

УДК 599.537-111.11:57.087

ИНДЕКСЫ В ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ ДЕЛЬФИНА-АФАЛИНЫ *TURSIOPS TRUNCATUS* (MONTAGU, 1821)

© 2024 г. Т. В. Селиверстова

Мурманский морской биологический институт РАН, Мурманск, Российская Федерация
E-mail: minzyuk@mail.ru

Поступила в редакцию 10.05.2023; после доработки 17.08.2023;
принята к публикации 27.08.2024; опубликована онлайн 09.09.2024.

Содержание катионного белка в гранулоцитах дельфина-афалины *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) определяли методом расчёта среднего цитохимического коэффициента. Обоснованы его недостатки при визуальном установлении интенсивности окрашивания продукта цитохимической реакции на препаратах крови и при распределении клеток на группы по количеству в них белка. Применены современные методы оценки активности вещества в клетке с использованием компьютерных программ и светового микроскопа, что позволяет минимизировать погрешности морфометрических измерений объектов. Рассчитаны индивидуальные параметры по степени заполнения и интенсивности окрашивания катионного белка в гранулоцитах у афалин с учётом и без учёта содержания белка во всём объёме крови. Такие показатели позволяют проводить сравнительные возрастные, внутри- и межвидовые исследования животных. Установлено, что содержание катионного белка в гранулоцитах может сильно различаться у разных особей афалин, а с возрастом его количество меняется незначительно.

Ключевые слова: морфометрия, средний цитохимический коэффициент, интегральный цитохимический показатель, катионный белок, гранулоциты, афалина

В России содержание морских млекопитающих в океанариумах и дельфинариях связано в основном с коммерческой деятельностью. Небольшое число таких организаций ведёт научно-исследовательскую работу по оценке состояния здоровья лаастоногих и китообразных и их иммунного статуса [Андреева и др., 2013; Васильева, 2019; Дёрко и др., 2018; Дуванова, Денисенко, 2018; Захаренко, 2019; Каганова, 2018; Романов и др., 2023; Семёнов и др., 2020; Lauderdale et al., 2021]. Для определения функционального состояния здоровья морских млекопитающих широко применяют клинический, биохимический и цитоморфологический анализ крови. К настоящему времени проведено большое количество таких исследований с использованием гематологических и биохимических анализаторов, проточного цитометра и т. д. [CRC Handbook, 2018; Keogh et al., 2011; Lauderdale et al., 2021; Nouri-Shirazi et al., 2017; Tryland et al., 2006]. Возможности сбора и доставки образцов крови, полученных от животных в природной среде обитания, зачастую ограничены удалённостью мест обитаний морских млекопитающих от лабораторий и допустимыми сроками хранения биоматериала. Мазки крови, полученные от животных как в условиях неволи, так и в природной среде обитания, могут храниться длительно и позволяют описать и оценить состояние здоровья млекопитающих позднее, с использованием современного оборудования.

Точные математические измерения клеточных структур с применением методов компьютерной морфометрии позволяют проводить сравнительные возрастные, внутри- и межвидовые исследования животных. Количественные и качественные методы эффективно применяются в оценке функциональной активности клеток крови млекопитающих. Количественный анализ направлен на выявление отдельных групп клеток и на определение их соотношения (например, лейкоцитарная формула), подсчёт количества гранул, ядерных элементов в отдельных клетках, а также на измерение площадей окрашенного различными цитохимическими реакциями вещества. Качественный анализ связан с определением интенсивности окрашивания продукта цитохимической реакции. В основе каждого из этих методов лежит использование размерных (длины, ширины, радиуса, площади и др.) и количественных (числа гранул и сегментов) характеристик анализируемых объектов.

Проведение качественного анализа требует определения не только размерных величин, но и цветовых характеристик (к примеру, оптической плотности) продукта реакции. Такая оценка функциональной активности изучаемой клетки предполагает применение специального оборудования. В то же время точные размерные и цветовые параметры не зависят от субъективности и опыта исследователя. При определении морфометрических показателей клеток на мазках крови используют абсолютные и относительные параметры. К абсолютным относят площадь, диаметр и форму клеток, а также количество в них гранул и клеточных элементов. Для этого в каждом мазке проводят измерения клеток, свободно расположенных в видимом поле без наложений друг на друга и без деформации от близлежащих клеток, чтобы исключить их сжатие в зависимости от плотности мазка. Использование относительных параметров позволяет определять характеристики клеточных структур вне зависимости от плотности мазка.

Количественные характеристики просты и удобны при определении функциональной активности клеток, но дают субъективную и лишь общую оценку интенсивности клеточных процессов. Широко используют полуколичественный метод — расчёт среднего цитохимического коэффициента [Лецкий, 1973], позволяющего по характеру распределения окрашенного вещества в клетке оценить среднюю цитохимическую активность всего живого организма. Эффективно применяют подсчёт лейкоцитарной формулы крови и на её основе определяют лейкоцитарные индексы [Гаркави и др., 1990; Кальф-Калиф, 1941; Мустафина и др., 1999; Островский и др., 2006, 2007; Сперанский и др., 2009; Davis et al., 2008]. Комплексное использование гематологических индексов даёт большой объём информации и позволяет оценить развитие, тяжесть и течение воспалительного процесса и эндогенной интоксикации, проанализировать общую иммунологическую реактивность организма. Применение данных коэффициентов и индексов информативно как по отдельности, так и совместно. В то же время некоторые существующие количественные показатели несовершенны.

Цель данной работы — изучить возможность применения дополнительных коэффициентов и индексов для оценки функциональной активности белков и ферментов в клетках крови афалины на примере катионного белка в гранулоцитах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования — дельфины *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) возрастом от 1 до 16 лет. Материал от 14 особей получен в океанариуме города Севастополя. Кровь брали из вен хвостового плавника афалин. Мазки крови изготавливали общепринятым способом, перед окраской фиксировали в метаноле в течение 5 мин. Препараты окрашивали прочным зелёным по методике М. Олферта и И. Гешвинда [Бутенко и др., 1974] и изучали, используя масляную иммерсию, с помощью микроскопа Axio Imager M1, оснащённого цифровой видеокамерой AxioCam и программным обеспечением для анализа изображений микрообъектов AxioVision (фирма Zeiss).

Для определения содержания катионного белка (далее — КБ) вычисляли средний цитохимический коэффициент [Лецкий, 1973], определяли площадь клетки, а также площадь и оптическую плотность продукта цитохимической реакции. Рассчитывали следующие цитохимические характеристики: показатель заполнения клетки (далее — ПЗК) и интегральный цитохимический показатель (далее — ИЦП) [Славинский, 2000].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для вычисления среднего цитохимического коэффициента (далее — СЦК) визуально определяют степень интенсивности реакции по количеству окрашенного вещества в цитоплазме клетки (рис. 1). Гранулоциты делят на группы: 0 (отсутствие окраски или гранул в цитоплазме); А — малоактивные клетки (наличие единичных гранул или окраски); В — среднеактивные (исследуемое вещество в лейкоцитах заполняет почти всю клетку, но могут оставаться неокрашенные участки цитоплазмы); С — высокоактивные (интенсивно окрашенные зёрна [вещество] заполняют всю цитоплазму). СЦК рассчитывают по формуле $СЦК = (3С + 2В + А) / 200$. В каждом мазке учитывают 200 гранулоцитов.

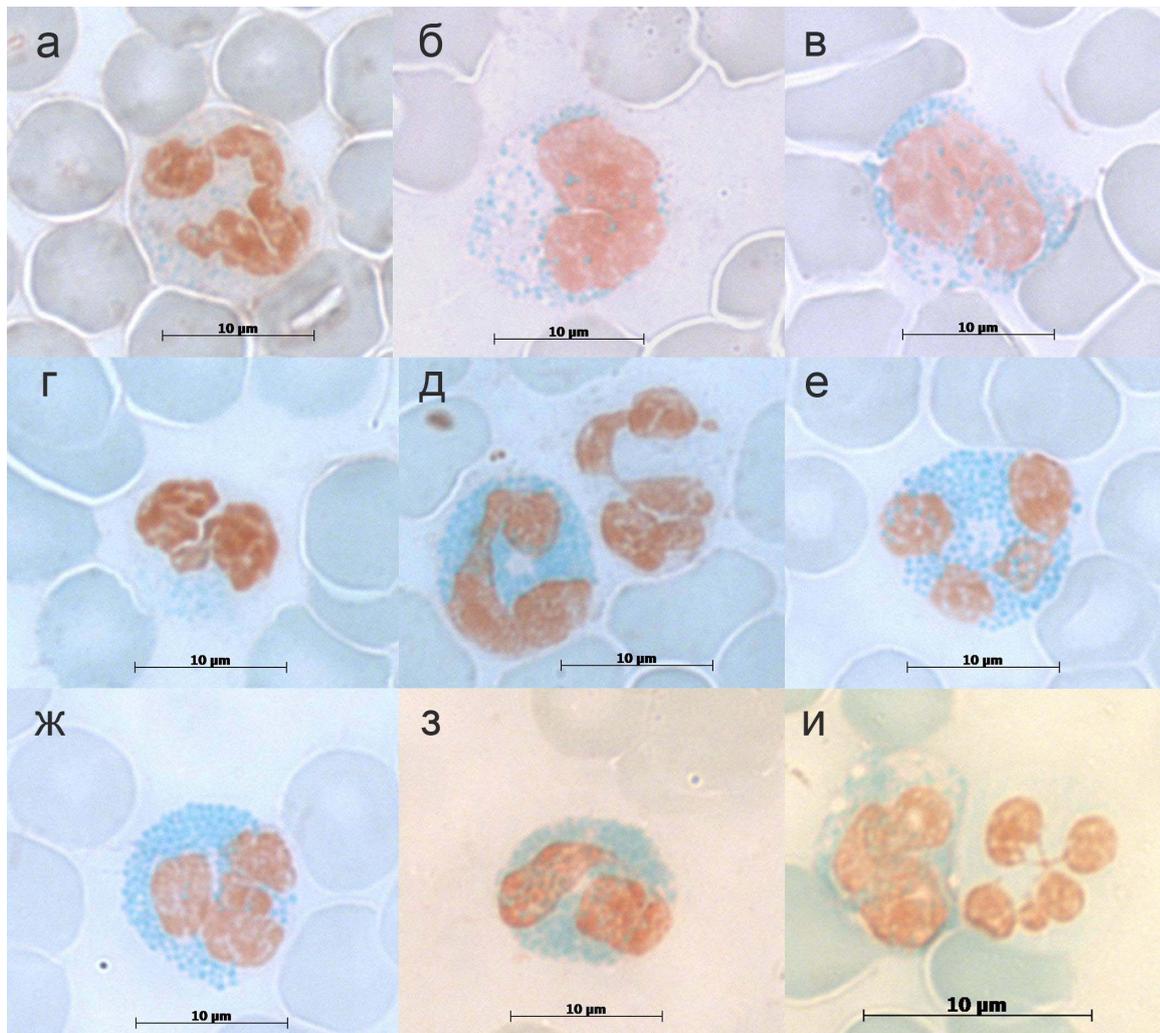


Рис. 1. Гранулоциты афалины. Окраска на катионный белок по методу М. Олферта и И. Гешвинда [Бутенко и др., 1974] (пояснения см. в тексте)

Fig. 1. Bottlenose dolphin granulocytes. Staining for cationic protein after M. Alfert and I. Geschwind [Butenko et al., 1974] (see text for explanation)

Визуально распределять клетки по вышеописанным группам, особенно относить к категориям А и В, сложно. К малоактивным клеткам с наличием единичных гранул (А) можно причислить клетку и с одной гранулой, и с небольшим участком окрашенного вещества, заполняющего четверть клетки или менее (рис. 1а, б, г). Среднеактивные гранулоциты (В) представлены также большим разбросом вариантов — от трети окрашенного вещества в клетке (рис. 1в, и) до почти полного заполнения зёрнами или активным веществом (рис. 1д, е, ж, з). При распределении клеток по группам к высокоактивным гранулоцитам (С) можно причислить те, в которых активное вещество занимает почти всю клетку и имеются лишь маленькие участки, свободные от зёрен или окрашенного вещества (рис. 1ж, з), однако, согласно классификации, данный тип окрашивания относится к группе В.

Для снижения доли окрашенных клеток, ошибочно отнесённых к той или иной группе, мы использовали дополнительные параметры оценки активности вещества. Для этого определяли площадь клетки, оптическую плотность и площадь продукта цитохимической реакции (рис. 2). Рассчитывали ПЗК и ИЦП [Славинский, 2000]. ПЗК — доля суммарной площади измеряемых структур (окрашенных гранул КБ) в площади клетки (рис. 2а, б). ИЦП — произведение суммарной площади продукта цитохимической реакции в клетке и его оптической плотности, соответствующее количеству окрашенного КБ (рис. 2б).

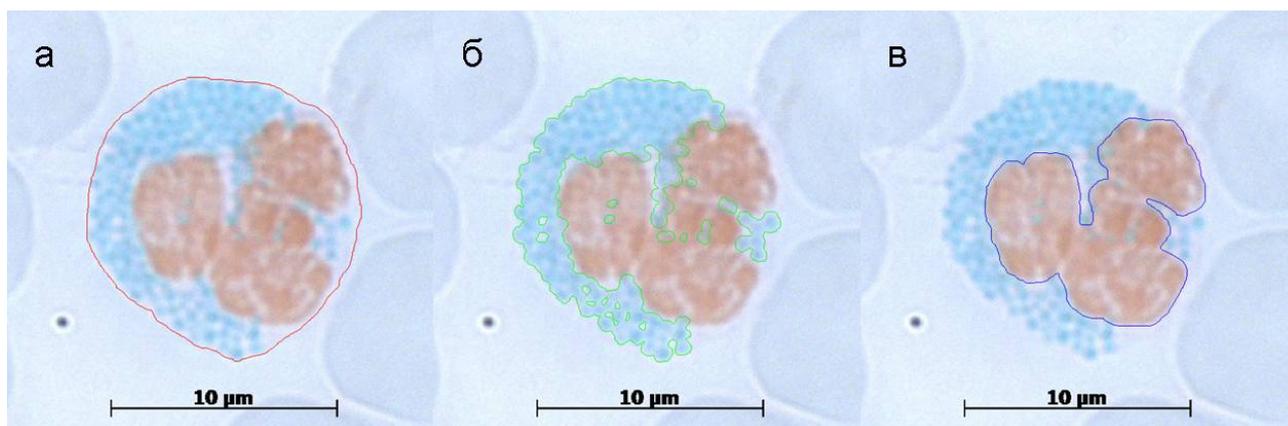


Рис. 2. Гранулоцит афалины: а — выделены границы всей клетки; б — выделена область продукта цитохимической реакции; в — выделена площадь ядра. Окраска на катионный белок по методу М. Олферта и И. Гешвинда [Бутенко и др., 1974]

Fig. 2. Bottlenose dolphin granulocytes: а, the structures of the entire cell are highlighted; б, the area of the cytochemical reaction product is highlighted; в, the area of the nucleus is highlighted. Staining for cationic protein after M. Alfert and I. Geschwind [Butenko et al., 1974]

ПЗК — удобный морфометрический параметр: он является относительным и позволяет проводить измерения вне зависимости от плотности мазка. В то же время данный параметр недостаточно информативен и требует дополнения в расчётной формуле. Вероятно, она будет более точной, если из площади клетки (рис. 2а) вычесть площадь ядра (рис. 2в) и уже данную разность разделить на суммарную площадь измеряемых структур (окрашенных гранул КБ) (рис. 2б). В таком случае можно оценить интенсивность заполнения активным веществом непосредственно в объёме цитоплазмы клетки, а не во всём объёме клетки. Недостатком ИЦП является то, что необходимо использовать клетки, свободно расположенные в видимом поле, чтобы показатели оптической плотности окрашенного вещества не изменялись при наложении или сжатии клеток.

Результаты определения СЦК, ИЦП и ПЗК в гранулоцитах афалин представлены на рис. 3 и 4. Количество лейкоцитов, содержащих КБ (количество КБ + лейкоцитов), интенсивность окрашивания и степень заполнения клеток (ПЗК) продуктом цитохимической реакции (ИЦП) меняются у дельфинов с возрастом. Значения СЦК у афалин выше, чем таковые у серых и гренландских тюленей, но ниже, чем у человека (рис. 3).

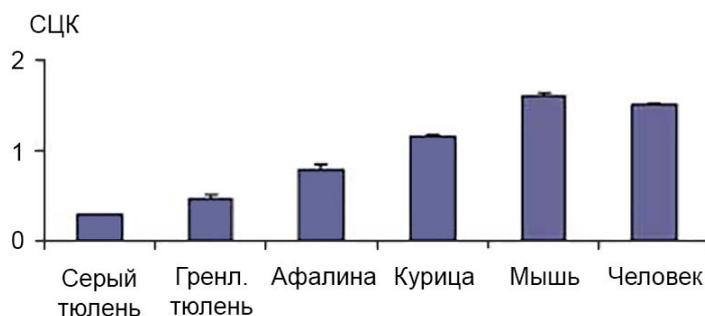


Рис. 3. Содержание катионного белка в гранулоцитах взрослых животных разных видов (по: [Будыка и др., 2009; Клетикова, 2010; Стойко, Ермаков, 2004])

Fig. 3. The content of cationic protein in granulocytes of adult animals of different species (according to: [Budyka et al., 2009; Kletikova, et al., 2010; Stoiko, Ermakov, 2004])

Нами дополнительно были введены коэффициенты. Так, средние значения ПЗК и ИЦП для выборок из 200 гранулоцитов выражали в коэффициенте показателя заполнения клетки (кПЗК) и коэффициенте интегрального цитохимического показателя (кИЦП). Использование двух последних параметров связано с необходимостью проведения сравнительных исследований между группами и отдельными видами животных, значительно отличающихся по активности белков в клетках (с такой же целью применим и средний цитохимический коэффициент). В частности, у самок афалин возрастом 4–5 лет (рис. 4, обведено кружком) при высоком значении ПЗК (то есть при самой высокой интенсивности заполнения цитоплазмы КБ + лейкоцитов окрашенными гранулами) и среднем значении ИЦП отмечены самые низкие значения СЦК, кПЗК и кИЦП, что обусловлено низким процентным содержанием КБ + лейкоцитов у животного. Такие индивидуальные колебания в распределении активного вещества в лейкоцитах (по индексу ПЗК) у афалин указывают на возрастное снижение согласно линии тренда на графике. Усреднение полученных данных как по интенсивности заполнения клеток гранулами активного вещества, так и по степени окрашивания белка в клетках показывает, что содержание КБ в гранулоцитах животных с возрастом меняется незначительно. У тюленей при средних значениях СЦК содержание активных клеток является высоким, но интенсивность заполнения активным веществом — низкой или средней.

Приведённые индексы и коэффициенты имеют преимущества и недостатки. Применение ИЦП требует чёткого соблюдения методики окрашивания по соотношению окрашивающих компонентов и времени проведения самой процедуры, а также использования клеток без наложений друг на друга, так как уплотнение мазка приводит к сгущению красящего вещества и, соответственно, к неправильному толкованию полученных результатов. ПЗК удобно применять на любых мазках вне зависимости от их плотности. Определение всех морфометрических показателей требует больших временных затрат, но компьютерные технологии и автоматические программы измерения позволяют сократить время на данные исследования. При этом использование ИЦП и ПЗК по отдельности даёт небольшой объём информации, и лучше применять их в совокупности друг с другом и с рядом других качественных и количественных параметров для оценки

функциональной активности вещества в изучаемых клетках. Следовательно, при сравнительном анализе функционального состояния организма животных на основе различных цветоярких характеристик клеток необходимо рассчитывать дополнительные индексы и коэффициенты, что продемонстрировано на примере определения содержания КБ в гранулоцитах афалины. Данные показатели могут быть эффективно применены не только при оценке содержания КБ в клетках крови, но и при определении активности других ферментов (щелочной фосфатазы, сукцинатдегидрогеназы, миелопероксидазы и т. д.).

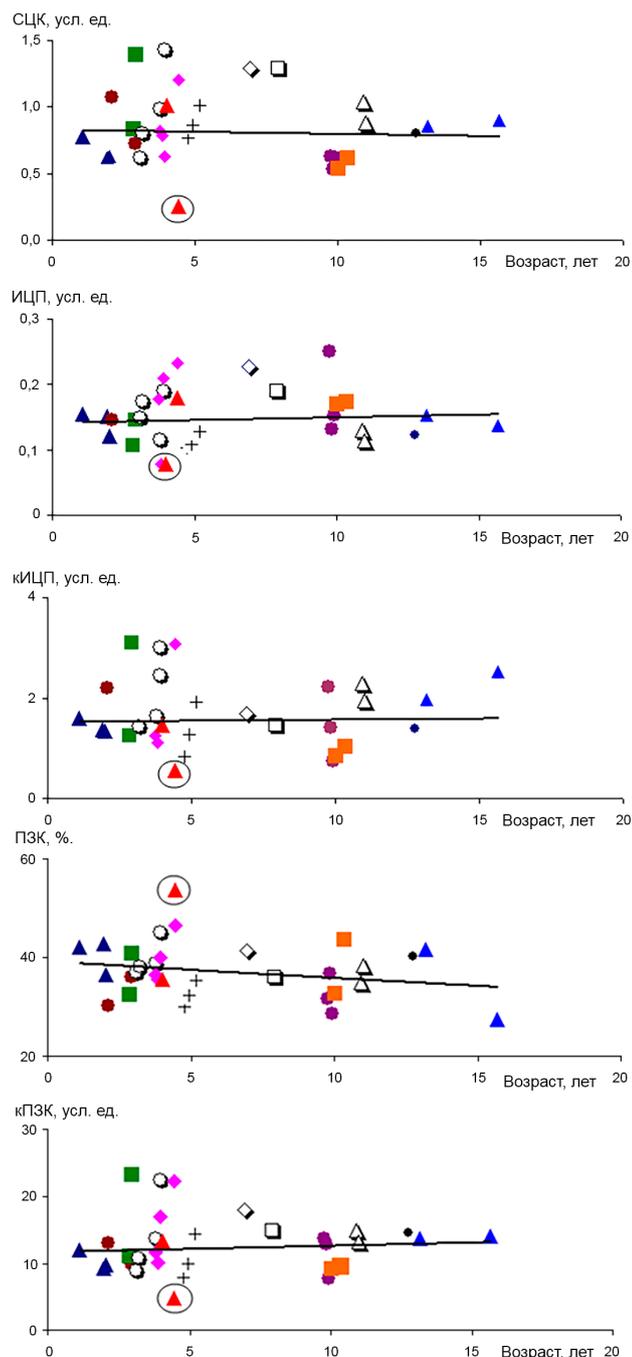


Рис. 4. Возрастные изменения цитохимических показателей содержания катионного белка в гранулоцитах афалины (для каждого отдельного животного свой символ)

Fig. 4. Age-related changes in cytochemical parameters of the content of cationic protein in granulocytes of bottlenose dolphins (each individual animal is marked with its own symbol)

Морфометрическое измерение клетки как отдельной структуры позволяет определять индивидуальные параметры для каждого организма. Несмотря на трудоёмкость дополнительных измерений и подсчётов при использовании компьютерной морфометрии, индексы дают точную количественную информацию о содержании веществ в клетках. Результаты определения морфометрических клеточных параметров морских млекопитающих необходимы в качестве дополнительных данных для оценки иммунологического статуса животных. Особенно это актуально для ластоногих и китообразных при их адаптации и длительном содержании в океанариумах и дельфинариях. Биоматериал, полученный от морских млекопитающих в естественной среде обитания, часто бывает очень разрозненным по возрастным, половым, весовым и видовым характеристикам животных, а также испорченным или недостаточным по объёму (сохраняются только мазки крови), а точность и максимальная информативность микроскопии крови животных позволяют проводить сравнительные возрастные, внутри- и межвидовые исследования морских млекопитающих.

Работа выполнена в рамках плана НИР и государственного задания ММБИ РАН на 2021–2023 гг. № FMEE-2021-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Андреева Н. А., Остапчук Т. В., Лискун О. В., Мазовская С. В. Микробиологическая адаптация дельфинов-афалин (*Tursiops truncatus*) к условиям содержания в океанариуме // *Учёные записки Таврического национального университета имени В. И. Вернадского. Биология, химия*. 2013. № 3. С. 3–14. [Andreeva N. A., Ostapchuk T. V., Liskun O. V., Mazovska S. V. Microbiological adaptation of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) to life in captivity. *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo. Biologiya, khimiya*, 2013, no. 3, pp. 3–14. (in Russ.)]
2. Бudyка Д. А., Абзаева Н. В., Руднев С. М., Иванова Г. Ф., Фисун А. А., Гостищева С. Е., Бондаренко А. И. Бактерицидная активность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови белых мышей, привитых против чумы, и в различных схемах инфицирования чумной инфекцией // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009. № 2 (100). С. 50–56. [Budyka D. A., Abzaeva N. V., Rudnev S. M., Ivanova G. F., Fissun A. A., Gostischeva S. E., Bondarenko A. I. Bactericidal activity of polymorphonuclear blood leucocytes of white mice vaccinated against plague and in different schemes of introduction of plague infection. *Problemy osobo opasnykh infektsii*, 2009, no. 2 (100), pp. 50–56. (in Russ.)]. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-2\(100\)-56-60](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-2(100)-56-60)
3. Бутенко З. А., Глузман Д. Ф., Зак К. П., Филатова Р. С., Шляховенко В. А. *Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов*. Киев : Наукова думка, 1974. 248 с. [Butenko Z. A., Gluzman D. F., Zak K. P., Filatova R. S., Shlyakhovenko V. A. *Tsitokhimiya i elektronnaya mikroskopiya kletok krovi i krovotvornykh organov*. Kyiv : Naukova dumka, 1974, 248 p. (in Russ.)]
4. Васильева С. В. Сравнительный анализ показателей красной крови у морских млекопитающих в условиях дельфинария открытого типа // *Академическая публицистика*. 2019. № 12. С. 262–264. [Vasileva S. V. Sravnitel'nyi analiz pokazatelei krasnoi krovi u morskikh mlekopitayushchikh v usloviyakh del'finariya otkrytogo tipa. *Akademicheskaya publitsistika*, 2019, no. 12, pp. 262–264. (in Russ.)]
5. Гаркави Л. Х., Квакина Е. Б., Уколова М. А. *Адаптационные реакции и резистентность организма*. Ростов-на-Дону : Изд-во Ростовского ун-та, 1990. 224 с. [Garkavi L. Kh., Kvakina E. B., Ukolova M. A. *Adaptatsionnye reaktcii i rezistentnost' organizma*. Rostov-on-Don : Izd-vo Rostovskogo un-ta, 1990, 224 p. (in Russ.)]
6. Дёрко А. А., Алексеев А. Ю., Романов В. В., Алекнайте И. А., Шестопалов А. М. Серологическое исследование некоторых патогенов байкальской нерпы (*Phoca sibirica* Gmelin, 1788), содержащейся в условиях неволи // *Научный альманах*. 2018. № 5-2 (43). С. 170–173. [Derko A. A., Alekseev A. Yu., Romanov V. V.,

- Aleknaite I. A., Shestopalov A. M. Serosurvey of selected pathogens in the Baikal seal (*Phoca sibirica* Gmelin, 1788) in captivity. *Nauchnyi al'manakh*, 2018, no. 5-2 (43), pp. 170–173. (in Russ.)]
7. Дуванова М. А., Денисенко Т. Е. Гематологические, биохимические, цитологические и микробиологические показатели состояния здоровья китообразных при диагностике заболеваний репродуктивной системы // *Морские млекопитающие Голарктики* : сборник научных трудов по материалам IX международной конференции. Москва : РОО «Совет по морским млекопитающим», 2018. Т. 1. С. 171–173. [Duvanova M. A., Denisenko T. E. Hematological, biochemical, cytological and microbiological indicators of the health status of cetaceans in the diagnosis of disease of the reproductive system. In: *Marine Mammals of the Holarctic* : collection of scientific papers. Moscow : РОО «Совет по морским млекопитающим», 2018, vol. 1, pp. 171–173. (in Russ.)]
 8. Захаренко П. Г. Основные гематологические показатели крови морских млекопитающих океанариума ДВО РАН // *Актуальные вопросы и инновационные технологии в ветеринарной медицине, животноводстве и природоохранном комплексе* : материалы международной научно-практической конференции, посвящённой 40-летию юбилею со дня образования ветеринарного факультета. Уссурйск, 2019. Ч. 1. С. 162–165. [Zakharenko P. G. The main haematological blood parameters of the marine mammals in the oceanarium of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences. In: *Aktual'nye voprosy i innovatsionnye tekhnologii v veterinarnoi meditsine, zhivotnovodstve i prirodookhrannom komplekse* : materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 40-letnemu yubileyu so dnya obrazovaniya veterinarnogo fakul'teta. Ussuriisk, 2019, pt 1, pp. 162–165. (in Russ.)]
 9. Каганова Н. В. Уровень фибриногена и время свёртывания крови как критерий динамики трёхмесячной послеотловной адаптации афалин (*Tursiops truncatus ponticus* Barabash, 1940) к условиям неволи // *Морские млекопитающие Голарктики* : сборник научных трудов по материалам IX международной конференции. Москва : РОО «Совет по морским млекопитающим», 2018. Т. 1. С. 195–202. [Kaganova N. V. Fibrinogen level and blood clotting time as a criterion of the dynamics of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus ponticus* Barabash, 1940) after three-month adaptation to captive environment. In: *Marine Mammals of the Holarctic* : collection of scientific papers. Moscow : РОО «Совет по морским млекопитающим», 2018, vol. 1, pp. 195–202. (in Russ.)]
 10. Кальф-Калиф Я. Я. О лейкоцитарном индексе интоксикации и его практическом значении // *Врачебное дело*. 1941. № 1. С. 31–35. [Kal'f-Kalif Ya. Ya. O leukotsitarnom indekse intoksikatsii i ego prakticheskom znachenii. *Vrachebnoe delo*, 1941, no. 1, pp. 31–35. (in Russ.)]
 11. Клетикова Л. В. Содержание катионных белков в гранулоцитах птиц // *Естествознание и гуманизм* : межвузовский сборник. Томск, 2010. Т. 6, № 1. С. 51–52. [Kletikova L. V. Soderzhanie kationnykh belkov v granulotsitakh ptits. *Natural Sciences & Humanism*. Tomsk, 2010, vol. 6, no. 1, pp. 51–52. (in Russ.)]
 12. Лецкий В. Б. Цитохимические исследования лейкоцитов. Возрастные колебания цитохимических показателей. Ленинград : Изд-во ЛГУ, 1973. 33 с. [Letsky V. B. *Tsitokhimicheskie issledovaniya leukotsitov. Vozrastnye kolebaniya tsitokhimicheskikh pokazatelei*. Leningrad : Izd-vo LGU, 1973, 33 p. (in Russ.)]
 13. Мустафина Ж. Г., Крамаренко Ю. С., Кобцева В. Ю. Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией // *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999. № 5. С. 47–48. [Mustafina Zh. G., Kramarenko Yu. S., Kobtseva V. Yu. Integral'nye gematologicheskie pokazateli v otsenke immunologicheskoi reaktivnosti organizma u bol'nykh s oftal'mopatologiei. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 1999, no. 5, pp. 47–48. (in Russ.)]
 14. Островский В. К., Машенко А. В., Макаров С. В. Оценка тяжести и прогноз гнойно-деструктивных заболеваний органов брюшной полости // *Хирургия. Журнал имени Н. И. Пирогова*. 2007. № 1. С. 33–37. [Ostrovsky V. K., Mashchenko A. V., Makarov S. V. Assessment of severity and prognosis of pyodestructive abdominal diseases. *Khirurgiya. Zhurnal imeni N. I. Pirogova*, 2007, no. 1, pp. 33–37. (in Russ.)]

15. Островский В. К., Машченко А. В., Янголенко Д. В., Макаров С. В. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2006. № 6. С. 50–53. [Ostrovsky V. K., Mashchenko A. V., Yangolenko D. V., Makarov S. V. The parameters of blood and leukocytic intoxication index in the evaluation of the severity of inflammatory, purulent, and pyodestructive diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 2006, no. 6, pp. 50–53. (in Russ.)]
16. Романов В. В., Чистяева М. В., Белокобыльский И. Ф. Ферритин сыворотки крови как один из важнейших индикаторов воспаления и тест для дифференциальной диагностики анемий у китообразных // *Морские млекопитающие Голарктики* : сборник научных трудов по материалам XI международной конференции. Москва : РОО «Совет по морским млекопитающим», 2023. С. 253–262. [Romanov V. V., Chistyayeva M. V., Belokobylsky I. F. Serum ferritin as one of the most important indicators of inflammation and a test for the differential diagnosis of anemia in cetaceans. In: *Marine Mammals of the Holarctic* : collection of scientific papers. Moscow : РОО “Sovet po morskim mlekopitayushchim”, 2023, pp. 253–262. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.35267/978-5-9904294-8-2-2023-253-262>
17. Семёнов В. А., Родин И. А., Седов А. В., Яковец М. Г., Капустин А. В. К вопросу о влиянии различных веществ, растворённых в воде, на гематологические показатели // *Ветеринария Кубани*. 2020. № 4. С. 31–33. [Semenov V. A., Rodin I. A., Sedov A. V., Yakovets M. G., Kapustin A. V. On influence of various substances dissolved in water on hematological parameters. *Veterinariya Kubani*, 2020, no. 4, pp. 31–33. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.33861/2071-8020-2020-4-31-33>
18. Славинский А. А. *Критерии функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов, основанные на компьютерном анализе изображения и люминесценции* : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 14.01.29. Москва, 2000. 38 с. [Slavinsky A. A. *Kriterii funktsional'noi aktivnosti neitrofil'nykh leukotsitov, osnovannye* na komp'yuternom analize izobrazheniya i lyuminestsentsii : avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk : 14.01.29. Moscow, 2000, 38 p. (in Russ.)]
19. Сперанский И. И., Самойленко Г. Е., Лобачева М. В. Общий анализ крови – все ли его возможности исчерпаны? Интегральные индексы интоксикации как критерии оценки тяжести течения эндогенной интоксикации, её осложнений и эффективности проводимого лечения // *Здоровье Украины*. 2009. Т. 19, № 6. С. 51–57. [Speransky I. I., Samoilenko G. E., Lobacheva M. V. Obshchii analiz krovi – vse li ego vozmozhnosti ischerpany? Integral'nye indeksy intoksikatsii kak kriterii otsenki tyazhesti techeniya endogennoi intoksikatsii, ee oslozhnenii i effektivnosti provodimogo lecheniya. *Zdorov'e Ukrainy*, 2009, vol. 19, no. 6, pp. 51–57. (in Russ.)]
20. Стойко Ю. М., Ермаков Н. А. Клинические и фармакоэкономические аспекты консервативного лечения хронической венозной недостаточности нижних конечностей // *Хирургия. Приложение к журналу Consilium Medicum*. 2004. Т. 6, № 2. С. 23–26. [Stoiko Yu. M., Ermakov N. A. Klinicheskie i farmakoekonomicheskie aspekty konservativnogo lecheniya khronicheskoi venoznoi nedostatocchnosti niznikh konechnostei. *Khirurgiya. Prilozhenie k zhurnaluu Consilium Medicum*, 2004, vol. 6, no. 2, pp. 23–26. (in Russ.)]
21. Davis A. K., Maney D. L., Maerz J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology*, 2008, vol. 22, iss. 5, pp. 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
22. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine* / F. M. D. Gulland, L. A. Dierauf, K. L. Whitman (Eds). 3rd edition. Boca Raton, Florida : CRC Press, 2018, 1144 p.
23. Keogh M. J., Spoon T., Ridgway S. H., Jensen E., Van Bonn W., Romano T. A. Simultaneous measurement of phagocytosis and respiratory burst of leukocytes in whole blood from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) utilizing flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, vol. 144, iss. 3–4, pp. 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.017>
24. Lauderdale L. K., Walsh M. T., Mitchell K. A., Granger D. A., Mellen J. D., Miller L. J. Health reference intervals and values for common

- bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*), Pacific white-sided dolphins (*Lagenorhynchus obliquidens*), and beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *PLoS One*, 2021, vol. 16, iss. 8, art. no. e0250332 (28 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250332>
25. Nouri-Shirazi M., Bible B. F., Zeng M., Tamjidi S., Bossart G. D. Phenotyping and comparing the immune cell populations of free-ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and dolphins under human care. *BMC Veterinary Research*, 2017, vol. 13, iss. 1, art. no. 78 (14 p.). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0998-3>
26. Tryland M., Thoresen S. I., Kovacs K. M., Lydersen C. Serum chemistry of free-ranging white whales (*Delphinapterus leucas*) in Svalbard. *Veterinary Clinical Pathology*, 2006, vol. 35, iss. 2, pp. 199–203. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2006.tb00114.x>

INDICES

IN THE EVALUATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF BLOOD CELLS OF THE BOTTLENOSE DOLPHIN *TURSIOPS TRUNCATUS* (MONTAGU, 1821)

T. Seliverstova

Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences, Murmansk, Russian Federation

E-mail: minzyuk@mail.ru

The content of cationic protein in granulocytes of the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) was established by calculating the average cytochemical coefficient. Its shortcomings were substantiated in visually determining the intensity of staining of the product of a cytochemical reaction on blood products and distributing cells into groups according to the amount of protein they contain. To assess the activity of a substance in a cell, computer programs were applied, and a light microscope was used which allows to minimize errors in morphometric measurements of objects. Individual parameters were calculated for the degree of filling and intensity of staining of cationic protein in granulocytes in bottlenose dolphins with and without taking into account the protein content in the entire blood volume. Such indicators allow carrying out comparative age-related, intraspecific, and interspecific studies in animals. As established, the content of cationic protein in granulocytes can vary greatly in different individuals of bottlenose dolphins, and its amount changes slightly with age.

Keywords: morphometry, average cytochemical coefficient, integral cytochemical index, cationic protein, granulocytes, bottlenose dolphin