

Русскова О.В.¹, Соколов А.В.², Найденко С.В.¹, Шпак О.В.¹, Глазов Д.М.¹, Мухаметов Л.М.¹, Рожнов В.В.¹

Гематологические, биохимические и гормональные данные как индикаторы физиологического состояния белух (*Delphinapterus leucas*) летнего амурского скопления в Охотском море

1. Институт Проблем Экологии и Эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия
2. Институт Экспериментальной Медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Russkova O.V.¹, Sokolov A.V.², Naidenko S.V.¹, Shpak O.V.¹, Glazov D.M.¹, Mukhametov L.M.¹, Rozhnov V.V.¹

Hematologic, biochemical and hormonal findings as indicators of physiological state of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) from the Amur summer aggregation in the Sea of Okhotsk

1. A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of RAS, Moscow, Russia
2. Institute for Experimental Medicine of RAMS, St. Petersburg, Russia

Белуха (*Delphinapterus leucas*) – один из самых многочисленных видов китообразных Арктики. Вид хорошо приспособлен к обитанию среди льдов. Белуха населяет прибрежные воды морей Арктического бассейна, а также Белого и Охотского морей. Высокая численность, сравнительная простота обнаружения, хорошо изученная биология и положение на вершине трофических цепей морских биоценозов делают белух одним из ключевых видов-индикаторов состояния экосистем арктических морей (Laidre 2007). В 2009 г. Институт Проблем Экологии и Эволюции им. А.Н. Северцова начал долгосрочную Программу «Белый Кит», в рамках которой должны быть проведены исследования численности, распределения и перемещения, генетические анализы и оценка состояния здоровья различных популяций белухи. Прошлым летом исследовательские усилия участников Программы «Белый Кит» были сосредоточены на охотоморской популяции и включали спутниковое мечение, авиаучет, отбор проб для генетического анализа, сбор материала для биолого-ветеринарного мониторинга. Целью первого этапа мониторинга, данные по которому представлены здесь, являлась отработка методологии получения базовых биолого-ветеринарных данных для долгосрочного использования в мониторинге на примере охотоморской популяции белухи. Исследования крови, включающие в себя общий клинический анализ, биохимические и гормональные исследования, определение титра антител к различным зоонозам, необходимы для оценки физиологического, репродуктивного и патологического состояния животных, и обычно используются для оценки состояния здоровья и физиологического статуса свободноживущих морских млеко-

The beluga whale (*Delphinapterus leucas*) is one of the most numerous cetacean species of the Arctic. The species is well adapted to life among the ice. The beluga populates the shore waters of the Arctic basin and also the White Sea and the Sea of Okhotsk. The high numbers, comparative simplicity of sighting and the well-studied biology and position at the top of the trophic chains of marine biocenoses render belugas a key indicator species of the ecosystem condition of the Arctic seas (Laidre 2007). In 2009, the Severtsov Institute of Ecology and Evolution Research launched a long-term program “The White Whale”, under which studies on the numbers, distribution and displacements, genetic analyses and assessment of the health condition of various beluga populations were conducted. Last summer, the research efforts of the participants of the “White Whale” program focused on the Sea of Okhotsk population and included satellite radio tracking, aircraft survey, selection of samples for genetic analysis, collection of data for biological-veterinary monitoring. The objective of the first stage of monitoring whose data are presented here was development of a methodology of obtaining biological and veterinary data for long-term utilization in monitoring as exemplified by the Sea of Okhotsk population of the beluga whale. The studies of the blood, including general clinical analysis, biochemical and hormonal studies and determination of the titer of antibodies to various zoonoses are necessary for the assessment of physiological, reproductive and pathological condition of animals, and are normally used for assessing the

питающих (St. Aubin 2001, Hansen 1996, Reif 2004). Задачи первого этапа сводились к сбору, классификации и оценке информативности морфометрических, гематологических, биохимических, иммунологических и гормональных данных. Отбор материала проходил летом 2009 г. в районе о-вов Чкалов и Байдуков Сахалинского залива Охотского моря. Было получено 23 образца крови от 20 белух (4 белухи были пойманы для мечения и 16 были отловлены для демонстрации или исследований ВладивостокТИНРО). Для 3 из 4 животных, отловленных для мечения, образцы крови были получены до и сразу после процедуры размещения датчика (процедура занимала около часа). Отлов проводился методом замата. Две белухи удерживались в прибрежной зоне сразу после отлова для обследования, отбора крови, мечения и выпуска. Остальные были транспортированы к сетевым вольерам для дальнейших обследований, отбора проб и адаптации (16 животных) или для мечения, отбора проб и выпуска (2 животных). Для этой группы животных мы имели различные интервалы времени между моментами отлова и отбора проб (таб. 1).

Для всех животных были измерены длина, аксиллярный обхват, толщина жирового слоя (УЗИ в стандартной точке), оценен цвет кожных покровов, отмечен размер зубов (если присутствовали), определен пол. Отмечалось наличие внешних признаков патологий (распространенные кожные повреждения, повреждения слизистых, признаки истощения, наличие неприятного запаха, изменения плавучести, позы или респираторных параметров). Самки белух получали ультразвуковое обследование для определения репродуктивного статуса. Одна самка оказалась беременной и была немедленно выпущена. Определение возраста происходило на основании критериев длины тела и цвета кожи (Doigde 1990), все белые животные рассматривались как взрослые (таб. 2). Образцы крови отбирались из периферических сосудов хвостового плавника. Кровь собиралась в вакуумные пробирки для гематологии, отделения сыворотки и плазмы (полученные центрифугированием образцы хранились при -18°C). На месте сразу после отбора проб проводился подсчет вручную гематологических параметров крови (определение количества лейкоцитов, эритроцитов, лейкоформулы и СОЭ). Концентрации сывороточных анализов были определены в лаборатории Санкт-Петербургской Городской Ветеринарной Станции, участвующей в международной системе контроля качества Labquality (Финляндия). Биохимические показатели (21 показатель) определялись на автоматическом анализаторе HITACHI-902, Roche, Switzerland. Тиреоидные и стероидные гормоны были определены с помощью радиоиммунного анализа на анализаторе STATFAX 3 200, Awareness Technology ink., США. Электрофорез белка и изоферментов ЛДГ проведен на

health and physiological status of free-ranging marine mammals (St. Aubin 2001, Hansen 1996, Reif 2004). The objectives of the first stage were confined to collection, classification and assessment of the informativeness of morphometric, hematological, immunological and hormonal data. Selection of material to take place in the summer of 2009 off the islands Chkalov and Baidukov of the Gulf of Sakhalin of the Sea of Okhotsk. Twenty three blood samples were obtained from 20 beluga whales (4 belugas were captured for marking and 16 were captured for the demonstration or research by VladivostokTINRO). For 3 out of 4 belugas captured for marking, blood samples were obtained before and immediately after the installation of the transmitter (the procedure took about an hour). For capture, the method for seine shooting was used. Two belugas were maintained in the shore zone immediately after capture for investigation, blood collection, marking and release. The others were transported to net enclosures for further examination, and adaptation (16 individuals) or for marking, sample collection and release (2 individuals). For that group of animals we had different time intervals between the moments of capture and sample collection (Table 1).

In all the animals, the length, axillary circumference, thickness of the blubber layer (US at a standard point) were determined, and the color of the skin was assessed, the size of the teeth examined if there were any and the sex determined. There were some external pathology characters (skin lesions were common, mucosa lesions occurred, there was an objectionable odor and changes in floatability, posture or respiratory parameters). Beluga females received ultrasound examination to determine their reproductive status. One female proved pregnant and was immediately released. Age was determined on the basis of the criteria of the body length and skin color (Doigde 1990), all the white animals were regarded as adult (Table 2). Blood samples were collected from the peripheral vessels of the tail flukes. The blood was collected into vacuum test-tubes for hematology separation of the serum and the plasma (the samples obtained by centrifuging were kept at -18°C). At the site immediately after blood sample collection, hematological parameters were estimated manually (determination of the number of leucocytes, erythrocytes, leukocyte formula and ESR). The concentrations of serum analytes were determined in the laboratory of the Saint-Petersburg Veterinary Station participating in the international system of quality control Labquality (Finland). The biochemical indices (21 indices) were obtained in an automatic ana-

анализаторе SAS-2/Platinum, Helena BioSciences Europe, Great Britain. Уровень кортизола определялся ИФА с использованием коммерческих наборов к кортизолу («Иммунотех», Россия) в ИПЭЭ РАН им. Северцова. Для определения церулоплазмينا использовался метод, основанный на ППД-оксидазной реакции (ИЭМ РАМН). Анализ специфичных сывороточных антител к возбудителям зоонозов (токсоплазма, бруцелла, морбилливирус, вирусы гриппа) был выполнен в ФГУ науки Государственный научный центр Вирусологии и Биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Количество образцов для различных субгрупп (интервалы времени после отлова, взрослые и молодые животные, самцы и самки, беременные и яловые белухи, меченные и интактные животные, здоровые и предположительно больные) было маленьким. Несмотря на достаточный в целом объем выборки, репрезентативность вышеперечисленных субгрупп была далека от однородности, что ограничивало возможности статистических сравнений для объяснения влияния этих различий. Для увеличения объема выборки предположительно здоровых животных, мы объединили данные, полученные от самцов и самок, половозрелых и неполовозрелых животных в подгруппы в зависимости от интервала времени, прошедшего с момента отлова. Полученные в настоящем исследовании значения гематологических, биохимических, гормональных параметров и электрофореза белка попадали – за несколькими исключениями - в пределы, описанные в предыдущих исследованиях (St. Aubin 1989, 2001, Tryland 2006). Концентрации кортизола были выше, а креатинина и билирубина были ниже в сравнении с сообщаемыми ранее данными; остальные результаты были поразительно похожи. У четырех животных обнаружены антитела к токсоплазме. Для оценки воздействия процедуры мечения, мы сравнили данные, полученные от 4 белух: 2 самца были помечены сразу после отлова (пробы получены до и после установки датчика), 1 самка помечена на 10-й день после отлова (пробы получены до и после выполнения процедуры); одна интактная самка, пробы получены через 1,5 часа после отлова. Показатели крови, полученные до осуществления процедуры мечения, попадали в референсные значения для определенного интервала времени после отлова. Для меченой самки параметры крови, полученные после установки датчика, не изменились. Для самцов выявлены определенные изменения: увеличился уровень кортизола, глюкозы и креатининфосфокиназы, тогда как уровень кальция и лимфоцитов снизился. Сходные показатели отмечены и у интактной самки. Подобные изменения определяются динамикой развития стресса в первые часы после отлова (St. Aubin 1990). Таким образом, можно предположить, что для самки процедура мечения не вызвала стрессовых изменений показателей крови, тогда как для самцов найденные

lyzer HITACHI-902, Roche, Switzerland. Thyrenoid and steroid hormones were determined by radio-immune assay in the analyzers ST AT FAX 3200. Awareness Technology Inc., USA. Electrophoresis of protein and iso-enzymes LDH was performed in the analyzer SAS-2/Platinum, Helena BioSciences Europe, Great Britain. The level of cortisol was determined IPA with the use of commercial sets to cortisol (“Immunotex”, Russia) in the IEER, RAS. To determine ceruloplasmine, a method was used, based on the PPD-oxidase reaction (IEM, RAMS). Analysis of specific serum antibodies to zoonosis causative agents (toxoplasma, brucella, morbillivirus, influenza viruses) was performed in the research FSE The State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rosпотребнадзор. The number of samples for different subgroups (time intervals upon capture, adult and young animals, males and females, pregnant and fallow belugas, marked and intact animals, healthy and supposedly sick individuals) was small. Despite the sufficient sample volume, the representativeness of the above subgroups was far from heterogeneity, which limited the possibility of statistical comparisons to account for the effect of those differences. In order to increase the sample volume from presumably healthy animals, we merged data obtained from males and females, mature and immature animals into subgroups depending on the time passed from the time of capture. The values of hematological, biochemical and hormonal parameters and electrophoresis of the protein, with some exceptions found themselves within the limits described in the previous studies (St. Aubin 1989, 2001, Tryland 2006). The cortisol concentration was higher and that of creatinine and bilirubin lower compared with the previous data, and the other results were strikingly similar. Four individuals showed antibodies to toxoplasma. To assess the effect of marking procedure we compared data obtained from 4 belugas: 2 males were tagged immediately upon capture (the samples obtained before and after installation of the transmitter, one female was tagged on the 10th day after capture (the sample were obtained prior to and after the procedure); one intact female; the samples were collected 1.5 hours after capture. The indices of the blood obtained prior to the tagging procedure found themselves in the reference value for a particular time interval after capture. For a tagged female, the blood parameters did not change after installation of the transmitter. Females showed some changes: the level of cortisol, glucose, and creatinine phosphokinase increased, whereas the level of calcium and lymphocytes decreased. The intact female showed similar indices.

изменения скорее отражают динамику развития постотловного стресса, чем реакцию на появление нового стрессового фактора. Наше исследование было расширено за счет анализа ЛДГ-изоэнзимов и определения церулоплазмينا, что, насколько нам известно, ранее не описывалось. По данным параметрам мы не обнаружили значимой разницы в данных, полученных до и после процедуры мечения. Но мы отметили определенные различия данных показателей, полученных от различных животных. Соотношение ЛДГ-изоэнзимов коррелировало с сывороточными маркерами, указывающими на повреждение различных органов и тканей (Reidarson 1999). Следует отметить, что уровень церулоплазмينا был несколько выше, чем отмечалось у животных из дельфинариев (Russkova 2008). Мы надеемся, что определение данных параметров может обеспечить диагностическую информацию для различных патологий, это позволит дифференцировать здоровых белух от больных животных. Настоящее исследование является первым развернутым биолого-ветеринарным исследованием охотоморской популяции белухи. Комплекс всех наших исследований позволяет оценить физиологическое состояние обследованной группы животных и заложить основы для проведения мониторинга популяций белухи в дальнейшем.

Such changes are determined by the dynamics of the development of stress during the first hours after capture (St. Aubin 1990). Thus, there are grounds to believe that for the female the tagging procedure caused no stressful changes in blood indices, whereas for males, the changes revealed rather reflect the dynamics of the development of post-capture stress than response to a new stressful factor. Our study was expanded owing to analysis of LDH – isoenzymes and determination of ceruloplasmine, which as we know, was previously not described. These parameters demonstrated no significant difference in data obtained before and after the tagging procedure. But we noted different indices obtained from different animals. The ratio of LDH enzymes was correlated to serum markers indicating the lesion of various organs and tissues (Reidarson 1999). It should be noted that the level of ceruloplasmine was higher than was found in animals from the dolphinariums (Russkova 2008). Hopefully, determination of the above parameters would ensure diagnostic information for various pathologies to distinguish between healthy belugas and the sick animals. The present study is the first biological and veterinary research of the Sea of Okhotsk beluga population. The complex of all our studies permits assessing the physiological condition of the group of animals under study and develop a basis for monitoring of the beluga population in future.

Пол / Sex 0	день / day 6	день / day 10	день / day 14
♀♀ (интактные / меченые) (intact/tagging)	1/0 0/	0	3/2
♂♂ (интактные/меченые) (intact/tagging)	0/2 12/	0	0/0

Таб. 1 Интервалы времени между отловом и отбором проб для самок и самцов в соответствии с процедурой мечения
Table 1. Sampling times intervals after capture for male and female according to tagging procedure

Возрастные группы <i>Age group</i>	Длина, см <i>Length, cm</i>	Самки <i>Females</i> (n=6)	Самцы <i>Males</i> (n=14)
Молодые / <i>Immature</i> 2	45-326	3	12
взрослые / <i>Mature</i> 3	60-505	3	2

Таб. 2 Distribution of sex and age for 20 beluga whales from Okhotsk Sea
Table 2 Распределение по полу и возрасту 20 белух из Охотского моря

Список использованных источников / References

Doidge D.W. 1990. Age-length and length-weight comparisons in beluga whale, *Delphinapterus leucas*. In: Smith T.G., St.Aubin D.J. and Geraci J.R. eds. *Advances in research on the beluga whale, Delphinapterus leucas*. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Science 224: 59-68
Hansen L.J., Wells R.S. 1995. Bottlenose dolphin health and environmental risk assessment. Eleventh Biennial Conference, Society for Marine Mammology, Orlando, Florida. Abstract.

- Laidre K.L. 2007. Background Document for Development of a Circumpolar Beluga Whale (*Delphinapterus leucas*) Monitoring Plan . Report to the U.S. Marine Mammal Commission, Bethesda, Maryland, USA. (<http://arctisportal.org/caff/circumpolar-biodiversity-monitoring-program-cbmp/pilot-projects/arctic-marine-mammal-monitoring-plans>)
- Reidarson T.H., McBain J., Dalton L.M. 1999. Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in cetaceans. *J. of Zoo and Wildlife Medicine* 30(2): 228-34.
- Reif J.S., Bachand A.M., Aguirre A.A., Kashinsky L., Borjesson D.L., Braun R., Antonelis G.A. 2004. Morphometry, hematology, and serum chemistry in the Hawaiian monk seal (*Monachus Schauinslandi*). *Marine Mammal Science* 20: 851-860.
- Russkova O.V., Sokolov A.V. 2008. Measurement and Possible Diagnostic Application of Ceruloplasmin in Serum of Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) and Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*). Proc. Internat. Assoc. for Aquatic Animal Medicine, IAAAM Archive.
- St Aubin D.J., Geraci J.R. 1989. Adaptive changes in hematologic and plasma chemical constituents in captive beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 796-803.
- St Aubin D.J., Geraci J.R. 1990. Adrenal responsiveness to stimulation by adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in captive beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Science* 224: 149-157.
- St Aubin D.J., Deguise S., Richard P.R., Smith T.G., Geraci J.R. 2001. Hematology and plasma chemistry as indicators of health and ecological status in beluga whale, *Delphinapterus leucas*. *Arctic*, 54: 317-331.
- Tryland M, Thoresen SI, Kovacs KM, Lydersen C 2006. Serum chemistry of free-ranging white whales (*Delphinapterus leucas*) in Svalbard. *Vet. Clin. Pathol*, 35 (2): 199-203.

Рязанов С.Д.^{1,2}, Мамаев Е.Г.³, Бурканов В.Н.^{4,5}

Мониторинг численности сивуча (*Eumetopias jubatus*) на о. Медный летом 2008-2009 гг.

1. Дальневосточный Государственный Университет, Владивосток, Россия
2. Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток, Россия
3. Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Петропавловск-Камчатский, Россия
4. Камчатский филиал ТИГ ДВО РАН, Петропавловск-Камчатский, Россия
5. Национальная лаборатория по изучению морских млекопитающих, Сиэтл, США

Ryazanov S.D.^{1,2}, Mamaev E.G.³, Burkanov V.N.^{4,5}

Monitoring of Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) abundance on Medny Island during summer 2008-2009

1. Far Eastern University, Vladivostok, Russia
2. V.I. Il'ichov Pacific Institute of Oceanology, RAS, Vladivostok, Russia
3. Kamchatka Research Institute Fishery and Oceanography, Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia
4. Kamchatka Branch of the Pacific Institute of Geography, RAS, Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia
5. National Marine Mammal Laboratory, AFSC, NMFS, NOAA, Seattle, USA

Остров Медный входит в состав Командорских островов, расположенных на западе Алеутской гряды. Сивучи обитают здесь круглый год, но их численность в течение года сильно изменяется (Burkanov and Loughlin 2005). Имеется одно репродуктивное лежбище, которое находится на юго-восточной оконечности

Medny Island belongs to the group of Commander Islands, which are located in the western part of the Aleutian Chain. Steller sea lions inhabit this area all the year round, but their abundance changes considerably throughout each year (Burkanov and Loughlin 2005). The only rookery is located on the south-eastern