

CZU 636.2 : 612.017.11/.12

## IMPORTANȚA TESTULUI DE TRANSFORMARE LIMFOBLASTICĂ – INDICATOR AL IMUNITĂȚII CELULARE

*Rita GOLBAN**Universitatea Agrară de Stat din Moldova*

**Abstract.** This paper includes scientific research results related to the lymphoblastic transformation test (LTT) “in vitro” under the action of anticarcinogenic antigens and purified protein derivative, as a result of stimulation of lymphocytes which are central cells of the immune system. It was studied the mechanism of the stimulated lymphocytes blastization, which proliferates due to their mitosis and it was practically determined a cellular population, which corresponds numerically and functionally to an immune high quality answer. At the same time, it was stated that due to blast transformations, lymphocytes leave the stage of immunological inactivity and pass to the kinetic stage, being capable to produce specific effects, both on other cells they cooperate with and on the antigenic substrate, which causes immunological reactions. We have also observed activated macrophage changes after the re-vaccination in young animals with 15.5% of blasts, compared to the reference sample where stimulation indices were 3.5%. Modifications of the nonspecific blast are necessary to evaluate the functional capacity of lymphocytes.

**Key words:** Lymphoblastic transformation; Antigen; Lymphocyte; Clone; Cellular Immunity.

**Rezumat.** În lucrare sunt redată rezultatele investigațiilor științifice cu privire la efectuarea testului de transformare limfoblastică (LTT) „in vitro” sub acțiunea antigenilor anticarcinogeni și protein purified derivative, ca rezultat al stimulării limfocitelor, celule centrale ale sistemului imunitar. S-a studiat mecanismul blastizării limfocitelor stimulate care proliferază datorită mitozelor acestora și s-a determinat practic o populație celulară ce corespunde numeric și funcțional unui răspuns imun de un nivel înalt calitativ. De asemenea s-a constatat că, grație transformărilor blastice, limfocitele părăsesc starea de inactivitate imunologică și trec în starea cinetică, devenind capabile să producă efecte specifice atât asupra altor celule cu care cooperează, cât și asupra substratului antigenic declanșator al reacțiilor imunologice. Concomitent, s-au observat transformări macrofagale active după revaccinare la animalele mai tinere, cu 15,5% blaști, comparativ cu varianta martor, unde indicele de stimulare a constituit 3,5%. Modificările indicelui de blastizare nespecifică sunt semnificative pentru aprecierea capacității funcționale a limfocitelor.

**Cuvinte-cheie:** Transformare limfoblastică; Antigen; Limfocite; Clonă; Imunitate celulară.

### INTRODUCERE

Cercetările efectuate în domeniul imunologiei – știință de vârf a secolului nostru – au determinat o acumulare de noțiuni teoretice într-un ritm foarte rapid. În același timp, s-au făcut progrese importante în diagnostic, metodele imunologice introduse în ultimii ani fiind de mare acuratețe, motiv pentru care au pătruns tot mai mult în laboratorul clinic.

În concepția clasică se consideră că activarea funcției imunitare are un efect exclusiv benefic, protector pentru organism. Din aceste considerente sistemul imunitar este tolerant față de substanțele proprii, deoarece a învățat să le recunoască în timpul vieții embrionare, dar este dotat cu proprietatea de a recunoaște și de a diferenția prompt substanțele străine, față de care se activează și le îndepărtează din organism (Andrieș, L. et al. 2014; Gâjâilă, G. 2014; Siloși, I. 2014).

Baza celulară a răspunsului imun celular este reprezentată de limfocitele T și B. Răspunsul imun celular protejează organismele față de agresiunea fungilor, paraziților, virusurilor și bacteriilor cu localizare intracelulară. Limfocitele T, responsabile de imunitatea celulară, exprimă receptori care recunosc doar scurte secvențe peptidice din antigenele proteice (Andrieș, L., Olinescu, A. 1992; Gâjâilă, G. 2002; Siloși, I. 2013).

Mecanismele de reglare a răspunsului imun se bazează pe reacțiile imune, care sunt controlate de către sisteme de reglare de o complexitate cel puțin egală cu a celor care stau la baza declanșării și exprimării lor. În situația blocării mecanismelor reglatoare, proliferarea clonală sau sinteza de imunoglobuline nu mai poate fi limitată, ajungându-se la alterarea profundă a răspunsului imun, însoțită de instalarea și evoluția unor boli care, de regulă, au un sfârșit letal. Totodată factorii care intervin în imunoreglare sunt foarte numeroși. Unii dintre aceștia se corelează cu antigenul, cu tipul și cantitatea anticorpilor (Tașbac, A. 2014).

Testul de transformare limfoblastică (LTT) a fost validat în Europa și este folosit cu aplicații în

determinarea imunității la animalele intacte și vaccinate în diagnosticul agenților infecțioși, alergii medicamentoase, alimentare etc. Testul se bazează pe principiul diviziunii celulare limfocitare induse de contactul cu antigenul specific.

O reacție pozitivă la LTT demonstrează existența limfocitelor antigen specifice (celule cu memorie) în sângele animalului. LTT oferă informații utile privind capacitatea funcțională a limfocitelor T, prin evaluarea răspunsurilor proliferative „in vitro” ale acestor celule la diferiți stimuli.

Din acest considerent, scopul cercetărilor a fost de a studia utilizarea cu perspectivă a testului de transformare limfoblastică pentru determinarea imunității la animalele intacte și vaccinate.

### MATERIAL ȘI METODĂ

Testul de transformare limfoblastică la bovinele intacte și vaccinate anticarbunos a fost efectuat cu antigenul PPD (protein purified derivative) extras din *Mycobacterium tuberculosis*. Indicele de transformare limfoblastică a fost determinat în culturi celulare limfocitare, cultivate în termostat la temperatura de 37 °C. Au fost recoltate, steril, probe de sânge din vena jugulară (10-15ml), pe heparină, de la bovine. Probele de sânge au fost lăsate pe 5-6 ore la temperatura camerei în poziție înclinată. Ulterior s-a separat plasma sanguină, după care au fost separate limfocitele vizualizate sub forma unui inel de culoare albă la hotarul stratului eritocitar și plasmei sangvine din eprubetă.

Plasma limfocitară a fost recoltată cu pipeta Pasteur în eprubete sterile de centrifugat, ulterior fiind centrifugate pe parcursul a 5 minute la 1000 rot./min. Stratul supernatant a fost înlăturat. Precipitantul a fost completat cu Mediul 199, efectuând resuspendarea limfocitelor de trei ori. Suspensia limfocitară, obținută în volum de 3,0 ml, a fost repartizată, câte 1,0 ml, în trei eprubete de centrifugat cu M-199, fiind amestecată cu suspensii antibiotice: penicilină, streptomycină, nistatină pH=7,2-7,4.

Conținutul primei eprubete a fost constituit din antigen anticarbunos, al eprubetei a doua – din antigen PPD, iar conținutul celei de a treia eprubete a servit drept martor. Eprubetele au fost termostatare la 37 °C, timp de 120 de ore, după care au fost centrifugate pe parcursul a 5 min la 1000 rot/min. Din sediment au fost prelevate frotiuri, fixate cu metanol și colorate prin metoda Romanovschii-Giemsa.

Indicele de transformare limfoblastică a fost determinat prin microscopie cu imersie. După numărarea a 200 celule limfocite și macrofage s-a exprimat procentual numărul de celule blastice și de limfocite netransformate. Numărarea celulelor a fost vizualizată pe trei câmpuri de microscopie, unde celulele au fost studiate izolat, cu structuri caracteristice bine exprimate.

### REZULTATE ȘI DISCUȚII

Investigarea funcțională a limfocitelor reprezentată de testul de transformare limfoblastică (testul de blastogeneză, diferențiere blastică) apreciază capacitatea acestor celule de a reacționa prompt și intens sub influența unor stimuli mitogeni (inductori de mitoză) - antigenici sau neantigenici.

Limfocitele sunt considerate a fi unicele celule care pot reveni într-un stadiu precedent al dezvoltării, adică din limfocite să redevină limfoblaști. Procesul de blastizare se derulează „in vivo”, dar poate fi reprodus și „in vitro”(Fig. 1).

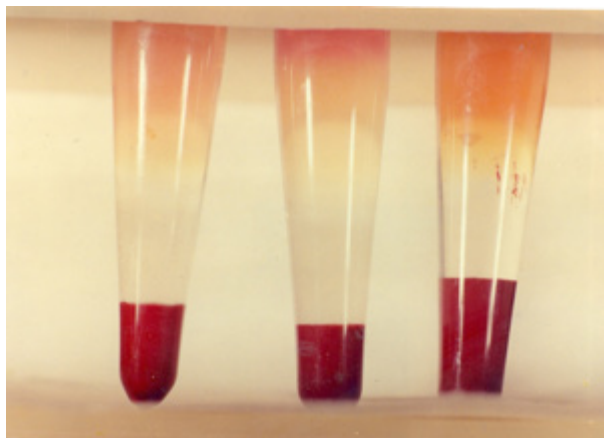


Figura 1. Separarea stratului limfocitar

Declanșarea transformării limfoblastice reprezintă rezultatul stimulării limfocitelor din structuri mitogene. Prin urmare, această inducție blastogenetică poate fi de tip specific sau nespecific.

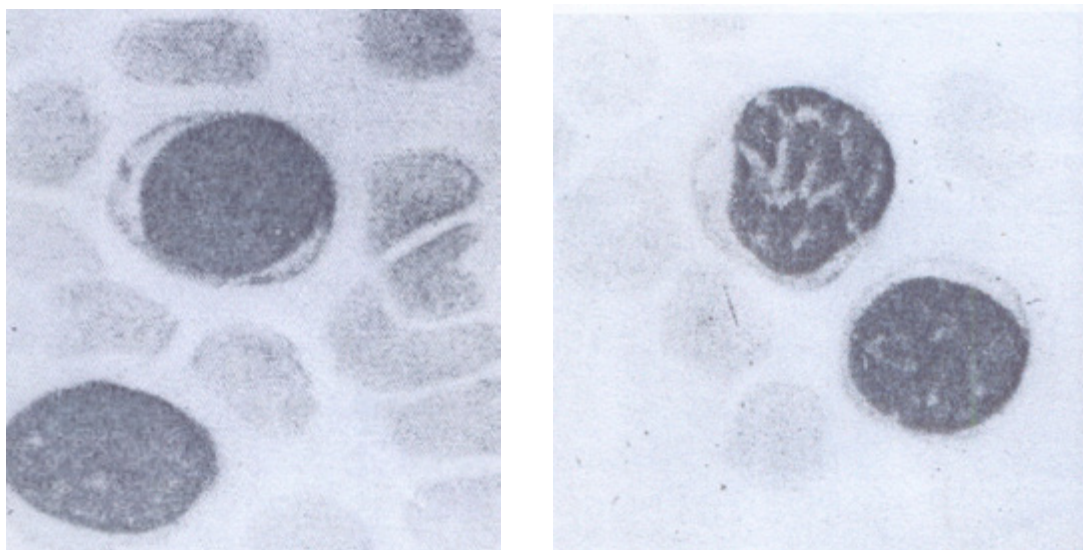
În rezultatul cercetărilor efectuate, pe preparatele colorate au fost determinate transformările macrofagale ale limfocitelor. Sub acțiunea agentului specific PPD s-a determinat stimularea limfocitelor provenite de la animalele presensibilizate care determină mecanismul stimulării selective a unei anumite clone de limfocite care recunoaște antigenul și, ulterior, limfocitele alogene într-o cultură mixtă de limfocite.

Intensitatea stimulării limfocitelor a fost evaluată prin determinarea procentuală a blaștilor din populație, procedeu cunoscut sub denumirea de metodă morfologică de evaluare a transformării blastice.

În rezultatul experienței s-au determinat transformări macrofagale active după revaccinare la animalele mai tinere, cu 15,5% blaști, comparativ cu varianta martor, unde indicele de stimulare a constituit 3,5%. Indicele de stimulare este considerat pozitiv când valoarea sa constituie 3. Modificările indicelui de blastizare nespecifică reprezintă semnificație evidentă pentru aprecierea capacității funcționale a limfocitelor.

Astfel, scăderea indicelui de stimulare este interpretată ca un indiciu al unui imunodeficit celular, sugerând reducerea capacității de răspuns. Indicii foarte înalți se traduc prin existența unui proces reactiv în plină evoluție din partea unor clone de limfocite cu funcționalitate normală.

Procesul de transformare a limfocitelor în celule macrofage a fost determinat prin mărirea nucleului și citoplasmei celulelor. Procentul majoritar al macrofagelor la această etapă de cultivare are o activitate fagocitară redusă. Prin urmare, în rezultatul vizualizării preparatelor, s-au observat celule macrofage tinere fără vacuole, cu bazofilie în citoplasmă și conturul bine determinat al nucleului (Fig. 2).



**Figura 2.** Transformarea limfoblastică

Transformarea limfoblastică a fost studiată la animalele intacte și imunizate în scopul determinării intensității procesului imunologic celular. În rezultatul investigațiilor efectuate s-a constatat că transformarea limfoblastică în sângele animalelor imunizate anticarbunos s-a mărit de aproximativ 3 ori în comparație cu martorul, ceea ce denotă un înalt nivel de sintetizare a anticorpilor. Investigarea animalelor mai în vârstă sub acțiunea PPD a determinat transformarea limfoblastică în sângele acestora cu un procent neînsemnat de formare a blastelor.

Aceste observații ne permit să afirmăm că metoda cultivării limfocitelor din sânge pe mediul 199 cu 15% ser taurin și antibiotice în combinație cu antigen anticarbunos și antigen PPD, poate fi folosită pentru interpretarea testului de transformare limfoblastică și, în special, în interpretarea specificității antigen independente a transformării limfoblastice.

## CONCLUZII

Blastogeneza limfocitară este un fenomen metabolic complex, grație caruia limfocitele se modifică morfologic și comportamental, fapt care le permite să participe la realizarea răspunsului imun. Din populația inițială a limfocitelor doar o parte se transformă blastice, și anume acele limfocite care dețin receptori de membrană corespunzători epitopilor antigenici, declanșatori de reacție imunitară.

Modificările indicelui de transformare limfoblastică la animalele imunizate, comparativ cu animalele intacte, a demonstrat un nivel înalt de sinteză al anticorpilor.

S-au constatat transformări macrofagale active după revaccinare la animalele mai tinere care au constituit 15,5% blaști, comparativ cu varianta martor, la care indicele de stimulare a constituit 3,5%. Modificările indicelui de blastizare nespecifică este semnificativ pentru aprecierea capacității funcționale a limfocitelor.

Testul de transformare limfoblastică poate fi folosit cu succes la interpretarea caracteristicilor statusului imunologic și specificității restructurării imunologice.

#### REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. ANDRIEȘ, L. (2014). *Imunologie clinică*. Chișinău. 556 p. ISBN 978-9975-53-383-6.
2. ANDRIEȘ, L., OLINESCU, A. (1992). *Compendiu de imunologie fundamentală*. Chișinău: Știința. 476 p.
3. GĂJĂILĂ, G. (2003). *Sistemul imunitar la suine*. București: Cartea Universitară. 131 p. ISBN 973-86231-7-0.
4. GĂJĂILĂ, G. (2002). *Imunologia analitică. Aspecte fundamentale și metodologice*. București: Printech. 224 p. ISBN 973-652-583-X.
5. SILOȘI, I. (2014). *Imunologie*. Craiova: SITECH. 266 p. ISBN 978-606-11-3717-6.
6. SILOȘI, I. (2013). *Investigațiile de laborator în imunologie clinică*. Craiova: Ed. Medicală Universitară. 241 p.
7. TAȘBAC, A. (2014). *Îndrumar pentru laboratorul de imunologie veterinară*. Ed. a 2-a, rev. și adăug. București: Larisa Câmpulung Muscel. 170 p. ISBN 978-606-715-271-5.

Data prezentării articolului: 05.05.2015

Data acceptării articolului: 12.08.2015