

# FUNCTIONAL EXPLOITATION MACROPHAGES DURING THE RESOLUTION OF BOVINE MAMMARY GLAND ACUTE INJURY

## FUNKČNÍ EXPLOATACE MAKROFÁGŮ BĚHEM REZOLUCE AKUTNÍHO POŠKOZENÍ MLÉČNÉ ŽLÁZY SKOTU

**Rýznarová H.**

Ústav morfologie, fyziologie a veterinářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

### ABSTRACT

The resolution of bovine mammary gland acute injury represents complex of reparative mechanisms leading to tissue regeneration. Among others, the cells of so called mononuclear phagocytosis system – the macrophages, are participating on this reparation.

The point of this experiment was to find out percentual number of macrophages phagocytosing and non-phagocytosing the apoptotic neutrophils during the resolution of acute injury of heifers mammary glands induced by forced infection *Staphylococcus aureus*. For apoptotic neutrophils detection in macrophage's cytoplasm the enzyme myeloperoxidase (MPO) was used.

The results show obviously, that the highest % number MPO positive macrophages occurred in lavages 48 hours after mammary gland stimulation *Staphylococcus aureus* and the resolution of acute injury initiated one day later in comparison with mammary gland stimulation PBS (control). There, the highest % number MPO positive macrophages in lavages was counted already in 24 hours. While using the antibiotics for treatment, again the resolution initiated one day later.

**Keywords:** macrophage, resolution, myeloperoxidase, neutrophil, phagocytosis, mammary gland acute injury

### ABSTRAKT

Rezoluce akutního poškození mléčné žlázy skotu představuje komplex reparativních mechanismů vedoucích k obnově tkáně. Na této obnově se mj. podílí buňky tzv. mononukleárního fagocytárního systému – makrofágy.

Cílem pokusu bylo zjistit % počet fagocytujících a nefagocytujících makrofágů apoptotické neutrofilů během rezoluce akutního poškození mléčné žlázy jalovic způsobeného umělou infekcí *Staphylococcus aureus*. Apoptotické neutrofilů byly v cytoplasmě makrofágů detekovány pomocí enzymu – myeloperoxidázy (MPO).

Z výsledků bylo zřejmé, že nejvyšší % MPO pozitivních makrofágů se vyskytovalo v lavážích 48h po stimulaci mléčných žláz *Staphylococcus aureus* a rezoluce akutního poškození byla zahájena o 1 den později než po stimulaci mléčných žláz PBS (kontrola), kdy nejvyšších %

hodnot MPO pozitivních makrofágů bylo zaznamenáno v lavážích již po 24h. Po přeléčení mléčných žláz antibiotiky byl začátek rezoluce vzhledem k PBS opět zpožděn o 1 den.

**Klíčová slova:** makrofág, rezoluce, myeloperoxidáza, neutrofil, fagocytóza, akutní poškození mléčné žlázy

## ÚVOD

Makrofágy představují skupinu buněk diferencovanou z monocytů, jež po průniku kapilární stěnou vstoupily do vaziva. Makrofágy jsou přítomny ve většině orgánů – v pojivové tkáni jsou to histiocyty, v plicích alveolární fagocyty, v játrech Kupfferovy buňky a v zánětlivých granulomech představují epiteloidní a gigantické buňky (Trávníček et al., 1987). Společně s monocyty tvoří tzv. mononukleární fagocytární systém (Jungueira et al., 1997), který se výrazně podílí na obranných a reparativních procesech organismu

V poslední době se pozornost zaměřila ke studiu funkce těchto buněk v rezoluci akutního poškození mléčné žlázy skotu, na rozdíl od let předešlých, kdy byl zájem soustředěn zejména k iniciační fázi akutního poškození.

Během rezoluce akutního poškození mléčné žlázy skotu dochází ke zvyšování počtu makrofágů v místě ložiska akutního poškození. Funkcí makrofágů je eliminace neutrofilních granulocytů, jež vycestovaly z krevního řečiště do místa poškození ve tkáni, aby se zde v iniciační fázi podílely na likvidaci škodlivého patogenu. Neutrofilní granulocyty, které splnily svoji funkci nebo vyčerpaly veškerou svoji energii, umírají nekrózou nebo procesem apoptózy. Tyto polymorfonukleární leukocyty se stávají pro tkáň hrozícím nebezpečím, jelikož disponují ve svých granulích množstvím enzymů, které by mohly při destrukci těchto neutrofilů způsobit sekundární poškození tkáně (Sládek et al., 2001). Proto je důležité, aby došlo k odvrácení tohoto nebezpečí. Děje se tak prostřednictvím makrofágů, jež mají schopnost fagocytovat apoptotické neutrofile a tím tyto buňky fyzicky eliminovat.

Detekce apoptotických, fagocytovaných neutrofilních granulocytů v cytoplazmě makrofágů je možná prostřednictvím antimikrobiálního enzymu polymorfonukleárů – myeloperoxidáze (MPO), obsažené v jejich azurofilních granulích. Speciálním barvením na MPO dle Henson et al. (1978) vytváří MPO v makrofázích okrsky tmavě hnědé až černé barvy zrnité struktury. Vedle toho je možné uplatnit modifikovanou metodu barvení dle Sládek a Ryšánek (2000) s použitím barviva Giemsa – Romanowski, které umožní zviditelnění jader buněk pro snadnější detekci.

Vzhledem ke zjištění významu fáze rezoluce akutního poškození mléčné žlázy skotu je třeba soustředit větší pozornost právě k této problematice.

## CÍL A METODIKA

Cílem pokusu bylo zjistit funkci mononukleárních fagocytů v rezoluci akutního poškození mléčné žlázy skotu. Konkrétně zjistit % počet fagocytujících makrofágů apoptotické neutrofile

a % počet nefagocytujících makrofágů z jejich celkového počtu pod vlivem experimentální infekce mléčné žlázy indukované bakteriálním patogenem *Staphylococcus aureus*.

Experiment byl proveden u 5 jalovic českého strakatého plemene ve věku 16 – 18 měsíců. Jalovice byly ustájeny v experimentální, stelivové stáji Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně. Experimentální zásahy byly vždy provedeny po ranním ošetření a nakrmení zvířat.

Pokus probíhal v třítydenním cyklu. V pondělí prvního týdne byly mléčné žlázy jalovic nastimulovány pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS). V dalších dnech (úterý, středa, čtvrtek a pondělí) byly prováděny laváže mléčných žláz, tzn. 24, 48, 72 a 168h po stimulaci PBS. Poté byly výplachy odstředěny a vzorky adjustovány na  $10^6$ /ml a  $10^5$ /ml. Z ředění  $10^5$ /ml bylo nanášeno 0,5 ml na každé ze čtyř podložních skel. Skla byla na 45 minut umístěna do termostatu a poté byla barvena na MPO metodou dle Henson et al. (1978). Dvě ze čtyř podložních skel byla ještě dobarvena modifikovanou metodou dle Sládek a Ryšánek (2000) pomocí barviva Giemsa – Romanowski, které umožnilo barevné znázornění jader buněk. Výsledky z tohoto týdne byly označeny jako kontrola.

Druhý týden v pondělí byla uskutečněna laváž po 168h a zároveň byly mléčné žlázy nastimulovány bakteriálním patogenem *Staphylococcus aureus*. Laváže byly prováděny ve stejném časovém harmonogramu jako v týdnu předešlém a rovněž metody barvení se shodovaly.

Třetí týden v pondělí byly mléčné žlázy přeléčeny antibiotikem a po 24, 48, 72 a 168h byly pomocí upravených katetrů uskutečněny výplachy.

Výsledky byly zpracovány metodou světelné mikroskopie, při níž se z každého podložního skla vyhodnocovalo 200 makrofágů. Bylo zjišťováno % nefagocytujících a % fagocytujících makrofágů z jejich celkového počtu a u modifikované metody barvení byly fagocytující makrofágy detailněji rozlišovány na nevakualizované, vakualizované a makrofágy s „čerstvě“ fagocytovanými apoptotickými neutrofilly.

Ze všech laváží byly spočítány celkové a diferenciální počty buněk a v rámci pokusu se provádělo i bakteriologické vyšetření laváží.

## **VÝSLEDKY**

Zjištěné výsledky z jednotlivých týdnů třítydenního cyklu pokusu vedly k porovnání rezoluce akutního poškození mléčné žlázy skotu. Rezoluce akutního poškození byla porovnávána z hlediska jejího zahájení a délky trvání.

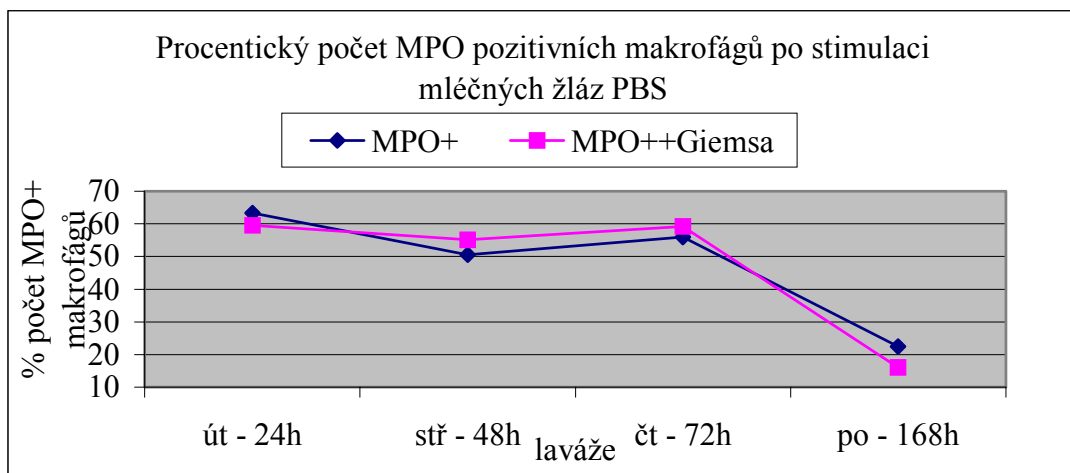
První týden byly mléčné žlázy nastimulovány PBS. Nejvyšší % počet MPO pozitivních makrofágů byl zaznamenán u obou způsobů barvení z laváží po 24h po stimulaci (63,27 % a 59,57 % u modifikované metody barvení – m.m.b.). Laváže po 48h vykazovaly mírný % pokles, a to na 50,50 % a 55,20 % (u m.m.b.). Opětovné mírné % zvýšení bylo pozorováno

u čtvrtěných výplachů (72h), ale nedosáhlo hodnot laváží po 24h. Prudký pokles u laváží po 168h (22,36 % a 16 % u m.m.b.) již svědčil o ukončení rezoluce.

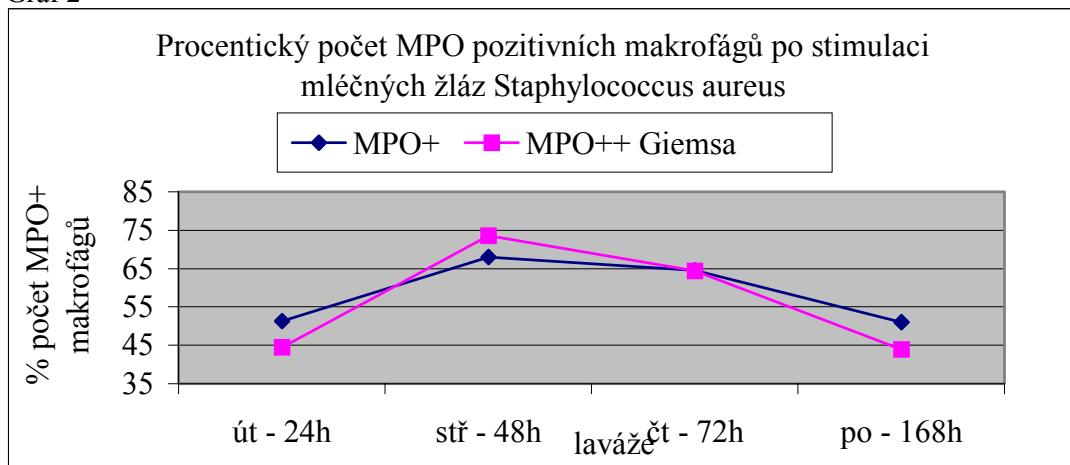
V druhém týdnu, po stimulaci mléčných žláz *Staphylococcus aureus* bylo napočítáno nejvyšších hodnot MPO pozitivních mononukleárních fagocytů v lavážích po 48h (67,95 % a 73,59 % u m.m.b.). V dalších dnech (po 72h a 168h) byl již zaznamenán % pokles MPO pozitivních makrofágů, ale je nutné upozornit na pokles pozvolný, pouze na hranici 50,98 % a 43,93 % (u m.m.b.).

Po přeléčení antibiotiky ve třetím týdnu bylo zjištěno nejvíce fagocytujících makrofágů ve středních lavážích (48h), a to 51,93 % a 49,98 % (u m.m.b.). Po 72h po stimulaci došlo k výraznému % poklesu MPO pozitivních makrofágů až na hranici 18,05 % a 18,74 % (u m.m.b.). U výplachů po 168h se výsledky mírně rozlišovaly podle metody barvení. U modifikované metody barvení byl zaznamenán proti 72h – lavážím mírný % pokles (16,17 %), kdežto u druhé metody barvení bylo objeveno nepatrné navýšení proti lavážím z předchozího dne, a to na 18,38 %.

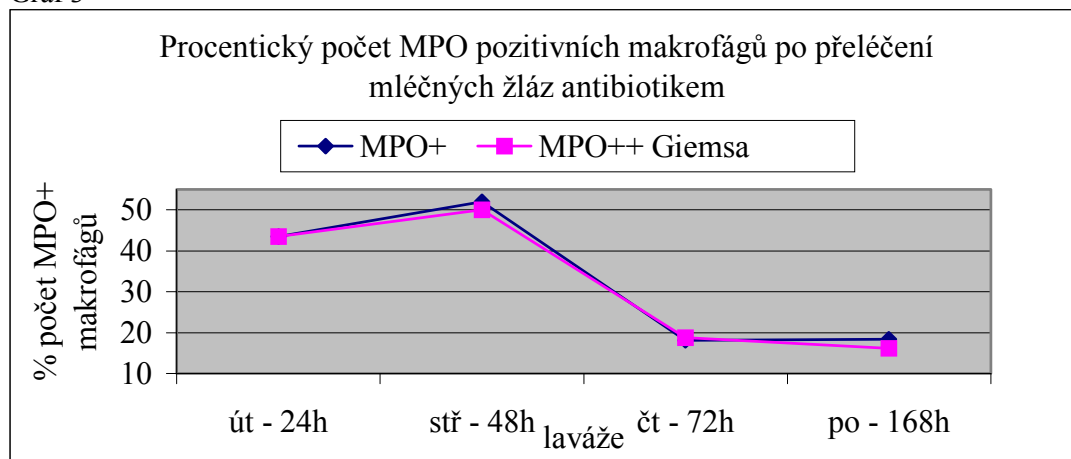
Graf 1:



Graf 2



Graf 3



## DISKUSE

Výsledky, jež byly získány z prvního týdne pokusu (kontrola), kdy byly mléčné žlázy nastimulovány PBS, umožnily porovnat zahájení a délku rezoluce akutního poškození pod vlivem umělé infekce a následného jejího přeléčení.

Po stimulaci mléčných žláz bakteriálním patogenem *Staphylococcus aureus* bylo možné poukázat na jednodenní opoždění nástupu rezoluce proti kontrole a také na její delší průběh, který byl patrný z velmi pozvolného a mírného poklesu MPO pozitivních makrofágů. U umělé infekce bylo na počátku rezoluce dosaženo nejvyšších hodnot MPO pozitivních mononukleárních fagocytů ze všech získaných hodnot, což svědčí o vysoké fagocytární aktivitě.

I po přeléčení mléčných žláz antibiotiky došlo v porovnání s kontrolou k nástupu rezoluce o 1 den později. Je však nutné upozornit na rychlé ukončení rezoluce, které bylo dokázáno výrazným poklesem MPO pozitivních makrofágů.

## ZÁVĚR

Předmětem provedeného pokusu bylo zaměřit pozornost k rezoluci akutního poškození mléčné žlázy skotu bakteriálním patogenem *Staphylococcus aureus* a pokusit se objasnit funkci makrofágů během jejího průběhu. Dále upozornit na skutečnost, že zahájení a délka rezoluce akutního poškození může být rozdílná podle použitého induktoru zánětlivé reakce mléčných žláz.

Tyto poznatky mohou přispět k bližšímu porozumění problematice rezoluce akutního poškození mléčné žlázy skotu, která v poslední době nabývá stále většího významu z terapeutického hlediska.

## POUŽITÁ LITERATURA

[1] JUNQUEIRA, L. – CARNEIRO, J. - KELLEY, R. (1997): *Základy histologie*. Nakladatelství a vydavatelství H&H Jinočany.

- [2] SLÁDEK, Z.-RYŠÁNEK, D. (2000): Morphology of apoptosis of polymorphonuclear leukocytes isolated from juvenile bovine mammary glands. *Veterinary Medicine Czech*, 45: 71-81.
- [3] SLÁDEK, Z.-RYŠÁNEK, D.-FALDYNA, M. (2001): Imaging of leukocytes from bovine virgin mammary gland in flow cytometry during evolution and resolution of induced influx. *Veterinary Medicine Czech*, 46: 190-198.
- [4] TRÁVNÍČEK, T. (1987): Patologická fyziologie. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., Praha.