

тина показало следующие результаты 15дней - 63%; 25 дней - 74%; 30дней - 84%.

3. В целях профилактики обязательно в каждую весну и осень проводить ортопедический осмотр. Ножные ванны проводить с интервалом в 10 дней с применением 15%-го раствора медного купороса или 7%-ым формалина.

Литература. 1. Anderson B. J. și coaut. (1984) – Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the structural subunit of *Bacteroides nodosus* fimbriae. *Journal of Bacteriology*; 160, p. 748-754. 2. Arkins, S. (1981) Lameness in dairy cows. Parts I and II. *Irish Veterinary Journal*. 35, p. 135-140; p. 163-170. 3. Baggot, D. G. Russell, A. M. (1988) – Lameness in cattle. *British Veterinary Journal* 137, p. 113-132. 4. Cristea, I. (1973) – Rev. De creșterea animalelor, București, N4, p. 70-79. 5. Egerton, J. B. (1978) – Characteristics of *Bacteroides nodosus* isolated from cattle. *Veterinary Microbiology* 3, p. 269-278. 6. Hernandez J., (2001) – Effect of lameness on the calving-to – conception interval in dairy cows. *JAVMA*, Vol.218, No. 10, p. 1611. 7. Lukianovski V. A. (1985) – Profilactica i lecenie zaboalevanii copăteț u corov. Moskva – Rossel'hozizdat. 128p. 8. Meyer, H., (1969) – Zuchtsgk, 41 (1), 1-3. 9. Step D., R. Smith., (2006) Nonrespiratory Diseases of Stocker Cattle. *Vet. clinics of North America*. Vol.22, N2, Saunders, Philadelphia, p. 425-429. 10. Toussaint Raven, (1985) – Cattle Footcare and Claw Trimming. *Farming Press, Ipswich*, p. 1-126. 11. Tranter, W. (1991) – A case study of lameness in three dairy herds. *New Zealand Veterinary Journal* 39, p. 88-96. 12. Watson, C. (1999) – Lameness in cattle – Lesion and diseases of the skin – Part I. *U. K. Vet. (January-February)* 4 No. 1, p. 51-60. 13. Wells, S. (1995) – Prevalence and severity of lameness in lactating cows in a sample of Minnesota and Wisconsin herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 202, p. 78-82.

ПОСТУПИЛА 30 мая 2007 г

УДК : 636 : 612. 017. 1

РЕАКЦИЯ БЛАСТТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ IN VITRO – КАК ТЕСТ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУННОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА

Н. С. Жосан, Р. Г. Голбан

Государственный Аграрный Университет Молдовы

В статье излагаются результаты изучения реакции бласттрансформации лимфоцитов *in vitro* под влиянием сибиреязвенного антигена и антигена PPD. Установлено, что сибиреязвенный антиген и антиген PPD подвергает изменению лимфоцитов, что сопровождается их антигензависимой бласттрансформации.

In this work are shown the results of studying the blast transformation reaction of the lymphocytes which take place *in vitro* under the action of the anticarbunus antigen and also of the PPD antigen. During the researches was observed that the anthrax antigen and the PPD antigen brings changes at lymphocytes, producing a blast transformation which is antigen dependent.

Введение. Корреляция иммунных реакций клеточного типа *in vitro* имеет значение, прежде всего для диагностики, так как она позволяет обнаружить реакции клеточного типа или оценить Т-звено иммунитета.

Иммунные реакции клеточного типа играют важную роль во многих защитных реакциях организма, а также при различных видах патологии.

В последние годы интенсивно изучается взаимодействия субпопуляций Т-лимфоцитов активированных, обработанные антигеном и макрофагальными характеристиками.

Методы для оценки Т-звена иммунной системы специфичны для каждой отдельной стадии развития.

Защитная реакция иммунной системы, возникающая при внедрении в организм животных различных антигенов проявляется иммуноморфологическими процессами: микро- и макрофагоцитозом, бласттрансформацией и пролиферацией Т- и В- лимфоцитов, плазмоцитозом и др.

Все иммунные реакции, направленные на нейтрализацию антигена, регистрируют главным образом в её периферических органах: в Т- и В- зависимых зонах лимфатических узлов в селезенке, в лимфоидных образованиях, ассоциированных с органами других систем, в крови и лимфе.

В периферических органах иммунной системы после переработки антигена макрофагами, Т- и В- лимфоциты подвергаются изменению, что сопровождается их антигензависимой бласттрансформацией. При этом малые лимфоциты превращаются в большие незрелые бластные формы, способные к интенсивной пролиферации.

Бласттрансформацию лимфоцитов изучают в культуре лимфоцитов *in vitro*. При постановке реакции бласттрансформации лимфоцитов у интактных или иммунизированных антигеном животных берут кровь и вносят в среду для культивирования, содержащую специфический антиген или митоген. Контакт лимфоцитов, несущих соответствующий рецептар с антигеном или митогеном, вызывает так называемую реакцию бласттрансформации (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Цель настоящего сообщения-оценка перспективности применения реакции бласттрансформации для определения клеточного иммунитета у интактных и вакцинированных животных.

Материалы и методы

Показатель макрофагальной трансформации лимфоцитов определяли в 120 ч культурах лимфоцитов, культивируемых в термостате при 37⁰С. Для этой цели брали кровь из яремной вены в объеме 10-15 мл, избегая энергичного встряхивания и перемешивания. Добавляли гепарин для инъекций из расчета 50 UI/мл, для предотвращения свертывания, перемешивали и оставляли на 5-6 ч при комнатной температуре в горизонтальном положении (под углом 10⁰). Затем пробирки ставили в вертикальное положение и выдерживали в течение 15-20 мин (2).

Плазма крови отделялась на поверхности содержимого пробирки. Между эритроцитами и светлой частью плазмы в виде дымчатой пленки накапливались лимфоциты, образуя резко очерченный слой.

Реакцию бласттрансформации лимфоцитов крови молодого крупного рогатого скота интактного и вакцинированного против сибирской язвы ставили с сибиреязвенным стандартным антигеном и антигеном PPD (purified protein derivate).

Плазму с лимфоцитами аккуратно отсасывали пастеровской пипеткой в стерильную центрифужную пробирку, центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли и к осадку добавляли среду 199 в том же объеме. Осторожно смывали клетки со стенок и со дна центрифужной пробирки и снова центрифугировали, повторяя эту процедуру трижды. Осадок ресуспендировали в таком количестве среды 199, чтобы в 1 мл содержалось 5×10^6 клеток подсчитанных в камере Горяева.

Полученную клеточную взвесь в объеме 3 мл вносили в три стерильные центрифужные пробирки (по 1 мл) и доливали по 3 мл среды 199, содержащую 15% бычьей сыворотки и антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 100 ЕД/мл, нистатин 200ЕД) с рН 7,2-7,4. В одну пробирку добавляли сухой PPD из расчета 60 мкг/мл во вторую – 0,1 мл стандартного сибиреязвенного антигена, третья пробирка служила контролем. Пробирки выдерживали в термостате при 37°C в течение 120 ч. После этого центрифугировали, удаляли супернатант а из осадка делали тонкие мазки на обезжиренных предметных стеклах.

Мазки фиксировали метанолом, окрашивали по Романовскому-Гимза.

Показатель макрофагальной трансформации определяли при микроскопическом исследовании препарата в иммерсионной системе. Подсчитывали 200 клеток (лимфоцитов и макрофагов), после чего определяли процентное соотношение. Подсчет производили в тех полях зрения, где клетки лежали, изолированно и четко была видна их структура, позволяющая установить их вид.

Результаты и обсуждение

В приготовленных препаратах наблюдали трансформацию в макрофаги лимфоцитов и иногда моноцитов.

Под влиянием специфического активатора (стандартный сибиреязвенный антиген) у животных в срок до 2-х лет после ревакцинации отличалось довольно активная макрофагальная трансформирования лимфоцитов крови в среднем 15,5% бластов, а в то время как в контроле этот показатель равнялся 3,5%.

Процесс превращения лимфоцитов в макрофагальные клетки сопровождался увеличением ядра и цитоплазмы. Основная масса макрофагов в этот срок культивирования, слабо проявляет фагоцитарную активность. В препаратах видны молодые макрофаги без вакуолей с базофильной цитоплазмой и четко выраженной структурой ядра.

Макрофагальную трансформацию лимфоцитов крови определяли вначале у интактных животных, а затем у иммунизированных с целью определения интенсивности клеточного иммунологического процесса.

Нами установлено, что показатель макрофагальной трансформации лимфоцитов крови у иммунизированных животных против сибирской язвы увеличивался по сравнению с исходным в 3 раза, что указывает на достаточно высокий уровень антителообразования (рис. 1).

Макрофагальная трансформация лимфоцитов крови у реагирующих на туберкулин животных (коровы 4-летнего возраста) характеризовалась

незначительным бластообразованием. Количество лимфоцитов трансформировавшихся в бласты составляло 3,3%, а у не реагирующих животных показатель бласттрансформации равнялся 9,2%, что указывает на наличие клеточного иммунитета у крупного рогатого скота против туберкулезной инфекции (рис. 2).

Таким образом, метод культивирования лимфоцитов крови на основе среды 199 с добавлением 15% бычьей сыворотки и антибиотиков в сочетании с сибиреязвенным антигеном и антигеном PPD может быть использован для оценки реакции бласттрансформации и в особенности, для оценки специфической антигензависимой бласттрансформации.

Заключение

Полученные данные дают основание использовать феномен макрофагальной трансформации лимфоцитов крови как ориентировочный метод для контроля за клеточными сдвигами в организме иммунизированных животных.

Кроме того, изменение показателя макрофагальной трансформации лимфоцитов в сторону увеличения у иммунизированных животных по сравнению с интактными указывает, что процесс антителообразования идет на достаточно высоком уровне.

Макрофагальная трансформации лимфоцитов крови может быть использована для характеристики иммунологического статуса и его способности к иммунологической перестройке.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов свидетельствует о наличии клеточного иммунитета у крупного рогатого скота против сибирской язвы и туберкулезной инфекции.

Литература. 1. Болотников И. А., Олейник Е. К., Такшеев С. А. Трансформация лимфоцитов цельной крови кур, стимулированная Т- клеточными митогенами // Ветеринария, 1984. - №1. - С. 32-34. 2. Гизатулин Х. Г., Сафин М. А. Изучение иммунитета у иммунизированных вакциной БЦЖ скота // Ветеринария, 1979. - №11. - С. 28-29. 3. Головченко А. П., Дун Е. А., Филатова Т. Г. Бластрреакция и митотическая активность лимфоидных клеток крови при лейкозе // Ветеринария, 1980. - №4. - С. 29-30. 4. Демченко Т. А. Макрофагальная трансформация лимфоцитов как показатель иммунного ответа организма // Ветеринария, 1979. - №3. - С. 39-42. 5. Иегер Л. Корреляция иммунных реакций клеточного типа in vitro // В кн. Клиническая иммунология и аллергология / М.: Медицина, 1990. - Т.1. - С. 89-90. 6. Жосан Н. С., Дячек О. Макрофагальная трансформация лимфоцитов // Acad. de Șt. a Moldovei. Secția de Șt. Biologice, Chimie și Agricole / Chișinău 2003. - P. 72-73. 7. Прудников В. С., Гук Ф. Д., Луппова И. М., Жуков А. И., Грушин В. Н. Изучение иммуноморфогенеза при заболеваниях и вакцинации животных // Ветеринария, 2005. - №4. - С. 20-23.

ПОСТУПИЛА 29 мая 2007 г