

Aktywność granulocytów krwi krów zdrowych i z zapaleniem gruczołu mlekowego*)

HANNA MARKIEWICZ, EDWARD MALINOWSKI, KRYSZYNA KUŻMA,
SEBASTIAN SMULSKI, MICHAŁ KACZMAROWSKI

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego Oddział w Bydgoszczy, al. Powstańców Wilk. 10, 85-090 Bydgoszcz

Markiewicz H., Malinowski E., Kuźma K., Smulski S., Kaczmarowski M.

Activity of neutrophils in the blood of healthy and mastitic cows

Summary

The purpose of the study was to evaluate the metabolic activity of neutrophils in pure blood healthy and mastitic cows. Examinations were performed on 10 cows with clinical mastitis, 10 with subclinical mastitis and 10 healthy cows. The blood samples were collected from the coccygeal vessels and milk veins on the first day of clinical mastitis treatment with an intramammary product containing amoxicillin, clavulanic acid and prednisolone (or observation of the other cows) and on 3rd and 7th days. The blood was examined in the following ways: without in vitro stimulation and in vitro stimulation using fMLP, OZ, PMA. The reactive oxygen species (ROS) production was assessed by means of luminol-enhanced chemiluminescence (CL) using a kinetic method for 40 minutes at 38°C, measuring CL at 5 minute intervals (BioOrbit 1251 Luminometer). The area under the curve (integrate) was calculated. Significant differences in CL levels between peripheral blood and blood flowing from the udder were not found, irregardless of the use of stimulators or udder health status. The spontaneous and induced CL level, mainly through means of the receptor, was significantly higher in the blood of mastitic cows in comparison to healthy cows. PMNs from chronic mastitic cows were characterized by weakness of oxygen metabolism and a crucial increase of a stimulated respiratory burst through activation of the protein kinase C way (PMA). A significant decrease of OZ stimulated and non significant decrease of PMA stimulated CL was determined on the 3rd and 7th days after intramammary clinical mastitis treatment; however, the spontaneous CL remained on the same level.

Keywords: mastitis, PMN activity

Granulocyty obojętnochłonne (PMN) stanowią najważniejszy składnik systemu obronnego gruczołu mlekowego. Przedostanie się drobnoustrojów do wnętrza wymienia powoduje aktywację tych komórek. Stan ten jest efektem kontaktu z czynnikami chemotaktycznymi, wytwarzanymi zarówno przez organizm gospodarza, jak i mikroorganizmy. Skutkiem aktywacji są zmiany w morfologii komórki oraz wzrost ekspresji receptorów. Nawet w zlokalizowanej postaci zapalenia uwalniane mediatory tego procesu przedostają się do krwiobiegu i działają ogólnoustrojowo, wpływając na stan czynnościowy granulocytów. Obserwuje się napływ PMN do miejsca objętego procesem zapalnym ze wszystkich dostępnych obszarów – obwodowego, puli marginalnej i szpiku (4, 13, 15, 18).

Do oceny zmian metabolizmu tlenowego, towarzyszących aktywacji granulocytów służą badania poziomu chemiluminescencji (CL), która jest zjawiskiem generowania fotonów światła podczas reakcji chemicznych. Badanie chemiluminescencji neutrofilów może

być przydatne do diagnostyki stanu zapalnego. CL granulocytów jest podwyższona w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych, niezależnie od ich etiologii i rodzaju użytej sondy. Chemiluminescencję można wywołać, między innymi, przez zajęcie receptorów dla związków chemotaktycznych za pomocą formylo-metionylo-leucylo-fenyloalaniny (fMLP), receptorów dla fragmentów Fc przeciwciał i dopełniacza przy użyciu opsonizowanego zymosanu (OZ) oraz drogą pozareceptorową, bezpośrednio pobudzając kinazę białkową C, z pominięciem interakcji ligand–receptor używając estru forbolu (PMA). Pomiar CL zależnej od luminolu koreluje ze stanem funkcjonalnym granulocytów i dotyczy produktów związanych z aktywnością peroksydazową. Badania prowadzone w pełnej krwi wykluczają możliwość aktywacji tych komórek podczas izolacji (5, 8, 22).

Celem badań była ocena spontanicznej i stymulowanej aktywności metabolicznej neutrofilów w pełnej krwi krów zdrowych oraz z klinicznym i podklinicznym zapaleniem wymienia wraz z wpływem leczenia *mastitis* na stan aktywacji tych komórek.

*) Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego nr 2 P06K 048 26 finansowanego przez KBN.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 10 krowach zdrowych, 10 z podklinicznym i 10 z klinicznym zapaleniem wymienia. Leczenie zwierząt wykazujących kliniczną postać *mastitis* polegało na 3-krotnej aplikacji dowymieniowej preparatu zawierającego amoksyliny z kwasem klawulanowym i prednizolon w odstępach 12 godz. Wszystkie krowy były w podobnej fazie laktacji (między 15. a 70. dniem po wycieleniu). Krew pobrano do probówek heparynizowanych (system Vacutainer) w dniu rozpoczęcia leczenia (lub obserwacji w przypadku krow zdrowych i z zapaleniem podklinicznym) oraz w 72. i 168. godzinie, licząc od tego momentu. Wskaźniki hematologiczne oznaczono przy użyciu analizatora Sysmex F800, a liczbę komórek somatycznych przy użyciu Fossomatic 90. W krwi pełnej z żyły młecznej i naczyń ogona określono wielkość CL, według następującego schematu: – bez stymulacji; – stymulacja fMLP; – stymulacja OZ; – stymulacja PMA. Oznaczenia wykonano metodą kinetyczną w temp. 38°C, rejestrując wskazania luminometru przez 40 min. w odstępach 5-minutowych. Pomiarów chemiluminescencji zależnej od luminolu z wykorzystaniem pola powierzchni pod krzywą w określonym przedziale czasu (integrate), wyrażającego całkowitą ilość światła wyemitowaną przez komórki, dokonano przy pomocy luminometru BioOrbit 1251.

Stosowano następujące odczynniki: luminol (Sigma) w postaci substancji, którą rozpuszczono w 0,4% roztworze NaOH do stężenia 28 $\mu\text{mol/l}$; zymosan (Sigma) – 100 mg zymosanu zawieszono w mieszaninie 10 ml PBS i 10 ml osocza pochodzącego od 5 zdrowych krow, mieszaninę inkubowano w 38°C przez 30 min., po odwirowaniu osad zawieszono w 10 ml PBS, a po trzykrotnym płukaniu osad zawieszono w PBS, aby końcowe stężenie wynosiło 0,3 mg/ml; PMA (Sigma) w ilości 5 mg rozpuszczono w 5 ml 96% etanolu, a następnie w PBS do stężenia 200 ng/ml; fMLP (Sigma) w ilości 5 mg rozpuszczono w 4,56 ml DMSO, z roztworu macierzystego przygotowano odczynnik roboczy w PBS o stężeniu 2×10^{-6} M.

Objętości i kolejność dodawanych odczynników przedstawiono w tab. 1.

Otrzymane wartości skorygowano według wzoru:

$$CL_{\text{obliczona}} = \frac{CL_{\text{zmierzona}} \times \text{Hb} (\%) }{\text{WBC} (\text{tys./}\mu\text{l}) \times \text{PMN} (\%) \times 1,5}$$

Przy doborze stymulatorów kierowano się mechanizmami, przez które dany związek powoduje uruchomienie reakcji wybuchu oddechowego.

Całkowity stan antyoksydacyjny osocza oceniano metodą kolorymetryczną opartą na redukcji powstawania katio-

Tab. 1. Objętości (μl) i kolejność dodawanych odczynników

Płyny i odczynniki	Bez stymulacji (BS)	OZ	fMLP	PMA
PBS	200	100	100	100
Luminol	100	100	100	100
Krew pełna	150	150	150	150
Stymulator		100	100	100

norodnika ABTS^{o+}. Badanie przeprowadzono używając odczynników firmy Randox.

Wyniki oceniano przy użyciu testu t-Studenta dla prób zależnych oraz za pomocą analizy wariancji ANOVA w klasyfikacji pojedynczej przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki i omówienie

Średnia liczba komórek somatycznych wynosiła w grupie krow zdrowych $82\ 000 \pm 70\ 000/\text{ml}$, w grupie z zapaleniami podklinicznymi $1\ 323\ 000 \pm 1\ 141\ 000/\text{ml}$, a w grupie z zapaleniami klinicznymi $5\ 437\ 000 \pm 2\ 855\ 000/\text{ml}$ (u 3 krow z tej grupy nie oznaczono liczby komórek somatycznych ze względu na ropny charakter wydzieliny).

Każda krowa cechowała się indywidualnym poziomem aktywności PMN, co wskazuje na dużą zmienność osobniczą. Wielkość wybuchu tlenowego neutrofilów determinowana jest także wiekiem i fazą laktacji (2, 10, 12). Nie wykazano istotnych różnic między CL krwi obwodowej a CL krwi odpływającej z wymienia, niezależnie od użytego stymulatora i stanu zdrowotnego gruczołu mlekowego (tab. 2), dlatego dalszych analiz dokonywano na wartościach CL krwi odpływającej z wymienia. Zapalenie kliniczne spowodowało znamieny wzrost CL spontanicznej w porównaniu do krow zdrowych. Wpłynęło również na istotny wzrost CL stymulowanej zarówno drogą receptorową, jak i pozareceptorową w porównaniu z grupą kontrolną i z grupą z zapaleniem podklinicznym. CL stymulowana fMLP pozostawała na poziomie CL spontanicznej we wszystkich grupach krow. Neutrofile krow zdrowych odpowiadały z podobnym natężeniem na aktywację zarówno drogą receptorową, jak i pozareceptorową, w przeciwieństwie do krow z zapaleniem podklinicznym, u których stymulacja PMA

Tab. 2. Aktywność PMN w krwi odpływającej z wymienia i krwi obwodowej krow zdrowych i krow z zapaleniem wymienia ($\bar{x} \pm \text{SD}$; $n = 10$)

Stan gruczołu mlekowego	Stymulator	Żyła młeczna	Naczynia ogona
Zdrowy	BS	$481^a \pm 204$	471 ± 197
	fMLP	$491^a \pm 189$	478 ± 159
	OZ	$1269^a \pm 427$	1125 ± 258
	PMA	$1129^a \pm 523$	1432 ± 703
Zapalenie podkliniczne	BS	885 ± 337	854 ± 316
	fMLP	895 ± 300	927 ± 307
	OZ	$1159^a \pm 458$	1136 ± 359
Zapalenie kliniczne	PMA	1725 ± 436	1593 ± 456
	BS	$1097^b \pm 772$	900 ± 734
	fMLP	$1251^b \pm 863$	1010 ± 869
	OZ	$2279^b \pm 1130$	1876 ± 834
	PMA	$1745^b \pm 948$	1926 ± 875

Objaśnienie: a, b – różnice istotne dla $p < 0,05$

wywołała istotnie wyższą CL niż opsonizowany zymosan. W grupie krów z zapaleniem klinicznym silniejszym stymulatorem był OZ niż PMA. Granulocyty krów z zapaleniem podklinicznym cechowały się słabą reakcją na stymulatory, przy jednoczesnej nadprodukcji reaktywnych form tlenu (wartość ilorazu „integrate” bez stymulacji do wartości „integrate” ze stymulatorem 0,76). U krów zdrowych iloraz ten wynosi 0,38, wobec 0,48 u krów z zapaleniem klinicznym. Uzyskane wyniki potwierdzają, że zapalenie gruczołu mlekowego nie jest jedynie procesem miejscowym, ograniczonym do danej ćwiartki, ale oddziałuje również na cały organizm, co wpływa na funkcję krążących granulocytów.

Podanie dowymieniowe antybiotyku spowodowało obniżenie CL stymulowanej OZ w 3. i 7. dniu od rozpoczęcia leczenia. Uzyskane różnice były na granicy istotności ($p = 0,057$). Obserwowano również spadek CL po stymulacji PMA. Chemiluminescencja spontaniczna i indukowana fMLP pozostawała na podobnym poziomie w kolejnych dniach po leczeniu (tab. 3).

Z danych piśmiennictwa wynika, że PMN była cechująca się brakiem receptorów dla fMLP. Formylometionylowe peptydy, których syntetycznym analogiem jest fMLP, nie wywołują chemotaksji neutrofilów bydłowych (19, 20). Uzyskane wyniki potwierdzają, że fMLP nie stymuluje wybuchu tlenowego granulocytów. Niektóre badania pokazują jednak, że receptory dla fMLP na neutrofilach tego gatunku mogą być utajone, a mechanizmy ich ekspresji są nieznane. Wykazano bowiem wzrost CL stymulowanej fMLP w wysokim stężeniu (2×10^{-4} M) przez PMN krów. Wybuch tlenowy wzrastał, kiedy pomiar poprzedzony był preinkubacją z mieloperoksydazą (3).

Inwazja bakterii do gruczołu mlekowego wpływa na aktywację komórek śródbłonna i wydzielanie cytokin (IL-1, IL-8, TNF- α) przez komórki epitelialne (1). Uwalnianie cytokin prozapalnych przez te komórki jest spolaryzowane w kierunku przypadstawnobocznym, co sprzyja nie tylko napływowi PMN do gruczołu mlekowego, ale także aktywacji neutrofilów w krwi obwodowej (17). Skutkiem aktywacji jest, między innymi, wzrost ekspresji receptorów dla czynników chemotaktycznych. U krów z chronicznym zapaleniem wymienia wywołanym przez *Staph. aureus* nie stwierdzono zmian w ekspresji receptorów błonowych neutrofilów krwi obwodowej, jak również zmian w subpopulacji limfocytów (16). Wykazano jednak, że 83% krów z tą postacią *mastitis* cechuje się obecnością specyficznych przeciwciał klasy IgG, podczas gdy u 17% zwierząt ich nie wykryto (7). Stan zapalny wymienia indukowany podaniem LPS powoduje obniżenie CL neutrofilów (11).

Funkcje opsonizujące u bydła spełniają głównie przeciwciała klasy IgM i IgG2. Większość obecnych w krwi PMN wiąże IgM, co wskazuje, że te właśnie przeciwciała są istotne dla fagocytozy. Rozpoznanie immunologiczne bakterii następuje przez region Fab,

Tab. 3. Aktywność granulocytów obojętnochłonnych krwi krów przed i po leczeniu *mastitis*

Stymulator	0. dzień	3. dzień	7. dzień
BS	1097 \pm 772	1152 \pm 883	1301 \pm 816
fMLP	1251 \pm 863	1182 \pm 798	1368 \pm 824
OZ	2279 \pm 1130	1535 \pm 985	1577 \pm 927
PMA	1745 \pm 948	1302 \pm 765	1370 \pm 821

Tab. 4. Wpływ stanu zdrowotnego gruczołu mlekowego na całkowity stan antyoksydacyjny osocza (TAS mmol/l)

Rodzaj krwi	Stan gruczołu mlekowego		
	zdrowy	zap. podkliniczne	zap. kliniczne
Żyła mleczna	0,312 \pm 0,166	0,199 \pm 0,116	0,243 \pm 0,178
Naczynia ogona	0,311 \pm 0,150	0,210 \pm 0,100	0,261* \pm 0,184

Objaśnienie: * – $p < 0,05$

a wiązanie z PMN przez Fc. Zdolność PMN do ruchu i fagocytozy jest, między innymi, uwarunkowana obecnością receptorów błonowych, które pozwalają na wiązanie immunoglobulin i wykrywanie chemoatraktantów (14).

W przeprowadzonych badaniach wykazano wzmożoną aktywność metaboliczną neutrofilów, ocenianą testem CL, u krów z klinicznym zapaleniem wymienia. Może to wskazywać na skuteczne działanie układu immunologicznego. Wielkość CL jest związana z bakteriobójczą zdolnością granulocytów obojętnochłonnych. W grupie krów z podklinicznym zapaleniem nie wykazano istotnego wzrostu CL po stymulacji PMA i OZ. Słabsza odpowiedź na aktywację zarówno drogą receptorową, jak i pozareceptorową może być wynikiem długotrwałej stymulacji wywołanej przez mediatory zapalenia i prowadzącej do funkcjonalnego wyczerpywania się komórek. W podobnych badaniach, w których jako wynik pomiaru przyjęto maksymalną wartość CL (szczyt), uzyskano odmienne wyniki. Najbardziej podatne na stymulację OZ były granulocyty krów wykazujących *mastitis subclinica*, a CL spontaniczna u krów z objawami klinicznymi była niższa niż u zdrowych (9).

Granulocyty obojętnochłonne mogą znajdować się w różnych stanach funkcjonalnych. Neutrofile zwierząt zdrowych wykazują tzw. spoczynkową aktywność CL. W ostrych i przewlekłych stanach zapalnych PMN mogą być w stanie aktywacji, preaktywacji lub wyczerpania. U krów z podklinicznym zapaleniem wymienia odpowiedź na stymulatory była słaba, co wskazuje na obniżenie się metabolizmu tlenowego neutrofilów. Może być to spowodowane wyczerpywaniem się rezerw energetycznych tych komórek, na skutek chronicznego przebiegu zapalenia podklinicznego. Obniżenie CL związane też jest ze zmniejszeniem liczby Fc receptorów na skutek złuszczenia lub internalizacji. O przejściu zapalenia w stan przewlekły lub też o wygaszeniu tego procesu decyduje ilość napływają-

cych leukocytów z krążenia i czas ich przeżycia oraz szybkość usuwania tych komórek przez makrofagi (21).

Oceniając całkowity stan antyoksydacyjny osocza, za który odpowiadają molekuły niskocząsteczkowe (6), nie stwierdzono istotnych różnic między grupami zwierząt (tab. 4). Krowy zdrowe cechowały się jednak najwyższym średnim poziomem TAS, podczas gdy najniższe wartości obserwowano u krów z zapaleniem podklinicznym. Obniżona wartość pojemności antyoksydacyjnej u krów z zapaleniem podklinicznym może wskazywać, że jest to równocześnie zapalenie przewlekłe, a niskie wartości TAS mogą być skutkiem długotrwałego utrzymywania się podwyższonego stężenia reaktywnych form tlenu (RFT). W grupie krów z zapaleniem klinicznym odnotowano istotną różnicę między TAS krwi odpływającej z wymienia, a krwią obwodową. Zwiększone wytwarzanie RFT w gruczole mlekowym, wywołane gwałtownym napływem PMN u tych zwierząt, może przyczynić się do obniżenia TAS w krwi odpływającej z wymienia. Nie stwierdzono wpływu dowymieniowej aplikacji preparatu antybiotykowego na zmianę poziom TAS w kolejnych dniach badań.

Z przeprowadzonych badań wynika, że w krwi krów z kliniczną postacią *mastitis* ma miejsce nasilona chemiluminescencja spontaniczna i indukowana głównie drogą receptorową, połączona z istotnym zmniejszeniem potencjału antyoksydacyjnego. U krów z podkliniczną postacią *mastitis* widoczne jest osłabienie metabolizmu tlenowego neutrofilów, a główną drogą stymulacji jest droga pozareceptorowa.

Piśmiennictwo

1. *Alluwaimi A.*: The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Res. Vet. Sci.* 2004, 77, 211-222.
2. *Burvenich C., Merris V., Mehrzad J., Diez-Fraile A., Duchateau L.*: Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 2003, 34, 521-564.
3. *Cooray R.*: Formylmethionyl – leucyl – phenylalanine – induced chemiluminescence responses in bovine polymorphonuclear leukocytes. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1996, 19, 1-8.
4. *Hampton M., Kettle J., Winterbourn C.*: Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998, 92, 3007-3017.
5. *Jurczak W., Skotnicki A., Zgliczyński M., Kwasnowska E.*: Chemiluminescencja granulocytów. *Przegląd Lek.* 1993, 50, 53-58.
6. *Kleczkowski M., Kluciński W., Sikora J., Zdanowicz M., Dziekan P.*: Role of the antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle – nonenzymatic mechanisms (Part 2). *Pol. J. Vet. Sci.* 2003, 6, 301-308.
7. *Leitner G., Yadlin B., Glickman A., Chaffer M., Saran A.*: Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Science* 2000, 69, 181-184.
8. *Lewkowicz P., Lauk-Puchała B., Banasik M., Górańska N., Tchórzewski H.*: Próba standaryzacji pomiaru chemiluminescencji krwi pełnej jako metody oceny funkcji ludzkich granulocytów w badaniach *in vitro*. *Diagn. Lab.* 1999, 35, 497-510.
9. *Malinowski E., Kuźma K., Sobolewska S., Kłossowska A.*: Aktywność metaboliczna komórek fagocytujących mleka i krwi krów zdrowych i z zapaleniem wymienia. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 321-324.
10. *Mehrzad J., Duchateau L., Pyöröla S., Burvenich C.*: Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 3268-3276.
11. *Mehrzad J., Dosogne H., Meyer E., Burvenich C.*: Local and systemic effects of endotoxin mastitis on the chemiluminescence of milk and blood neutrophils in dairy cows. *Vet. Res.* 2001, 32, 131-144.
12. *Mehrzad J., Dosogne H., Meyer E., Eman R., Burvenich C.*: Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *J. Dairy Res.* 2001, 68, 399-415.
13. *Paape M., Bannerman D., Zhao X., Lee J. W.*: The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 2003, 34, 597-627.
14. *Paape M., Mehrzad J., Zhao X., Detilleux J., Burvenich Ch.*: Defense of the bovine mammary Gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2002, 7, 109-119.
15. *Prin-Mathieu C., Le Roux Y., Faure G. C., Laurent F., Béné M. C., Mousaoui F.*: Enzymatic activities of bovine peripheral blood leukocytes and milk polymorphonuclear neutrophils during intramammary inflammation caused by lipopolysaccharide. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunol.* 2002, 9, 812-817.
16. *Riollet C., Rainard P., Poutrel B.*: Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.* 2001, 84, 1077-1084.
17. *Rambeaud M., Almeida R., Pighetti G., Oliver S.*: Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopath.* 2003, 96, 193-205.
18. *Sordillo L., Streicher K.*: Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2002, 7, 135-145.
19. *Swain S., Nelson L., Hanson A., Siemsen D., Quinn M.*: Host defense function in neutrophils from the American bison. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 2000, 127, 237-247.
20. *Targowski S., Niemiłowski M.*: Appearance of Fc receptors on polymorphonuclear leukocytes after migration and their role in phagocytosis. *Infect. Immun.* 1986, 52, 798-802.
21. *Tchórzewski H.*: Zapalenie. *Patofizjologia i klinika*. Medpress, Warszawa 1998, s. 99.
22. *Wiktorowicz K., Cofa J., Mackiewicz S.*: Zastosowanie chemiluminescencji do oceny aktywności komórek fagocytujących. *Post. Nauk Med.* 1993, 6, 184-187.

Adres autora: dr Hanna Markiewicz, ul. Toruńska 52D/51, 86-050 Solec Kujawski