

## ФЕНОТИПНИ И ФУНКЦИОНАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ЛЕВКОЦИТИ НА ИНДИЙСКИЯ БИВОЛ (*BUBALUS BUBALIS*) ОТ РАЙОНА НА ГР. ПЛОВДИВ

*Атанас Д. Арnaudов\**, *Красимира К. Арnaudова\*\**,

*\* Пловдивски университет “П. Хилендарски”, Биологически факултет, Катедра “Анатомия и физиология на човека”, ул. Цар Асен 24, Пловдив*

*\*\* Висше училище “Земеделски колеж”, бул. Дунав, 78, Пловдив*

### ABSTRACT

The morphological, as well as some phenotypic and functional characteristics of the leucocytes of the Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*) that inhabit the vicinity of Plovdiv were investigated.

It was found out that the white blood cells count in the peripheral blood of the animals is  $9.95 \times 10^9/l$ . White blood cell differential counts indicated predominantly lymphocytes, with mean proportion of 54.50%. 19.5% of the lymphocytes formed E-rosettes (respectively CD2 cells), and 8% formed active (early) E-rosettes.

Both types of leucocytes of the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) possess high functional activity – great degree of phagocyte activity of the neutrophils and the monocytes, active E-rosettes, presence of lymphoblasts, plasmatic cells and monocyto blasts. Possibly, this high physiological activity that has been established has a certain considerable role for the resistance of *Bubalus bubalis* towards various parasitic and infectious diseases.

**Key words:** *Bubalus bubalis*, leucocytes, CD2 cells, phagocytosis.

### ВЪВЕДЕНИЕ

В специализираната литература данните за морфологичните, фенотипните и функционалните характеристики на левкоцитите на индийския бивол (*Bubalus bubalis*) са малобройни, а по-задълбочени проучвания в тази насока са извършвани сравнително отскоро (Iglesia et al. 1999, Ferrer et al., 2000, Davis et al., 2001, Hernández- Fernández et al., 2005).

У нас подобни целенасочени проучвания не са извършвани. Индийският бивол е интересен обект и от биологична гледна точка. Тъй като е доместифициран сравнително късно, той е запазил много черти на дивия си

предшественик, най-важната от които е много високата резистентност към редица заболявания, причинявани от патогенни микроорганизми. Предвид на пряката зависимост между функциите на левкоцитите и резистентността, ние се насочихме към извършване на настоящото проучване и формулирахме неговата цел: да определим морфологичните, както и някои фенотипни и функционални особености на видовете левкоцити на *Bubalus bubalis*, свързани с неговата резистентност – неутрофилни левкоцити, лимфоцити и моноцити.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

### **Опитни животни**

Обект на изследване бяха 8 индивида *Bubalus bubalis* от женски пол, порода Мурра, на възраст между 2 и 4 години, в добро здравословно и физическо състояние. Животните се отглеждат в биволовдна ферма в град Раковски.

### **Определяне общия брой левкоцити и левкоцитната формула**

Използвахме стандартни методики, описани от Ангелов и сътр. (1999).

### **Определяне на някои фенотипни и функционални характеристики на лимфоцитите от периферната кръв**

Определянето извършихме чрез изследване броя и функционалната активност на CD2 клетките (Т–лимфоцити и NK–клетки). За целта използвахме имуноцитoadхерентния тест (Е–розетъчен тест), описан от Костурков и кол. (1983). Теста изпълнявахме и в двата му варианта:

– определяне на тоталните Е–розетки, които представляват общия процент на CD2 клетките.

– определяне на ранните (активните) Е–розетки, което представлява процент на функционално активните CD2 клетки.

### **Определяне на фагоцитарната активност на неутрофилните левкоцити и моноцитите**

Изследването извършихме по общоприетия у нас метод, описан от Вълчанов (1955). Работихме с цяла кръв, към която прибавяхме суспензия от убита култура *Staphylococcus aureus*.

Изброявахме минимум 200 неутрофила и моноцита, като фагоцитиралите от тях изразявахме в процент. Определяхме и фагоцитарния индекс и фагоцитарното число по формулите:

$$\text{Фагоцитарен индекс} = \frac{\text{бр. фагоцитирани бактерии}}{\text{бр. изброени неутрофили(моноцити) общо}}$$

$$\text{Фагоцитарно число} = \frac{\text{бр. фагоцитирани бактерии}}{\text{бр. фагоцитирани неутрофили(моноцити)}}$$

Получените резултати бяха обработени вариационно-статистически по методика, описана от Сепетлиев (1986).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### Общ брой левкоцити в периферната кръв и левкоцитна формула на *Bubalus bubalis*

Получените резултати от извършеното изследване са отразени на таблица 1.

Общият брой левкоцити ( $\times 10^9/l$ ) в периферна кръв на индийския бивол е 9.95, но установихме максимални и минимални отклонения, съответно 11.05 и 8.55. Получените от нас стойности са по-ниски от тези на Iglesia et al. (1999) и на Ferrer et al. (2000) които установяват, че броят на левкоцитите в периферната кръв на женски индивиди *Bubalus bubalis* в различни части на Венецуела е съответно  $12.02 \times 10^9/l$  и  $10.23 \times 10^9/l$ . Тези разлики можем да обясним както с различните природни условия на отглеждане на сравняваните популации *Bubalus bubalis*, така и с физиологичното състояние на женските животни. Според Hernández-Fernández et al. (2005), количеството на левкоцитите в периферната кръв на женските индийски биволи са достоверно различни по време на бременност и след раждане.

Анализът на левкоцитната формула показва, че бялата кръвна картина на бивола е от лимфоцитен тип (приблизително 54.5 % лимфоцити). Данните на Ferrer et al. (2000) за изследвани индивиди *Bubalus bubalis* във Венецуела показват дори по-силно изразено преобладаване на лимфоцитите в периферната кръв – 65%. Следователно, левкоцитната формула на *Bubalus bubalis* е сходна с другите преживни животни, чиято бяла кръвна картина също е от лимфоцитен тип – говедо (*Bos taurus*) – 57 %, елен (*Dama dama*) – 55–70 % лимфоцити и др.

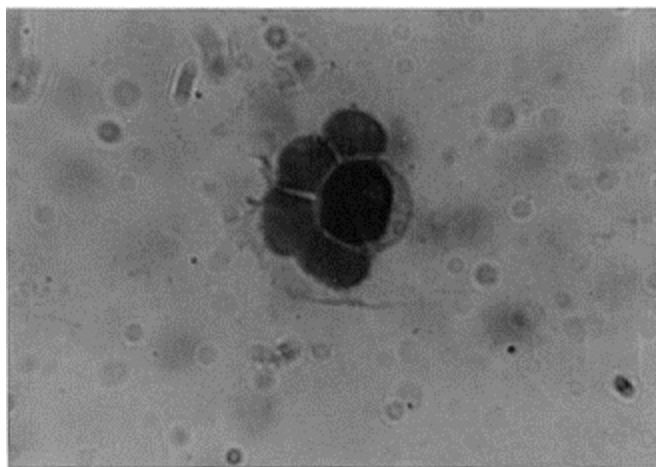
### Лимфоцити – общ брой, фенотипни и функционални особености

Общият брой на лимфоцитите в периферна кръв на индийския бивол е  $5.4 \times 10^9/l$  (табл. 1). Относително големият брой лимфоцити се дължи както на високото им процентно съдържание в периферната кръв, така и на големия общ брой левкоцити. Получените от нас резултати са малко по-високи, но близки като абсолютни стойности с данните на Hernández-Fernández et al. (2005), – съотв.  $4.74 \times 10^9/l$  по време на бременността и  $3.12 \times 10^9/l$  след раждане.

19.5% от лимфоцитите на индийския бивол образуват E-розетки, т.е. характеризирани са като CD2 клетки. Образуваните розетки имаха характерната конфигурация, описана от други автори по-рано, Brain et al., 1969, Костурков и кол., 1983, Фримель, 1987). Прави впечатление, че установените стойности за процента на CD2 клетките са много по-ниски в сравнение с тези при човека 50 – 73% (Костурков и кол., 1983), както и при други преживни – *Bos taurus* над 50 % (Vojtisek, 1992). Нашите резултати се доближават най-много до данните за котката (*Felis silvestris catus*) – 32% CD2 клетки и са много близки до данните на Kaura et al. (1979), според които 17.7% от лимфоцитите на биволи, отглеждани в Индия образуват E-розетки.

8% от лимфоцитите на изследваните индивиди, или почти половината от CD2 клетките, образуват активни (ранни) E-розетки.

При микроскопското изследване установихме също и немалък процент лимфобласти (1%) и плазматични клетки (1%).



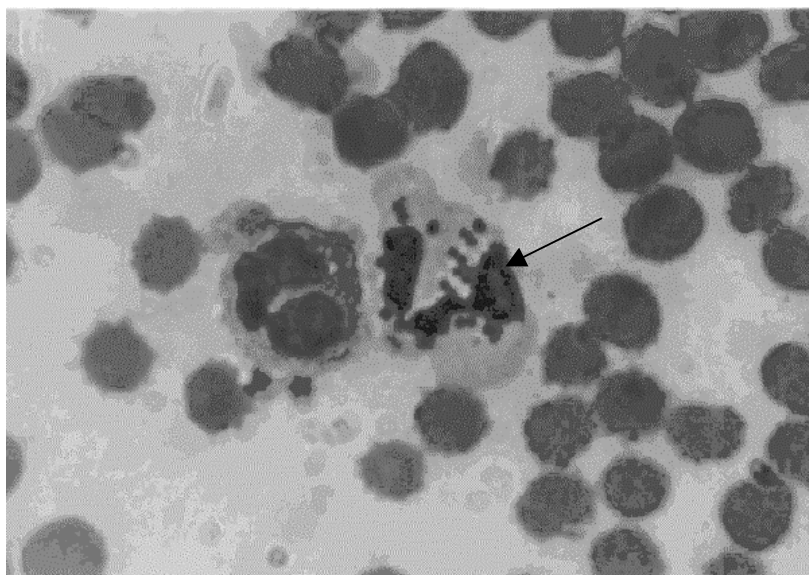
**Фигура 1.** Лимфоцит от периферна кръв на *Bibalus bubalis*, образувал E-розетка с овнешки еритроцити (увел. x 600).

#### **Неутрофилни левкоцити – брой и функционална характеристика**

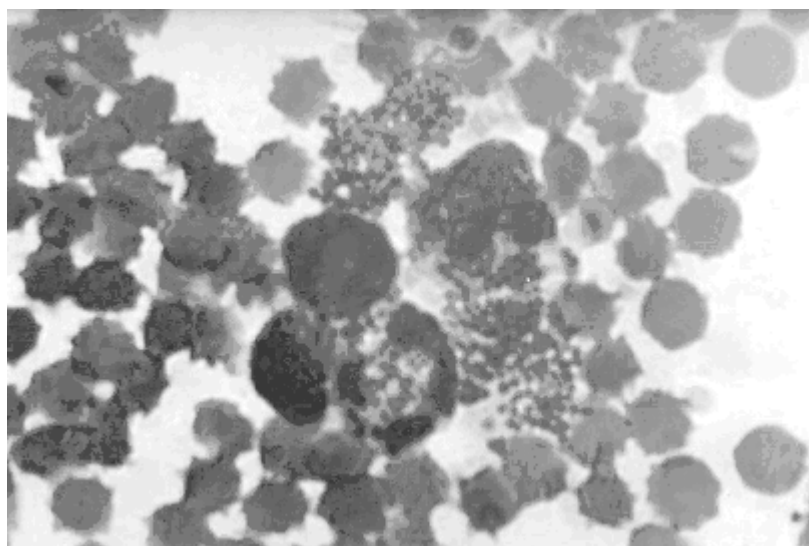
Неутрофилите са втората по численост популация левкоцити от периферната кръв на индийския бивол – 38.5% или  $3.67 \times 10^9/l$ . Получените резултати са по-ниски като абсолютни стойности от резултатите на Hernández-Fernández et al. (2005).

Важна особеност на неутрофилите на бивола е тяхната много висока фагоцитарна активност – 86.5% от тях фагоцитират бактериалната суспензия *Staphylococcus aureus*, а фагоцитарното число и фагоцитарният индекс са съответно 7.28 и 6.3 (табл. 1).

На фиг. 2, 3 и 4 са представени типични микроскопски находки на фагоцитиращи неутрофилни левкоцити на индийския бивол. Прави впечатление силния хемотаксис, силното прилепване и поглъщане. Усилената фагоцитоза обуславя и отчетените много високи стойности на фагоцитарното число и на фагоцитарния индекс. В сравнение с фагоцитарната активност на неутрофилите от периферната кръв на човек (Christina et al., 1985), на свинята (*Sus scrofa domestica*) (Арnaudов и Ангелов, 1999) и на кокошки (Попова и сътр., 1995), тази на неутрофилите на *Bibalus bubalis* е по-висока.



**Фигура 2.** Сегментоядрени левкоцити от *Vibalvus bubalis* в процес на фагоцитоза – бактерии, включени в цитоплазмата (стрелката). Х.Е. (увел. x 600).

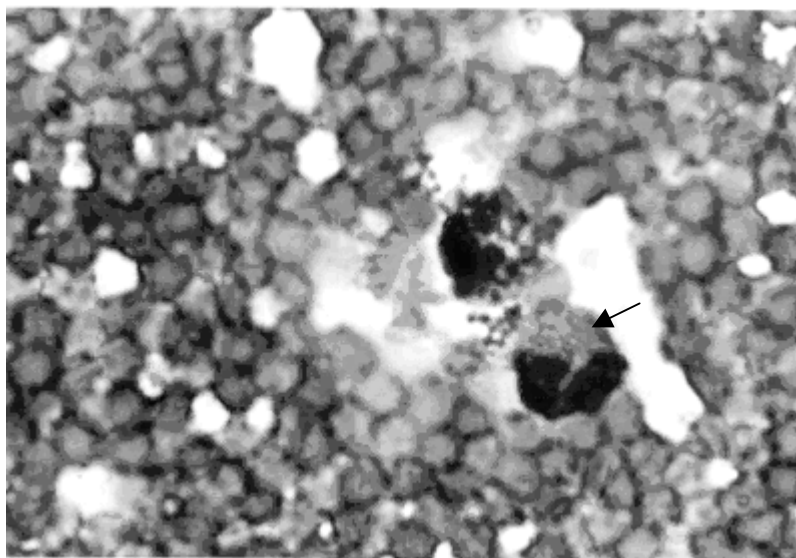


**Фигура 3.** Левкоцити на *Vibalvus bubalis* в процес на фагоцитоза. Адхезия, прилепване и поглъщане на множество бактериални частици *Staphylococcus aureus*. Х.Е. (увел. x 600).

### **Брой и функционална характеристика на моноцитите**

Ние установихме, че моноцитите в периферната кръв на *Vibalvus bubalis* са 3% от броя на белите кръвни клетки (табл. 1). Подобно на неутрофилните левкоцити, моноцитите притежават много висока фагоцитарна активност. Процентът на фагоцитиращите моноцити е малко по-нисък от този на неутрофилите – 82%, но фагоцитарните числа и фагоцитарните индекси са по-високи – 8.1 и 9.87. И тук подобно на фагоцитиращите неутрофили, установихме силен хемотаксис и силно прилепване и поглъщане на бактериалната суспензия – фиг. 4.

Същата тенденция са установили Young et al. (1975) при Африканския бивол (*Syncerus caffer*), чиито циркулиращи моноцити притежават много висока фагоцитарна активност срещу *Trypanosoma congolense*. Според нас тази висока фагоцитарна активност на кръвните фагоцити е в основата на силната резистентност на *Bubalus bubalis* към редица заболявания (в т. ч. и трипанозомоза). Освен това ние установихме и наличие на немалък процент моноцитобласти (0.5%), лимфобласти (1%) и плазматични клетки (1%). Тези резултати показват, че агранулоцитите от периферната кръв на *Bubalus bubalis* лесно могат да пролиферират и се диференцират. Успоредно с това установихме и 0.5% моноцитобласти.



**Фигура 4.** *Сегментоядрен левкоцит и моноцит (означен със стрелка) на Bubalus bubalis в процес на фагоцитоза. Х.Е. (увел. x 600).*

#### **Брой на еозинофилни и базофилни левкоцити в периферната кръв на индийския бивол**

Еозинофилните и базофилните левкоцити в периферната кръв, съответно 1% и 0.5% от броя на белите кръвни клетки (табл. 1), са по-високи като абсолютен брой от установените от Hernández-Fernández et al. (2005). Най-вероятно относително по-малкият процент на тези клетки се дължи на появата в периферната кръв на пролифериралите клетки – моноцитобласти, лимфобласти и на плазматични клетки.

Hawkey et al. (1983) установяват, че при якове (*Bos grunniens*) еозинофилните левкоцити се увеличават синификантно при паразитози. Вероятно еозинофилите също играят определена роля за поддържането на резистентността към заболявания и особено към паразитози.

#### **ИЗВОДИ**

1. Отчетените стойности на показателите “общ брой левкоцити” и “левкоцитна формула” на периферната кръв на изследваните женски индивиди

*Bubalus bubalis* са близки с известните от литературата данни за бялата кръвна картина на вида.

2. Неутрофилните левкоцити и моноцитите имат много висока фагоцитарна активност и вероятно това има важно значение за голямата резистентност на *Bubalus bubalis* към различни инфекциозни и инвазионни заболявания.

3. Въпреки, че броят на CD2 клетките на *Bubalus bubalis* е сравнително малък, сред лимфоцитната популация има и голям брой клетки с висока функционална и трансформационна активност – ранни E-розеткообразуващи клетки, лимфобласти, плазматични клетки, както и моноцитобласти.

## ЛИТЕРАТУРА

- АНГЕЛОВ Г., Н. ИБРИШИМОВ, Ст. МИЛАШКИ, 1999. Клинично-лабораторни изследвания във ветеринарната медицина, Акад. изд. "проф. М. Дринов", С., 367.
- АРНАУДОВ АТ., АН. АНГЕЛОВ, 1999. Проучване на някои показатели на естествения и адаптивния имунитет на свине с естествена бруцелна инфекция, Ветеринарна медицина, 1: 12 – 14.
- ВЪЛЧАНОВ В., 1955. Наблюдения, показващи участието на ядрото във фагоцитарния процес, Известия на Института по Биология "М. Попов", БАН, 5: 119 – 133.
- КОСТУРКОВ Г. и колектив, 1983. Практическо ръководство по алергология, Медицина и физкултура, София, 314.
- ПОПОВА Т., АТ. АРНАУДОВ, Н. ДЖАМБАЗОВА, 1995. Проучване на клетъчно-медиацията имунен отговор при птици, ваксинирани срещу инфекциозен ларинготрахеит и шаркодифтерит, Ветеринарна медицина, 1: 30 – 33.
- СЕПЕТЛИЕВ Д., 1986. Медицинска статистика, Медицина и физкултура, София, 110.
- ФРИМЕЛЪ Г., 1987. Иммунологические методы, Москва, Медицина, 472.
- BRAIN P., J. GORDON, W. A. WELLETTE, 1969. Rosette-formation by peripheral lymphocytes, Clin. Exp. Immunol. 6, 5: 681 – 688.
- CHRISTINA M., E. VANDERBRUCKE-GRAUS, M. HENRICUS, M. THUSSEN and J. VERHOEF, 1985. Phagocytosis of *Staphylococci* by human polymorphonuclear leucocytes is enhanced in the presence of endothelial cells, Infection and Immunity, 50, 1: 250–254.
- DAVIS, W.C., KHALID, A., HAMILTON, M., AHN, J., PARK, Y., CANTOR, G., 2001. The use of crossreactive monoclonal antibodies to characterize the immune system of the water buffalo (*Bubalus bubalis*), Journal of veterinary science (Suwon-si, Korea), 2, 2: 103-109.
- FERRER J., A. DE ÁRRAGA, M. BARBOZA, 2000. Hematological characterization of *Bubalus bubalis* by sex and age, 10, 6: 508–514.

- HAWKEY C.M., D.G. ASHTON, M.G. HAPT, R.N. CINDERY, D.M. JONES, 1983. Normal and clinical haematology in the yak (*Bos grunniens*), Res. Vet. Sci, 34, 1: 31 – 36.
- HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ A. A, O. A. ROMERO, N. B MONTIEL, H. B NAVA-TRUJILLO, N. C. CAHUAO, 2005. Haematological reference values determination in prepartum and postpartum female buffaloes (*Bubalus bubalis*) in a production unit at the south of Maracaibo Lake, Venezuela, Venezuela, Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia Venezuela, Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia 15, 2: 119-124.
- IGLESIA L. N. R., K. K. AZUAJE, F. SÁNCHEZ, A. D. DE RAMÍREZ, 1999. Haematological observations in apparently healthy water buffaloes (*Bubalus Bubalis*) from Western Venezuela, Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, 9, 6: 524–531.
- KAURA Y., R. PAKDEY, V. SHAMA, 1979. Rosette–formation by Buffalo T– and B–lymphocytes, Veterinary Record, 104, 17: 386 – 387.
- VOJTISEK P., Z. KNOTEK, P. HORIN, P. MADR, 1992. Detection of T-lymphocytes in the periferial blood and lymphoid tissnes of cattle using a variant of the E–rosette test and monoclonal antibodies, Zentralblat Veterinarmed, [B], 39, 9: 633 – 640.
- YOUNG A.S., G.K. KANHAY, D.A. STAGG, 1975. Phagocytosis of *Trypanosoma congolense* by circulating macrophages in African buffalo, Res. Vet. Sci., 19, 1: 108 – 110.



Таблица 1. Фенотипни и функционални характеристики на левкоцити на *Bubalus bubalus*.

Показатели	Стойности
<b>Общ брой левкоцити (<math>10^9/l</math>)</b>	9.95±0.92
<b>Неутрофилни левкоцити</b>	
%	38.50±1.13
общ брой ( $10^9/l$ )	3.6
Фагоцитарна активност:	
✓ % фагоцитоза	86.5
✓ Фагоцитарен индекс	6.3
✓ Фагоцитарно число	7.28
<b>Лимфоцити</b>	
%	54.50±1.53
Общ брой ( $10^9/l$ )	5.4
CD2 клетки:	
%	19.50 ± 1.88
Общ брой ( $10^9/l$ )	1.05
Ранни E-розеткообразуващи клетки:	
%	8.00 ± 1.13
Общ брой ( $10^9/l$ )	0.4
Плазматични клетки:	
%	1.00 ± 0.84
Общ брой ( $10^9/l$ )	0.99
Лимфобласти:	
%	1.00 ± 0.75
Общ брой ( $10^9/l$ )	0.99
<b>Моноцити</b>	
%	3.00 ± 1.25
Общ брой ( $10^9/l$ )	0.3
Фагоцитарна активност:	
✓ % фагоцитоза	82.0
✓ фагоциторен индекс	8.1
✓ Фагоцитарно число	9.87
Моноцитобласти:	
%	1.00
Общ брой ( $10^9/l$ )	0.99
<b>Еозинофили</b>	
%	1.00
Общ брой ( $10^9/l$ )	0.99
<b>Базофили</b>	
%	0.5 ± 0.37
Общ брой ( $10^9/l$ )	0.49

## PHENOTYPE AND FUNCTIONAL INVESTIGATION OF LEUCOCYTES OF INDIAN BUFFALO (*BUBALUS BUBALIS*)

*Atanas D. Arnaudov\**, *Krassimira K. Arnaudova\*\**

\* *Plovdiv University “P. Hilendarski”, Faculty of Biology, Department of Human Anatomy and Physiology, Tzar Assen 24, Plovdiv*

\*\* *Higer school “Agricultural College”, Dunav 78, Plovdiv*

(Summary)

It is well-known that the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) possesses high resistance to many infectious and parasitic diseases. However, there are not enough investigations on the material basis of this phenomenon – leucocytes, immunoglobulins, cytokines, etc.

The morphological, as well as some phenotypic and functional characteristics of the leucocytes of the Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*) that inhabit the vicinity of Plovdiv were investigated. The variables studied are: white blood cells count (WBC count), differential leukocyte count, the phagocytic activity of the neutrophils and the monocytes as well as the number and the functional activity of the CD2 cells.

It was found out that the WBC count in the peripheral blood of the animals is  $9.95 \times 10^9/l$ . White blood cell differential counts indicated predominantly lymphocytes, with mean proportion of 54.50%. 19.5% of the lymphocytes formed E-rosettes (respectively CD2 cells), and 8% formed active (early) E-rosettes.

Both types of leucocytes of the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) possess high functional activity – great degree of phagocyte activity of the neutrophils and the monocytes, active E-rosettes, presence of lymphoblasts, plasmatic cells and monocyto blasts. Possibly, this high physiological activity that has been established has a certain considerable role for the resistance of *Bubalus bubalis* towards various parasitic and infectious diseases.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Колективът изказва благодарност на Ася Д. Христозова, абсолвентка на Факултета по Биология на ПУ “П. Хилендарски” – Пловдив за оказаната техническа помощ при разработването на публикувания материал.