

ANDRZEJ SALWA

## Wstępne badania nad czynnością fagocytarną granulocytów obojętnochłonnych we krwi cieląt noworodków

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk

Funkcje granulocytów obojętnochłonnych i makrofagów odgrywają ważną rolę w zjawiskach odpornościowych ustroju. Fagocytoza jest procesem złożonym, obejmującym szereg zjawisk komórkowych, takich jak: opsonizacja drobnoustroju, chemotaksja, pochłanianie oraz wewnątrzkomórkowe unieszkodliwianie drobnoustrojów (6, 22). W czasie fagocytozy następuje w komórce nasilenie aktywności procesów metabolicznych, polegających głównie na spalaniu glukozy w cyklu pentozowym, w którym wytwarzany jest NADPH+H<sup>+</sup>, katalizujący syntezę H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1, 6, 17, 22). Stwierdzono, że komórki fagocytujące mają zdolność do redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) do granatowych wewnątrzkomórkowych ziarnistości formazanu NBT (1, 11). Właściwości te zostały wykorzystane w teście służącym do oceny stanu komórki fagocytującej. Test NBT może być wykonywany jako: test spontaniczny i pobudzany cząsteczkami lateksu, bakteriami albo toksynami bakteryjnymi (1, 7, 11, 20). Jak stwierdzono w licznych badaniach nad testem NBT, w zakażeniach bakteryjnych wzrasta we krwi odsetek granulocytów obojętnochłonnych zdolnych do redukcji NBT. Uważa się, że obecność powyżej 8—10% komórek NBT dodatnich wskazuje na występowanie zakażenia bakteryjnego. Z kolei brak wzrostu odsetka komórek redukujących NBT po stymulacji może świadczyć o obniżeniu fagocytozy (1, 4, 7, 11, 20).

Celem pracy było określenie dynamiki aktywności fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych we krwi obwodowej cieląt w pierwszych dniach życia. Szczególną uwagę postanowiono zwrócić na zdolność granulocytów obojętnochłonnych do redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (test NBT).

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 23 cielętach rasy ncb pochodzących z gospodarstw PGR. Nowo narodzone cielęta były oddzielane od krów-matek i umieszczane w klatkach indywidualnych. Cielęta otrzymywały

pierwszą porcję siary do 2 godzin po urodzeniu. W czasie pierwszych 48 godzin życia siarę podawano 3-krotnie na dobę. W następnych dniach cielętom podawano mleko pełne 2—3 razy na dobę. Krew do badań laboratoryjnych pobierano w 1, 3, 7 i 14 dniu życia. Próbkki krwi pobierano do próbek plastikowych lub silikonowanych z heparyną (20 j.m./ml krwi). Badania laboratoryjne obejmowały oznaczenia: liczby leukocytów, leukogramu, odczynu fagocytarnego oraz spontanicznego i pobudzanego testu NBT. Oznaczenie liczby leukocytów wykonywano przy użyciu licznika elektronowego Coulter Counter typ DN. Rozmazy krwi barwiono metodą May-Grünwald-Giemsy. Odczyn fagocytarne wykonywano wg metody La Motte (8). Test NBT spontaniczny i pobudzany wykonywano wg metody ilościowej Baehnera i Nathana (1) w modyfikacji Jarstrand (7). Do testu przygotowywano zawiesinę leukocytów izolowanych wg metody zaadaptowanej do krwi bydła przez Renshaw i wsp. (13).

W trakcie prowadzenia badań, cielęta podzielono na grupę zwierząt chorych (13 sztuk) i zdrowych (10 sztuk). Grupa cieląt chorych obejmowała zwierzęta, które zachorowały w okresie od 3 do 5 dnia po urodzeniu. U zwierząt tych stwierdzano biegunkę, brak apetytu i podwyższoną temperaturę ciała. W trakcie trwania choroby cielęta chore były leczone: surowicą Bocolin, antybiotykami i preparatami sulfonamidowymi. Uzupełniająco i sporadycznie podawano witaminy i roztwory soli mineralnych. U pięciu sztuk cieląt, które padły w czasie badania stwierdzono na sekcji nieżyty i stany zapalne błony śluzowej do krwotocznego włącznie. Przeprowadzone rutynowe badania bakteriologiczne wycinków narządów wewnętrznych w posiewach wykazały występowanie szczepów *E. coli* β-hemolitycznych.

### Wyniki i omówienie

Wyniki badań przedstawiono w tab. 1 i na ryc. 1, 2, 3. Analiza dynamiki zmian w obrazie białokrwinkowym cieląt w pierwszych dniach życia wykazała wahania w zakresie ogólnej liczby leukocytów, limfocytów i granulocytów obojętnochłonnych. Stwierdzono brak istotnych różnic statystycznych ( $p > 0,05$ ) między średnimi wartościami leukocytów w zależności od stanu zdrowia. Ogólna liczba leukocytów u zdrowych cieląt nie ulegała większym wahanom. U cieląt chorych natomiast w 3 dniu życia stwierdzono nieznaczny spadek liczby krwinek białych. W tym

Tab. 1. Liczba leukocytów, odczyn fagocytarne i test NBT w pierwszych dniach życia cieląt

Oznaczone parametry	Dzień życia							
	1		3		7		14	
	zdrowe	chore	zdrowe	chore	zdrowe	chore	zdrowe	chore
Liczba leukocytów 10 <sup>9</sup> /l	12,8 ± 5,1	12,0 ± 4,2	11,4 ± 1,8	9,5 ± 2,9	12,6 ± 3,2	14,6 ± 7,6	13,8 ± 3,6	12,2 ± 3,1
Granulocyty obojętnochłonne %	0,74 ± 0,015	0,76 ± 0,09	0,61 ± 0,07	0,57 ± 0,01	0,49 ± 0,08	0,49 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,53 ± 0,02
Limfocyty %	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,09	0,31 ± 0,07	0,36 ± 0,01	0,47 ± 0,09	0,43 ± 0,01	0,42 ± 0,17	0,36 ± 0,01
Monocyty %	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,05	0,10 ± 0,06	0,03 ± 0,02	0,60 ± 0,02	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,04
Odczyn fagocytarne %	17,6 ± 14,4	18,2 ± 14,4	22,0 ± 10,4	23,7 ± 14,1	13,7 ± 9,0	9,2 ± 8,0	12,6 ± 12,3	18,9 ± 11,7
Test NBT spont. dE546	0,117 ± 0,078	0,145 ± 0,079	0,19 ± 0,064	0,290 ± 0,039	0,170 ± 0,097	0,259 ± 0,023	0,164 ± 0,088	0,137 ± 0,097
Test NBT pobudz. dE546	0,221 ± 0,011	0,307 ± 0,144	0,312 ± 0,01	0,390 ± 0,156	0,245 ± 0,019	0,400 ± 0,060	0,298 ± 0,131	0,253 ± 0,140

samym czasie rozpoczął się wzrost odsetka limfocytów oraz spadek liczby granulocytów obojętnochłonnych.

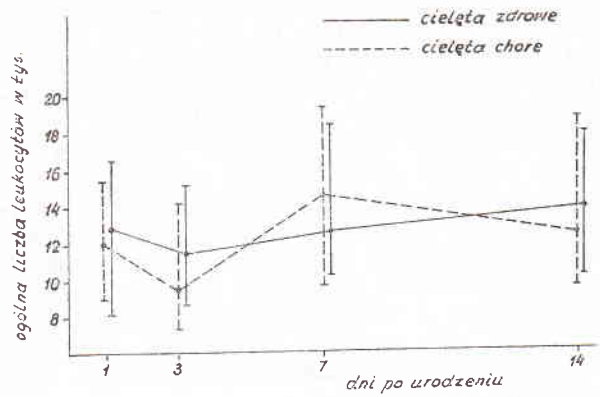
Uzyskane wyniki badań, szczególnie zaś zjawisko neutrofilii stwierdzone w pierwszych dniach życia, znajdują potwierdzenie w piśmiennictwie (9, 14, 17, 21). Uważa się, że wzrost procentu granulocytów obojętnochłonnych po urodzeniu może być związany ze wzrostem poziomu kortykoidów we krwi, których stężenie wzrasta w czasie porodu (3, 8).

Stożenie fagocytozy określane za pomocą odczynu fagocytnego nie wykazał różnic statystycznie istotnych ( $p > 0,05$ ) między dwiema grupami cieląt. Stwierdzono wzrost średnich wartości odczynu w 3 dniu życia, a następnie spadek w 7 dniu życia i ponowny wzrost wartości w 14 dniu życia. Wyniki przeprowadzonych badań są zbliżone do wyników badań innych autorów, którzy wykazali ścisłą zależność między stopniem fagocytozy a podawaniem siary nowo narodzonemu cielętom (8, 9). Z licznych danych piśmiennictwa wynika, że zmienność odczynu fagocytnego może być powodowana wieloma czynnikami, jak np. poziomem immunoglobulin w sianie (8, 9), poziomem kortykoidów (5, 8) oraz stanem odporności immunologicznej krów matek w czasie ciąży (12, 13).

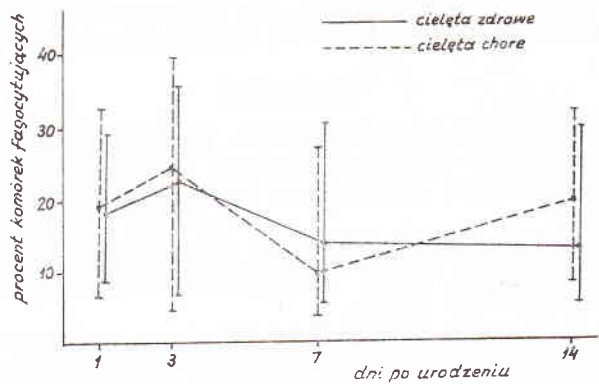
Interesującym elementem badań własnych zdaje się być pewna zależność między zmianami w obrazie białokrwinkowym a wartościami wskaźnika fagocytnego. Zależność tę ilustrują ryc. 1 i 2. Stwierdzono mianowicie, że spadkowi ogólnej liczby leukocytów w 3 dniu życia cieląt towarzyszył wzrost wartości odczynu fagocytnego. Z kolei przy wzroście liczby leukocytów między 3 a 7 dniem życia wartości odczynu obniżyły się. Stwierdzono także, że w kolejnych dniach życia cieląt odsetek komórek fagocytnych wykazał znaczne wahania, natomiast ogólna liczba tych komórek w krwiobiegach malała (ryc. 3). Powstaje więc pytanie czy warunki żywienia i utrzymania nowo narodzonych cieląt, a zwłaszcza ilość i sposób podawania siary wpływają na zdolności żerne granulocytów? Zagadnienie to jest przedmiotem dalszych badań.

Kształtowanie się średnich wartości testu NBT u cieląt w zależności od stanu klinicznego i wieku przedstawiono w tab. 1. Porównując dwie grupy cieląt stwierdzono istnienie nieznacznych różnic między średnimi.

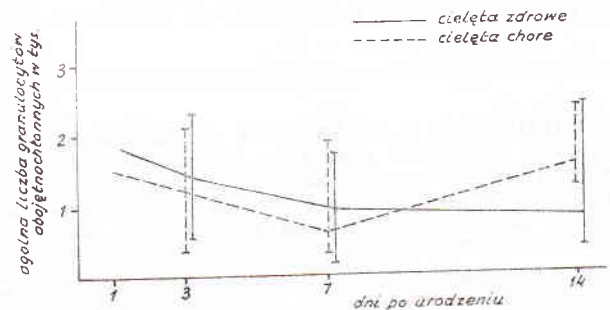
Interpretacja uzyskanych wyników jest trudna z uwagi na dość szeroki zakres wartości indywidualnych testu. W teście NBT spontanicznym największe różnice zaobserwowano w 3 i 7 dniu życia cieląt. W teście NBT pobudzonym największe różnice miały miejsce w 1, 3 i 7 dniu życia cieląt. W dostępnym piśmiennictwie istnieją nieliczne dane dotyczące wykorzystania testu NBT do diagnostyki różnicowej zakażeń bakteryjnych, wirusowych i



Ryc. 1. Wykres ogólnej liczby leukocytów we krwi cieląt w pierwszych dniach życia



Ryc. 2. Wykres procentu komórek fagocytnych we krwi cieląt w pierwszych dniach życia



Ryc. 3. Wykres ogólnej liczby granulocytów obojętnochłonnych we krwi cieląt w pierwszych dniach życia

Pasożytniczych. Zaobserwowano podwyższone wyniki testu w chorobach bakteryjnych i pasożytniczych, natomiast w chorobach wirusowych i chorobach wirusowych powikłanych czynnikiem bakteryjnym wyniki były niejednoznaczne (12, 13, 16). Z analizy piśmiennictwa wynika, że na aktywność metaboliczną komórek fagocytnych może wpływać szereg bardzo różnych czynników, jak np.: podawanie chemoterapeutyków, toksyczne produkty rozpadu tkanek w procesach nowotworowych

i oparzeniach, poziom immunoglobulin w surowicy krwi i inne (10, 15, 16, 18, 20). W czasie zakażenia bakteryjnego następuje wzrost liczby leukocytów wraz z uruchomieniem rezerw granulocytów obojętnochłonnych. W następstwie tego w krwioobiegu pojawiają się różne postacie granulocytów o różnym natężeniu przemian metabolicznych. Można przypuszczać, że trudności w interpretowaniu wyników testu NBT spowodowane są brakiem pełnego poznania zależności między komórką fagocytującą a otaczającym ją środowiskiem, zwłaszcza gdy warunki bytowania cieląt nie odpowiadają potrzebom fizjologicznym tych zwierząt.

Przedstawione wyniki badań ze względu na niewielką ilość materiału nie pozwalają na pełną i szczegółową ocenę przedstawionych zjawisk u cieląt noworodków. Poczynione wstępne badania stały się przyczynkiem do dalszych badań, które są kontynuowane.

### Wnioski

1. Największą aktywność fagocytarną granulocytów obojętnochłonnych we krwi cieląt noworodków stwierdzono w trzecim dniu życia.

2. Odczyn fagocytarny i test redukcji NBT u badanych cieląt zdrowych i chorych nie wykazywały różnic.

3. U cieląt noworodków zdrowych i chorych stwierdzono odwrotną zależność między liczbą leukocytów a odczynem fagocytarnym.

### Piśmiennictwo

1. *Baehner R. L., Nathan D. G.*: New Engl. J. Med. 278, 971, 1968.
2. *Cygiert S.*: Pol. Arch. wet. 18, 217, 1975.
3. *Eberhard R. J., Patt J. A.*: Am. J. vet. Res. 32, 1921, 1971.

4. *Freeman R., King, Kite P.*: J. Clin. Path. 26, 57, 1973.
5. *Hartman H., Heilmann P., Meyer H., Steinbach G.*: Arch. exp. Vet. Med. 30, 59, 1976.
6. *Horst A.*: Molekularne podstawy chorób. PZWL 1979.
7. *Jarstrand C.*: Scand. J. Infect. Dis. 9, 5, 1977.
8. *La Motte G. B., Eberhard R. J.*: Am. J. vet. Res. 37, 1190, 1976.
9. *Lombardo M. S., Todhunter D. A., Scholz R. W., Eberhard R. J.*: Am. J. vet. Res. 40, 362, 1979.
10. *Matusiewicz R.*: Wiad. lek. 32, 1283, 1979.
11. *Park B. H., Frikring S. M., Smithwick E. M.*: Lancet 2, 532, 1968.
12. *Poll G., Faravelli G.*: Clinica Vet., Milano. 97, 248, 1974.
13. *Renshaw H. W., Ecblad W. P., Thacker D. L., Frank F. W.*: Am. J. vet. Res. 37, 1267, 1976.
14. *Salwa A., Wolańczyk-Rutkowiak K., Tyzenhauz-Malinowska K.*: Mat. Sesji Nauk. Min. Rol., PTNW o/Gdańsk, 1980.
15. *Salwa A.*: Medycyna Wet. 36, 737, 1980.
16. *Sara I. S., Dwarakraht P. K.*: Indian J. Anim. Sci. 47, 362, 1977.
17. *Schalm O. W., Jain N. C., Carrall E. J.*: Veterinary hematology Lea Febiger, 1975.
18. *Sulek K., Jędrzejczak, Frank A., Piskorska H., Piotrow-*

### Сальва А. — Вступительные исследования фагоцитарной функции нейтрофильных гранулоцитов в крови новорожденных телят

На 23 телятах на 1, 3, 7 и 14 день жизни исследовалось число лейкоцитов, лейкоцитарная картина, фагоцитарная реакция и тест восстановления NBT. Отметились значительные колебания результатов и отсутствие существенных различий между результатами фагоцитарной реакции и теста восстановления NBT у здоровых и больных телят. Одновременно наблюдалось, что при росте числа лейкоцитов понижались величины фагоцитарной реакции.

### Salwa A. — Preliminary examinations on the phagocytic activity of neutrophils in the blood of newborn calves

The examinations were carried out on 23 calves in the 1st, 3rd, 7th, and 14th day of their life to assess the number of leukocytes, leukocytic picture, phagocytosis and NBT test. The results showed large fluctuations and the differences between the findings regarding phagocytosis and NBT in normal and diseased calves were not significant. It was found that along with an increase of leukocytes the values of phagocytosis went down.

**OULDRIIDGE E. J., FRANCIS M. J., BLACK L.**: Odpowiedź humoralna prosiąt na szczepionkę przeciwpryszczycową w emulsji olejowej: udział różnych klas przeciwciał (Antobody response of pigs to foot-and-mouth disease oil emulsion vaccine: the antibody classes involved). Res. Vet. Sci. 32, 327—331, 1982 (3).

W badaniach stosowano szczepionkę przeciwpryszczycową opartą o szczep O1, A24 i C3 wirusa namnożony na hodowli nerki płodu chomika, zawieszoną w zawieszynie Marcolu 52, Arlacelu A i Tween 80. Warchlaki w wieku 10 dni życia szczepiono domięśniowo 2 ml szczepionki i rewakcywowano po 21 i 148 względnie 106 dniach po pierwszym szczepieniu. Pierwotna odpowiedź immunologiczna pojawiła się po 8 dniach po szczepieniu, osiągała maksymalny poziom między 14 i 21 dniem i utrzymywała się na wysokim poziomie do rewakcytacji. Przeciwciała zobojętniające wirus, które pojawiły się 9 dnia po szczepieniu należały do klasy IgM. Natomiast przeciwciała które pojawiły się między 10 i 14 dniem po szczepieniu występowały w klasie IgM i IgG immunoglobulin. Po 25 dniach po szczepieniu wszystkie przeciwciała neutralizujące wirus występowały w klasie IgG. Rewakcywna powodowała wzrost miana przeciwciał zobojętniających wirus. Występowały one zarówno w klasie IgM jak i IgG immunoglobulin.

G.

**TOOFANIAN F., TARGOWSKI S. P.**: Rozwój w życiu płodowym i rozmieszczenie fosfatazy zasadowych w jelitach królika. (Fetal development and distribution of intestinal alkaline phosphatase in the rabbit). Res. Vet. Sci. 32,30 3—305, 1982 (3).

Aktywność fosfatazy zasadowej stwierdzono w jelitach cienkich 14-dniowych płodów króliczych (14,7 j/mg białka). W okresie 14—20 dni życia płodowego aktywność tego enzymu w jelitach cienkich nie ulegała większym zmianom. Wynosiła ona około 40% aktywności stwierdzanej w jelitach noworodków. Od 22 dnia życia płodowego aktywność fosfatazy zasadowej w jelitach wzrastała z  $0,5 \pm 0,5$  j/mg białka do  $29,8 \pm 2,0$  j/mg białka u 28 dniowego płodu. U noworodków wynosiła ona w dwunastnicy  $40,1 \pm 22,9$ ; w jelicie czczym  $28,3 \pm 3,5$  i w jelicie biodrowym  $18,2 \pm 3,5$  j/mg białka. Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic w aktywności fosfatazy zasadowej w jelitach noworodków, królików w wieku 4 tygodni życia i królików dojrzałych. Zarówno u płodów jak i u noworodków najwyższą aktywnością fosfatazy zasadowej cechuje się dwunastnica, zaś u młodych i dojrzałych królików jelito czcze ( $45,1 \pm 8,0$  i  $51,5 \pm 5,1$  j/mg białka).

G.