

# Ocena subpopulacji limfocytów TCD4<sup>+</sup> i TCD8<sup>+</sup> oraz aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów w krwi obwodowej krów i jałówek w okresie okołoporodowym<sup>\*</sup>)

LESZEK KRAKOWSKI, ZYGMUNT WRONA, KRZYSZTOF KOSTRO<sup>\*</sup>,  
IZABELA KRAKOWSKA<sup>\*\*</sup>, ARTUR KOSTRZEWA<sup>\*\*\*</sup>, TOMASZ PIECH, PIOTR BRODZKI

Zakład Andrologii i Biotechnologii Rozrodu Katedry i Kliniki Rozrodu Zwierząt,

<sup>\*</sup>Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

<sup>\*\*</sup>Katedra Anatomii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 13, 20-030 Lublin

<sup>\*\*\*</sup>Katedra Biologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk o Zdrowiu AM, ul. Długa 12, 61-848 Poznań

Krakowski L., Wrona Z., Kostro K., Krakowska I., Kostrzeva A., Piech T., Brodzki P.

## Analysis of subpopulations of TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> lymphocytes and the activity of phagocytes by neutrophils and monocytes in the peripheral blood of cows and heifers during the periparturient period

### Summary

Study examined the immunological profile and the effects of post-parturient disorders in cows and heifers during the last trimester of gestation and 2<sup>nd</sup> week following parturition. It determined the types of lymphocytes, including CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>, as well as the phagocyte activity of neutrophils and monocytes by using flow cytometry. A strict correlation was found between the phagocyte activity of PMNs and MNs and the total percent of Lymphocytes, monocytes and neutrophils both in pregnant females and in females with post-parturient disorders. The percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> and the relation between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> differed at gestation and the post-parturient period. Analyzing the phagocyte activity of PMNs and MNs and the immunomorphology of peripheral blood leukocytes in pregnant cows and heifers may be useful for prognosing the development of post-parturient disorders.

**Keywords:** cattle, immunity, polymorph nuclear leukocytes, flow cytometry, pregnancy, post-parturient period

Rola układu immunologicznego w stanach fizjologicznych i patologii schorzeń okresu okołoporodowego u bydła jest przedmiotem intensywnych badań. Wykazano istotną zależność pomiędzy aktywnością komórek układu odpornościowego a występowaniem zaburzeń w przebiegu ciąży i okresu okołoporodowego (3, 4, 6, 11, 17). Skuteczność zapobiegania tym schorzeniom zależy w dużym stopniu od właściwego monitoringu stanu czynnościowego układu immunologicznego, ponieważ stała jego kontrola umożliwia wczesne wykrycie zaburzeń homeostazy organizmu oraz podjęcie szybkiej interwencji w celu jej przywrócenia (3, 6). Jednym z kryteriów oceny przebiegu ciąży i okresu okołoporodowego u bydła jest analiza immunomorfologiczna i czynnościowa komórek układu immunologicznego. W tym celu wykorzystuje się obecnie metodę cytometrii przepływowej, która umożliwia zarówno jakościową, jak i ilościową ocenę cech morfologicznych i biologicznych leukocytów krwi obwodowej (13, 19).

Prawidłowy rozwój ciąży warunkuje właściwy profil immunologiczny, który w dużej mierze decyduje o jej przebiegu. Może on również odzwierciedlać wszelkie zaburzenia homeostazy, które prowadzić mogą do patologii ciąży, porodu i okresu poporodowego (3, 9, 17). Limfocyty T są aktywowane już w pierwszym trymes-

trze ciąży pod wpływem stymulacji antygenów płodowych, z tym że w prawidłowym jej przebiegu zachowana zostaje zarówno odpowiednia ich liczba, jak i właściwy stosunek TCD4<sup>+</sup> do TCD8<sup>+</sup>. Niewłaściwa proporcja tych dwóch subpopulacji komórek na korzyść limfocytów CD4<sup>+</sup> prowadzi do zmiany profilu immunologicznego w kierunku komórek Th1. Efektem tego jest nasilenie komórkowej odpowiedzi immunologicznej, co może być przyczyną wczesnych lub późnych ronień oraz zaburzeń okresu poporodowego (3). Natomiast wzrost odsetka limfocytów CD8<sup>+</sup> w stosunku do CD4<sup>+</sup> świadczy o występowaniu w czasie ciąży supresji komórkowej odpowiedzi immunologicznej uwarunkowanej dominacją limfocytów Th2, które wzmagają humoralną odpowiedź immunologiczną, korzystną dla implantacji zarodka, rozwoju łożyska i płodu (17). Stąd też uważa się, że pomyślny przebieg ciąży jest fenomenem limfocytów Th2. Oprócz właściwości supresorowych limfocyty CD8<sup>+</sup> wykazują działanie cytotoksyczne. Ich główna rola to niszczenie komórek zakażonych przez wirusy i inne mikroorganizmy. Ważną rolę w przebiegu ciąży pełnią również nieswoiste mechanizmy odporności humoralnej i komórkowej. W wyniku ich zaburzeń czynnościowych układ rozrodczy staje się bardziej podatny na rozwój infekcji, które są jedną z istotnych przyczyn zaburzeń w reprodukcji (11).

<sup>\*</sup>) Badania finansowane w ramach grantu KBN 6 PO6K 01120.

Celem badań było określenie przydatności oznaczania subpopulacji limfocytów TCD4<sup>+</sup> i TCD8<sup>+</sup> oraz aktywności fagocytarnej komórek polimorfonuklearnych (PMN) i mononuklearnych (MN) w krwi obwodowej krów i jałówek w ostatnim trymestrze ciąży w prognozowaniu wystąpienia zaburzeń w okresie okołoporodowym.

### Materiał i metody

Badania wykonano w okresie wiosenno-letnim w gospodarstwie specjalistycznym o profilu hodowli bydła mlecznego. Do badań użyto 20 klinicznie zdrowych krów wieloródek (3.-4. ciąża) rasy cb w wieku 5-6 lat oraz 20 jałówek tej samej rasy w wieku 22-24 miesięcy, będących w 256. dniu ciąży. Analogiczny czas trwania ciąży uzyskano dzięki uprzedniej synchronizacji rui i owulacji. Grupę porównawczą stanowiło 10 krów i 10 jałówek nieciążarnych w tym samym wieku, które przebywały w takich samych warunkach utrzymania. Użyte do badań zwierzęta były wolne od białaczki, brucelozy i gruźlicy. Warunki żywieniowe i zoohigieniczne nie budziły większych zastrzeżeń. Po wycieleniu się krów i jałówek zwierzęta podzielono na dodatkowe dwie grupy. Krowy i pierwiastki z prawidłowym porodem i odejściem błon płodowych (grupa A) oraz krowy i pierwiastki, u których doszło do zaburzeń w ostatniej fazie porodu (zatrzymanie łożyska – grupa B). Zatrzymanie łożyska traktowano po upływie 12 godzin po wycieleniu. Krew do analizy cytometrycznej w ilości 2 ml pobierano od krów i jałówek z żyły szyjnej zewnętrznej do jałowych probówek silikonowanych (Vacuette Greiner Labortechnik GmbH, Austria) z dodatkiem heparyny wolnej od środków konserwujących (14 j/ml) w 256. dniu trwania ciąży oraz 14 dni po porodzie. Próbkę krwi dostarczano do laboratorium w ciągu 1 godziny od momentu jej pobrania.

Ocenę liczby i składu leukocytów z uwzględnieniem subpopulacji limfocytów T oraz aktywności fagocytarnej komórek krwi obwodowej wykonano metodą cytometrii przepływowej przy użyciu aparatu Cytron Absolute-Ortho Diagnostic System, Germany. Do identyfikacji subpopulacji limfocytów T użyto przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciwko kompleksom różnicującym leukocyty bydłce, komercyjny zestaw Serotec: anty CD4 (T-helper, CC8, izotyp IgG2a, znakowane FITC) i CD8 (T-cytotoxic/supresor, CC63, izotyp IgG2a, znakowane FITC), CD3 firmy Serotec Immunological Excellence Oxford, England). Jako kontroli negatywnej użyto przeciwciał skierowanych przeciwko Mouse IgG<sub>1</sub> i IgG2a znakowanych FITC. Do 50 µl pełnej krwi dodano 10 µl przeciwciał anty-CD4 lub CD8 i inkubowa-

no przez 45 min. w temperaturze pokojowej. Następnie do mieszaniny inkubacyjnej dodano 700 µl płynu lizującego i ponownie inkubowano przez 20 min. w warunkach pokojowych. Po zakończeniu inkubacji próbki poddano analizie cytometrycznej.

Zdolność pochłaniania bakterii przez granulocyty i monocyty określono przy użyciu komercyjnego zestawu Phagotest (Orpegen Pharma, Heidelberg, F.R.G) zawierającego opsonizowane i znakowane FITC bakterie *Escherichia coli*. Do jałowych probówek wlewano 20 µl pełnej heparynizowanej krwi, schłodzonej przez 10 min. w temperaturze 0°C i mieszano z równą objętością (20 µl) zawiesiny bakterii *Escherichia coli*. Testowane hodowle inkubowano przez 20 min. w temp. 37°C, natomiast próbki kontrolne w łaźni lodowej (20 min. w 0°C). Po inkubacji badane próbki umieszczano w łaźni lodowej i po dodaniu do każdej 100 µl zimnego płynu Quenching dokładnie mieszano przez 2 min. w temp. 25°C. Dalej dodano do każdej próbki po 3 ml zimnego płynu płuczącego (Washing) i wirowano przy 250 g przez 5 minut w temperaturze 4°C. Następnie do wszystkich próbek dodano 700 µl płynu lizującego i inkubowano przez 10 min. w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji próbki poddano analizie cytometrycznej.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej testem t-Studenta, określając średnią, odchylenie standardowe oraz istotność różnic na poziomie  $p \leq 0,05$  i  $p \leq 0,01$ .

### Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki badań dotyczą oceny profilu immunologicznego u krów i jałówek w ostatnim trymestrze ciąży i po porodzie. Stwierdzono istotne zależności pomiędzy kształtowaniem się badanych wskaźników immunologicznych u ciężarnych krów i jałówek a występowaniem zaburzeń poporodowych. Wyniki średnich wartości leukocytów, limfocytów oraz komórek PMN i MN, a także subpopulacji limfocytów CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> w krwi obwodowej krów i jałówek z prawidłowym przebiegiem porodu i odejściem błon płodowych oraz z zatrzymaniem łożyska ilustruje tab. 1 i 2. Stwierdzono wyraźne różnice w wartościach analizowanych wskaź-

**Tab. 1. Odsetek komórek PMN i MN oraz limfocytów CD4 i CD8 w 256. dniu ciąży u krów bez i z zatrzymaniem łożyska ( $\bar{x} \pm s$ )**

Zwierzęta	WBC/ $\mu$ l	Limfocyty %	Monocyty %	Neutrofile %	CD4 %	CD8 %	CD4/CD8
<sup>a</sup> Krowy (n = 14)	7786 $\pm$ 767	53,9 $\pm$ 6,03	7,3 $\pm$ 2,12	38,7 $\pm$ 6,1	38,0 $\pm$ 3,61	16,7 $\pm$ 4,92	2,3 $\pm$ 0,7
<sup>b</sup> Krowy (n = 6)	8615 $\pm$ 1911	*38,3 $\pm$ 5,17 <sup>k</sup>	7,4 $\pm$ 2,91	*54,4 $\pm$ 4,04 <sup>k</sup>	*43,4 $\pm$ 5,39	15,1 $\pm$ 0,65	*2,9 $\pm$ 0,20 <sup>k</sup>
<sup>c</sup> Kontrola (n = 10)	7320 $\pm$ 1296	58,4 $\pm$ 7,1	6,7 $\pm$ 1,04	31,9 $\pm$ 4,02	31,6 $\pm$ 3,24	13,4 $\pm$ 3,11	2,4 $\pm$ 0,25

Objaśnienia: a – krowy, u których samoistnie odeszło łożysko; b – krowy z zatrzymaniem łożyska; c – krowy nieciążarne; \* – istotność różnic na poziomie  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$  pomiędzy krowami grupy a i b; k – istotność różnic na poziomie  $p \leq 0,05$ ; kk –  $p \leq 0,01$  w porównaniu z kontrolą

**Tab. 2. Odsetek komórek PMN i MN oraz limfocytów CD4 i CD8 w 256. dniu ciąży u jałówek bez i z zatrzymaniem łożyska ( $\bar{x} \pm s$ )**

Zwierzęta	WBC/ $\mu$ l	Limfocyty %	Monocyty %	Neutrofile %	CD4 %	CD8 %	CD4/CD8
<sup>a</sup> Jałówki (n = 14)	9816 $\pm$ 3330	48,6 $\pm$ 6,03	<sup>k</sup> 7,9 $\pm$ 1,45	<sup>kk</sup> 43,5 $\pm$ 6,16	<sup>k</sup> 37,9 $\pm$ 7,58	17,5 $\pm$ 4,92	2,2 $\pm$ 0,43
<sup>b</sup> Jałówki (n = 6)	8366 $\pm$ 932	**38,0 $\pm$ 3,27	**9,9 $\pm$ 1,08	**52,1 $\pm$ 3,51 <sup>kk</sup>	*42,7 $\pm$ 7,25 <sup>k</sup>	15,4 $\pm$ 2,30	**2,8 $\pm$ 0,25 <sup>k</sup>
<sup>c</sup> Kontrola (n = 10)	11660 $\pm$ 1996	55,2 $\pm$ 4,95	11,6 $\pm$ 2,48	33,1 $\pm$ 7,13	28,0 $\pm$ 6,45	15,3 $\pm$ 3,44	1,9 $\pm$ 0,69

Objaśnienia jak w tab. 1.

Tab. 3. Cytometryczna analiza aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów krwi obwodowej w 256. dniu ciąży u krów z prawidłowym porodem i odejściem błon płodowych oraz z zatrzymaniem łożyska ( $\bar{x} \pm s$ )

Zwierzęta	Aktywność fagocytarna granulocytów			Aktywność fagocytarna monocytów		
	% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica	% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica
<sup>a</sup> Krowy (n = 14)	38,1 ± 12,4	77,3 ± 24,2	48,6 ± 17,6	17,9 ± 3,41	47,1 ± 6,71	15,4 ± 6,8
<sup>b</sup> Krowy (n = 6)	*33,8 ± 25,8	73,2 ± 35,8	41,6 ± 28,9	*16,6 ± 4,0	42,7 ± 4,80	9,2 ± 8,20
<sup>c</sup> Kontrola (n = 10)	33,0 ± 12,5	62,4 ± 16,3	41,5 ± 16,7	22,3 ± 9,2	49,5 ± 11,7	31,7 ± 11,7

Objaśnienia jak w tab. 1.

Tab. 4. Cytometryczna analiza aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów krwi obwodowej u jałówek w 256. dniu ciąży z prawidłowym przebiegiem porodu i odejściem błon płodowych i z zatrzymaniem łożyska ( $\bar{x} \pm s$ )

Zwierzęta	Aktywność fagocytarna granulocytów			Aktywność fagocytarna monocytów		
	% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica	% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica
<sup>a</sup> Jałówki (n = 14)	50,0 ± 7,2	89,1 ± 17,4	68,2 ± 7,4	22,6 ± 10,9	54,0 ± 13,9	18,4 ± 9,7
<sup>b</sup> Jałówki (n = 6)	**75,7 ± 9,5	**106,4 ± 19,1	65,6 ± 9,3	**62,9 ± 14,9	**97,2 ± 9,9	51,0 ± 27,4
<sup>c</sup> Kontrola (n = 10)	53,6 ± 13,1	81,5 ± 20,6	68,0 ± 20,4	31,5 ± 11,1	58,1 ± 14,5	41,9 ± 15,9

Objaśnienia jak w tab. 1.

ników immunologicznych pomiędzy krowami i jałówkami z prawidłowym przebiegiem porodu a samicami z zatrzymaniem łożyska. U krów z zatrzymaniem łożyska, w porównaniu z krowami, u których błony płodowe odeszły samoistnie, wystąpił statystycznie istotny spadek ogólnej liczby limfocytów, natomiast wzrósł odsetek neutrofilów, limfocytów CD4<sup>+</sup> oraz stosunek CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (tab. 1). Również u ciężarnych jałówek, u których po porodzie doszło do zatrzymania łożyska stwierdzono statystycznie istotne różnice ocenianych wskaźników w porównaniu z jałówkami z prawidłowym odejściem łożyska (tab. 2). Ponadto u jałówek z zatrzymaniem łożyska dodatkowo stwierdzono istotny wzrost odsetka monocytów (tab. 1, 2).

i monocyty) był statystycznie wyższy w porównaniu z jałówkami bez zatrzymania łożyska i jałówkami nieciążnymi (tab. 4). Znalazło to odzwierciedlenie również w znacznie wyższym średnim kanale fluorescencji. Porównując aktywność fagocytną neutrofilów i monocytów krwi ciężarnych krów i jałówek wykazano, że odsetek komórek pobudzonych oraz średni kanał fluorescencji był istotnie wyższy u jałówek we wszystkich badanych grupach w porównaniu z krowami (tab. 3 i 4).

Tabele 5 i 6 ilustrują procentowy skład populacji leukocytów oraz odsetek limfocytów CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> w krwi obwodowej krów i pierworódek w drugim tygodniu po porodzie. Z danych zawartych w tab. 5 wynika, że u krów z zatrzymaniem łożyska notowano istotnie niższy od-

Tab. 5. Odsetek i bezwzględny udział komórek PMN i MN oraz subpopulacji limfocytów CD4 i CD8 w drugim tygodniu po porodzie u krów bez i z zatrzymaniem łożyska ( $\bar{x} \pm s$ )

2 tyg. po porodzie	WBC/ $\mu$ l	Limfocyty %	Monocyty %	Neutrofile %	CD4 %	CD8 %	CD4/CD8
<sup>a</sup> Krowy z zatrzymaniem łożyska (n = 6)	8270 ± 1906	<sup>kk</sup> 33,9 ± 7,77	<sup>kg</sup> 9,0 ± 1,99	<sup>kk</sup> 57,1 ± 9,78	<sup>kk</sup> 40,0 ± 10,9	17,9 ± 4,30	2,2 ± 0,35
<sup>b</sup> Krowy, u których odeszło łożysko (n = 14)	7508 ± 724	**41,4 ± 6,70	**11,2 ± 2,35	*49,4 ± 6,67	<sup>kk</sup> 42,6 ± 4,67	17,1 ± 2,04	2,5 ± 0,50
<sup>c</sup> Krowy nieciążarne (n = 10)	7320 ± 1296,7	58,4 ± 7,10	6,7 ± 1,04	31,0 ± 4,02	31,6 ± 3,24	13,4 ± 3,11	2,4 ± 0,25

Objaśnienia jak w tab. 1.

Tab. 6. Odsetek i bezwzględny udział komórek PMN i MN oraz subpopulacji limfocytów CD4 i CD8 w drugim tygodniu po porodzie u pierwiastek bez i z zatrzymaniem łożyska ( $\bar{x} \pm s$ )

2 tyg. po porodzie	WBC/ $\mu$ l	Limfocyty %	Monocyty %	Neutrofile %	CD4 %	CD8 %	CD4/CD8
<sup>a</sup> Pierwiastki, u których wystąpiło zatrzymanie łożyska (n = 6)	10410 ± 2380	<sup>kk</sup> 36,4 ± 12,2	*12,0 ± 2,02	**51,7 ± 11,9 <sup>kk</sup>	<sup>kk</sup> 44,0 ± 9,90	17,8 ± 5,23	2,5 ± 0,70
<sup>b</sup> Pierwiastki z prawidłowym odejściem łożyska (n = 14)	**7568 ± 2322	**45,9 ± 8,12	11,3 ± 2,81	<sup>k</sup> 42,7 ± 8,56	<sup>kk</sup> 45,0 ± 5,14	17,7 ± 2,60	2,5 ± 0,56
<sup>c</sup> Kontrola (n = 10)	11660 ± 1996	55,2 ± 4,95	11,6 ± 2,48	33,1 ± 7,13	28,0 ± 6,45	15,3 ± 3,44	*1,9 ± 0,69

Objaśnienia jak w tab. 1.

Cytometryczną analizę aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów w krwi obwodowej krów i jałówek w ostatnim trymestrze ciąży przedstawiono w tab. 3 i 4. U krów z zatrzymaniem błon płodowych odsetek neutrofilów i monocytów pobudzonych *E. coli* był istotnie niższy niż u krów, u których nastąpiło samoistne odejście łożyska. Wartości te były jednak statystycznie wyższe w obu grupach krów w stosunku do krów nieciążarnych. Widoczna była także różnica w średnim kanale fluorescencji (tab. 3). Oceniając natomiast aktywność fagocytną neutrofilów i monocytów u ciężarnych jałówek stwierdzono, że u zwierząt, które zatrzymały błony płodowe, odsetek komórek pobudzonych *E. coli* (neutrofile

tek ogólnej liczby limfocytów i wzrost odsetka neutrofilów w porównaniu z krowami z samodzielnym odejściem łożyska. Natomiast porównując średnie wartości ocenianych parametrów u krów z zatrzymaniem oraz samodzielnym odejściem łożyska

w stosunku do krów nieciążarnych stwierdzono, że u tych ostatnich występował istotnie wyższy odsetek limfocytów, zaś niższy monocytów, neutrofilów i limfocytów CD4<sup>+</sup>.

Charakterystykę populacji leukocytów i limfocytów u pierwiastek w 2. tygodniu po porodzie ilustruje tab. 6. Wynika z niej, że u pierwiastek z zatrzymaniem łożyska wystąpił istotny wzrost ogólnej liczby leukocytów oraz neutrofilów i monocytów, przy jednoczesnym spadku odsetka limfocytów w porównaniu z pierwiastkami z samodzielnym odejściem łożyska oraz jałówkami nieciążarnymi. Odsetek limfocytów CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> i wzajemny ich stosunek był podobny w grupach samic po porodzie, natomiast był on istotnie wyższy w stosunku do samic nieciążarnych.

Aktywność fagocytarną komórek PMN w 2. tygodniu po porodzie przedstawiono w tab. 7 i 8. Z uzyskanych danych wynika, że zarówno u krów, jak i pierwiastek, u których wystąpiło zatrzymanie łożyska oraz w grupie, gdzie łożysko odeszło samoistnie aktywność fagocytarna neutrofilów i monocytów znacznie wzrosła i wynosiła kolejno u krów 63,6% i 68,4% dla neutrofilów oraz 33,7% i 45,1% dla monocytów. Natomiast u pierwiastek aktywność ta była istotnie wyższa niż u krów i wynosiła 72,5% i 82,2% dla neutrofilów oraz 68% i 73,9% dla monocytów. Natomiast w grupach krów i jałówek nieciążarnych procent komórek pobudzonych był statystycznie niższy.

Wielkość i nasilenie odpowiedzi immunologicznej u krów warunkuje przede wszystkim wiek samicy (pierwiastka, wieloródka) oraz stan fizjologiczny układu rozrodczego: faza cyklu jajnikowego, ciąża, okres poporodowy (7, 8, 12, 15, 16, 21, 22). Występowanie zmian związanych z ciążą i okresem poporodowym zależy w dużym stopniu od sprawności naturalnych mechanizmów obronnych samicy. Pomyślny przebieg ciąży warunkuje

Tab. 7. Cytometryczna analiza aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów krwi obwodowej w drugim tygodniu po porodzie u krów bez i z zatrzymaniem błon płodowych ( $\bar{x} \pm s$ )

2 tyg. po porodzie	Aktywność fagocytarna neutrofilów			Aktywność fagocytarna monocytów		
	% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica	% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica
<sup>a</sup> Krowy z zatrzymaniem łożyska (n = 6)	63,6 ± 5,42	108,6 ± 21,1	93,0 ± 21,3	33,7 ± 7,33 <sup>kk</sup>	61,7 ± 7,50	42,0 ± 5,0
<sup>b</sup> Krowy, u których samoistnie odeszło łożysko (n = 14)	68,4 ± 15,8	100,2 ± 25,2	84,7 ± 24,9	**45,1 ± 11,5 <sup>kk</sup>	74,2 ± 13,9	55,0 ± 18,2
<sup>c</sup> Kontrola – krowy nieciążarne (n = 10)	<sup>kk</sup> 33,0 ± 12,5	<sup>kk</sup> 62,4 ± 16,3	<sup>kk</sup> 41,5 ± 16,7	22,3 ± 9,2	<sup>kk</sup> 49,5 ± 11,7	<sup>kk</sup> 31,7 ± 10,1

Objaśnienia jak w tab. 1.

Tab. 8. Cytometryczna analiza aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów krwi obwodowej w drugim tygodniu po porodzie u pierwiastek bez i z zatrzymaniem błon płodowych ( $\bar{x} \pm s$ )

2 tyg. po porodzie	Aktywność fagocytarna neutrofilów			Aktywność fagocytarna monocytów		
	% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica	% komórek pobudzonych	średni kanał fluorescencji	różnica
<sup>a</sup> Pierwiastki z zatrzymaniem łożyska (n = 6)	82,2 ± 9,3	159,2 ± 12,5	110,4 ± 22,6	68,0 ± 10,6	133,6 ± 15,6	84,6 ± 17,8
<sup>b</sup> Pierwiastki z prawidłowym odejściem łożyska (n = 14)	*72,5 ± 11,5	148,6 ± 12,7	110,0 ± 15,0	*73,9 ± 12,6	*112,4 ± 13,5	79,6 ± 18,6
<sup>c</sup> Kontrola – jałóвки nieciążarne (n = 10)	<sup>kk</sup> 53,6 ± 13,1	<sup>kk</sup> 81,5 ± 20,6	<sup>kk</sup> 68,0 ± 20,4	<sup>kk</sup> 31,5 ± 11,1	<sup>kk</sup> 58,1 ± 14,5	<sup>kk</sup> 41,9 ± 15,9

Objaśnienia jak w tab. 1.

stan względnego kompromisu immunologicznego. Stąd też prowadzenie właściwego monitoringu stanu czynnościowego komórek układu immunologicznego stwarza możliwość wczesnej diagnozy zaburzeń związanych z przebiegiem ciąży oraz prognozowanie wystąpienia powikłań poporodowych. Centralną rolę w regulacji mechanizmów immunologicznych odgrywiają limfocyty Th (CD4<sup>+</sup>, które wraz z komórkami posiadającymi antygeny MHC klasy II określają epitopy stanowiące cel odpowiedzi immunologicznej (10). Subpopulacja komórek ThCD4<sup>+</sup> obejmuje dwie różniące się pod względem czynnościowym podgrupy Th1 i Th2. Istotną rolę w tym procesie pełnią również limfocyty o fenotypie CD8<sup>+</sup> (18, 23). Uzyskując tolerancję płodu i zapobiegając immunologicznemu odrzuceniu, endometrium macicy utrzymuje stałą i właściwą proporcję limfocytów CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. Kiedy proporcja ta zostaje załamana na korzyść limfocytów CD4<sup>+</sup>, ciąża staje się zagrożona.

Potwierdzają to wyniki badań własnych, w których wykazano, że u samic z prawidłowym przebiegiem ciąży stosunek CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> w ostatnim jej trymestrze wynosił 2,2 u krów i 2,3 u jałówek. Natomiast różnią się one od wyników uzyskanych przez Meiroma i wsp. (14) i Zhijiana i wsp. (24), którzy podają że stosunek CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> u krów ciężarnych w ostatnim trymestrze wynosił odpowiednio 0,7 i 1,3. Naszym zdaniem różnice te mogą być uwarunkowane wiekiem krów oraz obciążeniem produkcyjnym w poszczególnych laktacjach. Jednakże opierając się na wynikach badań Asai i wsp. (1) oraz Ayoubi i Yanga (2) można przyjąć, że uzyskane w badaniach własnych wartości proporcji limfocytów CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> mieszczą się w zakresie wartości prawidłowych dla krów i jałówek w ostatnim trymestrze ciąży. Warto podkreślić, że u krów i jałówek z takim stosunkiem limfocytów CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> nie wystąpiły zaburzenia okresu poporodowego. Natomiast u krów i jałówek z za-

trzymaniem łożyska stosunek  $CD4^+/CD8^+$  był istotnie wyższy i wynosił odpowiednio 2,8 i 2,9. Istotny wzrost proporcji limfocytów  $CD4^+/CD8^+$  u tych samic wskazuje na przesunięcie profilu odpowiedzi immunologicznej w kierunku limfocytów Th1. Można zatem sądzić, że wzrost subpopulacji limfocytów  $CD4^+$  był wynikiem rozwijającego się zapalenia. Potwierdzeniem tej tezy jest obserwowany przed porodem u krów i jałówek, u których wystąpiło zatrzymanie łożyska istotny wzrost odsetka limfocytów  $CD4^+$  i neutrofilów. Istotny wzrost proporcji limfocytów  $CD4^+/CD8^+$ , występujący u pierwiastek w drugim tygodniu po porodzie w stosunku do jałówek nieciężarnych, można tłumaczyć charakterystycznym dla okresu poporodowego profilem hormonalnym oraz procesem oczyszczania się macicy. W tym też okresie stwierdzono także wzrost odsetka neutrofilów.

Wiele cennych informacji dotyczących możliwości powikłań poporodowych u krów dostarcza cytometryczna analiza aktywności fagocytarnej komórek PMN (5). Neutrofile w krwi obwodowej są dominującą populacją wśród komórek żernych i są one komórkami szybkiego reagowania w przypadku zadziałania czynnika szkodliwego. Przed porodem neutrofile intensywnie infiltrują ścianę macicy i aktywnie uczestniczą w procesie oddzielania się błon płodowych (20, 21). Z doniesień innych autorów wynika, że niska reaktywność nieswoistych komórkowych mechanizmów obronnych u krów przed porodem jest jedną z przyczyn zatrzymania błon płodowych oraz w większości przypadków poporodowych zapaleń macicy (11). Fakt ten potwierdzają wyniki badań własnych, w których stwierdzono, że aktywność fagocytarnej komórek PMN u krów w ostatnim trymestrze ciąży, u których po porodzie doszło do zatrzymania łożyska była istotnie niższa w porównaniu z krowami z samoistnym odklejeniem błon płodowych, co świadczy o supresji komórkowych mechanizmów obronnych. Inaczej kształtowała się aktywność fagocytarnej komórek PMN u ciężarnych jałówek. Mianowicie u jałówek, u których po porodzie doszło do zatrzymania łożyska stwierdzono istotny wzrost aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów w porównaniu z jałówkami bez zatrzymania łożyska i jałówkami nieciężarnymi. Wzrost aktywności komórek fagocytarnych był prawdopodobnie następstwem toczącego się procesu zapalnego.

Badania własne wykazały również, że w drugim tygodniu po porodzie zarówno u krów i pierworódek z prawidłowym przebiegiem okresu poporodowego, jak i z zatrzymaniem łożyska stwierdzono istotny wzrost odsetka komórek fagocytujących. Wzrost ten prawdopodobnie był związany z inwolucją i procesem oczyszczania się macicy. Natomiast większa aktywność fagocytarnej komórek PMN w krwi obwodowej jałówek w porównaniu z krowami, niezależnie od przebiegu okresu poporodowego, może być uwarunkowana wiekiem oraz brakiem obciążeń produkcyjnych.

Reasumując należy stwierdzić, że:

– monitoring stanu czynnościowego komórek układu immunologicznego u krów ciężarnych umożliwia wczesne wykrycie zaburzenia homeostazy organizmu i podjęcie szybkiej interwencji w celu jej przywrócenia,

– ocena aktywności fagocytarnej komórek MN i PMN w krwi obwodowej krów i jałówek w ostatnim miesiącu ciąży dostarcza cennych informacji odnośnie przebiegu okresu poporodowego,

– analiza cytometryczna leukocytów krwi obwodowej krów i jałówek w ostatnim miesiącu ciąży, ze szczególnym uwzględnieniem neutrofilów oraz subpopulacji limfocytów  $CD4^+$  i  $CD8^+$  umożliwia prognozowanie odnośnie wystąpienia zaburzeń w okresie okołoporodowym.

## Piśmiennictwo

1. Asai K., Kenzo K., Hidemi R., Shunji S., Yasuo M., Yamaguchi T., Ohta M., Kumagai K.: Variation in  $CD4^+$  T and  $CD8^+$  T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non lactating periods. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998, 65, 51-61.
2. Ayoub J. A., Yang T. J.: Age-dependent changes in periparturient blood lymphocyte subpopulations in cattle. *Dev. Comp. Immunol.* 1996, 5, 353-363.
3. Beer A. E., Kwak-Kim J. Y. H.: Immunology of normal pregnancy. Reproductive Medicine Program, Finch University of Health Sciences, Chicago Medical School 2000, 1-23.
4. Charley B.: The immunology of domestic animals: its present and future. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996, 54, 3-6.
5. Chassagne M., Barnouin J., Chacornac J. P.: Predictive markers in the late gestation period for retained placenta in Black-Pied dairy cows under field conditions in France. *Theriogenology.* 1997, 49, 645-656.
6. Detilleux J. C., Kehrl J., Stabel J. R., Freeman A. E., Kelley D. H.: Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995, 44, 251-267.
7. Dohm J. E., Metz A.: Stress-mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1991, 30, 89-109.
8. Dosogne H., Burvenich C., Freeman A. E., Kehrl Jr M. C., Detilleux J. C., Sulon J., Beckers J. F., Hoeben D.: Pregnancy-associated glycoprotein and decreased polymorphonuclear leukocyte function in early post-partum dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999, 67, 47-54.
9. Hansen P. J.: Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology.* 1997, 47, 121-130.
10. Harp J. A., Kehrl Jr M. E., Hurley D., Wilson R. A., Boone T. C.: Numbers and percent of T lymphocytes in bovine peripheral blood the periparturient period. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998, 28, 29-35.
11. Hussain A. M.: Bovine uterine defense mechanisms. *J. Vet. Med.* 1989, 36, 641-651.
12. Kampen C., Mallard B. A.: Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocytes subsets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997, 58, 79-91.
13. Lehmann A. K., Sornes S., Halstensen A.: Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 2000, 243, 229-242.
14. Meivrom R., Brenner S., Brenner J.: Changes in the cellular subpopulations of peripheral blood leukocytes during the reproductive cycle of dairy cows. *Isr. J. Vet. Med.* 1999, 54, 1-16.
15. Monfardini E., Pinotti L., Cheli F., Savoini G., Burvenich C., Baldi A.: Bovine neutrophil diapedesis and chemotaxis during peripartum in dairy cows. *International Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland.* Stresa 2000, s. 41-47.
16. Piccinni M. P., Scaletti C., Magii E., Romagnani S.: Role of hormone-controlled Th-1 and Th-2 type cytokines in successful pregnancy. *J. Neuroimmunol.* 2000, 109, 30-33.
17. Robertson S. A., Seamark R. F., Guilbert L. J., Wegmann T. G.: The role of cytokines in gestation. *Critical. Rev. Immunology.* 1994, 14, 239-292.
18. Shafer-Weaver K. A., Sordillo L.: Bovine  $CD8^+$  suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997, 56, 53-64.
19. Smits E., Burvenich C., Heyneman R.: Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997, 56, 259-269.
20. Stabel J. R., Kehrl Jr M. E., Reinhardt T. A., Nonnecke B. J.: Functional assessment of bovine monocytes isolated from peripheral blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997, 58, 147-153.
21. Subandrio A. L., Noakes D. E.: Neutrophil migration in to the uterine lumen of the cow: The influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones using two intrauterine chemoattractants. *Theriogenology* 1997, 47, 825-835.
22. Subandrio A. L., Sheldon I. M., Noakes D. E.: Peripheral and intrauterine neutrophil function in cow: The influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones. *Theriogenology* 2000, 53, 1591-1608.
23. Wilson R. A., Zolnai A., Rudas P., Frenyo L. V.: T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves and adult bovine. *J. Reprod. Immunol.* 1997, 33, 175-185.
24. Zhijian H., Yiming H., Fanping L., Chengliang Q., Yishan W.: Study on cellular immunity function in pregnant dairy cows. *Acta Vet. Zoot. Sinica* 1999, 30, 40-43.

Adres autora: dr Leszek Krakowski, ul. Królowej Jadwigi 6/28, 20-282 Lublin; e-mail: leszek@hortus.ar.lublin.pl