

# Wpływ stresu transportowego na stopień wrażliwości leukocytów na działanie leukotoksyny *Mannheimia haemolytica*

RENATA URBAN-CHMIEL, ANDRZEJ PUCHALSKI, ANDRZEJ WERNICKI

Zakład Prewencji Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Urban-Chmiel R., Puchalski A., Wernicki A.

## Influence of transport stress on susceptibility of bovine leukocytes on cytotoxic effect of *M. haemolytica* leukotoxin

### Summary

The purpose of the study was estimating the viability and susceptibility effect of leukocytes isolated from cattle before and after the transportation in vitro on *M. haemolytica* leukotoxin (Lkt) cytotoxicity. 40 Simentaler heifers that were transported by truck a distance of 1700 km for 72 hours were used in the experiment. The material for the study was the blood (40 samples) collected on heparin directly before and after transportation. In relation to leukocytes the examination of susceptibility on cytotoxic effect of Lkt has been carried out with the use of MTT (microtitration assay) and the viability of leukocytes after 1, 2, 3 and 6 hour of incubation. The results obtained in the cell viability test did not show statistically significant differences ( $P \geq 0.05$ ) in 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> hour of incubation in leukocytes obtained from heifers before and after transportation. After the 1<sup>st</sup> hour of incubation the percentage of leukocyte viability was on a very high level and showed 87% in both groups of animals. The significantly lower cell viability values in comparison to leukocytes isolated from animals before the transportation was observed in the transported heifers from 3<sup>rd</sup> to 6<sup>th</sup> hour of incubation. The analysis of the results obtained by MTT test indicated statistically significant differences in the susceptibility of leukocytes for cytotoxic activity of Lkt. The average values of toxic activity of Lkt in relation to leukocytes isolated before and after transportation was 79% and 92% respectively. The lytic activity of Lkt for 50% of the cell population referred as 1 unit (1U) was observed in Lkt concentration 15 mg/ml (leukocytes before transportation) and 7.5 mg/ml (after the transportation). The increase of susceptibility of leukocytes isolated after transportation on the cytotoxic effect of leukotoxin suggest the significant influence of transporting stress on the increase of respiratory diseases caused by *M. haemolytica* strains.

**Keywords:** *M. haemolytica*, transporting stress, leukotoxin (Lkt)

Stres jest jednym z podstawowych, egzogennych czynników usposabiających do zachorowań i padnięć bydła, szczególnie zaś zwierząt przewożonych w nieodpowiednich warunkach (9, 13, 15). Typowym wyznacznikiem reakcji organizmu na czynniki stresowe jest zwiększona produkcja steroidowych hormonów nadnerczowych, głównie kortyzolu, jako efekt pobudzenia układów współczulnego i przywspółczulnego oraz osi podwzgórze–przysadka–nadnercza (15, 19, 30). Oddziaływanie glikokortykoidów na komórkowe mechanizmy obronne organizmu, polega na osłabieniu zdolności migracyjnych komórek, supresji wydzielania cytokin przez limfocyty T, a także hamowaniu wzrostu i różnicowania limfocytów B. Sterydy nadnerczowe powodują między innymi obniżenie ogólnej liczby leukocytów i makrofagów, które w skrajnych przypadkach przyjmują wartości około 20-krotnie niższe od fizjolo-

gicznych. U makrofagów obwodowych obserwuje się osłabienie migracji, a limfocyty wykazują obniżenie zdolności blastogenezy (1, 4, 16, 20, 22, 23).

W etiopatogenezie chorób układu oddechowego bydła dominującą rolę przypisuje się czynnikom zakaźnym. Drobnoustrojem najczęściej izolowanym z klinicznych przypadków chorób płuc bydła jest *M. haemolytica*. Wytwarzana przez ten drobnoustrój leukotoksyna (Lkt) ma silne, wybiórcze powinowactwo do leukocytów oraz makrofagów płucnych bydła (3, 23). Powinowactwo to jest uwarunkowane, między innymi, obecnością specyficznych receptorów  $\beta_2$ -integrynowych, zlokalizowanych w ścianach tych komórek (2, 5, 7, 8, 17).

Mechanizm działania Lkt polega na cytolizie komórek, poprzez tworzenie mikropor w błonie makrofagów i leukocytów. Wnikająca do cytoplazmy toksyna zakłóca gradient  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ , co prowadzi w efekcie do śmierci ko-

mórki na drodze koloidalno-osmotycznej, określanej także jako apoptoza bądź nekroza (6, 14, 25). Ekspozycja leukocytów bydłęcych na działanie Lkt indukuje również morfologiczne zmiany wewnątrzkomórkowe związane z procesami apoptozy oraz ma bezpośredni wpływ na indukcję fragmentacji DNA komórki. Według Sun i Clinckenbeard (25) zdolność Lkt do indukcji apoptozy może stanowić ważny czynnik w zapoczątkowaniu i rozwoju syndromu oddechowego bydła, powstającego po transporcie zwierząt.

Celem badań była ocena żywotności oraz stopnia wrażliwości leukocytów w hodowli *in vitro*, izolowanych od bydła przed i po transporcie, na cytotoksyczne oddziaływanie leukotoksyny *M. haemolytica* serotyp 1.

### Materiał i metody

W eksperymencie wykorzystano jałowice rasy simmental, o masie 360-450 kg transportowane z Austrii do Polski na odległość ok. 1700 km przez 72 godziny. Jednorazowo przewożono 40 sztuk bydła, w dwóch dwupoziomowych ciężarówkach. Podczas transportu zwierzęta były dokarmiane, a także posiadały bezpośredni, nieograniczony dostęp do wody. Powierzchnia przeznaczona na jedno zwierzę wynosiła 1,462 m<sup>2</sup>, zgodnie z wymogami stosownych aktów prawnych (31, 32). Po zakończonym transporcie zwierzęta były w dobrej kondycji. Temperatura wewnętrzna, tętno i oddechy pozostawały w granicach normy fizjologicznej dla tego gatunku zwierząt.

Materiał do badań stanowiło 40 próbek krwi pobranej na heparynę z żyły szyjnej zewnętrznej bezpośrednio przed oraz po transporcie. Uzyskana od zwierząt przed transportem krew była poddawana analizie leukocytów w ciągu 5 godzin po pobraniu. Podobne warunki zastosowano dla leukocytów z próbek uzyskanych od bydła po transporcie. Izolację leukocytów przeprowadzono wg Clinckenbeard i Upton (5). W celu hemolizy erytrocytów, do próbek zawierających po 10 ml pełnej krwi, dodawano po 20 ml wody redestylowanej. Reakcje hamowano przy użyciu 20 ml dwukrotnie stężonego koncentratu Hanksa. Zawiesinę komórek po odwirowaniu (1800 obrotów/10 min.) w 4°C, przepłukiwano dwukrotnie płynem Eagle'a z 10% dodatkiem płodowej surowicy bydłowej (FBS), streptomycyny (50 µg/ml) i penicyliny G (1000 j.m./ml).

Wyizolowane leukocyty, zawieszano następnie w podłożu RPMI 1640 (Sigma) z 10% dodatkiem FBS, streptomycyny (50 µg/ml) oraz penicyliny G (1000 j.m./ml). Zawiesinę komórek o gęstości  $2,5 \times 10^6$ /ml wykorzystano do testu MTT wg Vega i wsp. (26). Do poszczególnych dołków mikropłytki (NUNC) nanoszono po 100 µl zawiesiny leukocytów, które inkubowano w temp. 37°C przez 1 godzinę. Dołki wypełniano następnie 100 µl Lkt zawieszanej w podłożu RPMI 1640. Po inkubacji (45 min. w temp. 37°C) do wszystkich dołków dodawano po 20 µl barwnika MTT o koncentracji 5 mg/ml i inkubowano 4 godz. w temp. 37°C. Do dołków wprowadzano następnie po 100 µl 0,04 M HCl w izopropanolu. Podłoże RPMI 1640 oraz barwnik MTT stanowiły próbę zerową testu, a zawiesina komórek oraz barwnik MTT próbę negatywną. Wyniki analizowano przy użyciu czytnika (Labsystem Multiskan Plus) przy długościach fal 550 i 630 nm.

Tab. 1. Żywotność leukocytów (%) izolowanych od bydła przed i po transporcie ( $\bar{x} \pm SD$ )

Żywotność leukocytów %	Czas inkubacji w godzinach					
	Bezpośrednio po izolacji	1	2	3	4	6
Przed transportem	96 ± 1,00	87 ± 1,20	81 ± 2,00	78 ± 2,0	65 ± 3,6	46 ± 5,60
Po transporcie	94 ± 2,08	87 ± 2,08	78 ± 2,08	65* ± 3,6	57* ± 2,6	37* ± 1,06

Objaśnienia: \*różnice statystycznie istotne ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do leukocytów izolowanych przed transportem

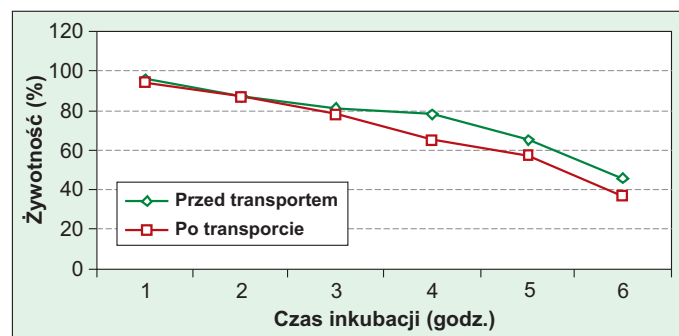
Leukotoksynę uzyskiwano z supernatantu 4,5 godz. hodowli referencyjnego szczepu *M. haemolytica* ser. 1 na podłożu RPMI 1640 wg metody Yoo i wsp. (29).

Ocenę stopnia przeżywalności leukocytów wykonano wg Baluyut i wsp. (3) po 1, 2, 3, 4 i 6 godz. inkubacji w temp. 37°C w podłożu RPMI 1640 z 10% dodatkiem FBS, streptomycyny oraz penicyliny G. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono testem t-Studenta przy użyciu programu Statistica 6.0.

### Wyniki i omówienie

Analiza odsetka żywotności leukocytów wyizolowanych od bydła bezpośrednio po transporcie w porównaniu do wartości uzyskanych przed transportem nie wykazała różnic istotnych statystycznie ( $p \geq 0,05$ ) po pierwszej i drugiej godzinie inkubacji. Po pierwszej godzinie inkubacji żywotność kształtowała się na bardzo wysokim poziomie wynoszącym około 87% leukocytów (tab. 1). Istotnie niższy odsetek żywych leukocytów stwierdzono w oznaczeniach wykonanych od 3. do 6. godziny inkubacji. Przeżywalność tych komórek była istotnie wyższa ( $p \leq 0,05$ ) dla leukocytów izolowanych przed transportem (ryc. 1).

Analiza podatności komórek na cytotoksyczne oddziaływanie Lkt mierzona w teście MTT wykazała istotne różnice ( $p \leq 0,01$ ) w wartościach uzyskanych przed i po transporcie zwierząt. Średni odsetek leukocytów wrażliwych Lkt wynosił  $79\% \pm 2,8$  dla komórek izolowanych przed transportem oraz  $92\% \pm 3,7$  dla leukocytów uzyskanych po jego zakończeniu. Aktywność lityczną w stosunku do 50% populacji leukocytów określaną jako 1 jednostkę cytotoksyczności – 1 U (26), ustalono przy koncentracji Lkt 15 µg/ml oraz 7,5 µg/ml, w stosunku do leukocytów uzyskanych odpowiednio przed oraz po transporcie zwierząt.



Ryc. 1. Średni odsetek żywotności leukocytów izolowanych od bydła przed i po transporcie

Stwierdzone w badaniach własnych różnice w żywotności leukocytów uzyskanych od bydła po oraz przed transportem, jak również różnice w podatności tych komórek na cytotoksyczne działanie Lkt sugerują indukowanie przez czynniki stresowe związane z transportem zmian w podstawowych funkcjach komórek. Stanowi to potwierdzenie wyników badań innych autorów (4, 10).

Można przyjąć, że zwiększona wrażliwość leukocytów izolowanych bezpośrednio po transporcie na cytotoksyczne oddziaływanie Lkt jest skutkiem wzrostu przepuszczalności błony komórkowej, spowodowanej zmianą aktywności kanałów jonowych komórki i tym samym, zakłóceniem gospodarki jonowej leukocytów. Mechanizm oddziaływania glikokortykoidów na błony leukocytów polega głównie na aktywacji transportu jonów  $Ca^{+}$  – zależnych od  $K^{+}$  do wnętrza komórki, co może zachodzić na drodze transportu przez kanały błonowe lub na drodze pinocytozy. W efekcie obserwuje się wzrost mobilizacji jonów  $Ca^{+}$  w przestrzeni wewnątrzkomórkowej (4, 10). Zwiększona reaktywność leukocytów na oddziaływanie Lkt może także być wynikiem wzrostu ekspresji receptorów  $\beta_2$ -integrzynowych, które wg Gahmberg i wsp. (11) zwiększają podatność leukocytów na efekt cytotoksyczny Lkt. Wg Ambagala i wsp. (2), fragmenty CD11<sub>a</sub>/DC18 oraz CD11<sub>b</sub>/CD18 łańcucha  $\beta_2$ -integrzynowego odpowiedzialne są za zwiększoną adhezję Lkt do błony komórkowej, co prowadzi do powstawania efektu cytopatycznego leukocytów.

W wielu badaniach (17, 21, 27, 28) wykazano, że podczas transportu oraz bezpośrednio po jego zakończeniu następuje znaczny wzrost kortyzolu w surowicy zwierząt. W badaniach prowadzonych *in vivo* przez Roth i wsp. (22), oceniających wpływ kortyzolu na funkcje leukocytów wielojądrzastych oraz blastogenezę limfocytów, wykazano znaczne obniżenie zdolności adhezyjnych neutrofilów do śródbłonna naczyń. Nie zaobserwowano natomiast istotnego wpływu podanego kortyzolu na metabolizm leukocytów i makrofagów obwodowych poddanych działaniu intensywnego stresu. Leite i wsp. (18) wykazali, że podczas infekcji bydła herpeswirusem (BHV-1), w warunkach *in vitro* obserwuje się zarówno zwiększoną podatność leukocytów na cytotoksyczny efekt Lkt *M. haemolytica*, jak również wzrost ekspresji błonowych receptorów  $\beta_2$ -integrzynowych.

Podsumowując należy zaznaczyć, że zwiększona wrażliwość leukocytów, izolowanych od bydła po transporcie na efekt cytotoksyczny Lkt, może w istotny sposób wpływać na wzrost zachorowalności na syndrom oddechowy z udziałem szczepów *M. haemolytica*.

## Piśmiennictwo

- Ackerman M. R., Brogden K. A.: Response of the ruminant respiratory tract to Mannheimia (Pasteurella) haemolytica. Microb. Infect. 2000, 2, 1079-1088.
- Ambagala T. C., Ambagala A. P., Sriksaran S.: The leukotoxin of *P. haemolytica* bind to beta (2) integrins on bovine leukocytes. Microb. Lett. 1999, 179, 161-167.
- Baluyut C. S., Simonson R. R., Bemrick W. J., Maheswaran S. K.: Interaction of Pasteurella haemolytica with bovine neutrophils: Identification and partial characterization of a cytotoxin. Am. J. Vet. Res. 1981, 42, 1920-1926.

- Clarke L. B., Moore D. R., Blalock J. E.: Adrenocorticotrophic hormone stimulates a transient calcium uptake in rat lymphocytes. Endocrinol. 1994, 135, 1780-1786.
- Clinkenbeard D. K., Upton L. M.: Lysis of bovine platelets by *P. haemolytica* leukotoxin. Am. J. Vet. Res. 1991, 52, 453-457.
- Clinkenbeard K. D., Clarke C. R., Morton R. J., Panciera R. J., Confer A. W., Mosier D. A.: Role of *P. haemolytica* leukotoxin in virulence and immunity in shipping fever pneumonia. Comp. Food Anim. Pract. 1992, 14, 1249-1263.
- Cox E., Mast J., MacHugh N., Schwenger B., Goddeeris B.: Expression of  $\beta_2$  integrins on blood leukocyte adhesion deficiency. Vet. Immunol. Immunopathol. 1997, 58, 249, 263.
- Deshpande M. S., Ambagala T. C., Ambagala A. P. N., Kehrl M. E., Sriksaran S.: Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate Mannheimia (Pasteurella) haemolytica leukotoxin - induced cytolysis. Infect. Immun. 2002, 70, 5058-5064.
- Frank G. H.: When Pasteurella haemolytica colonizes the nasal passages of cattle. Vet. Med. 1988, 83, 1060-1064.
- Fukushima T., Ichinose M., Shingai R., Sawada M.: Adrenocorticotrophic hormone activates an outward current in cultured mouse peritoneal macrophages. J. Neuroimmunol. 2001, 113, 231-235.
- Gahmberg C., Valmu L., Fagerholm S., Kotovuori P., Ihanus E., Tian L., Morikowa-Pessa T.: Leukocyte integrins and inflammation. Cell. Mol. Life Sci. 1998, 54, 549-555.
- Gresham N. C., Confer A. W., Bush J.: Serum and colostrum antibody to Pasteurella haemolytica species in dairy cattle. Am. J. Vet. Res. 1984, 45, 2227-2234.
- Gibbs H. A., Allen M. J., Wiseman A., Selman J. E.: Pneumonic pasteurellosis in housed, weaned, single suckled calves. Vet. Rec. 1983, 22, 87-92.
- Jeyaseelan S., Kannan M., Hsuan S., Singh A., Walseth T., Maheswaran S.: Pasteurella (Mannheimia) haemolytica leukotoxin-induced cytolysis of bovine leukocytes: role of arachidonic acid and its regulation. Microb. Pathog. 2001, 30, 59-69.
- Knowles T. G.: A review of the road transport of cattle. Vet. Rec. 1995, 144, 197-201.
- Lan H. C., Reddy P. G., Chambers M. A., Walker G., Srivastava K. K., Ferguson J. A.: Effect of stress on interleukin-2 receptor expression by bovine mononuclear leukocytes. Vet. Immun. Immunopath. 1995, 49, 241-249.
- Li J., Clinkenbeard K. D., Ritchey J. W.: Bovine CD18 identified as a species specific receptor for *P. haemolytica* leukotoxin. Vet. Microb. 1999, 67, 91-97.
- Leite F., Sylte M., Brien S., Schulz R., Peek S., van Reeth K., Czuprynski C.: Effect of experimental infection of cattle with bovine herpesvirus (BHV-1) on the ex vivo interaction of bovine leukocytes with Mannheimia (Pasteurella) haemolytica leukotoxin. Vet. Immun. Immunopath. 2002, 84, 97-110.
- Mackenzie A., Drennan M., Rowan T., Dixon J., Carter S.: Effect of transportation and weaning on humoral immune response of calves. Res. Vet. Sci. 1997, 63, 227-230.
- Meyer D., Coles E., Rich L.: Leukocytic tests and disorders. Vet. Lab. Med. 1992, 47 27-42.
- Palme R., Robia Ch., Messmann S., Hofer J., Möstl E.: Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. Wien. Tierärztl. Mschr. 1999, 86, 237-241.
- Roth J., Kaerberle M., Hsu W.: Effects of ACTH administration on bovine polymorphonuclear leukocyte function and lymphocyte blastogenesis. Am. J. Vet. Res. 1982, 43, 412-416.
- Shewen P. E., Wilkie B.: Cytotoxin of Pasteurella haemolytica acting on bovine leukocytes. Infect. Immun. 1982, 35, 91-94.
- Santoro M. G.: Heat Shock Factors and the control of the stress response. Biochem. Pharmacol. 2000, 59, 55-63.
- Sun Y., Clinkenbeard K. D.: Serum-free culture of *P. haemolytica* optimized for leukotoxin production. Am. J. Vet. Res. 1998, 59, 851-855.
- Vega M. V., Maheswaran S. K., Leininger J. R., Ames T. R.: Adaptation of a colorimetric microtitration assay for quantifying Pasteurella haemolytica A1 leukotoxin and antileukotoxin. Am. J. Vet. Res. 1987, 48, 1559-1564.
- Wernicki A., Urban-Chmiel R., Mikucki P., Puchalski A., Kankofer M.: The influence of transport stress on the humoral immunological response of calves induced by Mannheimia haemolytica antigen. Polish J. Vet. Sci. 2003a, 6, 41-45.
- Wernicki A., Urban-Chmiel R., Mikucki P., Puchalski A., Kankofer M.: Wpływ stresu transportowego na wybrane wskaźniki odporności komórkowej u bydła. Medycyna Wet. 2003b, 59, 608-611.
- Yoo H., Rajagopal B., Maheswaran S., Ames T.: Purified *P. haemolytica* leukotoxin induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages. Microb Path. 1995, 18, 237-252.
- Zavy M., Juniewicz P., Phillips W., VonTungeln D.: Effect of initial resistant, weaning and transport stress on baseline and ACTH-stimulated cortisol responses in beef calves of different genotypes. Am. J. Vet. Res. 1992, 53, 555-557.
- Rozporządzenie Ministra Infrastruktury z dnia 6 października 2003 r. w sprawie szczegółowych warunków i sposobu transportu zwierząt (Dz. U. Nr 185, poz. 1809).
- Ustawa Prezydenta RP z dnia 6 czerwca 2002 r. o zmianie ustawy o ochronie zwierząt (Dz. U. Nr 135).