

CZESŁAW KUREK

Oporność enzymatyczna gruczołu mlekowego krowy a bakteryjne stany zapalne wymienia

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku

Wydzielina gruczołu mlekowego krowy, w przebiegu *mastitis*, wykazuje wyższą aktywność bakteriostatyczną i bakteriobójczą w porównaniu z mlekiem normalnym. Wywołana jest ona obecnością komponentów niekomórkowych i nie będących przeciwciałami, w których skład wchodzi: system laktoperoksydazy (Lp), laktoferyna (Lf) i lizozym (Li).

System Lp ($\text{Lp}/\text{SCN}^-/\text{H}_2\text{O}_2$) jest aktywny jedynie w obecności trzech komponentów, a mianowicie: laktoperoksydazy, anionu rodankowego i nadtlenu wodoru.

Laktoperoksydaza jest enzymem wytwarzanym przez komórki nabłonkowe wymienia. Stymulatory wpływające na jego wydzielanie są nieznane, wiadomo natomiast, że poziom tego enzymu w mleku jest zmienny i może się wahać od 0–14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1). Zależy on od żywienia, okresu laktacji, rasy bydła i stanu zdrowotnego gruczołu mlekowego. Obok różnic indywidualnych, jakie zaobserwowano w poziomie tego enzymu w mleku z różnych krajów, największą aktywność wykazuje on w okresie 3–5 dni po porodzie. W okresie wypasów pastwiskowych aktywność Lp jest wzmożona i odnosić się ma do wyższego poziomu anionów rodankowych, które w postaci prekursorów występują w kapuście, rzepie oraz w burakach pastewnych. Nie wiadomo jednak, czy wyższy poziom Lp w wydzielinie wymienionej w przebiegu *mastitis* zależy od wzmożonego wydzielania tego enzymu w samym gruczole, czy też jest wynikiem przenikania peroksydazy krwi do gruczołu mlekowego. Nie wyklucza się też, że zależy od myeloperoksydazy wydzielanej przez leukocyty wydzieliny gruczołowej.

Anion rodankowy (SCN^-) może występować w wydzielinie gruczołu mlekowego w ilościach od 1–10 ppm i pochodzi z krwi, w której jego stężenie jest od 2 do 5 razy wyższe. Poziom ten zależy od paszy roślinnej, w której SCN^- występuje jako prekursor ulegając przemianom biochemicznym do postaci anionu rodankowego. W przebiegu *mastitis* ilość jego w wydzielinie gruczołu mlekowego wzrasta na skutek przenikania tego komponentu z krwi.

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) w mleku świeżo pozyskanym występuje w ilościach (2–4 ppm). Do naturalnych jego źródeł w gruczole mlekowym krowy należą puryny, z których pod wpływem enzymu oksydazy ksantynowej system Lp czerpie najprawdopodobniej nadtlenek wodoru. Innym źródłem H_2O_2 są prawdopodobnie leukocyty wydzieliny gruczołowej, szczególnie w stadium wzmożonej fagocytyzy. Bakterie kwasu mlekowego, nie produkujące katalazy,

mogą również stanowić źródło nadtlenu wodoru w mleku.

Poznanie mechanizmu działania systemu Lp w mleku jest wynikiem badań ostatnich lat (3, 5). Wynika z nich, że czynnikiem bakteriobójczym jest wytwarzanie labilnego i bardzo krótkotrwałego produktu przejściowego w postaci podtociocjanatu (OSCN^-), który powstaje z utleniania SCN^- . Do reakcji dochodzi w warunkach optymalnego stężenia molarnego SCN^- i H_2O_2 . Może się on również wytwarzać na drodze nie enzymatycznej w przebiegu hydrolizy tiocyanianu (SCN_2). W odniesieniu do *E. coli* mechanizm działania Lp polega na wewnątrzkomórkowej blokadzie cząsteczki tlenu i unieczynnieniu metabolizmu glukozy i aminokwasów. Komórka *E. coli* eksponowana na działanie systemu Lp ulega zniszczeniu po upływie 1,5–2 godzin. Wykazano również, że OSCN^- utlenia grupę sulfydrylową (SH^-) niektórych enzymów metabolicznych błony komórkowej bakterii. W odniesieniu do *Str. agalactiae* do efektu bakteriostatycznego dochodzi w wyniku równoczesnego działania wszystkich 3 komponentów systemu Lp. Anion rodankowy inkorporuje się wówczas w białko komórki bakteryjnej, co może okresowo hamować rozwój bakterii. Jak stwierdzono, różnice we wrażliwości na system Lp występują nie tylko w obrębie poszczególnych gatunków, lecz także zostały zaobserwowane u poszczególnych szczepów tego samego gatunku.

In vitro system Lp hamuje wzrost *Str. agalactiae* i *Str. uberis*, natomiast wobec *Str. dysgalactiae* jest on aktywny. W stosunku do *Str. pyogenes* system Lp jest bardzo aktywny, natomiast wobec *E. coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas sp.*, które nie akumulują metabolicznego H_2O_2 działa jedynie w przypadku dostarczenia nadtlenu wodoru pochodzenia egzogenego.

Odnosnie do działania Lp (SCN^-) H_2O_2 na drobnoustroje wywołujące *mastitis in vivo*, brak jest badań, których wyniki byłyby reprezentatywne. Z nielicznych obserwacji (cyt. 4) wynika, że przebieg zakażenia wymienia wywołany przez *E. coli* może być znacznie złagodzony po dogruczołowym wprowadzeniu glukozy z dodatkiem oksydazy jako źródła nadtlenu wodoru. Faktem ten może wskazywać na możliwość aktywacji systemu Lp w samym wymieniu, w którym istnieją warunki do wytworzenia H_2O_2 . Nie wyklucza to ewentualnej możliwości stosowania w przebiegu *mastitis* substratów zawierających źródło H_2O_2 , który mógłby

być uwalniany pod wpływem działania oksydazy ksantynowej.

Zagadnieniem otwartym jest problem, czy leukocyty wydzieliny wymieniowej mogą stanowić źródło H_2O_2 dla systemu Lp zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Z nielicznych badań zdaje się wynikać (cyt. 4), że fagocytoza cząsteczek kazeiny *in vitro* wytwarza wystarczające ilości H_2O_2 do utleniania SCN^- układu Lp. Można zatem przypuszczać, że analogiczny proces zachodzi również *in vitro*. Różne są jednak ilości SCN^- wymagane do aktywnego działania systemu Lp wobec drobnoustrojów wywołujących *mastitis*. Do zahamowania wzrostu *Str. pyogenes* w mleku wymagana jest obecność 2 ppm anionu rodanku, a w odniesieniu do *Str. agalactiae* podobny efekt występuje wtedy, kiedy stężenie tego komponentu jest od 5 do 10 razy wyższe. Taki wysoki poziom SCN^- w mleku występuje bardzo rzadko, ale można go osiągnąć poprzez odpowiednie żywienie krów. Z obserwacji wynika również, że w okresie lata, kiedy poziom SCN^- w mleku jest najwyższy, stwierdza się wyjątkowo występowanie *Str. uberis* jako czynnika etiologicznego *mastitis* (cyt. 4, 5).

Laktoferyna (Lf) jest bakteriostatyczną glikoproteiną wytwarzaną przez gruczoł mlekowy o właściwościach wiązania jonów Fe. Lf jest bardziej aktywna wobec drobnoustrojów żelazofobnych, jak np.: *E. coli*, natomiast nieco słabiej działa wobec paciorkowców i gronkowców, mających mniejsze zapotrzebowanie na jony Fe (6). Doświadczalnie wykazano, że Lf może hamować wzrost gronkowca złocistego i białego oraz drobnoustrojów rodzaju *Pseudomonas*. Mechanizm tego działania nie jest dokładnie poznany. Przyjmuje się, że polega na zachwianiu metabolizmu komórki bakteryjnej poprzez zubożenie środowiska w jony Fe, względnie działa na komórki bakteryjne uszkodzone przez lizozym lub też tworzy związki kompleksowe z immunoglobuliną o właściwościach bakteriostatycznych.

Lizozym (Li) jest enzymem litycznym składającym się z 129 aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. Bakterioliza wobec komórki bakteryjnej polega na wnikaniu enzymu pomiędzy kwas N-acetylmuramidowy i N-acetyloglukozaminę cząsteczki mukopolisacharydu ściany komórkowej. Drobnoustroje gromdotatnie są podatniejsze na lityczne działanie Li, ponieważ posiadają większą cząsteczkę mukopolisacharydu.

Jak stwierdzono, poziom Lf i Li w wydzielinie gruczołów mlekowych krów zależy od koncentracji komórek/ml, okresów laktacyjnych, ilości laktacji, okresu ciąży oraz rasy krów mlecznych.

W wydzielinie gruczołowej zawierającej poniżej 500 000 komórek/ml najwyższy poziom Lf stwierdza się pierwszego dnia po porodzie. Wynosi on 1287 $\mu\text{g/ml}$ i gwałtownie zmniejsza się

drugiego dnia do poziomu 693 $\mu\text{g/ml}$, opadając następnie do 111 $\mu\text{g/ml}$ w 10 dniu po wycieleniu. W 100 dniu laktacyjnym poziom Lf wynosi 300 $\mu\text{g/ml}$, w 200 dniu 650 $\mu\text{g/ml}$, w 300 dniu laktacyjnym 1000 $\mu\text{g/ml}$ (7). W porównaniu z Lf stwierdza się znacznie mniejsze ilości Li, którego poziom w 10 dniu laktacji wynosi 0,11 $\mu\text{g/ml}$, a dopiero pod jej koniec osiąga 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (7). Nie bez wpływu pozostaje również ilość przebytych laktacji na poziom Lf. Średnio u krów w okresie 1 i 2 laktacji poziom Lf wynosi 380 $\mu\text{g/ml}$, a u krów starszych 763 $\mu\text{g/ml}$. Wraz ze wzrostem ilościowych komórek w 1 ml wydzieliny gruczołowej zwiększa się ilość Lf/ml.

Ilość przebytych laktacji nie ma wpływu na poziom Li w wydzielinie gruczołowej. Natomiast wraz ze wzrostem ilościowym komórek przy $10 \times 10^6/\text{ml}$, koncentracja Lf jest trzykrotnie wyższa. Powyżej tej ilości poziom Li wzrasta czterokrotnie w stosunku do ilości tego enzymu stwierdzanego w wydzielinie gruczołów mlekowych zdrowych.

Nie bez wpływu na koncentrację tych enzymów pozostają okresy ciążowe zwierząt. Wykazano, że poziom Lf zwiększa się o 20% w 250 dniu ciąży, o 85% w 270 dniu i o 164% w 290 dniu ciąży (7). Nie wiadomo, jak kształtują się w tych okresach poziomy Li/ml. Wpływ rasy zaznacza się jedynie w odniesieniu do Lf. U krów raz nizinnych jest on znacznie wyższy w porównaniu z krowami ras terenów górzystych, czego nie wykazano w odniesieniu do Li.

Jak wynika z przytoczonych danych, poziom Lf zależy ściśle od stanu zdrowotnego wymienia, czego nie obserwuje się w odniesieniu do Li. W związku z powyższym, koncentracja Lf może być wskaźnikiem zaburzeń patologicznych gruczołu mlekowego krowy. Nie wiadomo jednak w jakim stopniu Lf i Li wpływają na enzymatyczną oporność wymienia wobec zakażeń bakteryjnych, co wymaga dalszych badań i obserwacji.

System Lp w gruczole mlekowym zasuszonym a mastitis

Znana jest wysoka podatność wymienia na zakażenia bakteryjne w początkowym okresie zasuszenia. Dotychczas nie było wiadomo, czy wynikała ona z łatwiejszej penetracji drobnoustrojów do wnętrza gruczołu mlekowego, czy też w obrębie samego wymienia wytwarzały się w tym okresie warunki stymulujące rozwój chorobotwórczej flory bakteryjnej. Wiadomo również, że w okresie zasuszenia wzrasta w wydzielinie gruczołowej poziom Lp i SCN^- oraz immunoglobulin i komplementu, które nie zabezpieczają jednak wymienia przed nowymi zakażeniami (cyt. 2). Jak stwierdzono, system Lp hamuje w mleku, szczególnie w okresie lata, wzrost *Str. uberis*, natomiast wobec *Str. aga-*

lactiae jest on mniej aktywny. Czynnikiem neutralizującym aktywność Lp ma być cystyna, występująca w mleku w stanie wolnym.

Z badań, jakie przeprowadzono nad bakterio-
statystycznymi właściwościami wydzieliny gruczołu zaszuszonego wynika, że wzrostowi Lp i SCN^- w początkowym okresie zasuszenia towarzyszył wzrost ilościowy wolnej cystyny, antagonisty Systemu Lp (2). Wykazano również, że jej średnia koncentracja przed zasuszeniem wynosiła 0,66 $\mu\text{molla/L}$, a po zasuszeniu 6,66 $\mu\text{molla/L}$. Odnośnie do cysteiny, poziom jej w analogicznych okresach wynosił 0,28 $\mu\text{molla/L}$ i 1,4 $\mu\text{molla/L}$. W porównaniu z hamującym wpływem cystyny na system Lp, analogiczne działanie cysteiny było zaznaczone w stopniu minimalnym (2).

Określając wpływ wydzieliny zaszuszonego gruczołu mlekowego na zawiesinę paciorkowców bezmleczności stwierdzono, że wzrost tych drobnoustrojów był stymulowany i to w stopniu wyższym aniżeli wtedy, kiedy paciorkowce były zawieszone w wydzielinie gruczołowej pozyskanej przed zasuszeniem (2). Działanie owe odniesiono do neutralizującego wpływu cystyny wobec systemu $\text{Lp/SCN}^-/\text{H}_2\text{O}_2$. Zjawisko to może tłumaczyć zwiększoną wrażliwość zaszuszonego gruczołu mlekowego krowy na zakażenia paciorkowcowe.

Istnieją jeszcze dodatkowe czynniki wpływające w okresie zasuszenia na zwiększoną podatność wymienia na zakażenia bakteryjne. Jednym z nich może być wyższe pH wydzieliny gruczołowej niwelujące bakteriostatyczne możliwości systemu Lp oraz katalaza wytwarzana przez komórki somatyczne, których ilość w tym okresie znacznie wzrasta. Wpływa ona neutralizującą na nadtlenek wodoru wytwarzany przez paciorkowce, co nie jest jednak regułą. Aktywność tego enzymu może być hamowana w wyniku utleniania kwasu askorbino-

wego w obecności katalicznych jonów Cu^{++} (cyt. 2). Oba te komponenty występują w mleku w stężeniach, które mogą hamować aktywność tego enzymu. Nie wiadomo jednak, czy w wydzielinie gruczołu mlekowego zaszuszonego występują one w odpowiednich ilościach, oraz czy mogą być aktywne *in vivo*. Niemniej jednak nie można wykluczyć neutralizującego wpływu katalazy na system Lp *in vivo*.

Dyskutowanym zagadnieniem jest również znana klinicystom duża ilość przypadków *mastitis* u krów w okresie 1 tygodnia po wycieleniu. Owa podatność wymienia na bakteryjne stany zapalne w tym okresie zdaje się mieć swe uzasadnienie w niższej koncentracji Lp i SCN^- w sianie w porównaniu z wydzieliną gruczołu zaszuszonego. Stwierdzono również, że poziom peroksydazy w sianie jest niższy aniżeli w mleku. Nie wiadomo jednak, w jakim stopniu zakażenia bakteryjne w tym okresie są stymulowane zmienną koncentracją komponentów systemu Lp (2). Nie można też wykluczyć, że w sianie znajduje się inny, nieznanый jeszcze komponent odpowiedzialny za stymulujący wpływ na wzrost chorobotwórczych paciorkowców wywołujących *mastitis*.

Piśmiennictwo

1. Bassalik-Chabielska L.: Proc. Conf. Resistance Factors and Genetic Aspects of Mastitis Control. Jabłonna, 189, Oct. 2-5, 1980.
2. Brown R. W., Mickelson M. N.: Am. J. vet. Res. 40, 250, 1979.
3. Holmberg O., Concha C., Morein B.: Proc. Conf. Resistance Factors and Genetic Aspects of Mastitis Control. Jabłonna, 307, Oct. 2-5, 1980.
4. Konkonen H.: Proc. Conf. Resistance Factors and Genetic Aspects of Mastitis Control. Jabłonna, 323, Oct. 2-5, 1980.
5. Reiter B.: Experta Medica. ser. 65, June 1979, Ciba Foundation.
6. Senf B., Meyer F., Erhardt G.: Proc. Conf. Resistance Factors and Genetic Aspects of Mastitis Control. Jabłonna, 340, Oct. 2-5, 1980.
7. Wrba H.: Expl. Path. 16, 154, 1978.

Adres autora: doc. dr hab. Czesław Kurel; ul. Batorego 37 C/34, 80-251 Gdańsk.

MAYLIN G. A., RUBIN D. S., LEIN D. H.: Poziom selenu i witaminy E u koni. (Selenium and vitamin E in horses). Cornell Vet. 70, 272-289, 1980 (3).

Określono poziom selenu w surowicy metodą Olsons i wsp. i witaminy E metodą Fabianek i wsp. oraz aktywność peroksydazy glutationu u koni w dwóch stadninach w listopadzie lub grudniu, w marcu i w lipcu. Nie stwierdzono znamienych różnic w średnim poziomie selenu we krwi w trzech okresach badawczych. Natomiast zawartość witaminy E w plazmie wykazywała wahania sezonowe. Średnia zawartość selenu w plazmie koni karmionych paszą lokalną wynosiła 7,7 $\mu\text{g/dl}$, zaś paszą pochodzącą z zakupu 15,6 $\mu\text{g/dl}$. Współczynnik korelacji między aktywnością peroksydazy glutationu a zawartością selenu w plazmie wynosił 0,94. Wzbogacenie dziennej dawki paszy 1 mg selenu powodowało wzrost stężenia tego pierwiastka we krwi powyżej poziomu przy którym występuje zwyrodnienie mięśni. Parenteralne podawanie selenu ciężarnym klaczom wskazuje na przechodzenie jedynie niewielkich ilości tego pierwiastka przez barierę łożyskową.

G.

HASHINO Y., SCOTT F. W.: Badanie immunofluorescencyjne i w mikroskopie elektronowym hodowli wycinka jelita cienkiego kotów zakażonego wirusem zakaźnego zapalenia otrzewnej kotów. (Immunofluorescent and electron microscopic studies of feline infectious peritonitis virus). Am. J. vet. Res. 41, 672-681, 1980 (5).

W hodowli jelit cienkich pochodzących od 1-3 tygodniowych kociąt, SPF, zakażonej wirusem zapalenia otrzewnej kotów przebadano patogenę, morfologię i morfogenezę zakażenia wirusowego. W badaniach zastosowano odczyn immunofluorescencji pośredniej i bezpośredniej oraz obserwacje w mikroskopie elektronowym. Obecność koronawirusów stwierdzono w badaniach w mikroskopie elektronowym w płynie z hodowli w okresie od 1 do 12 oraz 15, 22, 31 i 43 dnia po zakażeniu hodowli. Swoista immunofluorescencja występowała w komórkach kosmków jelita cienkiego w okresie pierwszych 12 dni po zakażeniu hodowli. Częstotki wirusa występowały w cytoplazmie zakażonych komórek nabłonka kolumnowego kosmków. Tam też można było obserwować kolejne stadia morfogenezy wirusa.

G.