

0.6–2.7%, mycoses 2.0–4.1% and parasitic diseases 1.8–3.5% of the diseases diagnosed. Among bacterial diseases was diagnosed mainly inflammation of the navel and yolk sac (18.3–38.5%) and colibacteriosis (5.5–22.7%). In slaughter chickens was also noted a successive increase of infections caused by ciliate *Salmonellae* (group B, C, D and E). Among viral diseases only Marek's disease (0.1–2.3%) and Gumboro disease (0.4–1.1%) was noted, from mycotic di-

seases was diagnosed mainly aspergillosis (2.0–3.8%) and among parasitic diseases-coccidiosis was found (1.8–3.5%). Among metabolic disorders dominated diathesis urica (11.0–20.4%), syndrom of fatty degeneration of the liver and kidneys (2.0–10.7%), diathesis exudativa (0.2–4.5%), rachitis (0.9–3.2%) and perosis (0.8–1.2%). Moreover, in 1985 in 0.8% of the examined chickens a syndrom of malabsorption was found.

WŁODZIMIERZ KLUCIŃSKI, EWA MIERNIK*,
BARBARA SZELESZCZUK, MAGDALENA ZALEŚKA

Wpływ *in vitro* jonów litu na stymulację limfocytów T krwi i mleka u krów*)

Katedra Epizootologii, *Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką Wydziału
Weterynaryjnego SGGW-AR, ul. Grochowska 272, 03-649 Warszawa

Na podstawie szeregu badań doświadczalnych i klinicznych można stwierdzić istotny udział jonów litu w wielu procesach metabolicznych żywych komórek i tkanek oraz praktyczne zastosowanie tego pierwiastka w terapii stanów maniakalno-depresyjnych u ludzi (4, 10, 12, 13). Na szczególną uwagę zasługują badania dotyczące udziału tych jonów w procesach odpornościowych u ludzi, szczególnie w stymulacji komórkowej. Jony litu przyczyniają się do wzrostu odsetka limfocytów tworzących rozety, wyższej reaktywności tych komórek na niespecyficzne (PHA, ConA) i specyficzne (PPD, SKSD) antygeny oraz wyższej aktywności procesów fagocytozy w makrofagach (1). Stwierdzono również, że najwyższa koncentracja Li^+ w organizmie występuje w węzłach chłonnych (około 0,2 $\mu\text{g/g}$ s.m.), podczas gdy w całkowitej krwi, wątrobie, mięśniach i mózgu waha się od 0,006 do 0,004 $\mu\text{g/g}$ s.m. (19).

W poszukiwaniu nowych, a jednocześnie taniach związków mogących stymulować układ odpornościowy u zwierząt i przez to poprawiać status immunologiczny organizmu, podjęto badania nad oceną przydatności tego jonu w stymulacji immunologicznej ogólnoustrojowej i lokalnej. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac przedstawiających wpływ tego kationu na funkcję limfocytów bydła.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu *in vitro* różnych stężeń jonów litu na transformację blastyczną limfocytów T bydła, izolowanych z krwi obwodowej oraz z mleka. Transformacja blastyczna limfocytów stanowi obecnie podstawowy test dla oceny funkcji tych komórek w procesach odpornościowych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 10 krowach rasy niższej czarno-białej, w wieku 2–3 lat, klinicznie zdrowych, będących w środku lub drugiej połowie laktacji. Ocenę zdrowotności gruczołu mlekowego przepro-

wadzano na podstawie badań klinicznych, oznaczenia całkowitej liczby komórek w mleku pełnym (metoda Newmana-Lamberta w modyfikacji Levowitza i Webera), odsetkowego ich składu (metodą Wrighta) oraz badań bakteriologicznych według ogólnie przyjętych zasad (8, 14).

20 ml krwi z żyły jarzmowej pobierano do strzykawki z obecnością antykoagulantu ACD w stosunku 8:1. Następnie krew rozcieńczano PBS w stosunku 1:2, nawarstwiano i wirowano w gradiencie Ficoll-Hypaque o gęstości 1,0805, przy 2500 obr./min. przez 45 minut (18). Limfocyty zbierano pipetą z granicy obu faz, płukano dwukrotnie w PBS i trzeci raz w podłożu Eagle'a z dodatkiem 1% L-glutaminy, 0,5% gentaminy oraz 10% inaktywowanej surowicy cielęcej (FBS). Następnie komórki zawieszano w 1 ml podłoża, liczone je, określano skład procentowy oraz żywotność, a następnie rozcieńczano do stężenia 4×10^6 limfocytów/ml. Odzysk komórek w stosunku do pełnej krwi wynosił $71,0 \pm 5,4\%$, przy żywotności $99,0 \pm 0,5\%$.

Mleko pobierano od krów, u których całkowita liczba komórek mleka nie przekraczała $5 \times 10^5/\text{ml}$, a średni skład odsetkowy przedstawiał się następująco: 20% neutrofili, 50% makrofagów i 30% limfocytów. 400–600 ml mleka od jednej krowy pobierano do sterylnych buteleczek, schładzano, rozcieńczano PBS w stosunku 1:2, a następnie wirowano przy 2500 obr./min. przez 20 minut. Supernatant wraz z tłuszczem wylewano, a osad komórek zbierano i płukano czterokrotnie w PBS, a piąty raz w podłożu Eagle'a. Komórki zawieszano w 1 ml podłoża, liczone i określano żywotność oraz różnicowano je. Następnie rozcieńczano w podłożu do stężenia 12×10^6 komórek/ml podłoża.

Na podstawie przeprowadzonej analizy obliczano odzysk komórek żywych po izolacji w stosunku do jej liczby w pełnym mleku. Stwierdzono, że średni odzysk wynosił $52,0 \pm 6,8\%$, przy żywotności komórek $93,0 \pm 0,2\%$.

W celu określenia optymalnych stężeń mitogenów, aktywujących transformację blastyczną, fitohemaglutyninę (PHA) i konkanawalinę A (ConA) produkcji Sigma Chemical St. Louis rozpuszczano w przygotowanym uprzednio podłożu Eagle'a tak, aby końcowe jej stężenie w mikrohodowlach wynosiło 0,5, 2,5, 5,0 $\mu\text{g/ml}$. Inkubację limfocytów krwi i mleka z Li^+ wykonano według następującego schematu: 2×10^5 limfocytów z krwi obwodowej lub 6×10^5 komórek izolowanych z mleka w 50 μl podłoża Eagle'a rozdzielano do studzienek płytek Limbro, zakładając mikrohodowle.

Studzienki podzielono na 5 serii (A, B, C, D, E). Każda seria składała się z 3 podzespołów (1, 2, 3)

*) Praca częściowo wykonana w ramach tematu międzyresortowego MR.II.10, oraz we współpracy z National Animal Diseases Center, Ames, Iowa, USA.

Tab. 1. Aktywność limfocytów krwi i mleka stymulowanych mitogenami. Aktywność wyrażono w $\text{cpm} \times 10^3$ inkorporowanej H^3 — tymidyny

Limfocyty nie stymulowane	Limfocyty stymulowane mitogenami			
	rodzaj mitogenu	dawka mitogenu w $\mu\text{g/ml}$ pożywki		
		0,5	2,5	5,0
Limfocyty krwi				
$2,8 \pm 0,8$ α)	PHA	$39,7^* \pm 16,3$	$45,3^* \pm 14,2$	$14,3^* \pm 4,1$
	ConA	$110,8^* \pm 27,1$	$123,8^* \pm 20,3$	$49,8^* \pm 8,9$
Limfocyty mleka				
$1,9 \pm 0,1$	PHA	$25,7^* \pm 9,9$	$20,4^* \pm 7,1$	$3,4^* \pm 0,2$
	ConA	$50,7^* \pm 20,8$	$40,2^* \pm 9,8$	$8,9^* \pm 0,4$

Objaśnienia: a) średnia arytmetyczna cpm z 10 krów $\pm$ odchylenie standardowe, * istotność $p < 0,01$ w porównaniu do limfocytów niestymulowanych.

liczących po 3 studzienki każdy. Do pierwszego podzespółu serii A dodawano 100 μl podłoża, do drugiego podzespółu 100 μl podłoża z dodatkiem PHA o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$, do trzeciego podzespółu 100 μl podłoża z dodatkiem ConA o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$. Końcowe 50 μl w serii A stanowiło podłoże bez dodatku roztworu chlorku litu. W serii B natomiast końcowe 50 μl stanowiło podłoże z dodatkiem chlorku litu (Sigma Chemical St. Louis) o takim stężeniu, aby wynosiło ono 1 mM/l, w serii C natomiast 5 mM/l, w serii D — 10 mM/l oraz w serii E — 20 mM/l.

Następnie płytki inkubowano w ciągu 72 godzin w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO_2 . Osiemnaście godzin przed końcem inkubacji dodawano do każdej studzienki 50 μl (0,5 μCi) roztworu H^3 — tymidyny (New England Nuclear, Boston MA). Po zakończonej inkubacji mikrohodowle z poszczególnych studzienek przenoszono pojedynczo na bibułę przy użyciu harwestu, a po wyschnięciu do próbek z płynem scyntylacyjnym (PermaBlend II — rozpuszczony w toluenie). Radioaktywność liczono w liczniku scyntylacyjnym, a wyniki otrzymywano w ilości impulsów na minutę (cpm).

Wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych cpm $\pm$ odchylenie standardowe. Istotność różnic obliczano przy użyciu testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że fitohemaglutynina i kankanawelina A w stężeniach 0,5, 2,5 i 5,0 $\mu\text{g/ml}$ znamienne aktywują transakcję blastyczną limfocytów krwi obwodowej i mleka u krów. Optymalną stymulację uzyskiwano przy stężeniach 0,5 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$ PHA lub ConA (tab. 1).

Fitohemaglutynina i konkanawelina A należą do nieswoistych antygenów (mitogenów), które w stosowanych w niniejszej pracy stężeniach powodują w maksymalnym stopniu przekształcanie blastyczne, czyli przechodzenie komórek dojrzałych (limfocytów) w komórki niedojrzałe (limfoblasty). W badaniach własnych aktywność tę oceniano, jak podano w metodyce, przez określanie aktywności tymidyny znakowanej trytem, która wbudowywana jest do DNA proliferujących komórek.

Porównując reaktywność limfocytów krwi obwodowej na PHA i ConA z analogicznymi limfocytami mleka można stwierdzić, że te ostatnie stymulowane są znacznie słabiej. Spostrzeżenia te są zgodne z obserwacjami innych autorów (3, 9, 17). Na temat przyczyn tych

różnic istnieje w literaturze jeszcze wiele rozbieżności. Brane są pod uwagę między innymi takie przyczyny, jak większa heterologia populacji limfocytów T mleka, większy odsetek martwych komórek, i możliwość uwalniania z nich cytotoksycznych czynników, zablokowanie na powierzchni limfocytów receptorów dla PHA i ConA przez rozpuszczalne komponenty mleka (2, 5, 9, 11).

Dodatek do hodowli komórkowych jonów litu w stężeniach od 1 do 10 mM/l powoduje wzrost inkorporacji tymidyny znakowanej H^3 do aktywowanych mitogenami (PHA i ConA) limfocytów krwi obwodowej i mleka. Maksymalną inkorporację obserwowano przy stężeniu Li^+ 5 mM/l. Stymulacja limfocytów krwi wzrastała przy tym stężeniu o 92,9% w obecności PHA i o 41,8% w obecności ConA, a limfocytów mleka odpowiednio o 20,2% i o 86,4% (tab.2).

Otrzymane wyniki świadczą o hiperreaktywności limfocytów T bydła na jony litu. Podobna hiperreaktywność obserwowano również w przypadku limfocytów człowieka (1, 15). Porównując stężenie Li^+ w hodowlach komórkowych (1—5 mM/l) z fizjologicznym stężeniem tego kationu w surowicy (1—2 mEq/l) należy stwierdzić, że do hiperreaktywności limfocytów *in vitro* potrzebne są wysokie stężenia tego kationu. Uwzględnić jednak trzeba w badaniach *in vivo* większą kumulację tego jonu w układzie chłonnym (19).

W świetle opublikowanych badań nad mechanizmem stymulacji limfocytów T przez jony litu można stwierdzić, że kation ten jest inhi-

Tab. 2. Wpływ różnych stężeń jonów litu na aktywność limfocytów krwi i mleka stymulowanych PHA i ConA. Aktywność wyrażono w $\text{cpm} \times 10^3$ inkorporowanej H^3 — tymidyny

Stężenie Li^+ (mg/l)	Stymulacja mitogenami			
	Limfocytów krwi		Limfocytów mleka	
	PHA	ConA	PHA	ConA
0	$39,7 \pm 16,3$	$110,8 \pm 27,1$	$25,7 \pm 9,9$	$50,7 \pm 20,8$
0,1	$51,8 \pm 16,9$	$125,7 \pm 26,3$	$44,4 \pm 12,7$	$69,4 \pm 25,3$
0,5	$76,6 \pm 26,0^*$	$157,1 \pm 25,1^*$	$56,6 \pm 11,7^*$	$94,5 \pm 21,4^*$
1,0	$53,1 \pm 18,3$	$125,3 \pm 16,6$	$45,5 \pm 13,1$	$78,5 \pm 13,7$
10,0	$27,6 \pm 11,8$	$74,8 \pm 15,6$	$18,5 \pm 5,8$	$54,1 \pm 14,4$

Objaśnienia: a) średnia arytmetyczna cpm z 10 krów $\pm$ odchylenie standardowe, * istotny ($p < 0,05$) wzrost aktywności w porównaniu do aktywności limfocytów bez dodatku jonów litu.

bitorem cykazy adenilowej, jak również powoduje hipofunkcję komórek supresorowych, będących jedną z subpopulacji limfocytów T (1, 6, 16).

Reasumując, należy stwierdzić, że jony litu w stężeniach 1–10 mM/l stymulują *in vitro* limfocyty krwi obwodowej i mleka u krów; optymalną stymulację otrzymuje się przy stężeniu tego kationu 5 mM/l.

Zarejestrowane zjawisko uzasadnia celowość dalszych badań nad możliwością praktycznego wykorzystania tego kationu do ogólnoustrojowej lub lokalnej farmakologicznej immunostymulacji limfocytów bydła. Dotychczasowe doniesienia dotyczące stymulacji układu odpornościowego *in vitro* przez jony litu są rozbieżne (7).

Piśmiennictwo

1. Borkowsky W., Shenkman L., Wadler S.: Adv. Exper. Med. Biol. 127, 417, 1980.
2. Brock J. H., Mainon-Fowler T.: Immunol. Today 12, 347, 1983.
3. Concha D., Holmberg O., Morein B.: J. Dairy Res. 45, 287, 1978.
4. Emrich H. M., Aldenhoff J. B., Lux H. D.: Excerpta Medica, Amsterdam — Oxford — Princeton, 1982.
5. Evans P. A., Mewby T. J., Stokes C. R.: Vet. Immunol. Immunopathol. 3, 515, 1982.
6. Gelfand E. W., Dosch H. M., Hastings D., Shore A.: Science. 203, 365, 1979.
7. Greco F. A.: Adv. Exper. Med. Biol. 127, 463, 1980.
8. National Mastitic Council: J. Milk F-d Technol. 31, 344, 1968.
9. Nonnecke B. J., Kehrl M. E.: Am. J. Vet. Res. 46, 1259, 1985.
10. Pandey G. N., Davis J. M.: Adv. Exper. Med. Biol. 127, 15, 1980.
11. Parmely M. J., Beer A. E., Billingham R. E.: J. Exp. Med. 144, 358, 1976.
12. Rybakowski J.: Psychiat. pol. 5, 547, 1972.
13. Rybakowski J.: Przegl. lek. 30, 739, 1973.
14. Schalm O. W.: Veterinary Hematology, Lea and Febiger, Philadelphia, 1965, s. 62.
15. Shenkman L., Borkowsky W., Holzman R. S., Shopsin B.: Clin. Immunol. Immunopathol. 10, 187, 1978.
16. Singer I., Rotenberg D.: New Engl. J. Med. 289, 254, 1973.
17. Smith J. W., Schultz R. D.: Cell Immunol. 29, 165, 1977.
18. Targowski S., Kluciński W.: Am. J. Vet. Res. 44, 828, 1983.
19. Underwood E. J.: Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Academic Press, London, 1977, a. 440.

Adres autora: doc. dr hab. Włodzimierz Kluciński, ul. Wiołnowa 4, m. 19, 02-789 Warszawa

Клюцинский В., Мерник Э., Шелешук Б., Залеская М. — Влияние *in vitro* ионов лита на стимуляцию лимфоцитов Т крови и молока у коров

Цель работы состояла в определении влияния *in vitro* разных концентраций ионов лита на бластическую трансформацию лимфоцитов скота, изолированных из периферической крови и молока

Исследования провели на 10 коровах н.ч.-п, находящихся в середине либо второй половине лактации.

Лимфоциты из периферических крови изолировали с применением градиента Ficoll-Нупаке. Клетки молока изолировали от коров, у которых полное число клеток молока не превышало 5×10^5 /мл молока, а средний процентный состав был следующий: 20% = PMNs, 50% макрофагов и 30% лимфоцитов.

Влияние разных концентраций ионов лита на бластическую трансформацию лимфоцитов крови и молока исследовали изотопным методом с применением H^3 -тимидина и неспецифических митогенов (PHA и ConA).

На основе проведенных исследований отметили, что добавка к клеточным культурам ионов лита в концентрациях 1–10 mM/l вызывает рост инкорпорации титрованного тимидина до активированных митогенами (PHA и ConA) лимфоцитов периферической крови и молока. Оптимальный рост наблюдали при концентрации Li^+ 5 mM/l.

Kluciński W., Miernik E., Szeleszczuk B., Zaleska M. — Stimulation of T lymphocytes of the blood and milk of cows *in vitro* by lithium ions

The purpose of the work was to determine the influence of different concentrations of lithium on the blastic transformation of lymphocytes isolated from the peripheral blood and milk of cattle. The examinations were carried out on 10 cows, Black-White breed being in the middle or in the second half lactation. The lymphocytes of the peripheral blood were isolated by means of Ficoll-Hypaque gradient. The cells from milk were taken from animals whose milk did not contain more than 5×10^5 cells/ml; the mean content was: PMNs — 20%, macrophages — 50%, lymphocytes — 30%. The experiments were performed using 3H — thymidine and non-specific mitogens, i.e. PHA and ConA. It was found that the addition of lithium ions into the cell culture at a concentration from 1.0 to 10 mM/l caused an increased incorporation of 3H -thymidine into lymphocytes stimulated with the mitogens. The highest increase was observed at the level of 5 mM Li^+ /l.

BECKER B. A., NIENABER J. A., CHRISTENSON R. K., MANAK R. C., DE SHAZER J. A., HAHN G. L.: Stężenie kortyzolu we krwi obwodowej jako wskaźnik działania stresu u świń. (Peripheral concentrations of cortisol as an indicator of stress in the pig). Am. J. vet. Res. 46, 1034–1038, 1985 (5)

Badania nad wpływem trzech różnych czynników stresowych (ograniczenie ruchu przez 1 godz., stymulacja prądem elektrycznym przez 6 minut, stres termiczny trwający 6 godz.) powtarzane przez 3 kolejne dni, przeprowadzone na warchlakach w wieku 7–9 miesięcy wykazało wzrost stężenia kortyzolu we krwi obwodowej. Poziom kortyzolu oznaczono metodą radioimmunologiczną. Maksymalny poziom kortyzolu we krwi obwodowej warchlaków o granicznym ruchu, stymulowanych prądem elektrycznym i poddanych stresowi termicznemu w porównaniu do poziomu kortyzolu we krwi warchlaków z grupy kontrolnej był wyższy odpowiednio o $87,8 \pm 0,9$; $43,2 \pm 5,8$ i $25,2 \pm 3,0$ ng/ml.

G.

MORNER T., OLSON P.: Wykazanie zakażenia parwowirusem u psów przy użyciu metody immunofluorescencji. (Canine parvovirus infection demonstrated by immunofluorescence). Zbl. Vet. Med. B, 32, 337–344, 1985 (5)

Obecność parwowirusa wykazano metodą immunofluorescencji u 40 z 41 badanych psów. Metoda ta dała wyniki dodatnie u 33 z 34 szczeniąt z parwowirusowym zapaleniem jelit. W odczynie immunofluorescencji obecność antygenu wirusowego wykazano zarówno w zamrożonych skrawkach tkanek oraz w tych samych skrawkach po utrwaleniu w formalinie. U 15 szczeniąt odczyn immunofluorescencji wypadł dodatnio z obydwoma rodzajami próbek, w dwóch przypadkach silniejszy odczyn notowano stosując świeże skrawki i tylko w jednym przypadku uzyskano silniejszy odczyn stosując skrawki tkanek utrwalone w formalinie.

G.