

MEDYCyna WETERYNARYJNA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

ZASOPISMO POSWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,
prof. dr Abdon STRYSZAK, doc. dr Stanisław WOŁOSZYN — sekretarz naukowy.

RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Zygmunt EWY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Tadeusz JASTRZĘBSKI, prof. dr Lech JAŚKOWSKI, dyr. dr Zbigniew JARZĘBSKI, prof. dr Adam KĄDZIOŁKA, plk doc. dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Stanisław KRAUSS, prof. dr Józef KULCZYCKI, prof. dr Zdzisław LARSKI, dr Władysław LUTYŃSKI, dyr. dr Henryk OBERFELD, prof. dr Wincenty PEZACKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Aleksander ZAKRZEWSKI, prof. dr Eugeniusz ŻARŃOWSKI.

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

STANISŁAW GOŁĘBIEWSKI

Przeciwbakteryjne mechanizmy obronne zwierząt. II. Fagocytoza

Zakład Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: prof. dr M. TRUSZCZYŃSKI

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Łodzi
Kierownik: dr habil. S. GOŁĘBIEWSKI

Antybakteryjne mechanizmy obronne organizmu nie mogą być wyjaśnione jedynie tylko aktywnością bakteriobójczą surowicy. Równie ważną rolę w zjawiskach odpornościowych spełnia fagocytoza. Zjawisko fagocytozy odkrył i opisał Miecznikow przy końcu ubiegłego wieku, on też nadał nazwę temu zjawisku i biorącym w nim udział komórkom. Fagocytozą nazywamy wyłapywanie i aktywne pochłanianie cząstek nieorganicznych i organicznych przez specjalne komórki ciała w połączeniu z ewentualną enzymatyczną ich likwidacją.

W ustroju ssaków wyróżnia się dwie kategorie komórek fagocytarnych: makrofagi i mikrofagi. Makrofagi tworzą układ siateczkowo-śródbłonkowy (RES), dzieli się na wędrujące i stałe. Do makrofagów wędrujących zaliczono: limfocyty, monocyty, komórki plazmatyczne, tkankowe histocyty; do stałych — komórki wysielające ściany zatok lub naczyń włosowatych: wątroby, szpiku, węzłów chłonnych, śledziony, nadnerczy, przysadki, ciała żółtego oraz komórki siateczki: śledziony, węzłów chłonnych, grasicy. W układzie RES można wyróżnić 3 zasadnicze funkcje: fagocytarną, immunologiczną (wytwarzanie przeciwciał) i metaboliczną. Do mikrofagów należą granulocyty krwi. W fagocytozie najbardziej aktywne są makrofagi i granulocyty obojętnochłonne, następnie granulocyty kwasochłonne (Cohn, 1964,

Sabesin, 1963, Stobbe, 1960). Najślabszą żerność obserwuje się u granulocytów zasadochłonnych. Największą aktywność wykazują komórki dojrzałe, lecz niezbyt stare. Występuje ona u neutrofilów z jądrem segmentowym składającym się z dwóch do trzech segmentów (Fritze, 1951, Stobbe, 1960). Stwierdzono także różnice w aktywności komórek fagocytarnych w zależności od gatunku zwierzęcia. Łapińska-Michalska (1962) ustaliła aktywność żerną neutrofilów od największej do najmniejszej w następującej kolejności: bydło, człowiek, koń, owca, świnka morska i królik, a eozynofiliów w rzędzie następującym: bydło, człowiek, królik, owca, świnka morska. Eozynofile konia mogą być nieczynne w procesie fagocytozy.

Fagocytoza przebiega w dwóch etapach: a) przyciąganie fagocyta przez drobnoustroj (chematoksja dodatnia), b) przyleganie drobnoustroju do ściany fagocyta i wchłanianie drobnoustroju. Podczas fagocytozy występują w fagocytach zmiany fizyczne i chemiczne. Dotyczą one głównie ładunku i napięcia powierzchniowego oraz przemiany materii (Sołtys, 1963). Podczas fagocytozy bakterii stwierdza się wysoki wzrost przemiany materii w fagocytach, natomiast w wypadku pochłaniania ziarenek kwarcu tylko wzrost nieznaczny. Fagocytoza tuszu nie wywiera widocznego wpływu na procesy komórki fagocytarnej. Fagocyty

czerpiają energię z procesów glikolitycznych. Energia ta dostarczana jest w zasadzie z zewnątrz. Pochłonięte bakterie zostają poddane działaniu różnych substancji bakteriobójczych, które są zlokalizowane głównie w ziarnistościach granulocytów (Frei, 1963). W fagocytach występuje bakteriobójcza globulina zwana fagocytyną, lizozym (acetylo-amino-polisacharydaza), katepsyna (Hirsch, 1965, Thimann, 1965). Ponadto stwierdzono jeszcze inne enzymy działające wybiórczo na Gram-dodatnie i -ujemne bakterie, jak np. kwaśna i alkaliczna fosfataza, nukleotydaza, rybonukleaza, dezoksyrybonukleaza, betaglikuronidaza (Cohn i Hirsch, 1960). Drobnoustroje sfagocytowane mogą być zabite i zniszczone we wnętrzu fagocytów, mogą się rozmnażać i zniszczyć fagocyt, wreszcie mogą być wydalone na zewnątrz jako materiał nie strawiony. Drobnoustroje żywe znajdujące się w fagocytozie są chronione przed działaniem przeciwciał i antybiotyków. Fagocyty zwierząt odpornych wykazują większą aktywność, niż fagocyty zwierząt normalnych. Odporność komórkowa może być przeniesiona biernie na normalne zwierzęta przez wstrzykiwanie im komórek fagocytarnych zwierząt czynnie uodpornionych (Suter, 1953, Fong, 1962).

Na przebieg fagocytozy mają wpływ właściwości fagocytowanych cząsteczek, w szczególności zdolność do wytwarzania enzymów i toksyn oraz wielkość i liczba tych cząsteczek. Drobnoustroje posiadające otoczki są wybitnie odporne na fagocytozę, również dobrze rozwinięte antygeny powierzchniowe jak Vi, A, B, L pałeczek Gramujemnych wyraźnie hamują fagocytozę (Ślopek i współpracownicy, 1958, 1959). Antygen M i kwas hialuronowy wydają się zwiększają oporność paciorkowców. Meyer i Leirer (1968) wykazali różną aktywność fagocytarną tej samej surowicy w stosunku do różnych szczepów *E. coli*. Szczepy chorobotwórcze były słabiej fagocytowane niż niechorobotwórcze. Böhme (1958) podaje, że wzrostowi zjadliwości bakterii towarzyszy pogorszenie fagocytozy i odwrotnie. Podobnie wypowiadają się Sołtys (1963), Gubarew (1964) oraz Hughes i Lovell (1966). Wiele gatunków drobnoustrojów wytwarza substancje opisane pod różnymi nazwami jak leukocydyny, predyspozyny, wiruliny, leukotoksyny, agresyny, antyfaginy, które paraliżują lub niszczą fagocyty. Endotoksyna bakterii Gram-ujemnych w wysokim stężeniu działa toksycznie na komórki żerne.

Humoralny system obronny odgrywa ważną rolę w procesach fagocytozy. Fagocytoza bakterii w środowisku bez surowicy jest bardzo słaba lub wcale nie występuje. Jedynie szorstkie formy bakterii mogą być pochłonięte przez komórki żerne bez uprzedniej opsonizacji. Sanarelli (1891) opisał pierwszy substancje występujące w surowicy krwi, które przygotowywały bakterie do fagocytozy. Wright i Douglas w 1903 r. nazwali opsoniną ciepło-

chwijną substancję surowicy sprzyjającą fagocytozie. Składnik ten działał na bakterie, a nie na leukocyty. Dalsze badania nad wpływem surowicy na przebieg fagocytozy doprowadziły do wykrycia licznych i różnie nazywanych substancji występujących w surowicy jak lizyna, aleksyna, bakteriocydyna, bakteriotropina (Isliker, 1958, Meyer, Leirer i Steinbach, 1967, Ślopek, 1963). Muir (wg Ślopka, 1963) stwierdza, że działanie opsonizujące surowicy zależy od obecności: a) przeciwciała współdziałającego z dopełniaczem, b) substancji opsonizującej nie wymagającej udziału dopełniacza. Obecnie wyróżnia się w surowicy dwa rodzaje czynników stymulujących fagocytozę, opsoniny i bakteriotropiny. Do opsonin należy zaliczyć substancje występujące w normalnych surowicach nowonarodzonych jak i dojrzałych zwierząt. Są to czynniki ciepłochwienne, nie ulegające zwiększeniu po podaniu specyficznych antygenów. Bakteriotropiny należy traktować jako opsoniny odpornościowe o daleko idącej specyficzności. Są one ciepłostale, a poziom ich w surowicy wzrasta po parenteralnym wprowadzeniu antygeny. Nie są one identyczne z przeciwciałami w odczynach serologicznych jak aglutyniny czy precypityny (Topley i Wilson, 1964). Działalność opsonin objawia się w procesach litycznych lub w zmianach powierzchniowych komórki bakteryjnej (Hirsch, 1965, Mayr, 1963, Sołtys, 1963). Wysoka zawartość opsonin i przeciwciał w surowicy nie zawsze idzie w parze z aktywnością fagocytarną. Korelacja występuje tylko do pewnego stopnia, przy czym wzrost poziomu czynników opsonizujących nie powoduje zwiększenia fagocytozy. Wydaje się, że jest niezbędny tylko jakiś średni poziom opsonin dla optymalnej fagocytozy (Staak, 1964).

Zagadnienie udziału komplementu w zjawisku fagocytozy wielokrotnie było przedmiotem zainteresowania badaczy. Ostatecznie wykazano zależność między stopniem fagocytozy a obecnością komplementu w surowicy. Z badań Nelsona i Lebruna (1965) wynika, że 4 komponenty dopełniacza są niezbędne dla opsonizacji bakterii. Komplement ulega związaniu przez uczulony przeciwciałem antygen w temperaturze 37° w obecności jonów wapnia i magnezu. Ślopek i współpracownicy (1962, 1964) wykazali, że w opsonizacji czynne są tylko 3 składniki dopełniacza świnki morskiej C'1, C'2, C'4, a jeden C'2 komplementu surowicy królika. Nie stwierdzono korelacji między aktywnością opsonizującą i wysokością miana hemolitycznego komplementu surowicy. Badania Grzybek-Hrynczewicz i współpracowników (1964) dowiodły, że aktywność opsonizująca normalnej surowicy królika zależy od obecności przeciwciał i dopełniacza. W wypadku nieobecności jednego z czynników fagocytoza nie występuje. Przeciwciała biorące udział w procesie fagocytozy są specyficzne. Uprzednia absorbcja normalnej surowicy za pomocą endotoksyny

pałeczek *Salmonella* w formie S wybitnie zmniejsza fagocytozę tych pałeczek przy zastosowaniu tejże surowicy. Endotoksyny otrzymane ze szczepów gładkich nie wywierają żadnego wpływu na fagocytozę szczepów szorstkich, które posiadają odmienny antygen somatyczny. Endotoksyny pałeczek z grupy *Salmonella* nie hamują fagocytozy bakterii nie należących do grupy *Salmonella* (Skurski, 1948). Grzybek-Hryncewicz i współpracownicy (1962) podają, że świeże nie rozcieńczone surowice świnki morskiej opsonizują słabiej bakterie Gram-ujemne niż rozcieńczone lub oziębione w temperaturze 4° w ciągu 2 tygodni, zamrożone w temperaturze -70° lub absorbowane bentonitem. Badania te potwierdzają przypuszczenie, że w świeżej surowicy znajduje się czynnik hamujący aktywność fagocytarną. Skurski (1958) w pracy nad fagocytozą przy brucelozie dochodzi do wniosku, że w ostrym okresie choroby występuje w ciepłochwiejnej frakcji surowicy czynnik hamujący fagocytozę.

Do bliższego określenia opsonin wykorzystano elektroforezę i immunoelektroforezę. Tullis i Surgenor (1956) wykazali przy pomocy elektroforezy bibułowej, że czynniki stymulujące fagocytozę znajdują się we frakcji beta-globulinowej i w szybko wędrujących frakcjach alfa-globuliny surowicy ludzkiej. Rowley i Jenkin (1962) badając opsoniny surowicy świnki morskiej w żelu skrobiowym określili je jako beta-globuliny. Szczegółowe badania z tego zakresu przeprowadzili Brzuchowska i współpracownicy (1964) oraz Grzybek-Hryncewicz i współpracownicy (1964) stosując metodę immunoelektroforezy i surowicę antyopsoninową. Stwierdzono, że substancje wykazujące aktywność opsonizującą w stosunku do gronkowca złocistego, a występujące w surowicy świnki morskiej, nie są homogenne. Lokalizują się one we frakcjach alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 i gamma-globulinach oraz składają się z 6 białek. Z tych 6 białek 3 reprezentują przeciwciała, a 3 składniki komplementu biorące udział w opsonizacji bakterii.

Fagocytoza może być stymulowana lub hamowana przez różne niespecyficzne czynniki. Większość badaczy przyjmuje, że fagocytoza nasila się wraz ze wzrostem temperatury do 40°—44°. Neutrofile pobrane od zwierząt napromieniowanych wykazują obniżoną fagocytozę. Znaczenie terapii bodźcowej polega w głównej mierze na aktywacji fagocytozy. Do czynników sprzyjających fagocytozie należą: atropina, efedryna, histamina, cholina, nowokaina, tanina, jony miedzi, magnezu i sodu, wielocukry, RNA, DNA, hialuronidaza, witamina B₁₂, witamina C, sulfonamidy, antybiotyki, podwyższona ciepłota ciała, dobre odżywianie. Hamują fagocytozę m. in.: ACTH, EDTA, cortison, heparyna, mucyny, cholesterol, jony kobaltu, rezerpina, jodoocetan, niedobór białka, brak witamin A, B₁, B₂, stress, zatrucie, obni-

żenie ciepłoty ciała (Meyer, Leirer i Steinbach, 1967, Ślopek, 1963). Według Cottingham i Mils (1943) odczyn fagocytarny okazał się czułym testem dla określenia niedoboru witamin w ustroju.

Intensywność fagocytozy może być mierzona *in vivo* i *in vitro*. W pierwszym wypadku oznacza się szybkość oczyszczania krwi z wprowadzonych do niej barwników, homogennej zawiesiny cząstek węgla, roztworu surowiczej albuminy znaczonej promieniotwórczym jodem lub zawiesiny drobnoustrojów. *In vitro* stopień fagocytozy określa się najczęściej przy pomocy: a) indeksu opsono-fagocytarnego w różnych modyfikacjach, b) procentu fagocytozy, tj. procentu leukocytów, które pożyły przynajmniej jedną bakterię, c) wskaźnika fagocytarnego, tj. średniej liczby pożytych bakterii przypadających na jeden leukocyt, d) współczynnika fagocytarnego, tj. stosunku wskaźnika fagocytarnego badanej surowicy do wskaźnika fagocytarnego surowicy kontrolnej.

Zjawisko fagocytozy w przebiegu różnych chorób było tematem wielu prac. W weterynarii najwięcej prac poświęcono fagocytozie pałeczek *Brucella* i *E. coli*. W 1933 r. Huddleson wprowadził dla celów rozpoznawczych przy brucelozie próbę zwaną indeksem opsono-fagocytarnym i podał, że u osobników zakażonych brucelozą w ostrej fazie choroby indeks był niski, u ozdowieńców zaś i przy łagodnym przebiegu — wysoki. Aleksiejenko (1950) i Akijew (1950) stwierdzili, że proces zdrowienia chorych na brucelozę przebiega szybciej przy narastaniu i utrzymywaniu się indeksu opsono-fagocytarnego na wysokim poziomie. Badacze ci wnioskujeją, że dynamika reakcji fagocytarniej odzwierciedla wpływ swoistego i nieswoistego oddziaływania środków leczniczych na organizm. Tuzowa (1952) podaje, że ze świnek morskich uodpornionych przeciwko brucelozie i wykazujących wysoki indeks nie udało się wyizolować zarazków, którymi zakażano te zwierzęta. Odmienne wyniki uzyskał Larsen (1951). Zwierzęta laboratoryjne uodpornione przeciw brucelozie pomimo silnie dodatniego indeksu łatwo ulegały w jego badaniach zakażeniu zjadliwymi pałeczkami *Brucella*. Wołoszyn (1960) w szeroko udokumentowanej pracy ustalił wartość odczynu fagocytarnego dla celów diagnostycznych i prognostycznych przy brucelozie bydła. Autor stwierdza, że odczyn fagocytarny jest próbą swoistą i dość czułą oraz może być przydatny do oceny wartości uodporniającej szczepionek przeciw brucelozie bydła. Zaobserwowano krótkotrwały wzrost wskaźnika opsonofagocytarnego w modyfikacji Harrisa u zwierząt gorączkujących i podaniu preparatów bodźcowych, natomiast po wprowadzeniu swoistego antygeny brucelozowego bardzo silny i długotrwały. Wiśniowski i Drożdżyńska (1970) oceniając wartość dwóch różnych szczepionek przeciw brucelozie określili

między innymi właściwości opsonizujące surowicy bydła uodpornionego tymi szczepionkami stosując heterologiczne układy immunologiczne. Maksimum indeksu opsono-fagocytarnego stwierdzono w 6-tym dniu po szczepieniu. Obserwowano znaczne różnice osobnicze wyrażające się dużą rozpiętością skrajnych wartości indeksu. Autorzy uważają, że indeks opsono-fagocytarny dla danej populacji posiada cechy większej stałości, niż miana serologiczne. Meyer i Leirer (1968) w badaniach nad fagocytozą u nowonarodzonych cieląt określali wartość opsonizującą surowicy przy pomocy wskaźnika fagocytarnego i procentu fagocytozy. Przed pobraniem siary wskaźniki te były bardzo niskie w stosunku do różnych szczepów pałeczki okrężnicy. Po przyjęciu siary następował gwałtowny wzrost aktywności opsonizującej surowicy cieląt, po 24 godzinach od urodzenia aktywność osiągała poziom zwierząt dojrzałych. U cieląt zaś, którym w ciągu 24 godzin nie podano siary, wartości wskaźników nie uległy zmianie. Sobczyk (1970) po pojeniu świnek morskich w ciągu 14-tu dni szczepami *E. coli* stwierdził u nich wzrost indeksu fagocytarnego, dwukrotny w krwi krezkowej i około pięciokrotny w krwi obwodowej w porównaniu z grupą kontrolną. Truszczyński i współpracownicy (1966) podają, że u trzody chlewnej zakażonej wirusem pomoru nie stwierdzono na 3-ci dzień po zakażeniu istotnych zmian we własnościach opsonizujących surowicy w stosunku do *E. coli*.

W badaniach własnych (1971) określono aktywność fagocytarną normalnej surowicy bydła i po uodpornieniu w stosunku do *Pasteurella multocida*. Intensywność fagocytozy mierzono przy pomocy indeksu opsono-fagocytarnego w modyfikacji HARRISA (1950), wskaźnika fagocytarnego i współczynnika fagocytarnego wg DAVIESA (1951). W prowadzonych badaniach najbardziej przydatnym do oceny właściwości opsonizujących surowicy bydła okazał się wskaźnik fagocytarny. Zaobserwowano sezonowe wahania aktywności fagocytarniej normalnej surowicy bydła związane z warunkami żywienia i utrzymania zwierząt. W okresie pastwiskowym zanotowano wyraźny wzrost właściwości opsonizujących. W okresie wiosny i lata był to wzrost statystycznie znamieny. Przejście z chowu pastwiskowego na alkierzowy powodowało osłabienie fagocytozy. Wartość maksymalna od minimalnej wskaźnika fagocytarnego w okresie objętym badaniami różniła się o 214%. Właściwości opsonizujące i bakteriobójcze normalnej surowicy bydła w stosunku do *Pasteurella multocida* nie wykazywały korelacji. Podanie szczepionki przeciw pasterelozie „Septivac” spowodowało zmiany aktywności fagocytarniej surowicy bydła. Między 10 a 24 dniem

po uodpornieniu nastąpił prawie trzykrotny wzrost wskaźnika fagocytarnego. Po tym okresie obserwowano powolny spadek właściwości opsonizujących surowicy i po 130 dniach wyrównanie z poziomem zwierząt kontrolnych. Zmiany w intensywności fagocytozy nastąpiły także po wprowadzeniu krowom „placebo”. „Placebo” zawierało wszystkie składniki szczepionki „Septivac” z wyjątkiem *Pasteurella multocida*. Reakcja organizmu po „placebo” była szybsza niż po szczepionce, lecz trwała około 40 dni. „Placebo” działało na organizm bydłecy w sposób podobny do preparatu bodźcowego. Wzrost właściwości opsonizujących surowicy po podaniu „placebo” przemawia za udziałem w tych zjawiskach czynników niespecyficznych. Jednak istniejące różnice w nasileniu i czasie trwania zmienionych wskaźników w grupie krów szczepionych „Septivac” i „placebo” wskazują na zasadnicze znaczenie przeciwciał swoistych. W badaniach własnych wykazano stosunkowo nieduży wzrost aktywności fagocytarniej u zwierząt uodpornionych w stosunku do *Pasteurella multocida*. Stwierdzono także słabego stopnia fagocytozę normalnej surowicy bydła. Wydaje się, że fagocytoza odgrywa mniejszą rolę niż bakteriocydia w obronie organizmu bydła dorosłego przeciw zakażeniu *Pasteurella multocida*.

Komórki fagocytarne odgrywają poważną rolę w obronie ustroju przed bakteriami, grzybami i pierwotniakami. Według Miecznikowa między stopniem fagocytozy a odpornością istnieje prosta zależność.

Dubos (1945) stwierdza, że fagocytoza jest bezwątpienia ważnym obronnym mechanizmem skierowanym przeciw zakażeniu. Slopek (1963) podaje, że znaczenie układu fagocytarnego dla odporności naturalnej jest bezsprzeczne, a jego wartość uwidacznia się zwłaszcza w przypadkach, w których dochodzi do jego wybitnego uszkodzenia. Na przykład w agranulocytozie zakażenie niektórymi ziarniakami prowadzi do ciężkiego schorzenia, kończącego się często śmiercią (Zabłocki, 1970). Według Truszczyńskiego (1969) fagocytozę należy traktować jako jeden z mechanizmów obronnych organizmu zwierzęcia, a odczyn opsono-fagocytarny może być użyty do badania poziomu odporności przeciwzakaźnej.

Dokonany przegląd piśmiennictwa pozwala na stwierdzenie, że fagocytoza wraz z innymi mechanizmami obronnymi ustroju bierze czynny udział w likwidacji zakażeń wywołanych przez bakterie.

Piśmiennictwo, obejmujące 135 pozycji, u Autora.

Adres autora: dr habil. Stanisław Gołębiowski, Łódź, ul. Bolesława 5.