

# Wskaźniki odporności nieswoistej po zabiegach ovariohysterectomii u suk

ROMAN DĄBROWSKI

Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Dąbrowski R.

## Parameters of non-specific immunity after ovariohysterectomy in bitch

Summary

Ovariohysterectomy is the treatment of choice for pyometra and a common contraceptive method for bitches. The effectiveness of preventing the postoperative complications depends largely on the proper monitoring of the health condition of bitches. The non-specific immunity parameters in the postoperative period are evaluated using the NBT test as well as determining the phagocytic index, percentage of phagocytizing cells, lysozyme activity, serum levels of total protein and its globulin fraction.

Our study shows that the values of selected parameters of non-specific immunity provide valuable information concerning the end of inflammatory reaction caused by the discontinuity of tissues in the normal postoperative course. Moreover, the data obtained indicate that such parameters may be used in routine diagnostic procedures of early postoperative complications.

**Keywords:** bitches, pyometra, ovariohysterectomy

Psy jako zwierzęta towarzyszące stały się nieodzownym elementem życia człowieka i są często traktowane na równi z członkami rodziny. Sprawia to, że problemy zdrowia tych zwierząt, w tym schorzenia układu rozrodczego, stają się niezmiernie ważne dla ich właścicieli. W ostatnich latach obserwujemy dwa zjawiska dotyczące psów. Z jednej strony, stosunkowo szybko rośnie liczba psów prawidłowo żywionych i pielęgnowanych, z drugiej zaś, coraz częściej pojawia się problem ich bezdomności. Niekontrolowana liczba urodzeń wśród psów bezdomnych jest przyczyną nadmiernego wzrostu ich populacji. Stąd też w celu ograniczenia ich liczebności, a w przypadku psów posiadających właścicieli – kontrolowania liczby urodzeń, stosowana jest antykoncepcja. Znane są dwie główne metody antykoncepcji: farmakologiczna oraz chirurgiczna. Pomimo szerokiego wyboru i dostępności preparatów farmakologicznych przeznaczonych dla celów antykoncepcyjnych u suk, ich stosowanie nadal nie jest w pełni bezpieczne. Zastosowanie antykoncepcji farmakologicznej u tego gatunku zwierząt w nieodpowiednim momencie cyklu rujowego może prowadzić do zmian w błonie śluzowej macicy i rozwoju ropomacicza. Druga metoda antykoncepcyjna – chirurgiczna, ma na celu trwałe pozbawienie suk zdolności rozrodczych. Jest to zabieg ovariohysterectomii (sterylizacji), polegający na operacyjnym usunięciu macicy wraz z jajnikami. Ovariohysterectomia jest również metodą z wyboru w leczeniu ropomacicza u suk,

które należy do najczęstszych schorzeń układu rozrodczego (10).

Przebieg okresu pooperacyjnego jest ściśle związany ze stanem odporności organizmu, zwłaszcza z jej nieswoistymi mechanizmami komórkowymi. Głównym komórkowym mechanizmem odporności naturalnej biorącym udział w eliminacji infekcji jest fagocytoza, w której najważniejszą rolę odgrywają neutrofile stanowiące pierwszą linię obrony (3, 8, 13, 15, 22). W nieswoistej odporności komórkowej uczestniczą również makrofagi, jednakże ich udział w procesie fagocytozy jest mniejszy i przebiega wolniej w porównaniu do komórek polimorfonuklearnych (PMN) (2, 7, 22).

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że sprawność oraz wzajemna harmonia pomiędzy humoralnymi i komórkowymi mechanizmami odporności nieswoistej warunkuje szybki powrót pacjenta do zdrowia po zabiegach chirurgicznych. Wszelkie zaburzenia funkcji tych mechanizmów w okresie pooperacyjnym są główną przyczyną rozwoju infekcji przyranych, wywołanych zwłaszcza przez drobnoustroje oportunistyczne (16, 18, 23). Ponadto, rozwijające się w tym okresie infekcje, przy braku zastosowania właściwej terapii przyczynowej prowadzą do wydłużenia okresu rekonwalescencji, niekiedy mogą być również bezpośrednią przyczyną zgonu pacjenta (4, 16, 26, 28). Dlatego, możliwość zapobiegania wystąpieniom komplikacji po zabiegach chirurgicznych zależy w dużym stopniu od

właściwego monitoringu stanu czynnościowego układu immunologicznego. Stała jego kontrola umożliwiła wczesne wykrycie zaburzeń homeostazy wewnętrznej organizmu oraz podjęcie szybkiej interwencji w celu jej przywrócenia (20).

Celem przeprowadzonych badań było określenie kształtowania się wybranych wskaźników nieswoistej odporności komórkowej i humoralnej po zabiegach ovariectomii u suk.

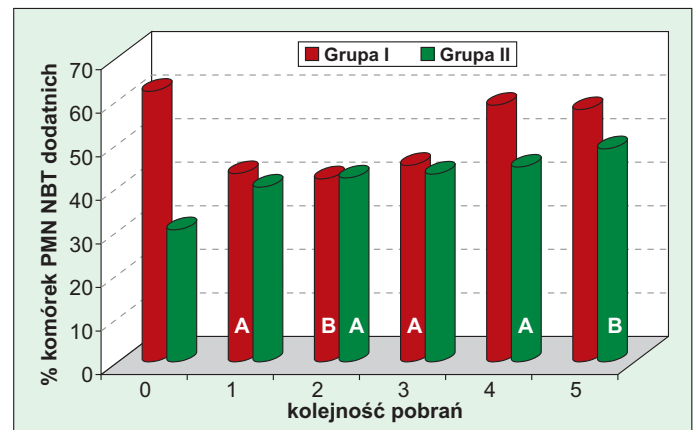
### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 20 sukach różnych ras oraz bezrasowych. Zostały one podzielone na dwie grupy doświadczalne. Grupę I (n = 10) stanowiły suki pochodzące ze Schroniska dla Bezdomnych Zwierząt w Lublinie, które w okresie poprzedzającym zabieg zostały poddane badaniu klinicznemu, zgodnie z planem badania ginekologiczno-położniczym oraz badaniom dodatkowym. W oparciu o uzyskane wyniki badań zwierzęta zakwalifikowano do grupy suk zdrowych znajdujących się w fazie *anoestrus*, u których wykonano zabieg sterylizacji chirurgicznej (ovariectomii). Grupę II (n = 10) stanowiły natomiast suki z ropomaciczem, u których wykonano zabieg amputacji chorobowo zmienionej macicy i jajników.

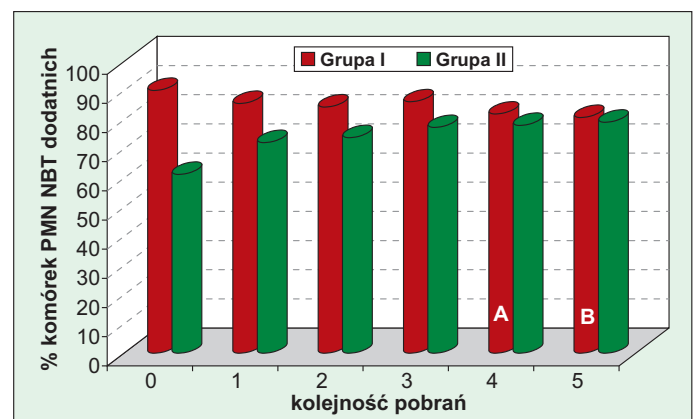
Obie grupy zwierząt zostały poddane zabiegowi ovariectomii zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami w zabiegach chirurgicznych. Przed przystąpieniem do operacji zwierzęta poddano premedykacji przy użyciu ksylazyny w dawce 2 mg/kg m.c. (prep. Rometar 2%® – Spofa, Republika Czeska) i atropiny w dawce 0,05 mg/kg m.c. (prep. Atropinum sulfuricum® – Polfa, Polska). Następnie suki wprowadzono w stan znieczulenia ogólnego dysocjacyjnego przy pomocy ketaminy (prep. Narkamon 5%® – Spofa, Republika Czeska) w dawce od 5 do 15 mg/kg m.c. w zależności od indywidualnych reakcji zwierząt poddanych znieczuleniu. Od wszystkich suk doświadczalnych pobierano krew z żyły dostopowej (*vena saphena*) w następujących przedziałach czasowych: przed zabiegiem (próbą 0), a następnie 24 godz. (I pobranie), 72 godz. (II pobranie), 120 godz. (III pobranie), 240 godz. (IV pobranie) oraz 408 godz. (V pobranie) po ovariectomii. Krew pobierano każdorazowo do jałowych probówek wirówkowych oraz jałowych probówek silikonowych typu vakuette-9 ml (Greiner Labor Technik GmbH, Austria), zawierających heparynę w ilości 20 j.m. na 1 ml krwi. Surowicę uzyskiwano po odwirowaniu pełnej krwi przez 10 minut (3000-4000 obr./min.), po czym zamrażano ją w temperaturze -76°C (Polar 110 H) i przetrzymywano do momentu wykonania oznaczeń. W pełnej krwi wykonano test redukcji NBT metodą cytochemiczną w wariancie spoczynkowym i stymulowanym wg Parka i wsp. (19), określono aktywność fagocytarną oraz indeks fagocytarny przy użyciu standardowego szczepu *Staphylococcus aureus* 206P (6). Ponadto w surowicy krwi oznaczano aktywność lizozymu metodą turbidymetryczną (21), poziom białka całkowitego i jego frakcję globulinową metodą Lowry (11). Wyniki badań poddano analizie statystycznej obliczając średnią, odchylenie standardowe oraz istotność różnic. Porównanie średnich parametrów wewnątrzgrupowych do wartości wyjściowej (przed zabiegiem) dokonano na podstawie analizy zmienności (test t-Studenta). Istotność różnic określono przy  $p \leq 0,05$  i  $p \leq 0,01$ .

### Wyniki i omówienie

Sprawny układ komórek fagocytarnych stanowi jeden z podstawowych mechanizmów odporności przeciwzakaźnej macicy. W przypadku wystąpienia infekcji dominującą populacją komórek żernych w macicy są neutrofile przenikające z krwi obwodowej do ogniska zapalnego, które stanowią mechanizm szybkiego reagowania (5, 12, 13, 14, 22). W badaniach własnych wykazano (ryc. 1, ryc. 2), że u suk z ropomaciczem (grupa II) przed zabiegiem średnie wartości badanych wskaźników komórkowej odporności nieswoistej były niższe w porównaniu do ich wartości w grupie suk zdrowych (grupa I). Parametrem określającym aktywność metaboliczną neutrofilów jest zdolność redukcji błękitu nitrotetrazoliowego określana za pomocą testu NBT. Spadkowi wartości testu NBT towarzyszył 2-krotny spadek odsetka komórek fagocytujących (ryc. 3) i wartości in-



**Ryc. 1. Spontaniczna zdolność komórek PMN krwi obwodowej u suk do redukcji NBT w przebiegu doświadczenia (%)**  
Objaśnienia: grupa I – suki zdrowe poddane sterylizacji chirurgicznej; grupa II – suki z ropomaciczem poddane zabiegowi ovariectomii; A – różnice statystycznie istotne w porównaniu do wartości wyjściowej ( $p \leq 0,05$ ); B – różnice statystycznie istotne w porównaniu do wartości wyjściowej ( $p \leq 0,01$ ); Kolejność pobrań: 0 – przed zabiegiem, 1 – 24 godziny po zabiegu (1. doba), 2 – 72 godziny po zabiegu (3. doba), 3 – 120 godzin po zabiegu (5. doba), 4 – 240 godzin po zabiegu (10. doba), 5 – 408 godzin po zabiegu (17. doba)

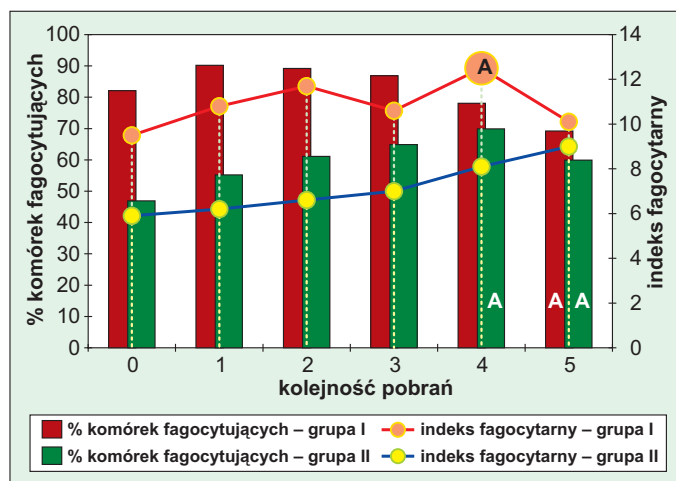


**Ryc. 2. Stymulowana zdolność komórek PMN krwi obwodowej u suk do redukcji NBT w przebiegu doświadczenia (%)**  
Objaśnienia: jak przy ryc. 1

deksu fagocytarnego (ryc. 3). Można zatem sądzić, że zaobserwowany u suk chorych spadek aktywności tlenowej neutrofilów w teście NBT szczególnie w wersji stymulowanej, aktywności fagocytarnej i indeksu fagocytarnego w porównaniu do suk zdrowych, przemawia za immunosupresją nieswoistych mechanizmów obronnych układu immunologicznego. Podobne wyniki uzyskali Krzyżanowski i wsp. (9), Mojžišová i wsp. (15) oraz Vandeplassche i wsp. (27). Potwierdzeniem występowania immunosupresji u suk z ropomaciczem jest utrzymywanie się również niskiego poziomu surowiczego białka całkowitego i spadek stężenia jej frakcji globulinowej (ryc. 5).

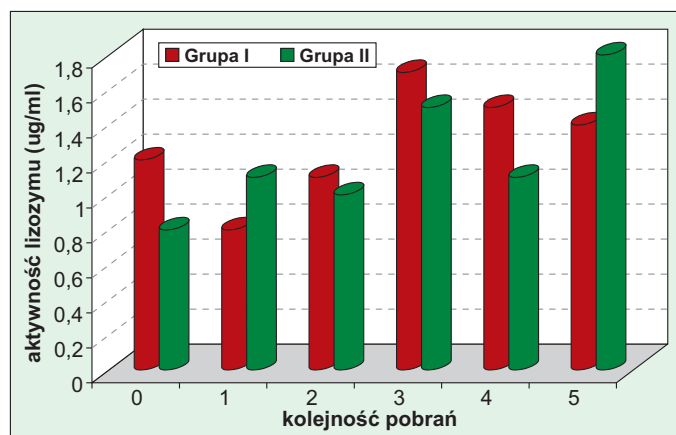
Właściwa funkcja komórek fagocytarnych stanowi jeden z podstawowych mechanizmów warunkujących prawidłowy przebieg okresu pooperacyjnego u suk po ovariohysterectomii. Efektem dysfunkcji neutrofilów w okresie pooperacyjnym może być infekcja, co w konsekwencji może prowadzić do wydłużonego okresu hospitalizacji, rekonwalescencji, a niekiedy nawet do zejść śmiertelnych. U suk z ropomaciczem (grupa II) w pierwszej dobie po ovariohysterectomii zaobserwowano istotny wzrost, w porównaniu do wartości przed zabiegiem, średnich wartości PMN NBT dodatnich (ryc. 1, ryc. 2), odsetka komórek wykazujących aktywność fagocytarną (ryc. 3) i wartości indeksu fagocytarnego (ryc. 3). Natomiast u suk zdrowych (grupa I) w pierwszych pięciu dobach po zabiegu stwierdzono istotny spadek średnich wartości testu NBT w wersji spoczynkowej przy utrzymujących się na zbliżonym poziomie wartości testu NBT w wersji stymulowanej w stosunku do wartości przed zabiegiem (ryc. 1, ryc. 2). Towarzyszył temu nieznaczny wzrost odsetka komórek fagocytujących oraz wartości indeksu fagocytarnego (ryc. 3). Wzrost aktywności metabolicznej i fagocytarnej neutrofilów u suk grupy II w pierwszych dniach po zabiegu ovariohysterectomii może świadczyć o stopniowym przywracaniu prawidłowych mechanizmów komórkowej odporności nieswoistej. Natomiast u suk zdrowych, w prawidłowym okresie pooperacyjnym obniżona aktywność tlenowych mechanizmów bójczości neutrofilów po ovariohysterectomii może wynikać z samego stresu, jakim jest zabieg chirurgiczny oraz z rozwoju miejscowego odczynu zapalnego wywołanego przerwaniem ciągłości tkanek. Zdaniem Mojžišová i wsp. (14), Nishina i wsp. (17) oraz Vallejo i wsp. (25), osłabienie aktywności metabolicznej neutrofilów w pierwszych godzinach po zabiegu chirurgicznym może być dodatkowo efektem działania leków anestetycznych.

W ostatnich dwóch terminach badań, u suk w grupie II nastąpił dalszy wzrost średnich wartości testu NBT w obu jego wersjach oraz indeksu fagocytarnego i były one najwyższe w toku całego doświadczenia, jednakże niższe w porównaniu do suk grupy I. Świadczy to o przywracaniu prawidłowych funkcji biologicznych komórek fagocytarnych w obu grupach suk w wyniku stopniowego ustępowania miejscowego odczynu zapalnego spowodowanego zabiegiem, a w przypadku suk grupy II dodatkowo likwidacją odczynu zapalnego w dro-



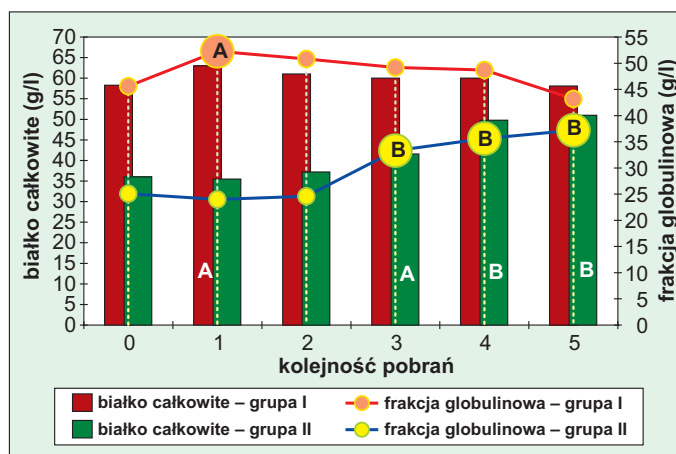
Ryc. 3. Kształtowanie się odsetka komórek fagocytujących oraz średnie wartości indeksu fagocytarnego komórek PMN krwi obwodowej u suk w przebiegu doświadczenia

Objaśnienia: jak przy ryc. 1



Ryc. 4. Bakteriolityczna aktywność lizozymu w surowicy krwi suk w przebiegu doświadczenia (µg/ml)

Objaśnienia: jak przy ryc. 1



Ryc. 5. Surowiczy poziom białka całkowitego (g/l) i frakcji globulinowej (g/l) u suk w przebiegu doświadczenia

Objaśnienia: jak przy ryc. 1

gach rodnych. Podobne wyniki uzyskali Mojžišová i wsp. (14, 15).

W badaniach własnych stwierdzono, że zmianom wartości parametrów nieswoistej odporności komórkowej u suk doświadczalnych towarzyszyły zmiany oce-

nianych wskaźników humoralnych. Pierwszym z nich była aktywność lizozymu (LZM). U suk w obu grupach doświadczalnych przed zabiegiem średnie wartości lizozymu utrzymywały się na podobnym poziomie (ryc. 4). W grupie I suk, po zabiegu ovariectomii średnie wartości LZM we wszystkich terminach oznaczeń kształtowały się na poziomie zbliżonym do wartości wyjściowych, co świadczy, że zabieg chirurgiczny nie wpływa na zmiany bakteriologicznej aktywności lizozymu. Natomiast u suk grupy II po zabiegu ovariectomii stwierdzono w kolejnych terminach oznaczeń stopniowy wzrost średnich wartości LZM w stosunku do wartości początkowej. Wzrost aktywności lizozymu u suk grupy II w poszczególnych dniach po zabiegu dodatnio korelował ze wzrostem aktywności fagocytarnej neutrofilów. Można zatem przypuszczać, że wzrost poziomu LZM był wynikiem stopniowego przywracania prawidłowej funkcji biologicznej neutrofilów, które są głównym źródłem jego produkcji.

Kolejnym ocenianym parametrem w surowicy krwi u suk doświadczalnych było białko całkowite oraz jego frakcja globulinowa (ryc. 5). Z danych literaturowych wynika, że oznaczanie poziomu białka całkowitego jest przydatne w diagnostyce toczącego się zapalenia (1). Za syntezę oraz rozpad białka całkowitego i jego frakcji odpowiedzialna jest przede wszystkim wątroba, jednakże duży udział w jego produkcji ogrywa również układ siateczkowo-śródbłonkowy. Jednym z podstawowych mechanizmów regulujących poziom białka w organizmie jest przeciwstawne zachowanie się albumin i globulin, z których za produkcję przeciwciał odpowiedzialna jest przede wszystkim frakcja gammaglobulinowa (24). Zaobserwowane w dniu rozpoczęcia doświadczenia wyraźnie niższe stężenie białka całkowitego w surowicy krwi u suk grupy II w porównaniu do suk zdrowych (ryc. 5) można tłumaczyć spadkiem poziomu albumin na skutek ich przesunięcia do przestrzeni pozanaczyniowych spowodowanego ropomaciczem oraz ich zwiększonym wydalaniem z organizmu przez uszkodzone w wyniku intoksykacji nerki (9, 24). Towarzyszył temu również spadek stężenia frakcji globulinowej w surowicy krwi (ryc. 5), co prawdopodobnie było związane ze wzmożonym przenikaniem immunoglobulin, zwłaszcza klasy IgG, z surowicy do ogniska zapalnego w macicy. W stanach zapalnych oprócz infiltracji neutrofilów do *endometrium*, które uczestniczą we wczesnej fazie odpowiedzi immunologicznej macicy na zakażenia bakteryjne, następuje dodatkowo bierny transport surowiczych immunoglobulin klasy IgG. Potwierdzeniem tego jest utrzymujące się u suk grupy II, w pierwszych trzech dobach po zabiegu niższe stężenie białka całkowitego i jego frakcji globulinowej. Natomiast stwierdzony w tej grupie suk w ostatnim terminie oznaczeń wzrastający poziom białka całkowitego i frakcji globulinowej wskazuje na wygasanie odczynu zapalnego.

Podsumowując uzyskane wyniki badań własnych należy stwierdzić, że ropomacicz jest schorzeniem, w przebiegu którego dochodzi do supresji komórkowych

i humoralnych mechanizmów odporności nieswoistej. Kształtowanie się poziomów wybranych wskaźników odporności nieswoistej w prawidłowym przebiegu okresu pooperacyjnego dostarcza cennych informacji odnośnie do czasu wygasania odczynu zapalnego u suk po ovariectomii spowodowanego przerwaniem ciągłości tkanek. Uzyskane dane wskazują jednocześnie na możliwość ich wykorzystania jako przydatnych wskaźników w monitorowaniu okresu pooperacyjnego u suk.

## Piśmiennictwo

1. Birger M., Samborski Z.: Aktualne poglądy na etiopatogenezę zespołu endometritis-pyometra u suk. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 239-241.
2. Bostedt H.: Diagnostyka i terapia ostrych postaci zapalenia gruczołu mlekowego u krów. *Życie Wet.* 2001, 76, 477-479.
3. Egger G., Aigner R., Glasner A., Hofer H. P., Mitterhammer H., Zelzer S.: Blood polymorphonuclear leukocyte migration as a predictive marker for infections in severe trauma: comparison with various inflammation parameters. *Intensive Care Med.* 2004, 30, 331-334.
4. Giannoudis P. V.: Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update. *Injury* 2003, 34, 397-404.
5. Gosset K. A., MacWilliams P. S., Enright F. M., Cleghorn B.: In vitro function of canine neutrophils during experimental inflammatory disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1983, 5, 151-159.
6. Gościńska T.: Ćwiczenia z immunologii. PWN, Warszawa 1979.
7. Hellum K. B., Solberg C. O.: Granulocyte function in bacterial infections in man. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C* 1977, 85, 1-9.
8. Kristal B., Shurtz-Swirski R., Chezar J., Manaster J., Levy R., Shapiro G., Weissman I., Shasha S. M., Sela S.: Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 1998, 11, 921-928.
9. Krzyżanowski J., Wawron W., Krakowski L., Kostro K., Wrona Z., Szczubial M., Piech T., Kusy R.: Badania nad stanem nieswoistych mechanizmów obronnych u suk z ropomaciczem. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 382-385.
10. Kucharski J.: Immuno-endokrynowe mechanizmy obrony macicy w infekcjach bakteryjnych. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 868-871.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Randall R.: Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1956, 193, 265-275.
12. Mattila-Vuori A., Salo M., Iisalo E., Pajulo O., Viljanto J.: Local and systemic immune response to surgery under balanced anaesthesia in children. *Paediatr. Anaesth.* 2000, 10, 381-388.
13. Midtvedt T., Baardsen A.: Elimination of ingested P-labelled E. coli from rat polymorphonuclear neutrophils (PMN). Evaluation of a method. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C* 1976, 84, 100-104.
14. Mojžišová J., Hromada R., Valocký I., Paulík S., Hipiková V., Bajova V., Posivakova S., Bugarský A.: Effects of ovariectomies on canine posturgical leukocyt function. *Acta Vet. Hung.* 2003, 51, 219-227.
15. Mojžišová J., Valocký I., Maraček I.: Monitoring of selected immunological parameters in bitches with glandular cystic hyperplasia-pyometra complex before and after ovariectomies. *Pol. J. Vet. Sci.* 2000, 3, 23-27.
16. Niedziela P., Michalak J., Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Loreniewicz K.: Białko CRP jako marker wczesnego diagnozowania powikłań po implantacji protezy aortalno-dwuudowej. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 50-53.
17. Nishina K., Akamatsu H., Mikawa K., Shiga M., Maekawa N., Obara H., Niwa Y.: The inhibitory effects of thiopental, midazolam and ketamine on human neutrophil function. *Anesth. Analg.* 1998, 86, 159-165.
18. Otto M., Zieliński A., Tolłoczko T.: Problem zakażeń w chirurgii naczyniowej. *Terapia* 1997, 5, 20-22.
19. Park B. H., Firling S. Y. M., Smithwick E. M.: Infection and nitroblutazolium reduction by neutrophils. *Lancet* 1968, 2, 532-534.
20. Salo M.: Effects of anaesthesia and surgery on the immune response. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1992, 36, 201-220.
21. Stwicki A. K., Anderson D. P.: Fish diseases diagnosis and preventions methods. *FAO Project GCP/INT/526/IPN.* Wyd. IRS. Olsztyn 1993.
22. Solberg C. O.: Enhanced Susceptibility to infection. *Acta Path. Microbiol. Scand. Section B*, 1972, 80, 10-18.
23. Staszkiwicz W.: Współczesne kierunki rozwoju metod leczenia chorób tętnic. *Terapia* 1998, 6, 3-5.
24. Urbańska D.: Wykorzystanie wyników badań laboratoryjnych w rozwiązanych chirurgicznie porodzie u suk i kotek. *Medycyna Wet.* 1973, 29, 466-468.
25. Vallejo R., Hord E. D., Barna S. A., Santiago-Palma J., Ahmed S.: Perioperative immunosuppression in cancer patients. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2003, 22, 139-146.
26. Valtonen W.: Role of infectious in atherosclerosis. *Am. Heart J.* 1999, 138, 431-433.
27. Vandeplassche M., Coryn M., Schepper J. D.: Pyometra in the bitch: cytological, bacterial, histological and endocrinological characteristics. *Vlaams-Diergeneeskundig Tijdschrift* 1991, 60, 207-211.
28. Wątroba M., Bulanda M., Heczko P. B.: Zakażenia szpitalne w chirurgii implantacyjnej. *Terapia* 1997, 5, 16-19.