

Г.Б. Кузембекова, Ж.С. Кіркімбаева, О.О. Жансеркенова, Ш.Н. Қасымбекова,
Б. Құрманов, А.Т. Тәубеева

ТӘУЛІКТІК ӨСІНДІДЕН ЛЕПТОСПИРА ДНҚ-ЫН БӨЛІП АЛУ ӘДІСІН ЖЕТІЛДІРУ

Мақала авторлары Қазақстан аймағындағы патогенді лептоспираларды анықтау үшін полимеразды тізбекті реакция қоюды жетілдіруге байланысты жұмыстар жүргізді. Зерттеуге бактериозға қарсы биотехнология зертханасы қорынан 9 мұражайлық штамм пайдаланылды: *L.pomona*, *L.icterohaemorrhagiae*, *L.tarassovi*, *L.canicola*, *L.hebdomadis*, *L.australlis*, *L.sejroe*, *L.grippotyphosa*.

Кілт сөздер: лептоспироз, полимеразды тізбекті реакция, электрофорез

УДК 619:616.33/. 34-008.711.2

Г. К. Касиева¹, А.Ш. Иргашев¹, Ж.И. Казиев², М. Рейнахер³

*Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина (Кыргызстан)*¹

*Казахский национальный аграрный университет (Казахстан)*²

*Гиссенский университет, Институт ветеринарной патологии (Германия)*³

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ТИМУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Аннотация. С помощью гистологических и иммуногистохимических методов с использованием Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD 3, Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clone MAC 387 и Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC10 антисывороток, были выявлены и продемонстрированы места локализации Т- лимфоцитов, макрофагов и митоза лимфоидных клеток в парафиновых срезах тимуса крупного рогатого скота, фиксированное в формалине.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, тимус, иммуногистохимия, поли- и моноклональные антисыворотки, Т-лимфоциты, макрофаги, митоз лимфоидных клеток.

Введение

По исследованию вопросов морфологии тимуса крупного рогатого скота в странах СНГ имеется ряд научных работ [1-4].

Гатин И.М. (1990) исследовал морфогенез и клеточный состав тимуса у бычков разного возраста при откорме в индивидуальном секторе и в промышленных условиях. Состав и соотношение клеточных элементов тимуса бычков при откорме в индивидуальном секторе отражают антигенезависимые изменения. Морфология тимуса 16-месячных бычков при откорме в промышленных условиях характеризуется большим разнообразием клеток, наличием значительного числа гранулоцитов, тканевых базофилов с выраженной деградацией, резким огрубением ретикулярных волокон стромы, мукоидным набуханием стенок сосудов микроциркуляторного русла. Выявленные изменения являются морфологическим эквивалентом возникновения аллергических реакций гиперчувствительности замедленного типа [1].

Применение кормовой добавки препарата "Привес-40" нормализовало морфологию тимуса, т.е. соотношение лимфоидных клеток коркового и мозгового вещества в сторону увеличения их количества в коре долек тимуса. При этом произошло снижение содержания эозинофильных гранулоцитов и тканевых базофилов.

Фомина Н.М. (1990) исследовала возрастную морфологию лимфоидных органов, в том числе тимуса у крупного рогатого скота в зависимости от различной степени двигательной активности [2].

У новорожденных телочек тимус имеет значительно развитую лимфоидную ткань, которая хорошо дифференцирована на корковое и мозговое вещество. Корковое вещество занимает большую площадь, чем мозговое. Тимус за период от новорожденного до девятимесячного возраста меняет свою топографию. Цвет органа изменяется от бледно-розового у новорожденных до серо-розового у 9 месячных, его консистенция с возрастом уплотняется. Форма тимуса становится лентовидной. В условиях гиподинамии тимусу характерна более ранняя возрастная регрессия. Этот процесс начинается у телят с 4 месячного возраста и отчетливо прослеживается к 9 месяцам, а у телят, получавших дозированное принудительное движение, признаков возрастной регрессии еще нет.

Сабирова Э.С. (2009) изучала строение и иннервацию тимуса крупного рогатого скота холмогорской породы в онтогенезе. По ее данным во всех исследованных этапах (плоды 5-8 - месячного возраста, новорожденные, 2-, 4 - месячные телята, 2 - летние животные) развития органа, тимус холмогорской породы имеет непарную грудную и парные шейные доли. Грудная доля располагается в предсердном средостении, а шейные тянутся вдоль трахеи по обе стороны, топография которых в возрастном аспекте не претерпевает значительных изменений. В постнатальном онтогенезе (у новорожденных, 2-, 4 - месячных телят, 2 - летних животных) изменение абсолютной массы тимуса неравномерное: у новорожденных телят - $152,64 \pm 10,42$ г., у 2- месячных телят - $113,11 \pm 6,60$ г., у 4 - месячных телят - $121,93 \pm 5,92$ г., у 2 - летних животных - $244,84 \pm 9,87$ г., а относительная масса органа неукоснительно снижается с 0,56 у новорожденных до 0,06 у 2 - летних животных. К 2 - летнему возрасту у животных происходит замещение части рабочей паренхимы на жировую ткань. При выраженной возрастной инволюции в дольках тимуса обнаруживаются кровеносные сосуды, с хорошо развитыми стенками и большое количество тимусных телец [3].

Фисенко С.П. (2010) с помощью морфологических и морфометрических исследований изучала динамику интенсивности роста и возрастные морфологические изменения тимуса телят черно-пестрой породы от рождения до восьмимесячного возраста. По ее данным тимус телят крупного рогатого скота представлен анатомически сформированным органом, состоящим из двух отделов — грудного и шейного и имеющим светло-серый цвет с розоватым оттенком [4].

Изучение гистологических изменений в тимусе телят в возрастном аспекте показало: период от рождения до семи месяцев постнатальной жизни характеризуется быстрым увеличением массы и объема железистой ткани, стабилизацией структуры, преобладанием коркового вещества над мозговым, возрастанием количества долек, увеличением плотности и усилением митоза тимоцитов в подкапсулярной зоне коры, количественным и качественным многообразием тимусных телец. Тимус в указанный период достигает максимального развития, что соответствует его высокой функциональной значимости как органа лимфоэпителиальной системы. Начиная с восьмимесячного возраста в тимусе появляются первые признаки инволютивных явлений: появление жировых клеток в соединительнотканых элементах железы, преобладание мозгового вещества над корковым, уменьшение плотности расположения клеток мозговой зоны и снижение митотической активности клеток корковой.

В научных трудах вышеуказанных авторов исследованы макроморфология, морфометрия, топографическая анатомия, клеточный состав тимуса на основе гистологических исследований в зависимости от возраста и условий содержания и отсутствуют исследования, посвященные дифференцировке популяции иммунокомпетентных клеток в тимусе.

Сегодня в развитых странах мира в гуманитарной и ветеринарной медицине морфологами и патологами широко применяются иммуногистохимические методы, которые

дают возможность дифференцировать исследуемые клетки и показать их непосредственно в гистосрезах.

На сегодня поли- и моноклональные антитела, используемые для дифференцировки поверхностных маркеров лейкоцитов человека и пролиферации клеток, применяются в экспериментальной биомедицине, ветеринарной медицине для выявления лейкоцитов экспериментальных, домашних и диких животных [5-10].

Цель настоящей работы заключается в выявлении и демонстрации в парафиновых гистосрезах, фиксированных в формалине, структуры и клеточного состава тимуса крупного рогатого скота с помощью гистологических и иммуногистохимических методов.

Материалы и методы исследования

Работа выполнялась на кафедре ветеринарно-санитарной экспертизы, гистологии и патологии факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина и в лаборатории иммуногистохимии и гематологии института ветеринарной патологии факультета ветеринарной медицины Гиссенского Университета (Гиссен, Германия, руководитель института - профессор Манфред Рейнахер).

После забоя 7 голов крупного рогатого скота в возрасте от 1,5 до 7 лет в убойных пунктах городов Ош и Бишкек все органы забитых животных были подвергнуты детальному осмотру для исключения каких-либо патологии в органах. При исследовании в тимусе отсутствовали макроскопические и гистологические изменения.

Объектом исследования служил тимус. Гистологическому исследованию подвергнуты все 7 голов крупного рогатого скота, а иммуногистохимическому исследованию 3 головы.

Кусочки от тимуса после детального осмотра были зафиксированы в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина в соответствии с методикой. После фиксации дальнейшая гистологическая процедура (обезвоживание и заключение в парафин кусочков) производилась в обычных лабораторных условиях (вручную) и в специальной машине в вакууме (автоматически). Из парафиновых блоков готовились серийные срезы на санном микротоме толщиной 4-6 мкм и на микротоме новой модификации толщиной 2-3 мкм. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином для описания и анализа общей гистокартины тимуса, селезенки и лимфатических узлов.

При иммуногистохимическом исследовании был использован PAP (peroxidase-antiperoxidase complex) метод для выявления Т-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток. Для выявления Т-лимфоцитов использовали антисыворотку Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD 3. Code No. A. 0452, (PAP); макрофагов – антисыворотку Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clone MAC 387. Code Nr. M0747 (PAP); пролиферацию клеток - антисыворотку Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC10. Code-Nr. M 0879 (PAP). При положительной реакции CD 3 положительные клетки (Т- лимфоциты), клетки в состоянии пролиферации окрашивались в коричневый цвет, MAC 387 положительные клетки (макрофаги) – в темно-коричневый цвет.

Результаты исследований

Гистологически тимус крупного рогатого состоит из капсулы, междольковых перегородок и паренхимы. В паренхиме тимуса крупного рогатого скота в возрасте 1,5 лет имеются дольки, в которых четко дифференцированы корковое и мозговое вещество. Между дольками тимуса можно наблюдать наличие жировой ткани. В корковом веществе тимоциты располагаются густо, особенно, в подкапсулярной зоне. Из-за рыхлого расположения лимфоцитов, мозговое вещество выделяется светлой окраской. В мозговом веществе, помимо тимоцитов и макрофагов, выделяются тимусные тельца или тельца Гассалья (Рисунок 1а).

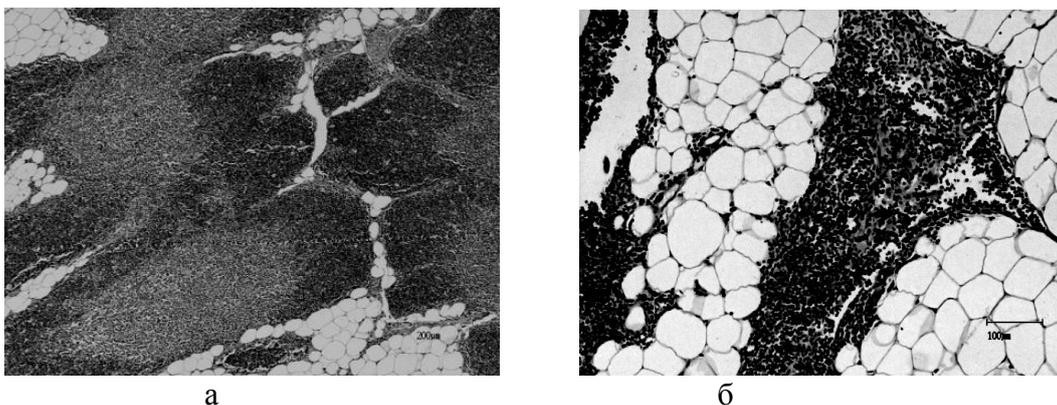


Рисунок 1 - Парафиновые срезы тимуса крупного рогатого скота.

Окраска гематоксилином и эозином. а. Активное морфофункциональное состояние тимуса с началом процесса инволюции. Четко выражено корковое и мозговое вещество тимуса. Небольшая часть паренхимы замещена жировой тканью. Возраст – 1,5 лет. bar=200µm; б. Выраженная возрастная инволюция тимуса. Отсутствует корковое вещество долек тимуса. Возраст – 7 лет. bar=100µm.

При сравнительном исследовании тимусных телец, можно выделить одноклеточные, мелкие и крупные слоистые тельца, а также слоистые тельца с кистозным перерождением. Тимус у крупного рогатого скота старшего возраста подвержен выраженной возрастной инволюции, которая на гистологических срезах характеризуется наличием большого количества жировой ткани, уменьшением площади паренхимы тимуса. В дольках тимуса отсутствуют корковое вещество. В отдельных местах паренхима тимуса полностью замещена жировой тканью (Рисунок 1 б).

Иммуногистохимические исследования парафиновых срезов тимуса крупного рогатого скота разных возрастов показали следующие результаты:

В тимусе крупного рогатого скота в возрасте 1,5 лет Т- лимфоциты в большом количестве расположены в корковом веществе и умеренно в мозговом веществе (Рисунок 2 а).

Макрофаги расположены в междольковых перегородках, вокруг сосудов, в корковом и мозговом веществе, но в мозговом веществе количество макрофагов преобладает (Рисунок 3а).

В корковом и мозговом веществе тимуса, особенно в подкапсулярной зоне коркового вещества, отмечена интенсивная пролиферация тимобластов (Рисунок 4а).

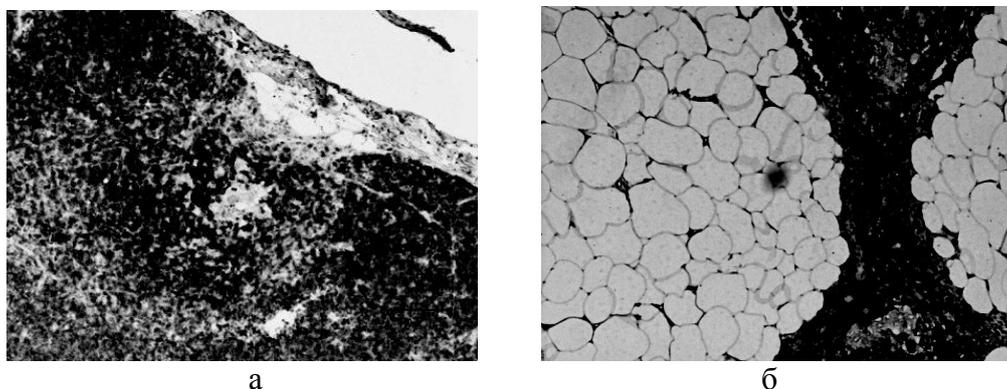


Рисунок 2 - Иммуногистохимическое выявление Т-лимфоцитов в тимусе. РАР метод. а.

Масса Т-лимфоцитов в корковом веществе тимуса при его активном морфофункциональном состоянии. Возраст – 1,5 лет. bar=100µm.; б. Наличие Т-лимфоцитов только в мозговом веществе тимуса его при выраженной инволюции. Возраст – 7 лет. bar=100µm.

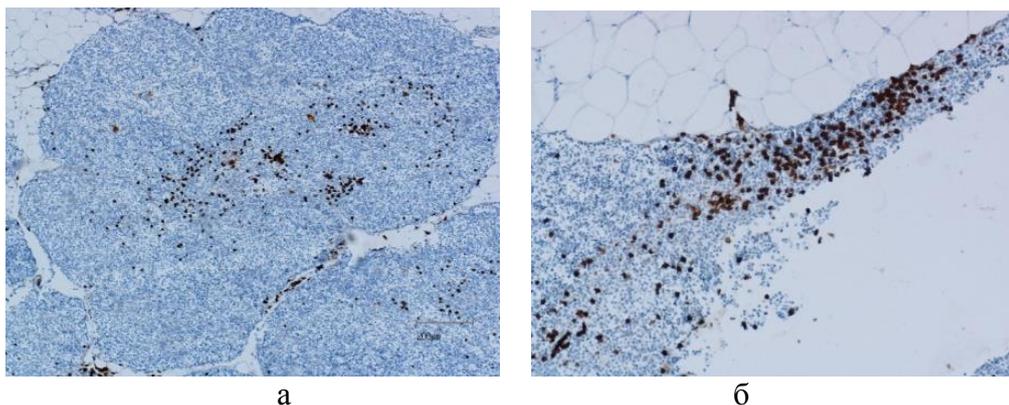


Рисунок - 3. Иммуногистохимическое выявление макрофагов. РАР метод. а. Макрофаги в паренхиме тимуса. Возраст – 1,5 лет. bar=200µm; б. Увеличение макрофагов в паренхиме тимуса при ее выраженной возрастной инволюции. Возраст – 7 лет. bar=100µm.

В тимусе крупного рогатого скота в возрасте 7 лет при выраженной возрастной инволюции Т- лимфоциты располагаются только в мозговом веществе (Рис. 2б), увеличено количество макрофагов, особенно в мозговом веществе (Рис. 3б), выявлена слабая пролиферация клеток в мозговом веществе (Рис. 4б).

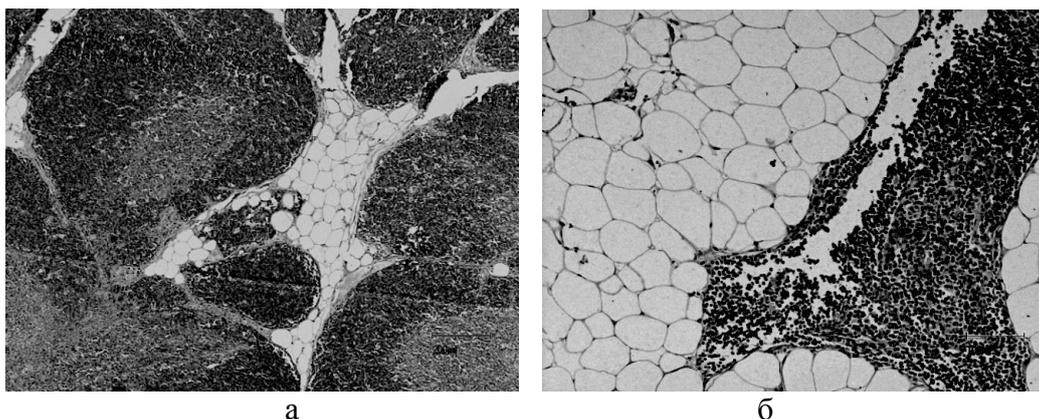


Рисунок - 4. а. Иммуногистохимическое выявление пролиферации лимфоидных клеток. РАР метод.

Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток в корковом и мозговом веществе тимуса при ее активном морфофункциональном состоянии. Возраст – 1,5 лет. bar=200µm; б. Ослабление митотической активности долек тимуса при выраженной его инволюции. Возраст – 7 лет. bar=100µm.

Выводы

Результаты проведенных гистологических и иммуногистохимических исследований позволяют нам сделать следующие выводы:

1. Исследован клеточный состав тимуса крупного рогатого скота в активном морфофункциональном состоянии и при возрастной инволюции.
2. Установлено, что Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD 3 антисыворотку можно использовать для выявления Т-лимфоцитов, Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clone MAC 387 антисыворотку – для выявления макрофагов, а Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC10 – для выявления пролиферирующих клеток в парафиновых срезах тимуса крупного рогатого скота, фиксированные в формалине.
3. Вышеуказанные поли- и моноклональные антитела в дальнейшем можно использовать при исследовании нормы и патологии тимуса крупного рогатого скота.
4. Впервые продемонстрированы и показаны места локализации Т-лимфоцитов,

макрофагов и митоза лимфоидных клеток в тимусе в активном морфофункциональном состоянии и при возрастной инволюции.

Литература

1. Гатин И. М. Биоморфология тимуса и селезенки крупного рогатого скота при откорме / Автореф. дис.... канд. вет. наук 16.00.02. – Казань, 1990. – 20 с.
2. Фомина Н.М. Возрастная морфология лимфоидных органов у крупного рогатого скота в зависимости от различной степени двигательной активности / Автореф. дис... канд. биол. наук. 16.00.02. – Москва, 1990. – 20 с.
3. Сабирова Э.С. Особенности строения и иннервации тимуса крупного рогатого скота холмогорской породы в онтогенезе/ Автореф. дис.... канд. биол. наук 16.00.02. – Казань, 2009. -22 с.
4. Фисенко С.П. Морфологическая характеристика щитовидной железы и тимуса молодняка крупного рогатого скота черно-пестрой породы/ Автореф. дис..... канд. биол. наук 06.02.01. – Саранск, 2010. – 20 с.
5. Mackay C. Sheep leukocyte molecules: a review of their distribution, structure and possible function. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1988. – Vol. 19. –p. 1-20.
6. Иргашев А.Ш., Алдаяров Н.С. Демонстрация иммунокомпетентных клеток в периферических органах иммуногенеза у клинически здоровых собак // Вестник КАУ, № 2(6), Бишкек, 2006. С. 85-89.
7. Иргашев А.Ш., Асанова Э.И., Manfred R. Выявление иммунокомпетентных клеток в лимфатических узлах яка// Вестник КАУ, № 1(7), Бишкек, 2007. -С. 165 – 169.
8. Иргашев А.Ш., Асанова Э.И., Manfred R. Иммуноморфология селезенки яка // Исследования, результаты, № 3, 2007. –С. 105 – 108.
9. Марасулов А.А., Алдаяров Н.С., Иргашев А.Ш. Возрастная морфология тимуса у домашних кроликов // Вестник Кыргызского национального аграрного университета. – 2009.- № 4 (15). - С. 162-168.
10. Irgashev A., Mitrofanov B., Arbaev K., Gutberlet K., Rudolph R.. Demonstration of T- and B- lymphocytes and proliferative cells in formalin-fixed paraffin embedded thymus, lymph nodes and spleen of clinically healthy sheep.// Материалы 1-международного ветеринарного конгресса, Алматы, 2002. –С. 108-110.

G.K.Kasieva, A.Sh. Irgashev, J.I.Kazyev, M. Reinacher

COMPARATIVE RESULTS OF IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES OF THE CELLS OF THE THYMUS OF CATTLE

Using histological and immunohistochemical methods with the help of Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD 3, Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clone MAC 387 and Monoclonal Mouse Anti-Defined Cell Nuclear Antigen, Clone PC10 Antibodies were identified and showed the localization of T-lymphocytes, macrophages and mitosis of lymphoid cells in formalin- fixed paraffin-embedded sections of the thymus of cattle.

Key words: cattle, thymus, immunohistochemistry, Poly-and Monoclonal Antibodies, T-lymphocytes, macrophages, mitosis of lymphoid cells.

МҮЙІЗДІ ІРІ ҚАРА МАЛ ТИМУСЫНЫҢ ЖАСУША ҚҰРАМЫН ИММУНДЫ ГИСТОХИМИЯЛЫҚ ЗЕРТТЕУДІҢ САЛЫСТЫРМАЛЫ НӘТИЖЕЛЕРІ

Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD 3, Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clone MAC 387 и Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC10 антиқан сарысуларын қолдау арқылы формалинде бекітілген мүйізді ірі қара мал тимусының балауыздалған жұқа кесіндісінде оқшауланған Т-лимфоциттердің, макрофагтардың және лимфоидты жасушалар митозының орналасуын гистологиялық және иммунды гистохимиялық әдістерімен айқындалғаны көрсетілген.

Кілт сөздер: мүйізді ірі қара, тимус, иммундыгистохимия, поли- және моноклональды антиқан сарысуы, Т-лимфоциттер, макрофагтар, лимфоидты жасушалар митозы.

ӘОЖ 597:504.4.054

Ғ.С. Қойшыбаева, Қ.Ш. Нұрғазы

Қазақ ұлттық аграрлық университеті

ҮЛКЕН АЛМАТЫ ӨЗЕНІНДЕГІ ҚАБЫРШАҚСЫЗ КӨКБАС БАЛЫҒЫНЫҢ (*DIPTYCHUS DYBOWSKII*) ЖАҒДАЙЫН БАҒАЛАУ

Андатпа. Үлкен Алматы өзенінде тіршілік ететін қабыршақсыз көкбас балығының (*Diptychus dybowskii*) қазіргі жағдайы зерттелді. Жүргізген зерттеу бойынша балықтар мөлшерінің кіші болуына қарамастан қоңдылығы жоғары болуы эфтрофикацияны, яғни су қойманың улы заттармен ластануын меңзейді. Үлкен Алматы өзенінің суы тоқтау сулардың жиналуымен, қаланың, сонымен қатар өндірістің қалдық суларымен ластанады.

Кілт сөздер: абориген, ихтиофауна, қабыршақсыз көкбас балығы, эфтрофикация, антропогенді фактор, индикатор.

Кіріспе. Балқаш су алабы тұщы сулардың үлкен ресурстарымен орналасқан. Құрлық суларының көптеген бөлігі Алматы облысында орналасқан - 800 өзендер мен су қоймалар. Бірақ осы су ресурстары рационалды түрде қолданылмай келеді. Облыстың су объектілерінің ластануының негізгі көзі қалдық суларды су қоймаларға жіберетін, ұйымдар мен кәсіпорындар болып табылады [1].

Алматы территориясының физико-географиялық және табиғи-климаттық жағдайы бойынша ерекшеленеді, оның экологиялық жағдайын қиындататын басым табиғи факторлар көп. Техногенді қалдықтардың шамамен 70% қаланың территориясында қаласында. Сонымен, Алматы қаласы қала арқылы өтетін өзендер мен су қоймаларды әртүрлі поллютанттармен, соның ішінде ауыр металдармен ластаушы көзі болып табылады

Үлкен Алматы өзені Алматы қаласының маңызы жоғары, суы мол өзені болып табылады. Ол өзінің бастауын теңіз деңгейінен шамамен 4000 м биіктіктен алады және Қаскелең өзеніне құяды. Оның жалпы ұзындығы – 96 м². Өзеннің тауға шығардағы су жинайтын ауданы – 96 км². Өзен қаланы ауыз сумен қамтамасыз ететін негізгі құрлық су көзі болып табылады. Бірақ соңғы онжылдықта оның экожүйесі қала жағынан антропогенді жүктемелерді бастан кешіп отыр [2].

Тіршілік ету ортасына баға беру үшін әртүрлі физикалық, химиялық және биологиялық әдістер қолданылады. Соның ішінде биоиндикация әдісі кең таралған. Биологиялық индикаторлар жүйеге немесе процеске тән, экологиялық жүйе жағдайларының өзгерістерін анықтау мен баға беретін қасиеттерге ие. Соның ішінде балықтарды да қолдануда, балықтар