

PATOLOGIA I TERAPIA

JERZY KOTZ, KHALED BASMADJI, JANUSZ A. MADEJ

Aktywność lizozymu oraz fosfatazy kwaśnej przy zapaleniu gruczołu mlekowego u krów

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

Gruczoł mlekowy krowy jest narządem wybitnie eksploatowanym i dlatego też często dotknięty jest procesem zapalnym. Podczas zapalenia występują odchylenia od normalnego poziomu różnych składników podstawowych i śladowych mleka, jak również zmiany w aktywności niektórych enzymów jak: katalazy, peroksydazy, GGTP-azy, fosfatazy kwaśnej i zasadowej oraz glikozydazy.

Do grupy glikozydaz należy między innymi lizozym (muramidaza) — N-acetylo-muramyl-hydrolaza mukopeptydowa — EC.3.2.1.17. Hydrolizuje on wiązanie 1,4-glikozydowe, między kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozaminą (7, 14, 17) polisacharydowych składników ścian wielu bakterii. Enzym ten odgrywa więc dużą rolę w odporności naturalnej ustroju, jako czynnik immunologicznie nieswoisty. Występuje on w różnych płynach ustrojowych oraz lizosomach komórek żernych (zwłaszcza neutrofilów). Dane na temat występowania i znaczenia lizozymu w mleku przy zapaleniach gruczołu mlekowego u krów są wyjątkowo skąpe i często sprzeczne (1, 2, 11, 15). Nie przeprowadzono również badań dotyczących współzależności między lizozymem a fosfatazą kwaśną — jako markerem komórek żernych.

Fosfataza kwaśna (FK) — EC. 3.1.3.2. — jest bowiem enzymem hydrolitycznym, stanowiącym wyznacznik między innymi lizosomów komórek żernych, a tym samym pośrednio i lizozymu. Bierze ona udział w wewnątrzkomórkowym trawieniu substancji wchłoniętych przez komórkę na drodze fago- i pinocytozy oraz autofagii, zaś w stanach uszkodzenia błon lizosomalnych współuczestniczy w samotrąwieniu i śmierci komórki.

Celem niniejszej pracy było prześledzenie zachowania się lizozymu w mleku lub wydzielinie gruczołu mlekowego krów w stanach zapalnych tego narządu, wywołanych różnymi czynnikami (również bakteryjnymi) oraz oznaczenie aktywności fosfatazy kwaśnej, a tym samym ilości komórek żernych, które są źródłem lizozymu w zmienionej tkance gruczołowej.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły zmienione zapalnie płaty gruczołu mlekowego siedmiu krów. Kontrolę stanowiło pięć zwierząt zdrowych. Aktywność lizozymatyczną w mleku lub wydzielinie oznaczano metodą dyfuzji

plytkowej w żelu agarowym (6, 8, 19) w modyfikacji własnej, polegającej na zabiciu szczepu *Micrococcus lysodeicticus* roztworem 1:250 thiomersalu (nie zaś promieniami UV). Oprócz określenia aktywności lizozymatycznej wykonano uzupełniające badania makroskopowe, bakteriologiczne i cytologiczne na obecność komórek jądrazastych, przede wszystkim neutrofilów.

Do badań histoenzymatycznych pobierano wycinki gruczołu mlekowego bezpośrednio po uboju zwierząt i oznaczano aktywność FK metodą precypitacji Gomo-riego (5), inkubując skrawki przez 45 minut w temperaturze 37°C. Kontrolę reakcji enzymatycznej wykazano na skrawkach narządu bez użycia substratu (tzw. kontrola dodatnia).

Jednocześnie do badań histopatologicznych pobierano wycinki gruczołu mlekowego i barwiono je rutynowo hematoksyliną i eozyną.

Wyniki

Wyniki badań bakteriologicznych, cytologicznych, aktywności lizozymatycznej oraz badań histoenzymatycznych gruczołu mlekowego krów przedstawiono schematycznie w tab. 1. Natomiast korelację między aktywnością lizozymatyczną a liczbą komórek mleka lub wydzieliny, przedstawiono w postaci prostej na ryc. 4.

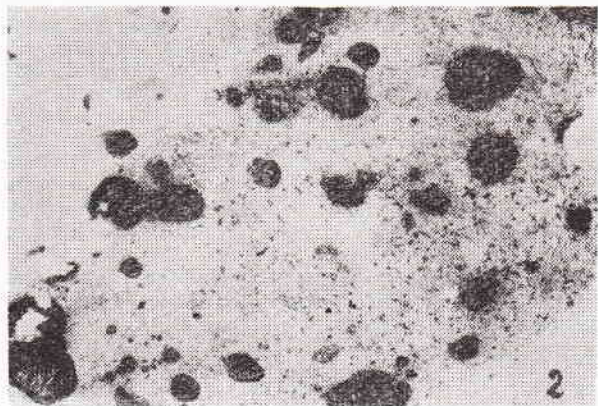
U zwierząt kontrolnych gruczoł mlekowy w obrazie makro- i mikroskopowym był niezmienniony, posiewy bakteriologiczne jałowe, ilość komórek w mleku wynosiła od 150 do 430 na ml, a poziom lizozymu od 1,0 do 1,5 IU.

Fosfataza kwaśna: w grupie kontrolnej enzym ten lokalizował się w lizosomach komórek na-

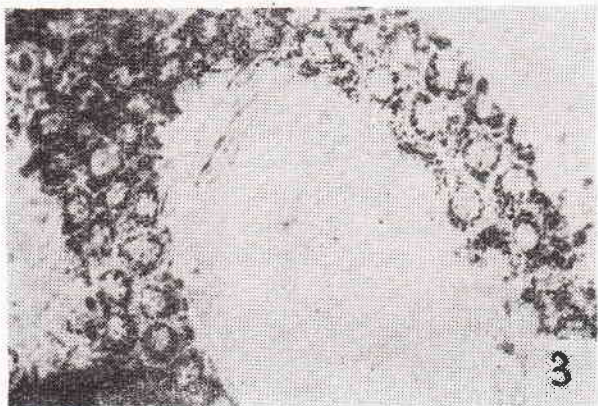


Ryc. 1. Zapalenie gruczołu mlekowego. Intensywny odczyn na fosfatazę kwaśną w licznych fagocytach naciekających tkankę łączną międzyzrazikową (pow. 220 ×)

błonna wydzielniczego (+) oraz nielicznych komórkach fagocytarnych w tkance łącznej międzyzrazikowej (+ —). W gruczole zmienionym aktywność FK była rozmaicie nasiloną, zwykle wyraźnie wzmożoną, miejscami nikłą lub ujemną, przede wszystkim w bardzo licznych komórkach fagocytarnych, naciekających ogniskowo lub rozlanie tkankę międzyzrazikową (ryc. 1), w komórkach nabłonka wydzielniczego (ryc. 3) oraz wokół często spotykanych ciałek skrobiowatych (ryc. 2). Nierzadko obserwowano ponadto w obrębie komórek nabłonka tworzenie się sekwestrów komórkowych.



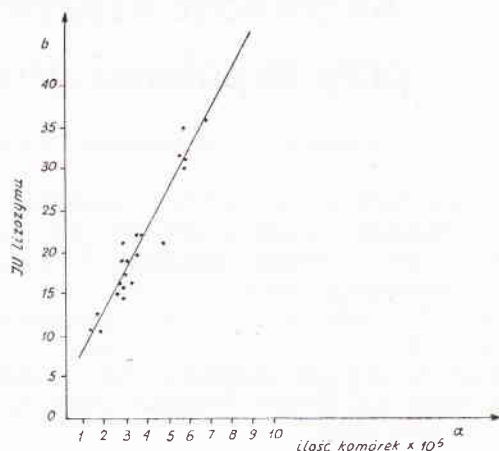
Ryc. 2. Zapalenie gruczołu mlekowego. Intensywny odczyn na fosfatazę kwaśną w komórkach żernych skupiających się w obrębie ciałek skrobiowatych (pow. 60 ×)



Ryc. 3. Zapalenie gruczołu mlekowego. Wzrost odczynu na fosfatazę kwaśną w komórkach nabłonka wydzielniczego (pow. 420 ×)

W obrazie histopatologicznym w większości przypadków obserwowano wyraźny obrzęk tkanki łącznej międzyzrazikowej narządu, ogniskowo lub rozlanie nacieczonej dużą ilością komórek fagocytarnych, złożonych przede wszystkim z neutrofilów (z których część uległa rozpadowi) oraz mniej licznych makrofagów, limfocytów i histiocytów. W utkaniu gruczołu spotykano też mniej lub bardziej liczne ciałka skrobiowate, wokół których często układały się wia-

nuszkowato komórki fagocytarne. W poszerzonych pęcherzykach gruczołu gromadziły się obumierające nabłonki oraz pojedyncze makro i mikrofagi pozlepiane niekiedy w grudki przez krzepnące masy białkowe.



Ryc. 4. Korelacja między aktywnością lizozymatyczną a liczbą komórek mleka lub wydzieliny gruczołu mlekowego

Omówienie wyników

Głównym źródłem lizozymu (muramidazy) są lizosomy komórek żernych. Wykryto go obok innych hydrolaz w lizosomach neutrofilów (3, 9) oraz makrofagach (4, 12, 13).

Enzym ten trawi Gramdodatnie i niektóre Gramujemne bakterie, zarówno żywe jak i martwe, w warunkach tlenowych oraz beztlenowych i jest uważany za jeden z ważnych czynników warunkujących nieswoistą odporność organizmu.

Badania własne obejmujące zdrowy gruczoł mlekowy w okresie laktacji, zapalenia aseptycznego oraz bakteryjnego wykazały wyraźną współzależność między stanem chorobowym gruczołu a poziomem lizozymu i ilością komórek żernych w naciekach zapalnych.

Mleko krów kontrolnych (zdrowych) zawierało nieznaczne ilości tego enzymu, bo do 1,5 IU. We wszystkich natomiast przypadkach schorzeń gruczołu aktywność lizozymatyczna była wielokrotnie wyższa. Równocześnie stopień tej aktywności w mleku w poszczególnych płatach gruczołu był rozmiły i zależny od rozległości komórkowego nacieku zapalnego.

Równolegle ze wzrostem poziomu lizozymu ilość komórek w mleku lub wydzielinie wyraźnie wzrastała, wśród nich obok złuszczonego nabłonków często spotykano neutrofile. Liczba opisywanych komórek w mleku w poszczególnych płatach gruczołu była rozmaita i zwykle tym większa, im wyższa była aktywność lizozymatyczna. Występuje więc wysoka korelacja, wskazująca na wyraźną współzależność między ilością komórek w mleku a aktywnością lizo-

zymu oraz zależność tej aktywności od ilości komórek żernych w naciekach zapalnych tkanki gruczołowej.

W porównaniu z gruczołem krów kontrolnych, u których drobnoziarnisty odczyn na fosfatazę kwaśną, odpowiadający lizosomom, lokalizował się w komórkach nabłonka wydzielniczego oraz nielicznych fagocytach, gruczoł zmieniony chorobowo wykazywał znamienne różnice. Dotyczyły one przede wszystkim aktywności fosfatazy kwaśnej i ilości komórek żernych. Zmiany te były rozmaicie nasilone w poszczególnych płatach gruczołu, zależnie od stopnia zaawansowania procesu zapalnego. W porównaniu z kontrolą ilość komórek żernych wyraźnie wzrosła. Występowały one w tkance mezenchymalnej, skupiały się wokół licznych ciałek skrobiowych oraz w samym świetle pęcherzyków, gdzie często ulegały rozpadowi. Odczyn na fosfatazę kwaśną w opisywanych komórkach był rozmaicie nasilony, zwykle znacznie wzmożony, miejscami nikły lub ujemny, w zależności od stopnia aktywności fagocytarnej tych komórek, ich uszkodzenia i rozpadu. Podobnie przedstawiała się reakcja w nabłonku wydzielniczym. Ilość lizosomów w komórkach nabłonka zwiększała się, aktywność fosfatazy rosła, zaś w cytoplazmie pojawiały się miejscami twory o intensywnym odczynie, odpowiadające sekwestrom komórkowym.

Obserwowane zatem zmiany są podobne do zmian spotykanych w inwolucji gruczołu mlekowego u ssaków, podczas której dominującą rolę odgrywają lizosomy (16, 18). Biorą one bowiem udział w procesach autofagii, redukując cytoplazmę komórek nabłonka gruczołowego (18) oraz procesie heterofagii, w której makrofagi pochłaniają i trawią resztki rozpadłych komórek nabłonka oraz mleko (cyt. za 20). Ponadto w czasie inwolucji ilość makrofagów w gruczole wzrasta (10), odczyn na fosfatazę kwaśną wyraźnie nasila się, zarówno w makrofagach jak i komórkach nabłonka wydzielniczego, co jest związane z zanikiem tkanki gruczołowej. Równoległe ze wzrostem ilości komórek żernych zwiększa się aktywność lizozymu w mleku. Należy więc sądzić, że wahania aktywności lizozymu w różnych okresach funkcji fizjologicznej gruczołu, są wynikiem tworzenia przez lizozym i komórki żerne nieswoistej biologicznej bariery obronnej.

Badania własne wykazały, że w stanach zapalnych gruczołu mlekowego (niezależnie od czynnika wywołującego ten proces) następuje wzrost aktywności lizozymu oraz licznych komórek w mleku, równoległe ze zwiększeniem ilości fagocytów w tkance gruczołowej, które są źródłem tego enzymu.

W badaniach mikroskopowych odczyn na fosfatazę kwaśną stanowi dobry wyznacznik komórek żernych, a tym samym stopnia zaawansowania procesu zapalnego, podobnie jak liczba komórek w mleku i stopień aktywności lizozymu.

Wydaje się również, że w badaniach histoenzymatycznych odczyn na fosfatazę kwaśną będzie przydatny w określaniu nasilenia stanu zapalnego gruczołu mlekowego.

Piśmiennictwo

1. Basmadji K.: Znaczenie biologiczne substancji lizozymopodobnych (lizozym mleka krowiego) przy stanach fizjologicznych i patologicznych gruczołu mlekowego u krów. Praca doktorska AR Wrocław 1977.
2. Burgile J., Kruminš R., Sojane V., Grampacze L.: Trudy Latv. selchoz. Akademii, 68, 28, 1973.
3. Cohn Z. A., Hirsch J. G.: J. exp. Med. 12, 983, 1960.
4. Cohn Z. A., Weiner E.: J. ex. Med. 118, 991, 1963.
5. Gomori G.: Microscopic Histochemistry. University of Chicago Press, 1953.
6. Hankiewicz J., Swierczek E.: Prz. lek. 4, 376, 1975.
7. Hankiewicz J., Swierczek E.: Postę. hig. 5, 609, 1976.
8. Jacob A., Jorre J., Vokral N., Paton A., Theliet J.: Annls Pharm. Paryż. 22, 301, 1964.
9. Jolles P.: Proc. R. Soc. Ser. B. 167, 350, 1967.
10. Mayberry H. E.: Anat. Rec. 149, 99, 1964.
11. Mutovin V. I., Mitjusnikov V. M.: Veterinarija, Moskwa 12, 103, 1973.
12. Myrvik Q. N., Leake E. S., Fariss B.: J. Immun. 86, 133, 1961.
13. Pavillard E. R.: Austr. J. exp. Biol. 41, 265, 1963.
14. Salton M. R. J.: Bact. Rev. 25, 77, 1961.
15. Samborski Z., Basmadji K.: Medycyna Wet. (w druku).
16. Slater T. F., Greenbaum A. L., Wang D. Y.: Ciba Foud. Symp. Lysosomes. 311, 1963.
17. Szymczyk T., Grątkowska H., Kozłowska J.: Czas. stom. 22, 213, 1969.
18. Verley J. M., Holmann K. H.: Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 82, 212, 1967.
19. Wleczorek Z., Czajka M., Kowalczyk H.: Arch. Immun. Ther. 15, 829, 1967.
20. Woessner F. J.: Lysosomes in mammary involution. In Lysosomes in Biology and Pathology. Ed. Dingle J. T. Fell H. B., Am — Els. Publ. Co INC — N. J. 322, 1973.

Adres autora: doc. dr habil. Jerzy Kotz, ul. Mianowskiego 12/2, 51-605 Wrocław.

Котц Я., Басмаджи К., Мадей Е. А. — Активность лизоцима и кислой фосфатазы при мастите коров.

Цель работы заключалась в преследовании поведения лизоцима в молоке или секрете молочной железы в воспалительных состояниях, вызванных разными факторами (чаще всего бактериальными) и в определении активности кислой фосфатазы (а тем самым посредственно и лизоцима) в измененной ткани. Констатировали, что при мастите отмечается рост активности лизоцима и числа клеток в молоке, являющихся его источником. Лизоцим может таким образом считаться фактором, принимающим участие в натуральной сопротивляемости здоровой молочной железы и в бактериальных воспалениях. В микроскопических исследованиях реакция на кислотную фосфатазу является хорошим определителем фагоцитов, а тем самым степени развития воспалительного процесса, похожей как число клеток в молоке и степень активности лизоцима. Кажется также, что в гистоэнзиматических исследованиях реакция на кислотную фосфатазу будет пригодна для определения интенсивности воспалительного состояния молочной железы.

Kotz J., Basmadji K., Madej J. A. — The activity of lysozyme and acid phosphatase in mastitis of cattle.

The purpose of the work was to monitor the behaviour of lysozyme in milk or secretion products of the udder in inflammatory statuses due to different factors (mainly bacteria) and to determine the activity of acid phosphatase in the changed tissue. It was found that in case of mastitis there was an increase of the activity of lysozyme and the number of cells which produced that enzyme. Therefore lysozyme might be treated as a factor taking part in the physiological immunity of the normal udder and in the inflammatory status caused by bacteria. Microscope examinations revealed that the reaction for acid phosphatase reflected the state of phagocytes and therefore the degree of the inflammatory process like the number of cells and the activity of lysozyme. It seems also that the reaction for acid phosphatase may be useful to determine the degree of inflammation of the udder.