месяца, мигрировавшие в Кандалакшский залив, были доставлены в океанариум для длительного содержания и исследования. Некоторые гематологические показатели щенков выходили за пределы возрастной "нормы", предложенной Ф.Р. Энгельгардтом (Engelhardt, 1979). Наиболее существенные отклонения наблюдались у тюленей №2 и №3. Особенно значительным было повышение у них скорости оседания эритроцитов (32-55 мм/час), что могло свидетельствовать о наличии патологического (вероятно, воспалительного) процесса. Кроме того, эти тюлени отличались сниженным числом эритроцитов.

Согласно результатам биохимических исследований (Кавцевич, Ерохина, 2003), у всех животных также было повышено, по сравнению с возрастной

нормой, содержание глюкозы, что является одним из показателей стресс-реакции; нарушен минеральный обмен. У щенка № 2, несмотря на нормальную упитанность, наблюдался дисбаланс обмена белка. Оценка состояния животных осложнялась наличием у них гельминтоза (ленточные и круглые черви в желудочно-кишечном тракте).

В результате последующих анализов клеточного состава крови найдено, что наиболее значительно в период наблюдения изменялось абсолютное число эозинофилов (рис. 12).

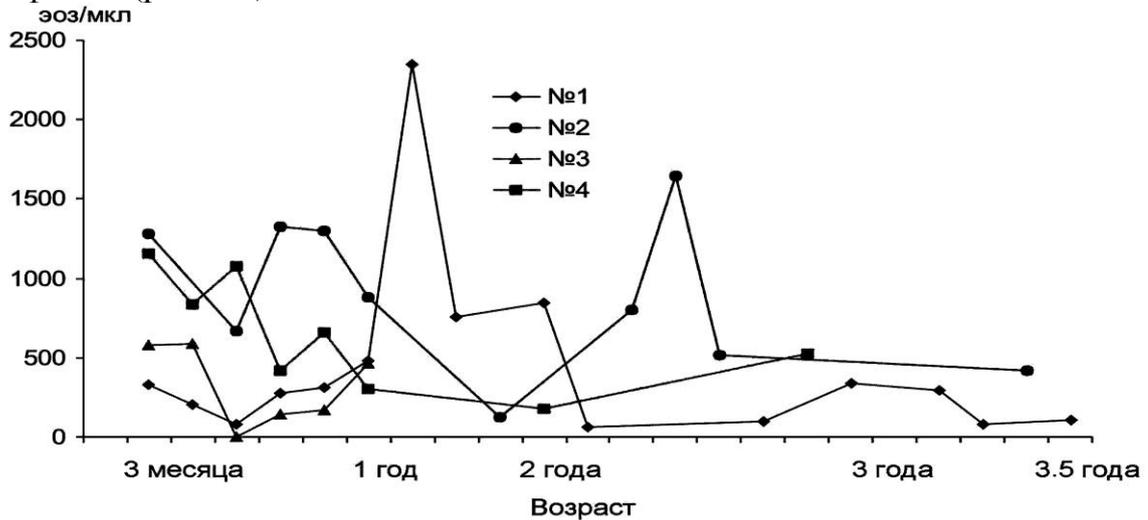


Рис. 12. Динамика изменения числа эозинофилов у щенков гренландского тюленя.

Длительное содержание животных в контролируемых условиях позволило проследить динамику показателей лейкоцитарной формулы (рис. 13).

Обращает на себя внимание резкое разделение обследованных животных на две группы по характеру динамики лимфоцитов и нейтрофилов. В одну группу вошли тюлени №1 и №2 (успешно прошедшие период адаптации), во вторую — №3 и №4 (погибшие через 18 и 34 месяца пребывания в неволе, соответственно). Таким образом, динамика клеточного состава крови в течение периода наблюдения у экспериментальных животных резко различается по соотношению уровня лимфоцитов и нейтрофилов. У погибших в разное время тюленей №3 и №4 не наблюдался так называемый "физиологический перекрест", являющийся характерной возрастной особенностью клеточного состава крови млекопитающих. Это позволяет предполагать, что утрата упомянутых выше характерных особенностей может рассматриваться как показатель снижения уровня жизнеспособности детенышей тюленей.

По данным биохимического анализа крови, период реабилитации у щенков гренландского тюленя составил более 3-х месяцев (Кавцевич, Ерохина, 2003, 2009). После года пребывания в неволе отмечена утрата резких индивидуальных различий в биохимическом статусе животных, что, видимо, обусловлено одинаковыми и комфортными по сравнению с природной средой условиями жизни (отсутствие врагов, регулярное кормление, уход, ветеринарное обеспечение).

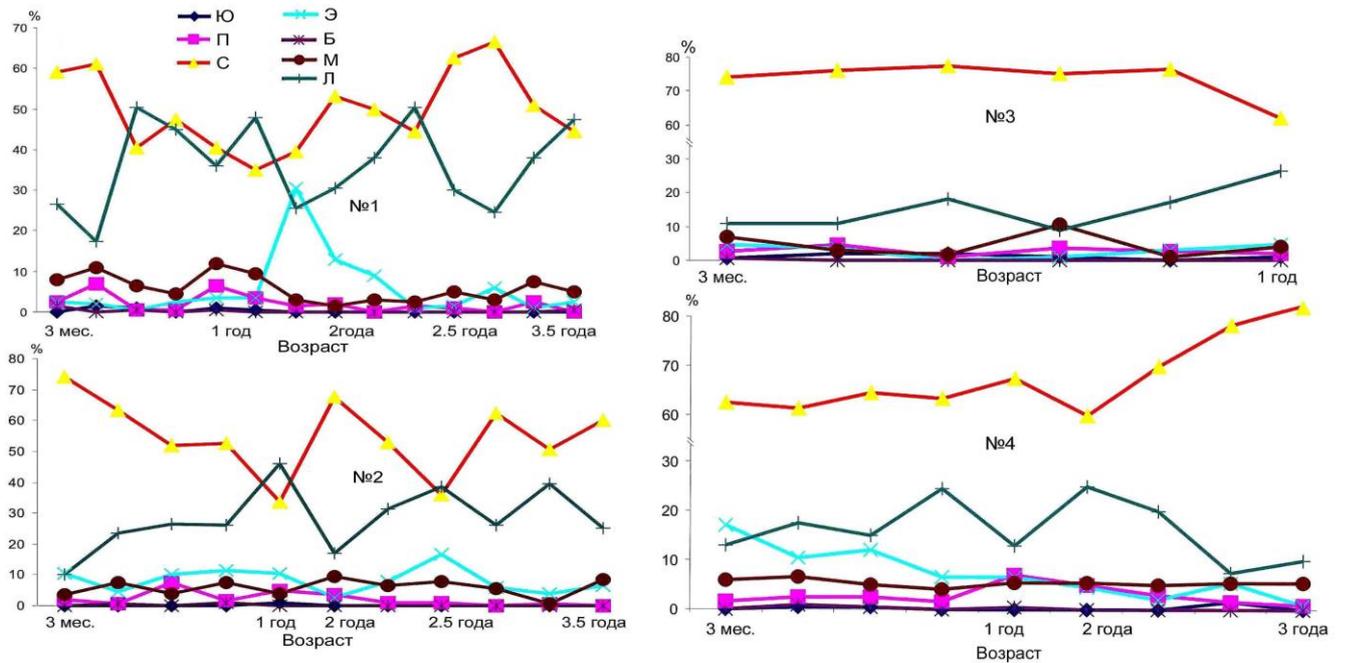


Рис. 13. Динамика изменения соотношения лейкоцитов различных типов у щенков гренландских тюленей. Ю, П, С – юные, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, Э – эозинофилы; Б – базофилы; М – моноциты; Л – лимфоциты, соответственно.

.В первые месяцы после отлова и помещения в океанариум у животных наблюдались значительные колебания среднего числа ЯОРАg. Далее, по мере взросления тюленей, колебания снизились, и оно приблизилось к уровню взрослых (рис. 14).

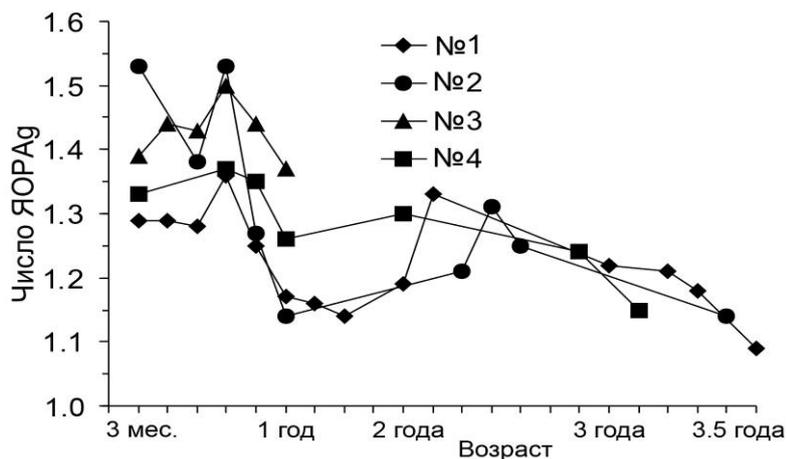


Рис. 14. Возрастные изменения числа ЯОРАg в лимфоцитах щенков гренландских тюленей, адаптирующихся к условиям неволи.

Видовой и индивидуальный уровень параметров активности ядрышек устанавливается, вероятно, при половом созревании, которое начинается у гренландских

тюленей в 3–4 года.

Стабилизация числа больших гранулярных лимфоцитов и общего числа лейкоцитов произошла в тот же период, что и изменение активности ядрышек (рис. 15). Однако это снижение числа БГЛ, по-видимому, связанное с развитием у молодых тюленей системы специфического иммунитета, у взрослых половозрелых особей 10-15 лет вновь сменяется его повышением (табл. 11).

Что касается числа эстеразоположительных лимфоцитов, большинство из которых являются, предположительно, Т-клетками, то оно изменялось иначе, чем предыдущие 3 показателя. После 9-ти месяцев пребывания в неволе произошло падение ниже исходного уровня, а затем – подъем до уровня, приближающемуся к таковому взрослых животных.

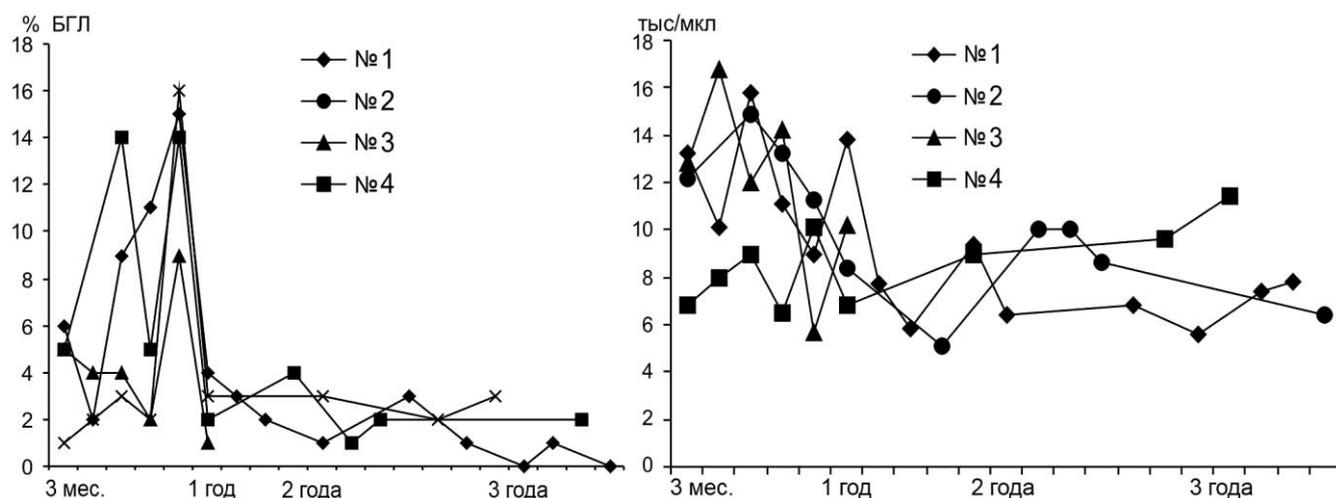


Рис. 15 Динамика изменения числа БГЛ и лейкоцитов.

Таблица 11 Число БГЛ (% от общего числа лимфоцитов) у гренландских тюленей разного возраста

№	Группы тюленей	М±m
1	Бельки, 1 нед. (n=38)	6.7±0.5
2	Серки, 1.5 мес., n=27	18.0±1.2
3	Серки-"заморыши", 1.5 мес., n=36	19.1±1.3
4	Серки-мигранты, 3-4 мес., n=6	8.6±1.4
5	Взрослые животные, n=10	13.9±1.7

Таким образом, при адаптации изучаемых видов морских млекопитающих к условиям неволи происходят существенные изменения в соотношении лейкоцитов различных типов и в структуре популяции лимфоцитов периферической крови по цитохимическим признакам. Колебания клеточного состава крови у детенышей тюленей зависят от возраста и индивидуальных особенностей состояния животных. Наиболее значительны они в первые недели и месяцы неволи, когда животные подвергаются воздействию стресса, а через 10-12 месяцев стабилизируются.

Глава 6 ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ

6.1 Отравление обыкновенных морских свиней нефтепродуктами

Мы проводили наблюдения за четырьмя взрослыми самцами обыкновенной морской свиньи, находившимися в воде, загрязненной мазутом. После 6 дней пребывания в загрязненной воде погиб первый дельфин, остальные – через 7, 9 и 10 суток. На третий день наблюдения у трех дельфинов в 1.5–2 раза повысилось общее содержание лейкоцитов, у одного – скорость оседания эритроцитов, т. е.

появились признаки острого воспалительного процесса. У одного из дельфинов более чем в 2 раза возросло количество лимфоцитов. В день, предшествовавший гибели, отклонения были наиболее значительными: снизилось количество эозинофилов, что является одним из признаков развития стресс-реакции, у трех дельфинов повысилось число "юных", низкодифференцированных нейтрофилов.

Соотношение лимфоцитов с различным числом эстеразоположительных гранул достоверно изменилось на третий день наблюдения у всех четверых животных (рис. 22). Причем у двух дельфинов уже на второй день значительно повысилось число клеток, содержащих 3 и более гранул. Дельфины, лимфоциты которых проявили более раннюю и сильную реакцию, прожили несколько дольше других.

За день до гибели форма распределения лимфоцитов отличалась от исходной наиболее значительно. Более половины лимфоцитов составили клетки с одной эстеразоположительной гранулой. При этом содержание лимфоцитов с парануклеарной реакцией на неспецифическую эстеразу, низкодифференцированных клеток, не несущих рецепторов Т- или В-лимфоцитов (Соколов, Иванова, 1982), изменялось мало (28.7 ± 2.6 , 32.5 ± 2.8 и 31.1 ± 2.2 в разные периоды, соответственно). Таким образом, быстрое (в течение нескольких дней) снижение числа эстеразоположительных гранул свидетельствовало о неспособности лимфоидной системы (и, вероятно, других систем организма) активно реагировать на раздражение.

6.2 Беременность у афалин

В течение 17 месяцев мы наблюдали четырех самок дельфинов-афалин, две из которых были беременны, две – здоровы и небеременны. У одной из беременных имелись, кроме того, симптомы инфекции (примесь гноя в моче). Наличие беременности в период исследования было подтверждено ретроспективно, после рождения доношенных детенышей, учитывая, что ее продолжительность у афалин равна 12 месяцам (Ожаровская, 1982).

Содержание лимфоцитов с "парануклеарным" типом эстеразной реакции было значительно, в 2-2.5 раза, повышено у беременных самок, по сравнению с небеременными, в течение всего срока беременности. Значения этого показателя до наступления беременности составляли у них 31.0 и 33.0%. Число эстеразоположительных гранул у беременной здоровой было снижено, а у беременной больной не отличалось от уровня здоровых (табл. 12).

Таблица 12 Показатели активности неспецифической эстеразы в лимфоцитах беременных и небеременных самок дельфинов афалин

Показатели	№6, небеременная здоровая n=12	№29, небеременная здоровая, n=11	№13, беременная здоровая, n=13	№28., беременная больная, n=10
ПН лимфоциты, %	21.1±1.2	27.8±1.4	64.6±1.4	51.3±1.6
Число гранул в 1 лимфоците	2.77±0.06	2.91±0.06	2.14±0.06	2.71±0.06

Согласно современным представлениям, беременность рассматривается как имплантация генетически чужеродного материала в организм матери. Она сопровождается повышением концентрации ингибиторов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов, что приводит к снижению количества иммунокомпетентных клеток. Поэтому повышение числа ПН лимфоцитов при беременности можно считать дополнительным свидетельством того, что и у морских млекопитающих они – низкодифференцированные клетки.

6.3 Изменения клеточного состава крови при инфекционных заболеваниях у гренландского тюленя и белух

В 1986г. в океанариум ММБИ из Архангельска (СевПИНРО) были доставлены 4 щенка гренландского тюленя. По заключению ветеринарного врача, у одного из них началась пневмония. В последующие 10 дней был проведен курс лечения.

Из показателей общего анализа крови наиболее велики в динамике лечения заболевания были колебания общего количества лейкоцитов (табл. 13). При выздоровлении тюленя заметно изменилась лейкоцитарная формула: стало меньше нейтрофилов с несегментированным ядром (низкодифференцированных) и значительно больше эозинофилов. Последнее является, наиболее вероятно, следствием длительного применения высоких доз антибиотиков.

Таблица 13 Показатели общего анализа крови гренландского тюленя, переболевшего пневмонией

Период	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, 10^6 /мкл	Лейкоциты, 10^3 /мкл	Н, %		Э, %	Б, %	М, %	Л, %
				несегм.	сегм.				
29 июня, лечение	224.0	4.2	30.2	5.5	63.0	3.5	0	7.0	21.0
15 июля, лечение	228.0	4.6	7.4	3.0	60.5	2.0	0.5	6.0	28.0
5 ноября, выздоровление	222.0	5.2	22.6	1.5	53.5	19.5	0	4.0	21.5

Соотношение групп лимфоцитов с различной активностью неспецифической эстеразы в ходе лечения существенно изменялось. При выздоровлении распределение лимфоцитов по числу эстеразоположительных гранул приобрело асимметричную форму, характерную для здоровых дельфинов и тюленей. Наибольшее среднее число гранул в реакции на неспецифическую эстеразу (5.93 ± 0.30) отмечено 29 июня, в начале лечения, в остальные сроки оно было достоверно ниже ($p < 0.01$). Согласно данным литературы, высокое число эстеразоположительных гранул в активной фазе заболевания отражает возрастание числа и изменение локализации лизосом при стимуляции лимфоцитов. Устойчивое снижение этого показателя и приближение формы распределения лимфоцитов к свойственной здоровым тюленям следует считать, согласно приведенным данным, прогностически благоприятными признаками.

Число лимфоцитов с парануклеарной эстеразной реакцией (ПН) при выздоровлении возросло в 3 раза, превысив уровень здоровых щенков 1.5-месячного возраста (более 50%). Процент ПН лимфоцитов у взрослых гренландских тюленей значительно ниже ($14.9 \pm 2.2\%$). Наблюдавшееся после заболевания повышение числа ПН клеток может быть обусловлено и супрессией активно развивавшихся в период заболевания гуморальных иммунологических реакций, и возрастанием количества предшественников зрелых Т-лимфоцитов в

связи с прекращением интенсивной антигенной стимуляции системы иммунитета возбудителями заболевания.

В Мурманском морском биологическом институте (поселок Дальние Зеленцы) содержались две самки белухи в возрасте 2 и 5 лет. Одна из белух (более молодая) была явно больна (обширные поражения кожи на спинной стороне тела, гнилостный запах и выделения из дыхала). У второй самки признаком заболевания было искривление хвостового стебля, являющееся симптомом глубокой инфекционной патологии (Томилин, Близнюк, 1981). Скорость оседания эритроцитов составляла 43 и 40 мм/час.

В мазках крови белух была повышена численность лимфоцитов с высокой активностью неспецифической эстеразы, часто встречались клетки с признаками активации, имеющие светлое ядро и многочисленные эстеразоположительные гранулы. Среднее число гранул было очень высоким – 7.28 ± 0.37 и 6.20 ± 0.31 .

Распределения лимфоцитов белух по числу эстеразоположительных гранул симметричны (у здоровых тюленей и дельфинов они асимметричны, сдвинуты влево). Такие признаки характерны для афалин с гнойно-септическими заболеваниями (Колесса и др., 1986). У афалин распределение лимфоцитов с описанными чертами также соответствовало крайне тяжелому состоянию, предшествовавшему гибели животных.

6.4 Изменения клеточного состава крови у афалин при иммунизации

Иммунизировали двух самок, содержащихся в океанариуме 6 лет. Ни микобактерии туберкулеза, ни антитела против них у афалин не выявлены (Денисенко, Соколова, 2002; Розанова и др., 2006; Романов и др., 2006). Поэтому, иммунный ответ на введение БЦЖ у дельфинов является первичным. Через 7 месяцев после иммунизации БЦЖ производили вакцинацию стандартной вакциной против рожи свиней (ВР-2). У исследованных животных ее повторяли каждые 6 мес., и иммунный ответ на ВР-2 – вторичный.

Через 11 месяцев после иммунизации БЦЖ одна из самок (№17) родила доношенного живого детеныша. Таким образом, первая иммунизация состоялась на первом месяце беременности, вторая – на седьмом.

Исходное количество лейкоцитов было близким у обоих животных как при первой, так и при второй иммунизации и находилось в пределах, установленных для здоровых адаптированных к неволе афалин (7-10 тыс./мкл). Однако после введения БЦЖ оно оставалось на одинаковом уровне в течение 3-х дней, а введение вакцины ВР-2 вызвало на 3-й день заметный лейкоцитоз у обоих афалин, причем, более сильный у самки №17 (беременной). Сильная лейкоцитарная реакция на БЦЖ наблюдалась у одной из самок лишь на 7-й день, что по-видимому, является следствием большей продолжительности индукционного периода при первичном иммунном ответе.

Заметны различия между беременной и небеременной афалинами как при первичном, так и при вторичном иммунном ответе. Сравнения по комплексу из семи параметров позволило выявить особенности реагирования животных и в 1-м, и во 2-м эксперименте. Причем, по изменениям параметров в первые дни после иммунизации можно судить о характере их изменений в дальнейшем.

ВЫВОДЫ

1. Комплексный анализ клеточного состава крови свидетельствует о существовании у дельфинов и тюленей особенностей системы крови, обусловленных водным образом жизни.
2. Для дельфинов и тюленей характерен нейтрофильный профиль лейкоцитарной формулы крови. Гренландскому и серому тюленям и морскому зайцу свойственны особенности дифференцировки клеток миелоидного ряда, проявляющиеся в морфологии ядра и цитоплазмы части гранулоцитов. Взрослые гренландские тюлени отличаются высоким уровнем эозинофилов – до 36%, в среднем – 19.3%.
3. К возрастным особенностям клеточного состава крови тюленей относится уравнивание числа лимфоцитов и нейтрофилов – физиологический перекрест лейкоцитарной формулы крови. Это явление отмечается у гренландского тюленя в более ранние сроки постнатального онтогенеза, чем у серого тюленя и тюленя хохлача. Его наличие или отсутствие может служить признаком, позволяющим судить о жизнеспособности детенышей тюленей.
4. У всех исследованных видов морских млекопитающих выявлены лимфоциты, сходные с Т-лимфоцитами-супрессорами, нулевыми лимфоцитами и Т-клетками-киллерами по парануклеарно локализованным скоплениям окрашенного продукта цитохимической реакции на неспецифическую эстеразу. Возрастание их числа у дельфинов сопряжено с увеличением числа гликогенсодержащих лимфоцитов и снижением активности сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов.
5. На ранних этапах процесса адаптации тюленей к условиям неволи в соотношении различных типов лейкоцитов и структуре популяции лимфоцитов крови происходят сдвиги, отражающие снижение уровня резистентности в специфическом и неспецифическом звеньях иммунитета. Процесс адаптации длится не менее одного года, имеются индивидуальные сроки стабилизации клеточного состава крови.
6. В состав популяции лимфоцитов периферической крови афалин входят 2 неравные по объему группы клеток. Численно преобладает субпопуляция с относительно низкой активностью НЭ, СДГ, НАДНр и НАДФНр. НАДФН-тетразолий редуктаза играет роль признака-индикатора в комплексе цитохимических реакций, включающем определение активности НЭ, СДГ, НАДНр, НАДФНр и содержания нуклеиновых кислот. Корреляции между характеристиками распределения лимфоцитов по этим цитохимическим признакам отражают ход внутриклеточных метаболических процессов.
7. Здоровые и больные, адаптированные и неадаптированные к неволе афалины различаются формой распределения лимфоцитов по активности НЭ и СДГ, силой и направленностью корреляций между параметрами распределения лимфоцитов по активности НЭ и СДГ и числом гликогенсодержащих лимфоцитов. Эти различия могут быть использованы для оценки течения периода адаптации к условиям неволи и отбора наиболее адаптированных особей.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах из перечня ВАК

1. Ерохина И.А., Кавцевич Н.Н. Состав и свойства белков сыворотки крови щенков гренландского тюленя *Pagophilus groenlandica* в период адаптации к неволе // Ж. эвол. биохимии и физиологии. 1998. Т. 34, № 6. С. 654-660.
2. Кавцевич Н.Н. Клеточный состав крови гренландских тюленей различного возраста // Доклады Академии наук. 2001. Т. 380, №2. С. 280-282.
3. Кавцевич Н.Н. Особенности клеточного состава крови гренландских тюленей (*Pagophilus groenlandicus*) различного возраста // Зоологический журнал. 2003. Т. 82, № 6. С. 758-761.
4. Ерохина И.А., Кавцевич Н.Н. Чувствительность эритроцитов морских млекопитающих к осмотическому шоку // Вет. практика, 2007, №3 (38). С. 60-63.
5. Кавцевич Н.Н., Матишов Г.Г., Кондаков А.А. Под дождем в полярную ночь на Айновых островах // Природа. 2007, № 7. С. 74-78.
6. Кавцевич Н.Н., Юрко А.С. Активность организаторов ядрышка в лимфоцитах гренландских тюленей разного возраста // Доклады АН. 2007. Т.416, №5. С. 706-708.
7. Войнов В.Б., Кавцевич Н.Н., Михайлюк А.Л., Зотов А.С. Поведенческие и физиологические признаки адаптации серых и гренландских тюленей к ныряющему образу жизни // Доклады АН. 2008. Т. 420, №2. С.271-274.
8. Войнов В.Б., Синютин С.А, Синютин А.С., Кавцевич Н.Н., Зотов А.С. Средства и способ исследования поведения и физиологии морских млекопитающих // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2008. Т. 145, №3. С. 248-250.
9. Ерохина И.А., Кавцевич Н.Н. К вопросу об оценке жизнеспособности щенков тюленей по некоторым параметрам крови // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2009, № 3. С. 3-8.
10. Кавцевич Н.Н., Минзюк Т.В. Клеточный состав крови серых тюленей различного возраста // Доклады АН. 2010. Т.432, №. 4. С. 552-555.
11. Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н. Новые данные о клеточном составе крови тюленя хохлача // Доклады АН. 2010. Т.435, № 5. С. 714-717.
12. Кавцевич Н.Н., Минзюк Т.В. Лейкоцитарные индексы и активность организаторов ядрышка лимфоцитов щенков серых тюленей // Вестник ЮНЦ. 2010. Т. 6, № 4. С. 76-83.
13. Кавцевич Н.Н. Гематологические показатели обыкновенных морских свиней при отравлении нефтепродуктами // Известия Самарского научного центра РАН. 2011, № 4 (в печати).
14. Кавцевич Н.Н. Цитохимические особенности лимфоцитов крови дельфинов афалин при содержании в неволе // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2011, № 3 (в печати).
15. Кавцевич Н.Н., Минзюк Т.В. Особенности клеточного состава крови серых тюленей (*Halichoerus grypus*) разного возраста // Зоол. журн. 2011, № 9 (в печати).

Публикации в других изданиях

16. Кавцевич Н.Н. Субпопуляции лимфоцитов крови черноморской афалины с различными цитохимическими характеристиками // Материалы I съезда анатомов, гистологов и эмбриологов Белоруссии. Минск, 1984. С.81.
17. Кавцевич Н.Н. Гетерогенность лимфоцитов крови черноморской афалины по цитохимическим признакам // Морфогенез органов и регулирующих систем в норме и эксперименте: Сб.тр. Минского гос. мед. ин-та. Минск, 1985. С. 135-138.
18. Мишин В.Л., Кавцевич Н.Н., Кочетков Н.В. Содержание в неволе некоторых видов морских млекопитающих Арктики. Изд. КФ АН СССР, Апатиты, 1987. 70 с.
19. Мишин В.Л., Елфимова Т.Б., Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А. Особенности полноценного жизнеобеспечения настоящих тюленей в неволе // Содержание в неволе и обучение ластоногих северного региона. Апатиты, 1992. С. 12-60.
20. Кавцевич Н.Н. Некоторые результаты исследования лейкоцитов морских млекопитающих // Эколого-физиологические исследования млекопитающих северных морей. Апатиты, 1992. С. 8-19.
21. Кавцевич Н.Н., Мишин В.Л., Ерохина И.А. Результаты обследования гренландского тюленя беломорской популяции в 1991-1992гг. Апатиты: КНЦ РАН, 1993. 19 с.
22. Кавцевич Н.Н. Вариабельность цитологических параметров крови гренландских тюленей беломорской популяции // Арктические моря: биоиндикация состояния среды, биотестирование и технология деструкции загрязнений. Апатиты: КНЦ РАН, 1993. С. 109-116.
23. Kavtsevich N.N., Yerokhina I.A. Biochemical and cytochemical features of harp seal blood // Abstr. Rep. Int. Symp. on Mar. Mamm., Tromsø, Norway, 1994. P. 93.
24. Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А. Биохимические и цитологические исследования морских млекопитающих в Арктике. Апатиты: КНЦ РАН, 1996. 169 с.
25. Kavtsevich N.N. Morphological and cytochemical features of marine mammal blood // J. of Morphology, 1997. V.232, N3. P. 122.
26. Kavtsevich N.N. Some cytochemical features of marine mammal lymphocytes // Abstr. Euro-Amer. Mammal Congr., Santiago de Compostela, 19-24 July, 1998. Santiago de Compostela, 1998. P. 199.
27. Yerokhina I.A., Kavtsevich N.N. On haematological indicators of arctic pinnipeds populations state // Abstr. Euro-Amer. Mammal Congr., Santiago de Compostela, 19-24 July, 1998. Santiago de Compostela, 1998. P. 203.
28. Мишин В.Л., Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А. Контроль функционального состояния морских млекопитающих в аквакомплексах // Адаптация и эволюция живого населения полярных морей в условиях океанического перигляциала. Апатиты: КНЦ РАН. 1999. С. 357-377.
29. Ерохина И.А., Кавцевич Н.Н. Методические аспекты оценки здоровья морских млекопитающих // Оптимизация использования морских биоресурсов и комплексное управление прибрежной зоной Баренцева моря. Мурманск, 1999. С. 31-33.

30. Кавцевич Н.Н. Гематологические показатели обыкновенных морских свиней при отравлении нефтепродуктами // Морские млекопитающие Голарктики. Матер. Междунар. конф. Архангельск, 21-23 сентября 2000г. Архангельск, 2000. С. 146-149.

31. Кавцевич Н.Н. Морфологические и некоторые цитохимические особенности крови гренландских тюленей разного возраста // Морские млекопитающие Голарктики. Матер.. Междунар. конф. Архангельск, 21-23 сентября 2000г. Архангельск, 2000. С. 150-154.

32. Кавцевич Н.Н. Морфологическое и цитохимическое исследование крови // Гренландский тюлень (современный статус вида и его роль в функционировании экосистем Белого и Баренцева морей). Мурманск, 2001. С. 48-72.

33. Кавцевич Н.Н. Параметры клеток крови щенков гренландского тюленя при адаптации к условиям неволи // Гренландский тюлень (современный статус вида и его роль в функционировании экосистем Белого и Баренцева морей). Мурманск, 2001. С. 127-133.

34. Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А. Некоторые особенности состава крови щенков гренландского тюленя, совершающих аномальные миграции // Современные проблемы физиологии и экологии морских животных. Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 2003. С. 174-185.

35. Ерохина И.А., Кавцевич Н.Н. О возможности применения гематологических данных в мониторинге популяций ластоногих // Ученые записки Тернопольского национального педагогического университета. Серия: Биология. 2005. № 4 (27). С. 82-83.

36. Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А., Юрко А.С. Параметры крови морских млекопитающих в системе биоиндикации состояния окружающей среды // Современное состояние экосистем Кольского полуострова. Мурманск: ЦНТИ, 2005. С. 103-122.

37. Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А. "Физиологический перекрест" лейкоцитарной формулы крови – показатель жизнеспособности щенков тюленей? // Морские млекопитающие Голарктики: Сб. науч. тр. СПб., 2006. С. 230-234.

38. Юрко А.С., Кавцевич Н.Н. Районы организаторов ядрышка гренландских тюленей разного возраста // Морские млекопитающие Голарктики: Сб. науч. тр. СПб., 2006. С. 576-580.

39. Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А. Войнов В.Б. Оценка и контроль физиологических и функциональных параметров ластоногих // Экспериментальные исследования морских млекопитающих в условиях Кольского залива. Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 2007. С. 125-161.

40. Кавцевич Н.Н., Минзюк Т.В. Некоторые морфологические и цитохимические особенности крови щенков серого тюленя // Биология: Теория, практика, эксперимент: Матер. междунар. науч. конф. В 2-х кн. Саранск: ООО "Бьюти", 2008. Кн. 2. С. 167-171.

41. Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н. Содержание больших гранулярных лимфоцитов у гренландских тюленей разного возраста // Современные проблемы

и методы экологической физиологии и патологии млекопитающих, введенных в зоокультуру. Матер. 4 междунар. симп. Петрозаводск, 2009. С. 181-186.

42. Кавцевич Н.Н., Минзюк Т.В. Выявление миелопероксидазы в лейкоцитах серых тюленей // Пробл. изуч. и охр. животного мира на Севере. Матер. всеросс. конф. Сыктывкар, 2009. С. 327-328.

43. Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н. Морфометрия районов организаторов ядрышка лимфоцитов серых тюленей // Пробл. изуч. и охр. животного мира на Севере. Матер. всеросс. конф. Сыктывкар, 2009. С. 332-333.

44. Ерохина И.А., Кавцевич Н.Н. Проблема охраны здоровья морских млекопитающих // Соврем. научно-практ. достижения в ветеринарии. Сб. статей Междунар. конф. 15-16 апреля 2010г. Киров. 2010. С. 73-76.

45. Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н. Морфологические особенности лейкоцитов щенков тюленя-хохлача // Соврем. научно-практ. достижения в ветеринарии. Сб. статей Междунар. конф. 15-16 апреля 2010г. Киров. 2010. С. 122-124.

46. Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н. Клеточный состав крови щенков тюленя хохлача (*Cystophora cristata* Erxleben, 1777) // Морские млекопитающие Голарктики. Сб. научн. тр. по материалам VI междунар. конф. Калининград, 11-15 октября 2010г. Калининград. 2010. С. 397-401.