

# Wpływ leukotoksyny *Mannheimia haemolytica* A1 na odpowiedź zapalną u cieląt

DARIUSZ BEDNAREK, MONIKA SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA, KATARZYNA DUDEK

Zakład Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Bednarek D., Szymańska-Czerwińska M., Dudek K.

## Effect of leukotoxin *Mannheimia haemolytica* A1 on the inflammatory response in calves

### Summary

The aim of this study was to estimate the effect of leukotoxin (Lkt) *Mannheimia haemolytica* A1 on the inflammatory response in calves. The study was performed on 12 clinically healthy, Black and White Lowland breed calves, aged 8 weeks. Each of the experimental animals received a single dose of 25µg of *Mannheimia haemolytica* A1 Lkt intravenously. The Lkt treated calves were compared with non-treated controls before (0) and 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48 and 72 h after the treatment. The following parameters were assayed: concentrations of eicosanoids such as: prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>), thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), as well as selected acute phase proteins (CRP, Cp, Tf, Hp, SAA). The obtained results showed that the concentrations of some acute phase proteins, such as Hp and SA,A and also eicosanoids (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>), were significantly higher in comparison to the controls especially during the first 3-6 h after the Lkt administration.

**Keywords:** *Mannheimia haemolytica* A1, leukotoxin, inflammatory response, calves

Choroby układu oddechowego bydła, a w szczególności enzoptyczna bronchopneumonia cieląt (EBC) stanowią obecnie ważny problem zdrowotny w odchowicie tych zwierząt w kraju i za granicą.

W złożonej etiologii enzoptycznej bronchopneumonii cieląt obok usposabiających czynników środowiskowych również liczne czynniki zakaźne, takie jak wirusy (BHV, BVDV, PI-3, BSRV) i bakterie, w tym mykoplazmy (*M. bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis*), odgrywają znaczącą rolę. Spośród bakterii na szczególną uwagę zasługuje zwłaszcza *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, której serotyp A1 odpowiedzialny jest za najbardziej ciężkie postaci kliniczne choroby, kończące się niejednokrotnie szybkim zejściem śmiertelnym. Na skutek infekcji tym zarazkiem dochodzi bowiem do rozległych uszkodzeń i zmian zapalnych tkanki płucnej. Powstają one przede wszystkim w następstwie rozpadu leukocytów bydłowych i działania na tkanki gospodarza reaktywnych substancji uwalnianych z ich wnętrza (wolne rodniki tlenowe, metaloproteazy, mediatory zapalne). Rozpad białych krwinek wywołany jest natomiast działaniem specyficznej egzotoksyny bakteryjnej produkowanej przez *M. haemolytica* A1, wykazującej szczególną predylekcję do leukocytów bydłowych – stąd jej nazwa: leukotoksyna (Lkt) (1).

Lkt jest białkopodobną, termolabilną egzotoksyną o masie cząsteczkowej 102 kDa, oporną na działanie tlenu, nieprzesączalną i rozpuszczalną w wodzie (13).

Szczyt jej produkcji przypada na 6 h po zakażeniu, tj. podczas logarytmicznej fazy wzrostu *M. haemolytica* A1. Lkt zaliczana jest do rodziny tzw. odtwarzalnych toksyn (RTX – repeats in toxin) o silnych właściwościach cytolitycznych, specyficznych w odniesieniu do przeżuwaczy (13, 17). Mechanizm jej działania, jak się przyjmuje, polega na tworzeniu mikroskopijnych por w błonie komórkowej leukocytów, umożliwiających przenikanie jonów Ca<sup>2+</sup> do komórki, wzrost ciśnienia osmotycznego w cytoplazmie i w konsekwencji rozpad komórki (6).

Kliniczne przypadki enzoptycznej bronchopneumonii, w których współuczestniczy *M. haemolytica* serotyp A1, cechują się zwykle ciężkim przebiegiem. U chorych cieląt stwierdza się najczęściej wysoką gorączkę, śluzowo-ropny lub ropny wypływ z nosa, łzawienie, występowanie bolesnego kaszlu z objawami ostrej duszności oraz osłabienie i apatię. U niektórych zwierząt wystąpić też może wodnista biegunka, a chore zwierzęta nie wykazują chęci do pobierania pokarmu; apetyt jest znacznie upośledzony lub obserwuje się jego brak.

Zakażenia *M. haemolytica* A1 u bydła mają duże znaczenie epidemiologiczne i gospodarcze. Z tego powodu są one przedmiotem zainteresowań wielu ośrodków naukowych na świecie. Mimo to wiele zagadnień związanych z udziałem tego zarazka, a w szczególności jej egzotoksyny w patogenezie choroby pozostają do dziś nie w pełni wyjaśnione.

Celem badań była ocena wpływu leukotoksyny *M. haemolytica* A1 na odpowiedź zapalną u cieląt.

### Material i metody

Badania wykonano na 12 cielętach rasy ncb, w wieku 8 tygodni, podzielonych na dwie równe grupy. Cielętom w grupie I podano dożylnie leukotoksynę (Lkt) *M. haemolytica* A1 w jednorazowej dawce 25 µg/zw. po rekonstytucji jej liofilizatu w jałowym płynie fizjologicznym. Leukotoksynę uzyskiwano z supernatantu 4,5 h hodowli referencyjnego szczepu *M. haemolytica* A1 na podłożu RPMI 1640 wg metody opisanej przez Clinkenbeard i wsp. (5) z modyfikacjami Urban-Chmiel i wsp. (19).

Cielęta grupy II stanowiły kontrolę i otrzymały w tym samym czasie, w porównywalnej do Lkt objętości, placebo w postaci jałowego płynu fizjologicznego. Od wszystkich cieląt pobierano krew do badań laboratoryjnych. Pierwsze pobranie, tzw. zerowe (0), wykonano bezpośrednio przed podaniem Lkt, a następne co godzinę do 6 h po jej podaniu. Po upływie 12, 24, 48 i 72 h krew została pobrana ponownie.

W surowicy krwi cieląt oznaczono poziom odpowiednich mediatorów kaskady kwasu arachidonowego, tj. eikozanoidów, takich jak: prozapalne prostaglandyny E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) i F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), tromboksan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) i leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego firmy R&D Systems (PGE<sub>2</sub> i LTB<sub>4</sub>) oraz Cayman (PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub>).

Ponadto przebadano wybrane białka ostrej fazy (APPs), takie jak: białko C-reaktywne (CRP), ceruloplazminę (Cp), transferynę (Tf), haptoglobulinę (Hp) i surowiczy amyloid A (SAA) przy użyciu testów immunoenzymatycznych firmy Biorpól (CRP, Cp, Tf) oraz Tridelta (Hp, SAA).

Ocenę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono z zastosowaniem średniej arytmetycznej ( $\bar{x}$ ) i odchylenia standardowego ( $\pm$  SD), a istotność różnic pomiędzy porównywanymi średnimi z poszczególnych grup zwierząt obliczono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta przy  $p \leq 0,05$ .

### Wyniki i omówienie

W badaniach odpowiedzi zapalnej u cieląt w następstwie podawania im Lkt *M. haemolytica* A1 prześlędzono kształtowanie się poziomów wybranych białek ostrej fazy (APPs), takich jak: białko C-reaktywne (CRP), ceruloplazmina (Cp) i transferyna (Tf) oraz tych uważanych za najbardziej indykatorowe dla bydła, tj. surowiczego amyloidu A (SAA) i haptoglobuliny (Hp). Wartości tych parametrów podano w tab. 1 i 2. Ponadto badano też kształtowanie się specyficznych mediatorów

Tab. 1. Średnie stężenia wybranych białek ostrej fazy (APP) w surowicy krwi cieląt otrzymujących leukotoksynę (Lkt) *M. haemolytica* A1 (grupa I) i kontrolnych (grupa II)

Czas Obserwacji (h)	Parametry					
	CRP (mg/l)		Cp (IU)		Tf (g/dl)	
	gr. I	gr. II	gr. I	gr. II	gr. I	gr. II
0	52,10 ± 3,11	50,11 ± 3,02	59,12 ± 0,91	58,10 ± 1,02	2,8 ± 0,10	2,9 ± 0,40
1	53,40 ± 3,60	49,92 ± 4,11	60,51 ± 1,11	53,40 ± 1,60	2,4 ± 0,90	3,0 ± 0,80
2	55,11 ± 3,11	50,10 ± 3,18	62,13 ± 1,18	55,11 ± 1,11	2,2 ± 0,60	2,8 ± 0,70
3	58,10 ± 4,13	55,17 ± 4,30	63,10 ± 2,30	58,10 ± 1,13	2,0 ± 0,30	2,6 ± 0,60
4	56,70 ± 4,17	54,91 ± 3,29	63,90 ± 2,22	59,70 ± 1,17	1,9 ± 0,30	2,4 ± 0,10
5	57,85 ± 4,13	56,13 ± 3,22	64,10 ± 2,28	58,81 ± 2,13	1,8 ± 0,10	2,4 ± 0,90
6	54,24 ± 3,01	48,98 ± 4,02	60,02 ± 1,92	57,20 ± 2,01	2,0 ± 0,20	2,9 ± 0,40
12	53,13 ± 3,10	53,59 ± 5,10	59,51 ± 0,98	55,12 ± 1,10	2,3 ± 0,80	3,0 ± 0,60
24	51,12 ± 4,10	48,99 ± 5,32	60,01 ± 1,30	56,10 ± 0,89	2,2 ± 0,50	2,6 ± 0,10
48	52,18 ± 4,10	50,10 ± 4,23	58,90 ± 1,28	57,19 ± 0,90	2,4 ± 0,60	2,4 ± 0,90
72	51,19 ± 4,51	51,14 ± 4,05	58,14 ± 1,02	59,10 ± 1,51	2,5 ± 0,30	2,2 ± 0,70

Tab. 2. Średnie stężenia wybranych białek ostrej fazy (APP) w surowicy krwi cieląt otrzymujących leukotoksynę (Lkt) *M. haemolytica* A1 (grupa I) i kontrolnych (grupa II)

Czas obserwacji (h)	Parametry			
	SAA (mg/ml)		Hp (mg/ml)	
	gr. I	gr. II	gr. I	gr. II
0	17,33 ± 7,41	15,13 ± 5,41	0,49 ± 0,15	0,42 ± 0,04
1	18,33 ± 6,40	16,13 ± 5,40	0,59 ± 0,15	0,43 ± 0,04
2	45,19 ± 18,06*	18,50 ± 5,30	1,24 ± 0,71*	0,41 ± 0,05
3	42,63 ± 19,54*	10,00 ± 4,40	1,28 ± 0,73*	0,44 ± 0,03
4	36,38 ± 11,87*	15,25 ± 6,84	1,25 ± 0,50*	0,58 ± 0,14
5	39,44 ± 12,55*	14,33 ± 5,10	1,21 ± 0,50*	0,52 ± 0,12
6	63,95 ± 25,45*	29,50 ± 8,50	1,06 ± 0,23*	0,53 ± 0,13
12	16,00 ± 5,71	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,04	0,64 ± 0,19
24	11,80 ± 4,92	0,00 ± 0,00	0,45 ± 0,19	0,50 ± 0,21
48	11,50 ± 4,80	2,25 ± 0,18	0,40 ± 0,09	0,65 ± 0,25
72	9,83 ± 2,21	2,70 ± 1,65	0,36 ± 0,10	0,56 ± 0,12

Objaśnienie: \* –  $p \leq 0,05$

zapalnych kaskady kwasu arachidonowego, tzw. eikozanoidów, oceniając w tym przypadku zmiany w koncentracjach prozapalnych prostaglandyn PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub> oraz tromboksanu TXB<sub>2</sub> i leukotrienu LTB<sub>4</sub>. Wyniki tych badań przedstawiono w tab. 3.

W przebiegu doświadczenia nie zaobserwowano w zasadzie istotnych zmian w odniesieniu do pierwszych trzech wymienionych białek ostrej fazy, tj. CRP, Cp i Tf (tab. 1). Wartości tych wskaźników w obu grupach zwierząt kształtowały się podobnie, choć z niewielką, zauważalną tendencją wzrostową u cieląt doświadczalnych dla CRP i Cp oraz niższą dla Tf. Ten nieznaczny spadek utrzymywał się do 5 h obserwacji. Notowane różnice nie były jednak istotne statystycznie w porównaniu do kontroli.

Tab. 3. Średnie stężenia eikozanoidów w surowicy krwi cieląt otrzymujących leukotoksynę (Lkt) *M. haemolytica* A1 (grupa I) i kontrolnych (grupa II)

Czas obserwacji (h)	Parametry							
	PGE <sub>2</sub> (ng/ml)		PGF <sub>2α</sub> (ng/ml)		TXB <sub>2</sub> (ng/ml)		LTB <sub>4</sub> (ng/ml)	
	gr. I	gr. II	gr. I	gr. II	gr. I	gr. II	gr. I	gr. II
0	9,17 ± 3,37	9,50 ± 3,97	0,67 ± 0,21	0,57 ± 0,28	28,00 ± 9,04	29,60 ± 10,68	1,17 ± 0,20	1,91 ± 0,61
1	21,17 ± 5,37*	9,52 ± 3,97	6,10 ± 2,21*	0,54 ± 0,18	79,00 ± 38,0*	30,60 ± 12,00	2,19 ± 1,20	2,00 ± 0,61
2	23,33 ± 6,29*	9,53 ± 4,24	6,68 ± 0,18*	0,54 ± 0,18	82,00 ± 17,7*	48,27 ± 21,83	2,57 ± 0,98	2,29 ± 0,99
3	19,33 ± 4,31*	10,43 ± 4,59	3,16 ± 0,05*	0,22 ± 0,08	58,53 ± 7,94*	15,47 ± 7,40	2,92 ± 0,31	2,04 ± 0,74
4	16,00 ± 1,41*	7,20 ± 3,83	0,88 ± 0,12*	0,16 ± 0,02	28,20 ± 1,98	21,46 ± 9,64	5,58 ± 0,1*	1,67 ± 0,02
5	16,83 ± 3,69*	4,90 ± 1,51	0,43 ± 0,11	0,32 ± 0,06	30,67 ± 10,73	28,80 ± 8,45	9,00 ± 2,2*	2,84 ± 0,18
6	12,03 ± 5,52*	3,66 ± 1,23	0,23 ± 0,05	0,21 ± 0,08	32,33 ± 12,62	41,20 ± 18,36	1,63 ± 0,49	1,75 ± 0,05
12	0,53 ± 0,23	1,30 ± 0,82	0,44 ± 0,21	0,29 ± 0,06	73,33 ± 13,01	53,07 ± 23,32	0,31 ± 0,13	0,37 ± 0,10
24	1,07 ± 0,96	2,27 ± 1,56	0,50 ± 0,01	0,28 ± 0,09	29,80 ± 11,60	47,40 ± 20,19	0,25 ± 0,06	0,40 ± 0,20
48	3,20 ± 1,48	4,24 ± 2,76	0,28 ± 0,09	0,38 ± 0,19	14,50 ± 4,95	19,53 ± 5,71	0,40 ± 0,32	0,31 ± 0,12
72	3,28 ± 1,59	5,28 ± 1,78	0,39 ± 0,16	0,30 ± 0,12	17,40 ± 0,85	13,20 ± 6,47	0,37 ± 0,08	0,30 ± 0,12

Objaśnienie: jak w tab. 1.

W odniesieniu do pozostałych bardziej indykatorowych dla bydła APPs, tj. SAA i Hp, notowane zmiany były statystycznie istotne u cieląt otrzymujących Lkt (tab. 2). U zwierząt tych SAA zwiększał się stopniowo w ciągu pierwszych 6 h po podaniu im egzotoksyny. Podobne zależności wykazano również w odniesieniu do Hp i w tym przypadku poziom tego białka wzrastał sukcesywnie, osiągając jednak maksymalne wartości już w 3 h po podaniu Lkt. Następnie jego wartości stopniowo obniżały się, przy czym jeszcze w 6 h były istotnie wyższe niż w kontroli.

W odniesieniu do zmian koncentracji eikozanoidów (tab. 3) wykazano, że stężenie PGE<sub>2</sub> w surowicy cieląt wzrosło wyraźnie już w pierwszych dwóch godzinach po zastosowaniu Lkt i utrzymywało się na istotnie wyższym poziomie aż do 6 h, mimo że wartości te były nieco niższe niż na początku. W grupie kontrolnej natomiast przez cały okres obserwacji parametr ten był bardziej stabilny. Druga z badanych prostaglandyn PGF<sub>2α</sub> zachowywała się podobnie, wzrastając dziesięciokrotnie w dwóch pierwszych godzinach, a następnie utrzymując swój podwyższony poziom do 5 h po podaniu Lkt. Dla przykładu, w grupie kontrolnej wartości jej były istotnie niższe, szczególnie w ciągu pierwszych 4 h. Stężenia TXB<sub>2</sub> oraz LTB<sub>4</sub> w surowicy cieląt otrzymujących Lkt uległy również podwyższeniu, przy czym wartości ich były istotnie wyższe tylko w ciągu pierwszych trzech godzin dla pierwszego z parametrów oraz w 4-5 h dla drugiego z nich.

Lkt zaliczana jest do grupy tzw. odtwarzalnych toksyn (RTX) o silnych właściwościach cytolitycznych dla przeżuwaczy (2, 13) i uszkodzających komórki fagocytarne (PMNL) gromadzące się w drogach oddechowych w odpowiedzi na zakażenie. Leukotoksyna *M. haemolytica* wiąże się z leukocytami bydła, przyłączając się do podjednostki CD18 leukocytarnego receptora β<sub>2</sub>-integryny. β<sub>2</sub>-integryna, czyli cząstka adhezyjna o koespre-

sji CD11a/CD18, określana też jako LFA-1 (leukocyte function associated antygen), zlokalizowana jest na powierzchni neutrofilów i odpowiedzialna za adhezję do śródbłonka naczyń krwionośnych, dla której ligandem jest ICAM-1 i ICAM-2 (intracellular adhesion molecules) (15, 18). Związanie się leukotoksyny aktywuje szereg wewnątrzkomórkowych szlaków przewodzenia sygnałów, z których część pobudzana jest również w następstwie przyłączenia się lipopolisacharydu *M. haemolytica* do określonego receptora (2, 13). Dalsze działanie Lkt polega na tworzeniu mikroskopijnych por w błonie komórkowej leukocytów i innych komórek immunokompetentnych (makrofagi płucne), umożliwiającich niekontrolowane wnikanie jonów Ca do ich wnętrza. Prowadzi to w krótkim czasie do wzrostu ciśnienia osmotycznego w cytoplazmie tych komórek, nieodwracalnych uszkodzeń, a w końcowej fazie całkowitego ich rozpadu (6). Wydaje się jednak, że leukotoksyna *M. haemolytica* zapoczątkowuje proces obumierania leukocytów krwi obwodowej bydła nie tylko na drodze napływu wapnia do ich wnętrza, co aktywuje również fosfolipazę A<sub>2</sub> i uwalnianie kwasu arachidonowego. W konsekwencji dochodzi do uwolnienia całej gamy prozapalnych mediatorów – pochodnych tego kwasu (eikozanoidów), ale także poprzez niekorzystne oddziaływanie na mitochondria komórkowe.

Wpływ Lkt na produkcję i zwiększone uwalnianie mediatorów zapalnych kaskady kwasu arachidonowego wykazano też w badaniach własnych. Spośród badanych eikozanoidów stwierdzono bowiem istotne pobudzenie produkcji prozapalnych prostaglandyn PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub> oraz tromboksanu TXB<sub>2</sub> zaobserwowane już w ciągu pierwszej godziny po podaniu egzotoksyny. Poziom pierwszego mediatora (PGE<sub>2</sub>) zwiększył się ponad dwukrotnie (21,17 ng/ml), podobnie też TXB<sub>2</sub> (79,0 ng/ml), a prostaglandyny PGF<sub>2α</sub> aż prawie 13-krotnie (6,10 ng/ml) w porównaniu z grupą kontrolną, w któ-

rej wynosił on, odpowiednio: 9,52, 30,60 i 0,54 ng/ml. Nieco mniej nasilony stymulujący efekt zaobserwowano w odniesieniu do innego mediatora, tj. leukotrienu  $LTB_4$  po 4-5 godzinach od iniekcji Lkt. Należy jednak podkreślić, że leukotrien ten ma istotne znaczenie proimmunologiczne jako silny chemoatraktant neutrofilów. Tak więc jego działanie można wiązać w zasadzie z korzystnym wpływem na organizm w zakresie odporności komórkowej odnośnie do fagocytozy. Natomiast w kontekście do zmian patologicznych inicjowanych działaniem Lkt najważniejszymi eikozanoidami w patomechanizmie przemian zapalnych wydają się produkowane w nadmiarze prostaglandyny  $PGE_2$  i  $PGF_{2\alpha}$ , których rola w procesie zapalenia jest trudna do przecenienia (1). Prostaglandyna  $PGE_2$  wpływa bowiem bezpośrednio na ośrodki termoregulacyjne w podwzgórzu, prowadząc do zwiększenia produkcji ciepła w organizmie i w konsekwencji do pojawienia się gorączki. Z kolei obie prostaglandyny w przebiegu zapalenia płuc istotnie pobudzają tzw. przesiąkanie naczyń, prowadząc w konsekwencji do pojawiania się zmian obrzękowych tkanki płucnej z towarzyszącą niedodmą, najczęściej dobrzusznym płotów płuc. Obniżają one ponadto znacząco próg pobudliwości nocyceptorów w zakończeniach czuciowych nerwu błędnego, dając w efekcie zwiększoną wrażliwość na ból oraz wzrost pobudliwości skurczowej mięśniówki gładkiej oskrzeli i zwiększoną podatność na tzw. bronchospazmy. Niemniej ważny jest również stymulujący efekt tych prostaglandyn w produkcji śluzu oskrzelowego, którego nadmiar, zalegając w płucach, upośledza wymianę gazową i sprzyja licznym powikłaniom. Wszystkie te niekorzystne efekty powstające na skutek działania prozapalnych eikozanoidów toru cyklooksygenacji kaskady kwasu arachidonowego, czyli tzw. prostanoidów  $X_2$ , pogłębiają i zaostrzają istotnie przebieg zapalenia, utrudniając przy tym skuteczne jego leczenie.

Warto nadmienić, że omówione wyżej, w większości niekorzystne efekty działania mediatorów zapalnych, głównie  $PGE_2$  i  $PGF_{2\alpha}$ , pojawiają się w następstwie działania dużych dawek Lkt. Natomiast przy niskich stężeniach tej egzotoksyny leukocyty po początkowym pobudzeniu ulegają następnie naturalnie przebiegającej apoptozie i przyjmują postać niewielkich ciałek związanych z błoną komórkową, a następnie mogą być bezpiecznie fagocytowane. Duże dawki Lkt, porównywalne ze stosowanymi w badaniach własnych, nasilają ten proces i produkcję mediatorów zapalnych, a leukocyty giną na skutek obrzęku i ostatecznego rozpadu komórki. Uwalniane z rozpadłych leukocytów enzymy proteolityczne i rozmaite mediatory nasilają proces zapalny, prowadząc do rozwoju zmian patologicznych w tkance płucnej z jednoczesnym aktywnym napływem komórek efektorowych (PMNL, limfocyty) do światła oskrzeli. Widocznym przejawem takiego działania jest również wyraźny wzrost odpowiednich markerów odczynu zapalnego. W badaniach własnych manifestowało się to wzrostem wybranych białek ostrej fazy (APPs), szczególnie SAA i Hp, a także omówionych już pokrótce prozapalnych mediatorów eikozanoidowych.

Białka ostrej fazy są grupą białek, których poziom wzrasta w ostrych stanach zapalnych, a po ich wygaśnięciu szybko wraca do normy (14). Obserwowano to również w badaniach własnych, w których najbardziej charakterystyczne dla bydła SAA i Hp normalizowały się już w 12 h po podaniu Lkt. Charakterystyczną cechą Hp u bydła (podobnie u owiec i kóz) jest, że u około 50% osobników zdrowych występuje ono w ilościach niemierzalnych („0”), a u pozostałych jej poziom zwykle nie przekracza 0,05-0,1 g/dm<sup>3</sup> surowicy (8). Zbliżone wartości notowano w badaniach własnych w odniesieniu do zwierząt kontrolnych. Wiadomo też, co potwierdzają również badania własne, że koncentracja Hp wzrasta w szybkim tempie w ciągu kilku godzin od zadziałania bodźca zapalnego i może zwiększyć się nawet 100-krotnie (7). Praktyczna nieobecność Hp u zwierząt zdrowych i szybki, wielokrotny wzrost stężenia w stanach zapalnych stanowią o jej wysokiej atrakcyjności w diagnostyce u przeżuwaczy. Wzrost stężenia Hp jest zwykle wprost proporcjonalny do nasilenia objawów klinicznych/ostrości procesu (11). Poziom haptoglobuliny w surowicy krwi cieląt zależy też od rodzaju choroby i jej przebiegu oraz podjętych metod i postępów w leczeniu. Wykazano m.in. przydatność oznaczania tego parametru w monitorowaniu leczenia zapaleń płuc u cieląt (20). Cielęta z klinicznymi objawami zapaleń układu oddechowego bez różnicowania charakteru zakażenia miały średnio 0,67 g Hp/dm<sup>3</sup>. Po podaniu im antybiotyków poziom Hp spadał, co wskazuje, że Hp może być indykatozem afektywności antybiotykoterapii. Nie zawsze jednak Hp spadał do zera, kiedy objawy choroby cofały się (klinicznie stwierdzono wyzdrowienie). Natomiast w przypadku eksperymentalnych zakażeń cieląt *M. haemolytica* notowano różne koncentracje tego białka. W skojarzonych infekcjach z BRSV-1 średnie stężenie Hp wynosiło 0,661 g/dm<sup>3</sup> u cieląt, które przeżyły (0,414-0,908 g/dm<sup>3</sup>) oraz średnio 2,812 g/dm<sup>3</sup> u zwierząt, które padły (1,57-4,045 g/dm<sup>3</sup>), przy czym jej zmiany były proporcjonalne do intensywności objawów (9). Z kolei przy eksperymentalnych monoinfekcjach cieląt tylko za pośrednictwem *M. haemolytica* po 12 godzinach obserwowano wzrost Hp do poziomu 0,5 g/dm<sup>3</sup> u cieląt, które przeżyły oraz powyżej 0,6 g/dm<sup>3</sup> u tych, które padły.

SAA od kilku lat wzbudza duże zainteresowanie jako wyjątkowo przydatny parametr zmian zapalnych u bydła. U tego gatunku zwierząt w stanach zdrowia nie przekracza on zwykle poziomu 5 mg/dm<sup>3</sup>. Do wzrostu jego poziomu, jak się uważa, dochodzi zwykle już po 4-5 godzinach. W badaniach własnych maksymalny wzrost SAA notowano natomiast po 6 h. Dla przykładu, w badaniach Boosman i wsp. (4) poziom SAA wzrastał po 5 h od dożylnego podania endotoksyny, a szczyt osiągał po 17-20 h. Wskazuje to na jego dobrą przydatność we wczesnej diagnostyce stanów zapalnych u bydła. Dla porównania, w badaniach własnych, w których zastosowano dożylnie egzotoksynę (Lkt), jego szczyt obserwowano po 6 h, a po 12 h poziom SAA powrócił w zasadzie do wartości wyjściowej. To również potwierdza jego wyjątkową przydatność jako wczesnego wskaźni-

ka zapalenia. Z kolei Horadagoda i wsp. (12) w doświadczalnym zakażeniu cieląt *Pasteurella haemolytica* A1 (obecnie *Mannheimia haemolytica*) wykazali co najmniej 10-krotny wzrost SAA w pierwszych 24 godzinach po iniekcji. Maksymalny poziom SAA (ponad 140 mg/dm<sup>3</sup>) wystąpił po 48 h, po czym następował stosunkowo szybki spadek jego koncentracji. Wykazano też, że ponad 90% surowiczego SAA w tych badaniach było związane z frakcją HDL. U 6 zakażonych cieląt następował wzrost SAA z ilości bardzo niskich (poniżej 10 mg/dm<sup>3</sup>), do ok. 70 mg/dm<sup>3</sup> już po 12 h, a po 36-48 h do ok. 130 mg/dm<sup>3</sup>. U zwierząt w warunkach terenowych stwierdzono nawet wyższe koncentracje SAA, co wskazuje, że odpowiedź zapalna na zakażenie doświadczalne nie była maksymalna. Warto również dodać, że po doświadczalnym zakażeniu cieląt innym ważnym czynnikiem zakaźnym EBC, takim jak wirus BRS, dochodziło też do silnej odpowiedzi SAA i Hp, natomiast szczyt ich uwalniania następował po 7-8 dniach. Odpowiedź Hp była wówczas ściśle skorelowana z ostrością przebiegu, a SAA reagował najszybciej na infekcję (10).

Z innych ważnych w badaniach własnych markerów zapalenia podobnie jak omówione białka ostrej fazy zachowywały się też eikozanoidy. Ich istotny wzrost w surowicy po podaniu cielętom Lkt był wynikiem bezpośredniego związania się tej egzotoksyny z błoną komórkową leukocytów bydłych za pośrednictwem  $\beta_2$ -integriny i uruchomienia w obrębie tych komórek szlaków enzymatycznych prowadzących do produkcji i uwalniania mediatorów w torze cyklo- (COX-1, COX-2) i lipooksygenacji kaskady kwasu arachidonowego. Leukotoksyna *M. haemolytica* pobudza bowiem skutecznie granulocyty obojętnochłonne do syntezy leukotrienu B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) będącego ważnym czynnikiem chemotaktycznym dla neutrofilów, aktywizującym ich wzmożoną migrację do miejsca zapalenia. Mediator ten zwiększa m.in. zdolności chemotaktyczne, ruchliwość i przyleganie tych komórek do śródbłonna naczyń. Współuczestniczy w ekspresji leukocytarnych cząsteczek adhezyjnych, umożliwiając migrację neutrofilów i innych komórek układu białokrwinkowego pomiędzy komórkami śródbłonna drogą diapedezy z łożyska naczyniowego do ogniska zapalnego. Ponadto czynnik ten zwiększa istotnie zdolności fagocytarne neutrofilów związane z pobudzeniem ich do chemotaksji oraz wewnątrzkomórkowego zabijania pochłoniętych patogenów. Leukotrien LTB<sub>4</sub> w odróżnieniu od innych eikozanoidów, głównie prostaglandyn, podwyższa próg pobudliwości nocyceptorów, co pozwala utrzymać stan miejscowej analgezji oraz poprawić komfort funkcjonowania organizmu w przebiegu zapalenia. W wyniku cyklooksygenacji powstaje również tromboksan (TXB<sub>2</sub>), którego poziom wzrasta na skutek podawania Lkt, co wykazano także w badaniach własnych. TXB<sub>2</sub> odpowiedzialny jest przede wszystkim za przyleganie trombocytów do ścian naczyń krwionośnych oraz za procesy krzepnięcia. Jego nadmierne działanie w procesie zapalenia prowadzić jednak może do powstawania zmian zakrzepowo-zatorowych w naczyniach krwionośnych płuc, a nawet do zakrzepicy notowanej w zakażeniach *P. multocida* (1).

Z kolei prostaglandyny, których istotny wzrost zaobserwowano w badaniach własnych, są ważnymi mediatorami fazy naczyniowej zapalenia. Rozszerzają naczynia, wpływają na przepuszczalność naczyń i uwrażliwiają receptory bólowe. Ponadto mogą modulować funkcje immunologiczne limfocytów, głównie na drodze hamowania wytwarzania interleukiny 2 przez limfocyty T (16).

W następstwie podawania cielętom leukotoksyny (Lkt) *Mannheimia haemolytica* A1 doszło spośród badanych białek ostrej fazy do znaczącego podwyższenia koncentracji SAA i Hp oraz zwiększenia produkcji i uwalniania eikozanoidów, tj. markerów zapalenia kaskady kwasu arachidonowego.

## Piśmiennictwo

1. Bednarek D.: Badania nad modulacją odczynów zapalnych płuc w terapii cieląt chorych z objawami bronchopneumonii. Praca hab., PIWet-PIB, Puławy 2003.
2. Bednarek D.: Znaczenie zakażeń *Pasteurella* sp. w etiopatogenezie syndromu oddechowego bydła, [w:] Bednarek D. (red.): Najważniejsze czynniki etiologiczne, patogenne i najnowsze trendy w profilaktyce i terapii syndromu oddechowego bydła (BRD). PIWet-PIB, Puławy 2008, 48-58.
3. Bednarek D., Urban-Chmiel R., Dudek K., Szymańska-Czerwińska M.: Evaluation of peripheral blood leukocyte subpopulations by flow cytometry in calves treated with *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. Bull. Vet. Inst. Puławy 2009, 53, 199-203.
4. Boosman R., Niewold T. A., Mutsaers C. W. A. A. M., Gruys E.: Serum amyloid A concentrations in cows given endotoxin as an phase stimulant. Am. J. Vet. Res. 1989, 50, 1690-1694.
5. Clinkenbeard K. D., Clinkenbeard C., Wawrzyniak B.: Choatropic agents cause disaggregation and enhanced activity of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Vet. Microbiol. 1995, 45, 201-209.
6. Clinkenbeard K. D., Mosier D. A., Confer A. W.: Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect. Immun. 1989, 57, 420-425.
7. Conner J. G., Eckersall P. D., Wiseman A., Bain R. K., Douglas T. A.: Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. Res. Vet. Sci. 1989, 47, 203-207.
8. Deigan T., Alwan A., Kelly J., McNair J., Warren T., O'Farely C.: Serum haptoglobin: an objective indicator of experimentally-induced *Salmonella* infection in calves. Res. Vet. Sci. 2000, 69, 153-158.
9. Godson D. L., Campos M., Attah-Poku S. K., Redmond M. J., Cordeiro D. M., Setih M. S., Harland R. J., Babiuk L. A.: Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. Vet. Immunol. Immunopathol. 1996, 51, 277-292.
10. Heegard P. M. H., Godson D. L., Toussaint M. J. M., Tjørnehøj K., Larsen L. E., Viuff B., Ronsholt L.: The acute phase of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with respiratory syncytial virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 2000, 77, 151-159.
11. Hivronen J., Pyörälä S., Jousimies-Somer H.: Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. J. Dairy Res. 1996, 64, 351-360.
12. Horadagoda A., Eckersall P. D., Alsemgeest S. P., Gibbs H. A.: Purification and quantitative measurement of bovine serum amyloid-A. Res. Vet. Sci. 1993, 55, 317-325.
13. Kaehler K. L., Markham R. J. F., Muscopolat Ch. C., Johson D. W.: Evidence of species specificity in the cytotoxic effect of *Pasteurella haemolytica*. Infect. Immun. 1980, 30, 615-616.
14. Kostro K., Gliński Z.: Białka ostrej fazy u zwierząt. WAR, Lublin 2003.
15. Lawrence P. K., Nelson W. R., Liu W., Knowles D. P., Foreyt W. J., Sikumaran S.:  $\beta_2$  integrin Mac-1 is a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine and ovine leukocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. 2008, 122, 285-294.
16. Mackiewicz S.: Immunologia. PZWL, Warszawa 1991.
17. Mikucki P., Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R.: Skuteczność natywnej i inaktywowanej leukotoksyny *Mannheimia haemolytica* w immunoprofilaktyce swoistej syndromu oddechowego owiec. Medycyna Wet. 2006, 62, 1302-1305.
18. Nagabata H., Kebrli M. E., Murata H., Okada H., Noda H., Kociba G. J.: Neutrophil function and pathologic findings in Holstein calves with leukocyte adhesion deficiency. Am. J. Vet. Res. 1994, 55, 40-48.
19. Urban-Chmiel R., Wernicki A., Puchalski A., Mikucki P.: Evaluation of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin prepared in non-supplemented and BSA or FBS supplemented RPMI 1640 medium. Pol. J. Vet. Sci. 2004, 7, 1-8.
20. Wittum T. E., Young C. R., Stanker L. H., Griffin D. D., Perino L. J., Little-dike E. T.: Haptoglobin response to clinical respiratory tract disease in feedlot cattle. Am. J. Vet. Res. 1996, 57, 646-649.

Adres autora: doc. dr hab. Dariusz Bednarek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: dbednare@piwet.pulawy.pl