

Wybrane wskaźniki odporności nieswoistej w różnych fazach cyklu rujowego suk^{*)}

TOMASZ JANOWSKI, ANDRZEJ K. SIWICKI*, IWONA BORKOWSKA, SŁAWOMIR ZDUŃCZYK

Zespół Rozrodu Zwierząt Katedry Nauk Klinicznych, *Zespół Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 14, 10-178 Olsztyn

Janowski T., Siwicki A. K., Borkowska I., Zduńczyk S.

Some parameters of non-specific immunity at different stages of the estrus cycle in bitches

Summary

The aim of this study was to assess the course of some parameters of non-specific immunity during the estrus cycle in bitches. Blood samples were collected from 28 healthy bitches at different stages (anestrus, proestrus, estrus, metestrus) of the estrus cycle. Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction by blood neutrophils, phagocytic activity of neutrophils, proliferative response of blood lymphocytes to phytohemagglutinin, serum activity of lysozyme and ceruloplasmin, level of total protein and γ -globulin fraction were determined. The study showed that nitroblue tetrazolium (NBT) reduction by blood neutrophils, proliferative response of blood lymphocytes to phytohemagglutinin, serum activity of lysozyme and ceruloplasmin were significantly higher ($p \leq 0.01$) in proestrus and estrus than in anestrus.

Keywords: bitches, estrus cycle, parameters of non-specific immunity

Stany zapalne pochwy i macicy należą do częstych schorzeń ginekologicznych suk. Etiopatogeneza tych schorzeń nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona. Przyjmuje się, że w powstawaniu stanów zapalnych układu rozrodczego suk oprócz drobnoustrojów istotną rolę odgrywają hormony płciowe (estrogeny, progesteron), które m.in. modulują stan miejscowej i ogólnej odporności nieswoistej zwierząt (13-15). U suk z ropomaciczem stwierdzono obniżenie wartości wskaźników odporności nieswoistej w porównaniu do zwierząt zdrowych (5, 11). Dotychczas niewiele wiadomo o wpływie hormonów płciowych na wskaźniki odporności nieswoistej suk. Generalnie przyjmuje się, że estrogeny stymulują odporność nieswoistą organizmu zwierząt, natomiast progesteron ją obniża (17, 23). Wpływ różnych faz cyklu rujowego na stan odporności nieswoistej suk nie był dotychczas badany.

Celem niniejszych badań było określenie kształtowania się niektórych wskaźników odporności nieswoistej w przebiegu cyklu rujowego suk.

Materiał i metody

Zwierzęta. Materiał badawczy stanowiło 28 suk mieszane w wieku 3-7 lat o masie ciała 7-20 kg. W okresie badań zwierzęta przebywały w pomieszczeniach Zespołu Rozrodu Zwierząt. Suki były żywione raz dziennie pełnoporcjową karmą przemysłową. Karmienie odbywało się raz

dziennie. Zwierzęta miały wolny dostęp do wody i były wyprowadzane na spacer trzy razy dziennie.

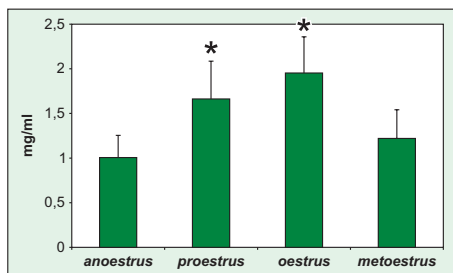
Określanie faz cyklu rujowego. Próby do badań pobierano we wszystkich fazach cyklu rujowego: spokoju płciowego czyli bezrujowej (*anoestrus*), przedrujowej (*proestrus*), rui właściwej (*oestrus*) i porujowej (*metoestrus*). Określano je badaniem klinicznym (oglądanie i omacywanie sromu, endoskopia pochwy), badaniem cytologicznym wymazów pochwowych oraz poprzez oznaczanie poziomu progesteronu w osoczu krwi (1, 25).

Wymazy z pochwy pobierano przy pomocy jałowych wymazówek (Hagmed s.c., Rawa Mazowiecka) z przedniego jej odcinka, po wprowadzenia wziernika pochwowego. Następnie wykonywano rozmaz na odtłuszczonym szkiełku podstawowym, utrwalano w mieszaninie alkoholu etylowego i eteru (1 : 1) i barwiono metodą Shorra (4). Preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym Olympus BX50F4.

Próbki krwi (3 ml) pobierano z żyły dostopowej do heparynizowanych probówek. Koncentrację progesteronu w osoczu oznaczano metodą RIA opisaną przez Hoffmana i wsp. (6). Czulość metody wynosiła 1,34 nmol/l, zaś zmienność wewnątrz- i zewnątrzserijna, odpowiednio, 6,7% i 9,8%.

Badania immunologiczne. Do badań immunologicznych pobierano 2 próbki krwi o objętości 3 ml. Pierwszą z nich pobierano do próbki bez środka przeciwkrzepliwego, w celu uzyskania surowicy. Po skrzepnięciu krwi próbkę wirowano przez 10 min. przy 3000 obrotów/min. Drugą próbkę pobierano do heparynizowanych probówek.

^{*)} Badania wykonane w ramach grantu 3 P06K 01426 finansowanego przez MNiSW.



Ryc. 1. Aktywność metaboliczna granulocytów obojętnochłonnych (test NBT) w krwi suk w różnych fazach cyklu rujowego ($\bar{x} \pm SD$)

Objaśnienie: * – różnica statystycznie istotna ($p \leq 0,01$) w porównaniu do fazy *anoestrus*

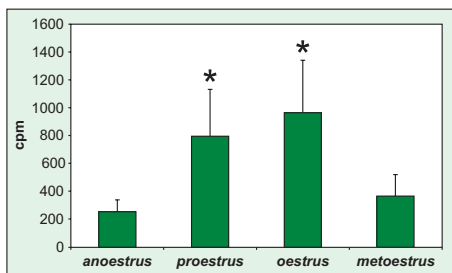
W krwi pełnej wykonywano test redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) metodą spektrofotometryczną (21), test proliferacji limfocytów metodą izotopową (22) oraz indeks fagocytny metodą morfologiczną (3) przy użyciu standardowego szczepu *Staphylococcus aureus* 209P. W surowicy oznaczono aktywność lizozymu metodą turbimetryczną (18), aktywność ceruloplazminy (16) oraz poziom białka całkowitego i γ -globulin metodą Lowry (12).

Analiza statystyczna. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej testem analizy wariancji i testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

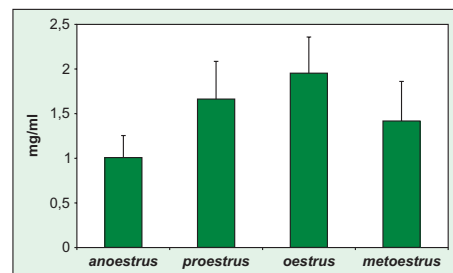
Kształtowanie się badanych wskaźników odporności nieswoistej w poszczególnych fazach cyklu rujowego przedstawiają ryciny 1-6.

Aktywność metabolizmu wewnątrzkomórkowego granulocytów obojętnochłonnych mierzona testem spontanicznej redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) oraz odpowiedź proliferacyjna limfocytów na mitogen fithemaglutyninę (LP) były istotnie wyższe w okresie przedrujowym i rui właściwej w porównaniu do okresu spokoju płciowego ($p \leq 0,01$), ulegając obniżeniu w okresie porujowym (ryc. 1, 2). Zdolność granulocytów obojętnochłonnych do fagocytozy, mierzona indeksem fagocytnym (IF) była wprawdzie wyższa w okresie przedrujowym i rui właściwej w porównaniu do pozostałych faz cyklu rujowego, ale różnice te nie były statystycznie istotne (ryc. 3). Także aktywność lizozymu i ceruloplazminy uległa istotnemu wzrostowi ($p \leq 0,01$) w okresie przedrujowym i rui właściwej w porównaniu do pozostałych okresów cyklu rujowego ($p \leq 0,01$; ryc. 4, 5). Poziomy białka całkowitego i γ -globulin uległy jedynie niewielkim zmianom w przebiegu cyklu rujowego (ryc. 6, 7).

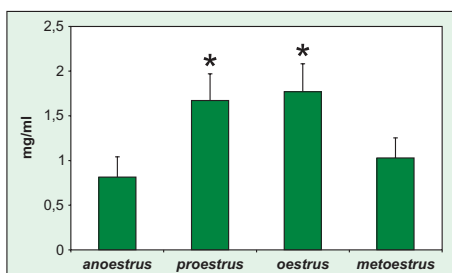


Ryc. 2. Odpowiedź proliferacyjna limfocytów krwi suk na fithemaglutyninę w różnych fazach cyklu rujowego ($\bar{x} \pm SD$)

Objaśnienia: * – jak przy ryc. 1.

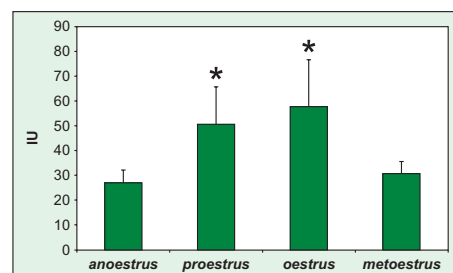


Ryc. 3. Zdolność granulocytów obojętnochłonnych do fagocytozy (indeks fagocytny) w krwi suk w różnych fazach cyklu rujowego ($\bar{x} \pm SD$)



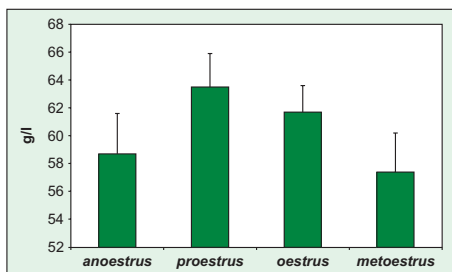
Ryc. 4. Koncentracja lizozymu w surowicy krwi suk w różnych fazach cyklu rujowego ($\bar{x} \pm SD$)

Objaśnienia: * – różnica statystycznie istotna ($p \leq 0,01$) w porównaniu do fazy *anoestrus* i *metoestrus*

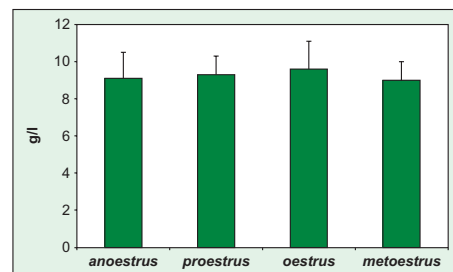


Ryc. 5. Aktywność ceruloplazminy w różnych fazach cyklu rujowego ($\bar{x} \pm SD$)

Objaśnienia: * – jak przy ryc. 4.



Ryc. 6. Koncentracja białka całkowitego w surowicy w różnych fazach cyklu rujowego ($\bar{x} \pm SD$)



Ryc. 7. Koncentracja γ -globulin w surowicy krwi suk w różnych fazach cyklu rujowego ($\bar{x} \pm SD$)

Uzyskane wyniki wskazują na wzrost odporności nieswoistej suk w okresie cieczki, a więc podwyższonego poziomu estrogenów. Macica zwierząt domowych jest w fazie rui mało wrażliwa na zakażenie, jak wykazano to u krów (7), kłaczy (10) i świń (24). Również u suk stwierdzono, że domaciczna inlokacja patogennych szczepów *E. coli* w okresie przedrujowym powodowała rozwój ropomacicza tylko u 25% zwierząt w porównaniu do 89% w okresie porujowym, kiedy ma miejsce dominacja progesteronu (14).

Należy podkreślić, że wpływ faz cyklu rujowego na wskaźniki odporności nieswoistej suk nie był dotychczas badany. Problematyka ta była rozpatrywana jedynie częściowo w ramach badań nad etiopatogenezą zespołu *endometritis-pyometra*. Zespół ten rozwija się w wyniku zakażenia macicy drogą wstępującą w okresie cieczki. Z usuniętych operacyjnie macic suk z ze-

społem *endometritis-pyometra* izolowano najczęściej pałeczki okrężnicy (70-80% przypadków), rzadziej gronkowce, paciorkowce i pałeczki ropy błękitnej (2, 11). U zdrowych suk największe zasiedlenie macicy bakteriami stwierdzono w okresie przedrujowym, wykazując m.in. obecność szczepów *E. coli*. W okresie rui właściwej ten gatunek bakterii nie był już w macicy obecny (9). W piśmiennictwie znajdują się nieliczne wyniki badań dotyczących stanu odporności nieswoistej suk z ropomaciczem. Wynika z nich, że schorzeniu temu towarzyszy obniżenie aktywności metabolicznej (NBT) i fagocytarnej (IF) leukocytów obojętnochnych oraz aktywności proliferacyjnej limfocytów (5, 11). Autorzy tych badań nie określali przy tym wartości wskaźników immunologicznych w innych fazach cyklu, jednak uzyskane przez nich wyniki są zbieżne z pochodzącymi z badań własnych, które wskazują na spadek odporności nieswoistej w fazie porujowej (*metoestrus*). Potwierdza to istotne znaczenie stanu odporności nieswoistej organizmu suk w patogenezie zespołu *endometritis-pyometra*. Jak wcześniej wspomniano, schorzenie to jest charakterystyczne dla fazy ciała żółtego oraz dominacji progesteronu (faza porujowa). Wykazano ponadto, że podanie zabitych szczepów *Propionibacterium avidum* lub methisprynolu powoduje pobudzenie odporności nieswoistej u psów (19, 20). Sugeruje to możliwość zapobiegania temu schorzeniu przez immunostymulację pod koniec okresu spokoju płciowego.

Pośrednim dowodem na istotny wpływ zmian hormonalnych na wartości wskaźników odporności nieswoistej są także obserwacje związane ze zjawiskami towarzyszącymi zachowawczemu leczeniu ropomacicza aglepristonem. Substancja ta blokuje receptor progesteronu i uniemożliwia oddziaływanie tego hormonu na tkanki, co prowadzi do szybkiego procesu zdrowienia. Towarzyszy temu wzrost liczby leukocytów (8). Należy przypuszczać, że istotną rolę odgrywa w tym przypadku zwiększenie odporności nieswoistej organizmu suk.

Reasumując, interesująca problematyka relacji między odpornością nieswoistą a statusem hormonalnym suk była dotychczas przedmiotem nielicznych badań. Utrudnia to bezpośrednie porównanie wyników badań własnych z rezultatami prezentowanymi przez innych autorów (5, 11). Ze względu na znaczenie tych zjawisk dla płodności i zdrowia suk wskazane są dalsze badania nad wpływem hormonów płciowych na stan odporności nieswoistej tych zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Arbeiter K.: Anwendung von Hormonen in der Reproduktion von Hund und Katze, [w:] Döcke E. (red.): Veterinärmedizinische Endokrinologie. Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart 1994, 823-841.
2. Birger M., Staroniewicz Z.: Rola bakterii w zespole *endometritis-pyometra* u suk. Medycyna Wet. 1996, 52, 245-248.
3. Brzezińska-Błaszczak Z.: Zarys immunodiagnostyki. Wyd. Uniwersytet Łódzki 1994, 72-73.
4. Dreier H.-K.: Genitaltrakt, [w:] Kraft W., Dürr U. M. (red.): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1999, 201-211.

5. Faldyna M., Laznicka A., Toman M.: Immunosuppression in bitches with pyometra. J. Anim. Pract. 2001, 452, 5-10.
6. Hoffmann B., Kyrein H. J., Ender M. L.: An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma. Hormone Res. 1973, 4, 302-310.
7. Hussain A. M., Daniel R.: Studies on some aspects of neutrophil functions and uterine defenses in cows during the estrous cycle. Reprod. Dom. Anim. 1991, 26, 290-296.
8. Janowski T., Domosławska A., Zduńczyk S.: Blokery receptorów progesteronowych (antygestageny) w rozrodzie małych zwierząt. Medycyna Wet. 2003, 59, 1053-1056.
9. Janowski T., Zduńczyk S., Jurczak A.: Bacterial flora of the genital tract of healthy bitches during the oestrous cycle and in bitches with vaginal discharge. Reprod. Dom. Anim. 2006, 41, suppl. 1, 17.
10. Katila T.: Uterine defense mechanisms in the mare. Anim. Reprod. Sci. 1996, 42, 197-204.
11. Krzyżanowski J., Wawron W., Krakowski L., Kostro K., Wrona Z., Szczubiał M., Piech T., Kusy R.: Badania nad stanem nieswoistych mechanizmów obronnych u suk z ropomaciczem. Medycyna Wet. 2000, 56, 382-385.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Randall R.: Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1980, 193, 265-275.
13. Nolte I., Volpert A., Brunnckhorst D.: Entstehung, Diagnose, Therapie und Komplikationen des Endometritis-Pyometra-Komplexes bei der Hündin. Kleintierpraxis 1990, 35, 589-602.
14. Nomura K., Funahashi H., Shimada Y.: Experimental production of canine pyometra by inoculation with *E. coli* into the uterus with the cervix not ligated. J. Jap. Vet. Med. Assoc. 1988, 41, 95-99.
15. Nomura K., Masooka K., Shimada Y.: Experimental production of canine pyometra by inoculation with *E. coli* into the uterus with the cervix ligated. J. Jap. Vet. Med. Assoc. 1987, 40, 252-256.
16. Rice E., Wagman E., Takenaka Y.: Ceruloplasmin assay in serum: standardization of ceruloplasmin activity in terms of international enzyme units. Diagnostic Laboratory 1986, 12, 39-53.
17. Roth J. A., Kaerberle M. L., Appell L. H., Nachreiner R. F.: Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. Am. J. Vet. Res. 1981, 44, 247-253.
18. Siwicki A. K., Anderson D. P.: Fish diseases diagnosis and prevention methods. FAO Project GCP/INT/526/JPN, Wyd. IRS Olsztyn 1993, 105-112.
19. Siwicki A. K., Krzyżanowski J., Bartoszcze M., Mizak Z., Paluch S., Szmigielski S., Jeljaszewicz J., Pulverer G.: Adjuvant properties of killed *Propionium avidum* KP-40 in vaccination of dogs against canine parvovirus. Dtsch. tierärztl. Wschr. 1998, 105, 173-208.
20. Siwicki A. K., Mizak B.: In vitro influence of methisoprinol on lymphocyte proliferation in dogs. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2001, 45, 227-234.
21. Szczylik C., Gornas P., Carewicz R.: Test redukcji NBT – metoda i praktyczne zastosowanie. Diag. Lab. 1979, 1, 35-43.
22. Wagner U., Burkhard E., Failing K.: Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the ³H-thymidine incorporation assay. Vet. Immunopathol. Immunol. 1999, 70, 151-159.
23. Wessendorf G., Scheibl P., Zerbe H.: Einfluss von Östrogenen auf das Immunsystem mit Berücksichtigung der bovinen Retentio secundinarum. Dtsch. tierärztl. Wschr. 1998, 105, 32-34.
24. Winter de P. J., Verdonck M., de Kruijff A., Devriese L. A., Haesbrouck F.: Influence of oestrous cycle on experimental intrauterine infection in the sow. Zbl. Vet. Med. A. 1994, 41, 640-644.
25. Zduńczyk S., Janowski T.: Zaburzenia rozrodu psów i kotów. UWM, Olsztyn 2002.

Adres autora: prof. dr hab. Tomasz Janowski, ul. Oczapowskiego 14, 10-718 Olsztyn; e-mail: jantom@uwm.edu.pl