

EDWARD MALINOWSKI, KRYSZYNA KUŻMA, SYBILLA SOBOLEWSKA, ANNA KŁOSSOWSKA

Aktywność metaboliczna komórek fagocytycznych mleka i krwi krów zdrowych i z zapaleniem wymienia^{*})

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,
ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Malinowski E., Kuźma K., Sobolewska S., Kłossowska A.

Metabolic activity of milk and blood phagocytic cells in samples from healthy and mastitic cows

Summary

The levels of luminol enhanced chemiluminescence in samples of udder secretion and blood taken from healthy cows as well as from cows with subclinical mastitis were examined. Luminometer 1251 and computer programme LKB Pharmacia were used to conduct the study. The spontaneous and zymosan induced chemiluminescence was directly related with the somatic cell count in milk or PMNs count in blood. However, the capacity of single cells for creating reactive oxygen metabolites in milk from healthy cows and in blood taken from cows with the subclinical form of mastitis was the highest. The coefficient ($mV/10^5$ milk somatic cells or blood granulocytes) of both spontaneous and zymosan induced chemiluminescence was the lowest in secretions taken from clinically inflamed udders.

Fagocytoza jest podstawowym mechanizmem przeciwbakteryjnym gruczołu mlekowego krowy. W mleku pochodzącym ze zdrowego gruczołu przeważają makrofagi, a w wydzielinie zapalnej dominują granulocyty obojętnochłonne (22, 26, 35). Wewnątrzkomórkowe niszczenie (zabijanie) pochłoniętych cząstek odbywa się na drodze niezależnej (8, 20) oraz zależnej od tlenu (5, 11, 27). Już w fazie chemotaksji i adherencji zachodzi aktywacja oksydazy zależnej od zredukowanego fosforanu dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) i wzmoczone glikoliza, czemu towarzyszy podwyższone zapotrzebowanie na tlen. Zużycie tlenu zwiększa się wielokrotnie i proporcjonalnie do ilości pochłoniętych cząstek. Proces ten nosi nazwę „respiratory burst” i prowadzi do generacji reaktywnych metabolitów tlenu (RMT) takich jak anionorodnik ponadtlenowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy i tlen syngletowy (2, 5, 7). Wymienione formy tlenu, a także tlenki azotu tworzą wraz z białkami kationowymi (defensyny) i enzymami hydrolitycznymi, wysoce toksyczne środowisko wewnątrz fagolizosomu. W przypadku wydostania się zawartości fagolizosomu poza obręb komórki fagocytycznej, a także wskutek nadmiernego wytwarzania RMT dochodzi do uszkodzenia tkanek i narządów (1, 16). Reaktywne metabolity tlenu nazy-

wane też wolnymi rodnikami, odpowiedzialne są za wiele chorób ludzi (1, 12, 27) i zwierząt (16, 21).

Jedną z metod określania poziomu reaktywnych form tlenu są pomiary chemiluminescencji (3, 11). Przejściu form wzbudzonych do stanu podstawowego towarzyszy emisja kwantu promieniowania elektromagnetycznego. W celu wzmocnienia naturalnej chemiluminescencji, która towarzyszy procesom życiowym, do badanego układu dodaje się związki o dużej wydajności światła. Związkiem, który pozwala ocenić jednoczesne występowanie różnych rodników tlenowych, jest luminol (3).

Poziom chemiluminescencji wskazuje na zdolność komórek do efektywnej fagocytozy (3, 5, 11, 32). Celem badań była ocena chemiluminescencji spontanicznej i stymulowanej zymosanem w próbkach mleka, wydzieliny gruczołu mlekowego oraz krwi od krów zdrowych i chorych na zapalenie wymienia.

Materiał i metody

Materiałem do badań były próbki mleka pobierane od krów zdrowych, próbki wydzieliny z gruczołów objętych podklinicznym stanem zapalnym i próbki wydzieliny zmienionej makroskopowo, pobrane z ćwiartek wymienia wykazujących *mastitis* z objawami klinicznymi. Od tych samych krów zdrowych i chorych na zapalenie wymienia pobrano też próbki krwi. Materiał schładzano do temp. około $+4^{\circ}C$ i transportowano do laboratorium, po czym wstawiano do termostatu o temp. $37^{\circ}C$ na okres 20 minut.

^{*}) Praca wykonana w ramach grantu KBN 5PO6K02108.

Tab. 1. Poziom chemiluminescencji w próbkach mleka i wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego ($\bar{x} \pm s$)

Wskaźnik	Charakterystyka wydzieliny		
	mleko zdrowe (kontrola) n=18	<i>mastitis subclinica</i> n=24	<i>mastitis clinica</i> n=22
Liczba komórek somatycznych $\times 10^3$ /ml mleka	211 \pm 136	3228 \pm 3082 p<0,01	38 108 \pm 22 506 p<0,01
Chemiluminescencja spontaniczna mV/0,5 ml mleka	666 \pm 26	1307 \pm 1101 p<0,002	4121 \pm 3909 p<0,001
Wskaźnik CLM spontanicznej	871 \pm 603	162 \pm 192 p<0,001	45 \pm 69 p<0,001
Chemiluminescencja indukowana mV/0,5ml mleka	763 \pm 227	3827 \pm 3417 p<0,01	5789 \pm 6370 p<0,002
Wskaźnik CLM indukowanej	946 \pm 617	398 \pm 468 p<0,01	60 \pm 10 p<0,01

Objaśnienie: wskaźnik CLM – mV/10⁵ komórek somatycznych; istotność różnic w stosunku do materiału od krów zdrowych.

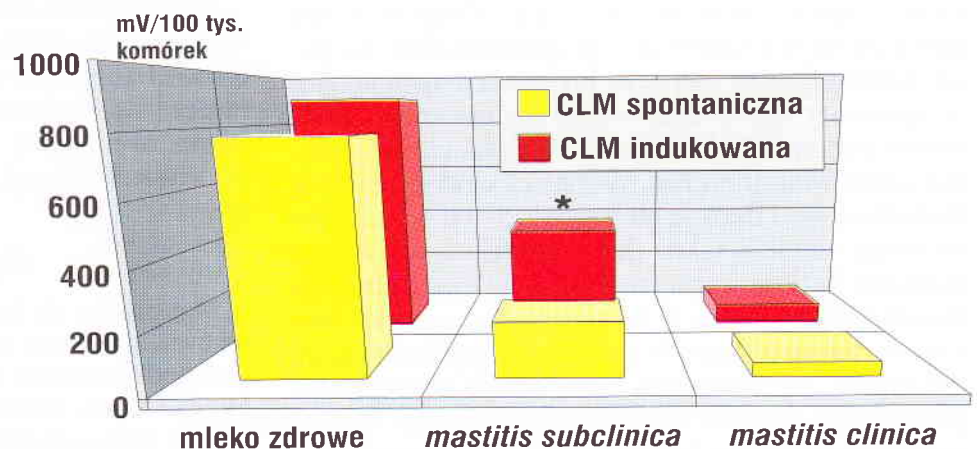
Próbki mleka (wydzieliny zapalnej) wysiewano na podłoża bakteriologiczne. Za pomocą automatu fossmatic określano w nich liczbę komórek somatycznych. Krew poddawano badaniu hematologicznemu.

Przygotowanie materiału do oceny chemiluminescencji polegało na przeniesieniu do plastikowych probówek 0,5 ml mleka (wydzieliny zapalnej) lub 0,1 ml krwi, do której dodawano 0,4 ml PBS. Do płynu wprowadzano po 20 μ l roztworu luminolu (IE Anglia) o roboczym stężeniu 10⁻⁴ M i całość inkubowano w temp. 37°C przez 10 minut. Probówki wstawiano do karuzeli Luminometru 1251 BIO-ORBIT (LKB Pharmacia), po czym następował odczyt zerowy (chemiluminescencja spontaniczna) i w tym momencie dispenser automatycznie podawał po 50 μ l zymosan (Sigma) opsonizowanego surowicą bydłą. Kolejne odczyty następowały co 5 minut (chemiluminescencja stymulowana) w okresie pół godziny. Wyniki wyrażone w miliwoltach poddano analizie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta dla prób zależnych i niezależnych. Wyliczono szacunkowy „wskaźnik chemiluminescencji” dla 100 000 komórek fagocytykujących krwi lub wydzieliny gruczołu mlekowego.

Wyniki i omówienie

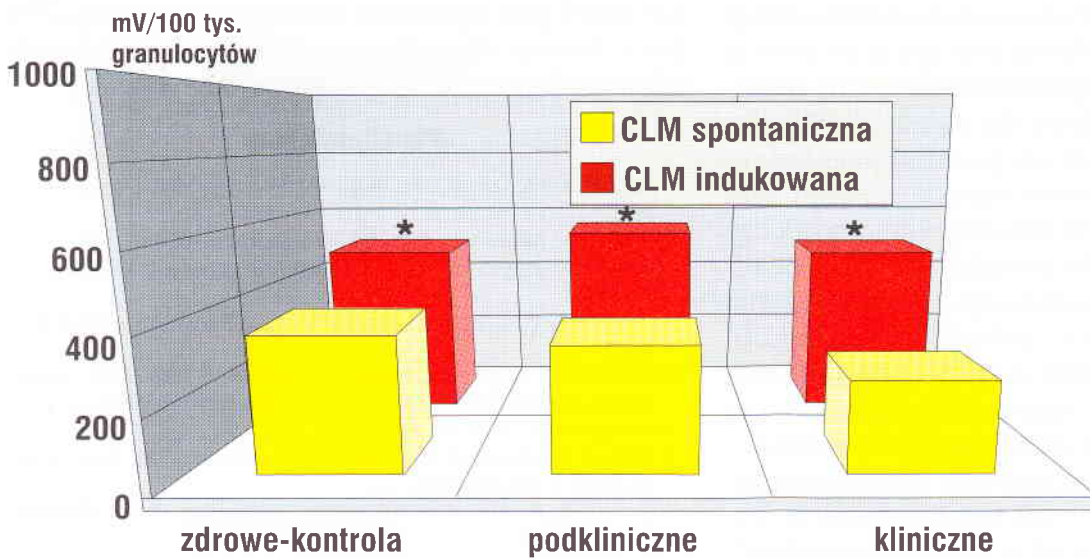
Poziom chemiluminescencji (CLM) w próbkach wydzieliny gruczołu mlekowego przedstawiono w tab. 1. Z danych wynika, że generacja reaktywnych form tlenu wyrażona w miliwoltach miała związek z liczbą komórek somatycznych. Najniższy poziom chemiluminescencji spontanicznej jak też indukowanej zymosanem wykazano w 0,5 ml mleka zdrowe-

go, a najwyższy w wydzielinie zapalnej zmienionej makroskopowo. Dodać należy, że najwyższą wartość chemiluminescencji indukowanej (pik) notowano najczęściej w 10 lub 15 minucie pomiaru. Jednak pojedyncze granulocyty i makrofagi znajdujące się w zdrowym mleku cechowały się wyższą, w porównaniu z wydzieliną zapalną zdolnością do generowania reaktywnych form tlenu, co wyraża szacunkowy wskaźnik chemiluminescencji. Wskaźnik ten wyliczony dla 100 tysięcy komórek wydzieliny pochodzącej z gruczołów objętych zapaleniem podklinicznym był niższy, najniższy zaś w przypadku wydzieliny zmienionej makroskopowo. Najwyższy przyrost chemiluminescencji indukowanej zymosanem zachodził w wydzielinie z gruczołów objętych zapaleniem podklinicznym. Najślabiej na zymosan reagowały pojedyncze komórki znajdujące się w zmienionej makroskopowo wydzielinie zapalnej (ryc. 1).



Ryc. 1. Wartości wskaźnika chemiluminescencji (CLM) spontanicznej i indukowanej wyliczonego dla 100 tys. komórek somatycznych

Objaśnienie: * – różnice istotne statystycznie przy P < 0,05.



Ryc. 2. Wartości wskaźnika chemiluminescencji (CLM) spontanicznej i indukowanej wyliczonego dla 100 tys. granulocytów we krwi

Objaśnienie: * – różnice istotne statystycznie przy $P < 0,001$.

W tab. 2 umieszczono dane odnośnie chemiluminescencji w pełnej krwi od krów zdrowych i chorych na zapalenie wymienia. Krowy chore z objawami klinicznymi cechowały się statystycznie wyższą liczbą granulocytów, ale chemiluminescencja spontaniczna u tych krów była niższa niż u zdrowych. Najwyższy poziom chemiluminescencji stymulowanej zymosanem stwierdzono w 0,1 ml krwi krów chorych z objawami klinicznymi. Jednak wskaźnik chemiluminescencji indukowanej u tych krów był taki sam jak u zwierząt zdrowych. Najbardziej podatne na stymulację zymosanem były granulocyty krwi krów wykazujących *mastitis subclinica* (ryc. 2).

możność pojedynczych komórek do fagocytozy i wewnątrzkomórkowego niszczenia drobnoustrojów na drodze zależnej od tlenu jest najwyższa w zdrowym gruczole mlekowym. Podobne spostrzeżenia poczynił też Zecconi i wsp. (35). Podatność na infekcje i *mastitis* łączona jest z niskim poziomem chemiluminescencji (4, 34). Dodać należy, że granulocyty krwi krów starszych są mniej aktywne w generowaniu reaktywnych form tlenu w porównaniu z pierwiastkami, które są bardziej odporne na choroby w okresie poporodowym (10). Komórki fagocytujące krwi krów oceniane w ostrej fazie zapalenia wymienia wykazują słabszą zdolność do wytwarzania RMT

Tab. 2. Poziom chemiluminescencji w pełnej krwi od krów zdrowych i chorych na zapalenie wymienia ($\bar{x} \pm s$)

Wskaźnik	Charakterystyka krów		
	zdrowe (kontrola) n=20	<i>mastitis subclinica</i> n=18	<i>mastitis clinica</i> n=20
Liczba granulocytów/ μ l krwi	2422 \pm 1291	2626 \pm 1539 $p=0,629$	3751 \pm 2577 $p<0,05$
Chemiluminescencja spontaniczna mV/0,1 ml krwi	697 \pm 41	672 \pm 30 $p=0,032$	686 \pm 43 $p=0,370$
Wskaźnik CLM spontanicznej	357 \pm 179	338 \pm 191 $p=0,736$	244 \pm 144 $p=0,024$
Chemiluminescencja indukowana mV/0,1 ml krwi	990 \pm 257	1157 \pm 344 $p=0,066$	1517 \pm 647 $p=0,003$
Wskaźnik CLM indukowanej	488 \pm 217	556 \pm 327 $p=0,406$	493 \pm 253 $p=0,947$

Objaśnienie: wskaźnik CLM – mV/10⁵ granulocytów; istotność różnic w stosunku do materiału od krów zdrowych.

Przeprowadzone badania wykazały, że pula reaktywnych form tlenu ma związek z liczbą granulocytów krwi, jak też liczbą komórek w mleku oraz pochodzeniem badanego materiału. Różne płyny ustrojowe mogą wykazywać inną zdolność do wytwarzania toksycznych rodników tlenowych (33). Skład komórek somatycznych zmienia się w czasie zapalenia, kiedy wzrasta liczba neutrofilii (11, 29, 31). Jednak zdol-

(4) oraz migracji (13). Poziom chemiluminescencji wytwarzanej przez granulocyty krwi spada po iniekcji deksametazonu (24). Aktywność metaboliczna granulocytów mierzona zdolnością do redukcji NBT ulega osłabieniu w przypadkach podklinicznej ketozy (14), jak też w początkowym okresie rozwoju *colimastitis* (23). Metabolizm tlenowy pobudza między innymi INF gamma (29) i prolaktyna (25). Chemiluminescencję *in vitro* hamują np. wysokie stężenia Mastisanu (15), ASA (18), pobudza zaś LPS (28), Mastisan w niskim stężeniu (15), cytokiny (24, 30) i dimer lizozymu (19). Z aktywnością metaboliczną komórek fagocytujących znajdujących się w wydzielinie zapalnej ma związek zarówno skuteczność terapii antybiotykowej (9) jak też efektywność Lydium-KLP (17). W warunkach mikroaerofilnych upośledzone jest przede wszystkim wewnątrzkomórkowe zabijanie drobnoustrojów (11, 26, 32). Skuteczność systemu obronnego wymienia zależy od szybkości i wielkości odpowiedzi migracyjnej granulocytów i ich zdolności do niszczenia bakterii w ognisku infekcji (31). Nadmierna, nieadekwatna do bodźca, ostra lub przewlekła odpowiedź zapalna, może być przyczyną uszkodzeń tkanki gruczolowej i utraty mleczości, a nawet rozległej martwicy lub śmierci zwierzęcia (4, 16).

Uzyskane wyniki wydają się tłumaczyć trudności z pobudzeniem do fagocytozy komórek znajdujących się w wydzielinie zapalnej gruczołu objętego *mastitis*. Lepszą zdolnością do generowania reaktywnych form tlenu cechują się granulocyty obecne w krwiobiegu. Napływ do chorego wymienia świeżych granulocytów może mieć korzystny wpływ na wyniki terapii. Prosty zabieg, który do tego celu prowadzi jest częste zdajanie i masaż. Usuwanie wraz z wydzieliną zapalną granulocytów zużytych metabolicznie prowadzi do diapedezy świeżych, aktywnych. W związku z tym pewien korzystny wpływ mogą mieć preparaty (leki) dowymieniowe, które wykazują działanie lekko drażniące. Sprawny układ obronny zwiększa bowiem efektywność nawet niskich dawek antybiotyków, a z kolei dawki wysokie mogą okazać się nieskuteczne w przypadkach osłabionej fagocytozy (6, 9, 26).

W podsumowaniu można stwierdzić, iż poziom indukowanej chemiluminescencji w próbkach pełnej krwi i wydzieliny gruczołu mlekowego krów zdrowych i z zapaleniem wymienia, ma związek z liczbą komórek fagocytujących obecnych w tych płynach. Fagocyty zdrowego mleka wykazują jednak wyższą aktywność w wytwarzaniu reaktywnych metabolitów tlenu w porównaniu z komórkami wydzieliny zapalnej. Stan zdrowia gruczołu mlekowego nie wywierał natomiast istotnego wpływu na wytwarza-

nie RMT pod wpływem zymosanu przez fagocyty krwi. Pomiar chemiluminescencji pozwala ocenić zdolność komórek do efektywnej fagocytozy.

Piśmiennictwo

1. Andrzejczak R., Goch J. H., Jurga M.: Post. Hig. Med. Dośw. 49, 531, 1995.
2. Badwey A., Karnovsky M. L.: Ann. Rev. Biochem. 49, 695, 1980.
3. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 1995.
4. Belotsky A.: Proc. 3rd Inter. Mastitis Seminar, TelAviv 1995, Vol. I, Sess. 1, s. 3.
5. Burvenich C., Paape M. J., Hill A. W., Guidry A. J., Miller R. H., Heyneman R., Kremer W. D. J., Brand A.: Vet. Quart. 16, 45, 1994.
6. Craven N.: Br. vet. J. 143, 410, 1987.
7. Cross A. R., Higson F. K., Jones O. T. G., Harper A. M., Segal A. W.: Biochem. J. 204, 479, 1982.
8. Cullor J. S., Wood S., Smith W., Panico L., Selsted M. E.: Vet. Microbiol. 29, 49, 1991.
9. Daley J. M., Oldham E. R., Williams T. J., Coyle P. A.: Am. J. vet. Res. 52, 447, 1991.
10. Gilbert R. O., Gröhn Y. T., Miller P. M., Hoffman D. J.: Vet. Immunol. Immunopathol. 36, 75, 1993.
11. Heyneman R., Burvenich C., Vercauteren R.: J. Dairy Sci. 73, 985, 1990.
12. Komosińska K., Olczyk K.: Post. Hig. Med. Dośw. 49, 733, 1996.
13. Kremer W. D. J., Noordhuizen-Stassen E. N., Grommers F. J., Daemen A. J. J. M., Brand A.: J. Dairy Sci. 76, 2613, 1993.
14. Kuźma K., Kuźma R., Malinowski E.: Bull. Vet. Inst. Pulawy 41, 55, 1997.
15. Kuźma K., Malinowski E.: Mat. II Kraj. Symp. Immunol. Weterynaryjnych, Szczecin-Świnoujście 1997, s. 185.
16. Lohuis J. A. C. M., Schukken Y. H., Verheijden J. H. M., Brand A., Van Miert A. S. J. P. A. M.: J. Dairy Sci. 73, 333, 1990.
17. Malinowski E., Kłossowska A.: Bull. Vet. Inst. Pulawy 41, 49, 1997.
18. Malinowski E., Kuźma K., Sobolewska S.: Bull. Vet. Inst. Pulawy, 1997 (oddano do druku).
19. Malinowski E., Kuźma K., Kłossowska A.: Vet. Immunol. Immunopathol., 1997 (oddano do ruku).
20. Mayer S. J., Craven N., Keen P. M., Bourne F. J.: Res. Vet. Sci. 44, 324, 1988.
21. Miller J. K., Brzezińska-Ślebodzińska E., Madsen F. C.: J. Dairy Sci. 76, 2812, 1993.
22. Miller R. H., Paape M. J., Fulton L. A.: J. Dairy Sci. 74, 3782, 1991.
23. Nagahata H., Yatsu A., Noda H.: Br. vet. J. 142, 578, 1986.
24. Reddy P. G., McVey D. S., Chengappa M. M., Błecha F., Minocha H. C., Bacer P. E.: Am. J. vet. Res. 51, 1395, 1990.
25. Rovinsky J., Vigan M., Marek J., Blazickova S., Korcakova H.: Inter. J.: Immunopharmacology 13, 267, 1991.
26. Sandholm M., Honkanen-Buzalski T., Kaartinen L., Pyörälä S.: The bovine udder and mastitis. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine. Jyväskylä 1995.
27. Sikora A.: Pol. J. Immunol. 20, 87, 1995.
28. Silva I. D., Jain N. C., Farver T. B., Zinkl J. G.: J. Dairy Sci. 71, 2513, 1988.
29. Sordillo L. M., Babiuk L. A.: Vet. Immunol. Immunopathol. 27, 393, 1990.
30. Sordillo L. M., Afseth G., Davies G., Babiuk L. A.: Can. J. vet. Res. 56, 16, 1992.
31. Werven von T., Noordhuizen-Stassen E. L., Daemen I. J. J. M., Burvenich C., Dosogne H., Schukken Y. H., Brand A.: Proc. 3rd Inter. Mastitis Seminar. TelAviv 1995, Vol. I, Sess. 1, s. 14.
32. Williams M. R., Craven N., Field T. R., Bunch K. J.: Br. vet. J. 141, 362, 1985.
33. Velev B., Fichorova R., Georgieva R.: Central Europ. J. Immunol. 21, 127, 1996.
34. Zeconi A., Bronzo V., Piccinni R., Sprafico G., Ruffo G.: J. Dairy Res. 61, 271, 1994.
35. Zeconi A., Bronzo V., Hamann J., Casula A.: Proc. 3rd Inter. Mastitis Seminar, TelAviv 1995, Vol. I, Sess. 1, s. 28.