

УДК 599.745.3:591.111.1

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ЗЕРНИСТЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ СЕРЫХ ТЮЛЕНЕЙ

© 2011 г. Т.В. Минзюк¹

Установлено, что в процессе раннего постнатального онтогенеза серых тюленей активность миелопероксидазы снижается, а содержание лизосомных катионных белков, наоборот, возрастает. Антимикробная защита у щенков серых тюленей до возраста 3–4 месяца обеспечивается главным образом миелопероксидазой. Катионные белки в этот период выступают в качестве дополнительного компонента неспецифической бактерицидной системы.

Ключевые слова: серый тюлень, лейкоциты, миелопероксидаза, катионный бактерицидный белок, неспецифическая резистентность организма.

ВВЕДЕНИЕ

Уровень естественной резистентности организма имеет большое значение в процессах адаптации морских млекопитающих к условиям окружающей среды. Центральным звеном врожденного клеточного иммунитета являются фагоцитирующие лейкоциты (нейтрофильные, эозинофильные и базофильные гранулоциты), основная функция которых в организме – антимикробная защита, они играют также роль медиаторов воспаления, обладают цитотоксическим, противоопухолевым действием [1, 2]. Обладая широким спектром защитно-приспособительных реакций, лейкоциты участвуют в формировании противoinфекционной неспецифической резистентности организма. Бактерицидная активность лейкоцитов обеспечивается кислород-зависимой ферментной системой (миелопероксидаза, синглетный кислород, супероксидный анион, гидроксильный радикал, пероксид водорода, галогены) и кислороднезависимой неферментной системой (катионные белки, лизоцим, трансферрин, лактоферрин, молочная кислота).

Миелопероксидаза (МПО) и катионные белки (КБ) являются важными составными частями антимикробной защиты организма. Недостаточность КБ и МПО в гранулоцитах приводит к резкому снижению неспецифической резистентности организма [1]. МПО и КБ выявляются в лизосомах лейкоцитов [2, 3]. Являясь главным кислородзависимым звеном в процессах фагоцитоза, МПО обладает микробицидным действием, выполняет тумори-

цидную функцию и участвует в ряде метаболических процессов [4]. В основе механизма бактерицидного действия МПО лежит процесс галогенизации белков бактерий, который осуществляется только в присутствии пероксида водорода и галогенов [2, 5, 6]. Кроме того, МПО как фермент антиоксидантной системы (АОС) принимает участие в регуляции уровня свободнорадикального окисления, обеспечивая защиту организма от окислительного стресса. У различных видов ныряющих млекопитающих (норки, ондатры, дельфины) при нормальном дыхании активность ферментов АОС выше, чем у наземных животных. Наряду с каталазой, пероксидазой и другими ферментами АОС МПО участвует в поддержании аэробных процессов метаболизма при гипоксии [7].

Неферментные катионные белки проявляют бактерицидную активность в анаэробных условиях. Адсорбируясь на поверхности бактерий, они вступают в электростатическое взаимодействие с ее анионными компонентами, что приводит к нарушению структуры и функции мембраны и гибели бактериальной клетки [6, 8].

Данных об активности миелопероксидазы и содержании катионного белка в организме морских млекопитающих в доступной литературе крайне мало, хотя они представляют существенный интерес как для оценки защитных резервов организма, так и для решения ключевых эволюционных проблем [9].

Ранее [10] мы исследовали изменения активности организаторов ядрышка лимфоцитов как основного клеточного звена специфического иммунитета у серых тюленей разного возраста. В качестве показателей общего уровня неспецифической резистентности определяли также лейкоцитарные ин-

¹ Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра РАН, 183010, Мурманск, ул. Владимирская, 17; e-mail: minzyuk@mail.ru

дексы согласно классификации адаптивных состояний, предложенной Л.Х. Гаркави с соавторами [11]. В настоящей работе проведена оценка содержания миелопероксидазы и катионных белков зернистых лейкоцитов серых тюленей в разные периоды раннего постнатального онтогенеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследований явились серые тюлени (*Halichoerus grypus* Fabricius, 1791) следующих возрастных групп: новорожденные, питающиеся молоком (2–3 недели), завершившие молочное питание (1–1,5 месяцев), самостоятельно питающиеся рыбой (3–4 месяца и самка, 1 год) и взрослые животные (3,5 года). Материал получен на ценных залежах (о. Большой Айнов, Баренцево море) и в аквариальном комплексе ММБИ.

Кровь брали из внутривенной (экстрадуральной) вены. Фиксированные в метаноле мазки окрашивали на катионный белок по методу М. Олферта и И. Гешвинда [12]. Активность миелопероксидазы выявляли в реакции с бензидином [13]. Препараты изучали, используя масляную иммерсию (объектив $\times 100$, окуляр $\times 10$). Морфометрические параметры окрашенных гранул лейкоцитов определяли с помощью видеосистемы и программного обеспечения AxioVision (фирмы Zeiss). Интенсивность реакции определяли по количеству окрашенного вещества в цитоплазме клетки по 4-балльной системе: от 0 (гранулы отсутствуют) до 3 баллов. В каждой мазке учитывали 200 гранулоцитов. Вычисляли средний цитохимический коэффициент (СЦК) [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Катионные белки. В клинической практике активность бактерицидных систем гранулоцитов оценивается по количеству содержащихся в цитоплазме гранул, интенсивности их окраски и характеру распределения. Уменьшение площади гранул и плотности их распределения в цитоплазме свидетельствуют о снижении активности ферментов. Недостаточное содержание антибактериальных компонентов гранул может привести к незавершенному фагоцитозу в воспалительном очаге и развитию гнойных осложнений [15].

Размер гранул, содержащих КБ (КБ⁺-гранул), у серых тюленей всех возрастных групп варьирует незначительно. Средняя площадь одной гранулы у тюленей составляет 0,26 мкм², в группе щенков 3–4 месяца несколько выше – 0,29 мкм², у питающихся молоком – 0,20 мкм². Средний размер гранул

серых тюленей мало отличается от такового человека (0,30 мкм²).

У всех серых тюленей в пределах одной клетки окрашенные гранулы в среднем одинаковы по размеру, только у щенков, начавших самостоятельно питаться рыбой, встречаются в одной и той же клетке как мелкие (0,15 мкм²), так и относительно крупные гранулы (до 0,53 мкм²), что и обеспечивает самый высокий их размер в данной возрастной группе.

Среди лейкоцитов, проявляющих положительную реакцию на КБ, во всех возрастных группах серых тюленей клетки с единичными окрашенными гранулами отсутствуют. Число гранул, как правило, несколько десятков. Лейкоциты, в которых они заполняют всю цитоплазму, составляют до 90% клеток, содержащих КБ.

С рождения у тюленей число лейкоцитов, в которых выявляются катионные белки, очень низкое (табл. 1). Достоверное увеличение КБ происходит с 1–1,5 месяцев, когда тюлени начинают самостоятельно питаться рыбой ($p < 0,01$). Следует отметить, что возрастание количества бактерицидных белков в организме тюленей с возрастом индивидуально, при этом различия в вариабельности, хоть и значительны, но низкодостоверны. Наибольшие колебания СЦК наблюдаются в группе животных, завершивших молочное вскармливание и ювенильную линьку, но еще не перешедших к самостоятельному питанию. Возможно, увеличение содержания КБ в этом возрасте связано с перестройками в метаболизме тюленей, обусловленными голоданием и повышенным уровнем катаболизма белка.

Каждый КБ⁺-лейкоцит серых тюленей содержит более 60 окрашенных лизосомных гранул. С возрастом происходит увеличение среднего числа окрашиваемых прочным зеленым гранул в одной клетке: от 95 (у тюленей 0,5–1,5 мес.) до 140 (у взрослых).

Следует отметить, что у серых тюленей на всех возрастных этапах очень низкий уровень КБ⁺-лейкоцитов по сравнению с другими видами животных и человеком. Значения СЦК у человека в норме 1,5, у детей в возрасте 1–3 лет – 1,9. У суточных цыплят СЦК содержания катионного белка составляет $1,20 \pm 0,09$, а к 4 месяцам повышается до 2,05–2,23, что соответствует среднему уровню естественной резистентности [16]. У интактных белых мышей нормальный уровень КБ составляет 1,60 [17].

Миелопероксидаза. Максимальный бактерицидный эффект достигается в корпоративном действии миелопероксидазы и катионных белков [1]. При этом микробицидное действие КБ гранулоцитов не зависит от МПО [18].

Таблица 1. Показатели содержания катионного белка у серых тюленей (средняя $\pm$ стандартная ошибка)

Группа тюленей	СЦК		КБ + лейкоциты, %	
	средняя	пределы колебаний (C.V., %)	средняя	пределы колебаний (C.V., %)
Новорожденные, $n = 8$	0,06 $\pm$ 0,01	0,03–0,09 (37,5 $\pm$ 10,6)	2,4 $\pm$ 0,4	1,0–4,0 (41,7 $\pm$ 12,1)
Питающиеся молоком, 2–3 нед., $n = 12$	0,08 $\pm$ 0,02	0,01–0,19 (67,0 $\pm$ 19,7)	3,0 $\pm$ 0,6	0,5–7,0 (67,0 $\pm$ 19,7)
Завершившие молочное питание, 1–1,5 мес., $n = 8$	0,19 $\pm$ 0,06	0,04–0,57 (93,5 $\pm$ 38,7)	7,3 $\pm$ 2,4	1,5–22,0 (92,7 $\pm$ 54,6)
Питающиеся рыбой, 3–4 мес., $n = 6$	0,15 $\pm$ 0,05	0,02–0,39 (82,1 $\pm$ 36,3)	7,4 $\pm$ 1,8	3,5–15,5 (59,5 $\pm$ 22,4)
Взрослые (3,5 года), $n = 2$	0,29 $\pm$ 0,01	0,28–0,29 (6,2 $\pm$ 3,1)	11,5 $\pm$ 0,5	11,0–12,0 (1,2 $\pm$ 0,6)

Таблица 2. Показатели активности миелопероксидазы серых тюленей (средняя $\pm$ стандартная ошибка)

Группа тюленей	СЦК		МПО ⁺ -лейкоциты, %	
	средняя	пределы колебаний (C.V., %)	средняя	пределы колебаний (C.V., %)
Новорожденные, $n = 8$	2,51 $\pm$ 0,04	2,29–2,69 (1,2 $\pm$ 0,3)	98,8 $\pm$ 0,4	97–100 (4,6 $\pm$ 1,2)
Кормящиеся молоком, $n = 12$	2,38 $\pm$ 0,02*	2,27–2,45 (1,0 $\pm$ 0,6)	98,5 $\pm$ 0,3	97–100 (2,7 $\pm$ 0,2)
Завершившие молочное питание, $n = 8$	2,22 $\pm$ 0,04**	2,00–2,41 (2,2 $\pm$ 1,4)	97,6 $\pm$ 0,8	95–100 (5,7 $\pm$ 0,5)
Питающийся рыбой (самка, 1 год), $n = 4$	1,91 $\pm$ 0,07**	1,72–2,07 (3,2 $\pm$ 1,1)	93,8 $\pm$ 1,5	90–97 (7,5 $\pm$ 2,6)

* – Отличие от группы 1 достоверно при $p < 0,01$, ** – достоверно при $p < 0,001$.

Количество лейкоцитов, дающих положительную реакцию на миелопероксидазу (МПО⁺-лейкоциты), у серых тюленей на всех возрастных этапах высокое (90–100%) (табл. 2). Однако СЦК достоверно снижается при переходе тюленей в новую возрастную группу (от 2,51 у новорожденных до 1,91 у взрослых). Также с возрастом, по-видимому, уменьшается количество МПО⁺-лейкоцитов, в которых окрашенные гранулы полностью занимают цитоплазму клетки. У новорожденных они составляют в среднем 59,5%, у годовалого тюленя – 15,6%.

Средний размер зерен нейтрофильных гранулоцитов, содержащих МПО, составляет 0,42 мкм², в эозинофильных гранулоцитах они крупнее – 0,55 мкм². Считается, что фагоцитоз бактерий эозинофильными гранулоцитами ниже по сравнению с нейтрофильными. При этом первые проявляют более высокую активность пероксидазы и более высокий окислительный метаболизм [4]. Определить количество гранул в нейтрофильных гранулоцитах достаточно сложно, т.к. зерна плотно прилегают друг к другу.

Существуют данные о том, что высокая резистентность к дефициту кислорода ныряющих млекопитающих по сравнению с наземными животными обеспечивается за счет повышенной активности АОС [19]. Активность ряда ферментов АОС в процессе онтогенеза артемии, мидий и рыб возрастает [7]. Обследованные нами детеныши серых тюленей слабо различаются по активности МПО. Однако различия между группами животных статистически достоверны и свидетельствуют о снижении уровня МПО с возрастом щенков (табл. 2). В то же время у тюленя (самка, 1 год), имеющего опыт погружений под воду, активность фермента значительно ниже (табл. 2). Система специфического иммунитета у щенков тюленей еще не сформирована в достаточной степени, поэтому существенна роль неспецифических защитных реакций, в частности фагоцитоза. Таким образом, у щенков тюленей, длительное время (1–1,5 месяцев) находящихся на суше во время ювенильной линьки, одной из основных функций МПО может быть обеспечение неспецифических защитных реакций лейкоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На ранних этапах онтогенеза тюленей ведущую роль в регуляции активности миелопероксидазы играет, вероятно, микрофлора среды, в которую попадают детеныши после рождения. При содержании лаастоногих в неволе влияние гипоксии на организм животных значительно ниже, чем в природных условиях, поэтому изменения уровня МПО могут рассматриваться в рамках воздействия на него других факторов (загрязнения, бактериальные инфекции). Высокая активность МПО у новорожденных обусловлена, вероятно, жизненно важной ролью этого фермента в АОС в период внутриутробного развития. После рождения возрастает значение бактерицидного действия этого фермента, которое дополняется повышающейся с возрастом активностью неферментного компонента бактерицидной защиты, лизосомных катионных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. М.: Медицина, 1978. 128 с.
2. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Механизмы развития болезней и синдромов. СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2002. 507 с.
3. Бобова Л.П., Кузнецов С.Л., Сапрыкин В.П. Гистофизиология крови и органов кроветворения и иммуногенеза. М.: Новая волна, 2003. 157 с.
4. Муравьев Р.А., Фомина В.А., Rogovin B.B. Пероксидазосомы эозинофильных лейкоцитов // Известия АН. Сер. биол. 1992. Вып. 6. С. 835–843.
5. Rogovin B.B., Муравьев Р.А., Пирузян Л.А. Пероксидазосомы – 83 // Известия АН. Сер. биол. 1983. Вып. 5. С. 645–666.
6. Практикум по иммунологии / Под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. М.: Изд-во МГУ, 2001. 224 с.
7. Руднева-Титова И.И. Формирование антиоксидантной системы в раннем онтогенезе морских животных // Усп. совр. биол. 1997. Т. 117. Вып. 3. С. 390–397.
8. Rogovin B.B., Муравьев Р.А., Фомина В.А. Антимикробные белки и пептиды нейтрофильных лейкоцитов // Известия АН. Сер. биол. 1992. Вып. 6. С. 854–859.
9. Руднева И.И. Особенности антиоксидантной системы крови черноморских дельфинов-афалин (*Tursiops truncatus*) // Морские млекопитающие Голарктики: Сб. науч. тр. по мат-лам 4-й Междунар. конф., 2006. СПб., 2006. С. 455–458.
10. Кавцевич Н.Н., Минзюк Т.В. Лейкоцитарные индексы и активность организаторов ядрышка лимфоцитов щенков серых тюленей // Вестник Южного научного центра. 2010. Т. 6. № 4. С. 76–83.
11. Гаркави Л.Х., Толмачев Г.Н., Михайлов Н.Ю. и др. Адаптационные реакции и уровни реактивности как эффективные диагностические показатели донозологических состояний // Вестник Южного научного центра. 2007. Т. 3. № 1. С. 61–66.
12. Allfert M., Geschwind I.I. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei // PNAS U.S. 1953. Vol. 39. P. 991–999.
13. Лецкий В.Б. Цитохимические исследования лейкоцитов (методические рекомендации). Л.: Медицина, 1973. 33 с.
14. Astaldi G., Verga L. The glycogen content of the cells of lymphatic leukaemia // Acta Haemat. 1957. Vol. 17. P. 1–29.
15. Напольников Н.В. Компьютерный анализ антибактериальных систем нейтрофильных лейкоцитов в оценке характера течения острого верхушечного периодонтита: Автореф. дисс... канд. мед. наук / Кубанский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ. Волгоград, 2007. 23 с.
16. Турицина Е.Г. Цитоморфология органов иммуногенеза кур при реализации комплексных программ вакцинации и коррекция иммунного статуса в условиях промышленных птицефабрик: Автореф. дисс... д-ра вет. наук. Барнаул, 2011, 42 с.
17. Будыка Д.А., Абзаева Н.А., Руднев С.М. и др. Бактерицидная активность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови белых мышей, привитых против чумы, и в различных схемах инфицирования чумной инфекцией // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. Т. 100. С. 56–50.
18. Odeberg H., Olsson I. Antibacterial activity of cationic proteins from human granulocytes // J. Clin. Invest. 1975. Vol. 56. № 5. P. 1118–1124.
19. Илюха В.В. Антиоксидантные ферменты в физиологических адаптациях млекопитающих (сравнительно-видовой, онтогенетический и прикладной аспекты): Дисс... д-ра биол. наук. Сыктывкар, 2003. 267 с.

AGE CHANGES OF BACTERICIDAL ACTIVITY OF GRANULAR LEUCOCYTES OF GREY SEALS

T.V. Minzyuk

It has been ascertained that during an early postnatal ontogenesis of grey seals myeloperoxidase activity decreases and the contents of lysosomal cationic proteins, on the contrary, increases. Antimicrobial protection of grey seals pups up to the age of 3–4 months is provided, mainly, by myeloperoxidase. Cationic proteins in this period represent themselves as an additional component of nonspecific bactericidal system.

Key words: grey seal, leucocytes, myeloperoxidase, cationic bactericidal protein, nonspecific resistance.

REFERENCES

1. Pigarevskiy V.E. 1978. *Zernistye leykotsity i ikh svoystva*. [Granular leukocytes and their properties]. M., "Medicine": 128 p. (In Russian).
2. Zaychik A.Sh., Churilov L.P. 2002. *Mekhanizmy razvitiya bolezney i sindromov*. [Mechanisms of disease and syndromes]. Saint Petersburg, "ELBI-SPb": 507 p. (In Russian).
3. Bobova L.P., Kuznetsov S.L., Saprykin V.P. 2003. *Gistofiziologiya krovi i organov krovetvoreniya i immunogeneza*. [Histophysiology blood and organs of hematopoiesis and immunogenesis]. M., "Novaya volna": 157 p. (In Russian).
4. Murav'ev R.A., Fomina V.A., Rogovin V.V. 1992. Peroksidazosomy eozinofil'nykh leykotsitov. [Peroksidazosomy Eosinophils]. *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk. Seriya Biologicheskaya*. (Biology Bulletin). 6: 835–843. (In Russian).
5. Rogovin V.V., Murav'ev R.A., Piruzyan L.A. 1983. Peroksidazosomy – 83. [Peroksidazosomy – 83]. *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk. Seriya Biologicheskaya*. (Biology Bulletin). 5: 645–666. (In Russian).
6. Kondrat'evoy I.A., Samuilova V.D. 2001. *Praktikum po immunologii*. [Workshop on immunology]. M., Moscow State University Publishers: 224 p. (In Russian).
7. Rudneva-Titova I.I. 1997. Formirovanie antioksidantnoy sistemy v rannem ontogeneze morskikh zhivotnykh. [Formation of the antioxidant system in early ontogeny of marine animals]. *Biology Bulletin Reviews*. 117(3): 390–397. (In Russian).
8. Rogovin V.V., Murav'ev R.A., Fomina V.A. 1992. Antimikrobnnye belki i peptidy neytrofil'nykh leykotsitov. [The antimicrobial proteins and peptides neutrophilic leukocytes]. *Biology Bulletin*. 1992. 6: 854–859. (In Russian).
9. Rudneva I.I. 2006. Osobennosti antioksidantnoy sistemy krovi chernomorskich del'finov-afalin (*Tursiops truncatus*). [Features of the Antioxidant System of the Blood of the Black Sea Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*)]. *Marine Mammals of the Holarctic. Collection of Scientific Papers*. Sankt Petersburg: 455–458. (In Russian).
10. Kavtsevich N.N., Minzyuk T.V. 2010. Leykotsitarnye indeksy i aktivnost' organizatorov yadryshka limfotsitov shchenkov serykh Tyuleney. [Leukocytic Indexes and Lymphocyte Nucleolus Organizers Activity of Grey Seal Pups]. *Vestnik Yuzhnogo Nauchnogo Tsentra*. 6(4): 76–83. (In Russian).
11. Garkavi L.Kh., Tolmachev G.N., Mikhaylov N.Yu. 2007. Adaptatsionnye reaktsii i urovni reaktivnosti kak effektivnye diagnosticheskie pokazateli donozologicheskikh sostoyaniy. [Adaption Reactions and Levels of Reactivity as Effective Diagnostic Indices of Prenosological States]. *Vestnik Yuzhnogo Nauchnogo Tsentra*. 3(1): 61–66. (In Russian).
12. Allfert M., Geschwind I.I. 1953. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *PNAS U.S.* 39. P. 991–999. (In English).
13. Letskiy V.B. 1973. *Tsitokhimicheskie issledovaniya leykotsitov (metodicheskie rekomendatsii)*. [Cytochemical studies of leukocytes (guidelines)]. Leningrad, "Medicine": 33 p. (In Russian).
14. Astaldi G., Verga L. 1957. The glycogen content of the cells of lymphatic leukaemia. *Acta Haemat.* 17: 1–29. (In English).
15. Napol'nikov N.V. 2007. *Komp'yuternyy analiz antibakterial'nykh sistem neytrofil'nykh leykotsitov v otsenke kharaktera techeniya ostrogo verkhushhechnogo periodontita*: Avtoref. diss... kand. med. nauk. Kubanskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet Federal'nogo agentstva po zdravookhraneniyu i sotsial'nomu razvitiyu RF. Volgograd: 23 p. (In Russian).

16. Turitsina E.G. 2011. *Tsitomorfologiya organov immunogeneza kur pri realizatsii kompleksnykh programm vaktsinatsiy i korrektsiya immunnogo statusa v usloviyakh promyshlennykh ptitsefabrik*: Avtoref. diss... d-ra vet. nauk. Barnaul: 42 p. (In Russian).
17. Budyka D.A., Abzaeva N.A., Rudnev S.M. 2009. Bakteritsidnaya aktivnost' polimorfno-yadernykh leykotsitov krovi belykh myshey, privitykh protiv chumy, i v razlichnykh skhemakh infitsirovaniya chumnoy infektsiy. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 100: 50–56. (In Russian).
18. Odeberg H., Olsson I. 1975. Antibacterial activity of cationic proteins from human granulocytes. *J. Clin. Invest.* 56(5): 1118–1124. (In English).
19. Ilyukha V.V. 2003. *Antioksidantnye fermenty v fiziologicheskikh adaptatsiyakh mlekopitayushchikh (sravnitel'no-vidovoy, ontogeneticheskiy i prikladnoy aspekty)*: Diss... d-ra biol. nauk. Syktyvkar: 267 p. (In Russian).