

# Inmufort Bov – możliwość stymulacji mechanizmów odporności nieswoistej gruczołu mlekowego krów

Hanna Markiewicz<sup>1</sup>, Wiesław Krumrych<sup>2</sup>

z Katedry Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy<sup>1</sup> oraz Zakładu Immunobiologii Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy<sup>2</sup>

Klasyczny podział patogenów na zakaźne i środowiskowe nie jest dzisiaj tak oczywisty, jak kilka dziesiąt lat temu. Niektóre szczepy bakterii mogą charakteryzować się transmisją zakaźną, podczas gdy inne szczepy tego samego gatunku zachowują się jak typowe patogeny środowiskowe. Zdarza się również, że gatunki uważane za środowiskowe mogą posiadać cechy patogenów zakaźnych (1). Implikacją tego jest oparcie programów zapobiegania i zwalczania *mastitis* nie tylko na poprawie higieny doju i środowiska, ale też na optymalizacji odpowiedzi immunologicznej krów/wymienia.

Prawie wszystkie zakażenia gruczołu mlekowego są wynikiem pokonania bariery anatomiczno-fizycznej, jaką jest kanał strzykowy. Wykazano, że tkanki kanału strzykowego reagują szybko i intensywnie na wnikające patogeny wzmożoną ekspresją receptorów rozpoznających wzorce (pattern recognition receptors – PRRs) i produkcją peptydów antybakteryjnych. Część patogenów kolonizuje jednak kanał strzykowy, np. *Staphylococcus aureus* czy *Streptococcus uberis*, reszta natomiast, po pokonaniu kanału strzykowego, zaczyna namnażać się w zatoce strzykowej (2).

U krów wysokowydajnych, szczególnie w okresie przejściowym, czy też w czasie stresu, wydolność układu odpornościowego może być niewystarczająca do ochrony wymienia przed zakażeniem. Rozwój *mastitis* spowodowany jest dysfunkcją odpowiedzi zapalnej. Celem zapalenia jest usunięcie źródła zakażenia, a następnie przywrócenie tkankom ich funkcji. Eliminacja patogenów uwarunkowana jest równowagą pomiędzy mechanizmami prozapalnymi i przeciwzapalnymi (prowygaszeniowymi). Zapoczątkowanie odpowiedzi zapalnej podczas *mastitis* ma miejsce wtedy, gdy populacja komórek rezydujących w gruczole mlekowym jest w stanie rozpoznać obecność bakterii poprzez PRRs (3).

Zdolność organizmu do rozpoznania inwazji patogenów wyrażona jest przez:

- 1) ekspozycję patogenów na czynniki komórkowe, humoralne, przeciwdrobnoustrojowe obecne w mleku,
- 2) kontakt drobnoustrojów z komórkami nabłonkowymi,
- 3) napływ neutrofilów, jako konsekwencja obecności czynników chemotaktycznych.

Schemat ten pokazuje główną rolę wrodzonych mechanizmów odpornościowych w ochronie wymienia przed zakażeniem oraz w zwalczaniu infekcji gruczołu mlekowego (4).

Mechanizmy odporności naturalnej stwarzają możliwość niespecyficznego skierowania

## Inmufort Bov – the possibility of stimulation the mechanisms of bovine mammary gland innate immunity

Markiewicz H.<sup>1</sup>, Krumrych W.<sup>2</sup>, Department of Animal Husbandry, UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz<sup>1</sup>, Department of Immunobiology, Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz<sup>2</sup>

The aim of this article is to present Inmufort Bov (LPS from *Ochrobactrum intermedium*), stimulator of bovine mammary gland non-specific immunity. It has a measurable effect in the decrease of somatic cells number in milk by up to 70%, in the case of udder infections caused by pathogens not colonizing glandular tissue. This preparation significantly reduces the incidence of subclinical mastitis, as well as reduces the intensity of mastitis clinical signs. The field studies have confirmed its immunostimulatory activity in cattle, mainly dairy cows. Inmufort Bov is intended to induce a cellular innate immune response in bovine mammary gland. Inmufort Bov in bovine clinic is part of the convention for the rational use of antibiotics. It allows not only to reduce the use of antibiotics for treating mastitis, but also significantly improves the effectiveness of such treatment.

**Keywords:** bovine mammary gland, mastitis, innate immunity.

przeciwko patogenom, którym udało się pokonać kanał strzykowy. W indukcji odpowiedzi wrodzonej pierwszoplanowym zagadnieniem jest zdolność układu immunologicznego do odróżniania obcych cząsteczek mikroorganizmów od własnych komórek/tkanek. Funkcję tę pełnią receptory powierzchniowe rozpoznające wzorce. Występują one na monocytach, makrofagach, neutrofilach, komórkach dendrytycznych i komórkach nabłonkowych. Receptory te cechują się zdolnością do rozpoznania cząsteczek charakterystycznych dla całych grup mikroorganizmów. Cząsteczki te określa się mianem wzorców molekularnych związanych z patogenami (pathogen associated molecular patterns – PAMPs). Przykładem takiego wzorca jest lipopolisacharyd (LPS) – składnik ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. LPS zbudowany jest z trzech składowych: 1) antygeny somatycznego – łańcucha „O”, który jest oligosacharydem, 2) części rdzeniowej – heterooligosacharydu, 3) lipidu A. Brak łańcucha „O” lub jego forma skrócona, u niektórych gatunków mikroorganizmów, powoduje szorstki fenotyp kolonii bakteryjnych, podczas gdy typowe kolonie są gładkie (5).

Lipopolisacharyd rozpoznawany jest przez receptory Toll-podobne (TLR), zdolne do aktywacji transkrypcji genów kodujących białka o charakterze prozapalnym, stanowiąc tym samym pierwszą linię obrony układu immunologicznego. Receptory Toll-podobne

znajdują się zarówno na komórkach śródbłonka i nabłonka, jak również na komórkach układu odpornościowego – neutrofilach, makrofagach, komórkach dendrytycznych i limfocytach B (6).

Najważniejsze elementy odporności wrodzonej to rozpoznanie drobnoustroju i możliwość jego wychwycenia, a następnie eliminacja patogenu. W indukcji specyficznej, miejscowej odpowiedzi immunologicznej biorą udział makrofagi, prezentujące limfocytom T antygeny w połączeniu z głównym układem zgodności tkankowej (MHC – major histocompatibility complex) klasy II. Makrofagi wykazują też inne, niespecyficzne funkcje, jak fagocytoza i zabijanie obcych cząsteczek. Mają one jednak mniej receptorów dla fragmentów Fc przeciwciał w porównaniu do neutrofilów. Makrofagi cechują się zdolnością wydzielania substancji wzmacniających miejscową odpowiedź zapalną, co wywołuje migrację neutrofilów i wzrost ich aktywności bójczej. Ta aktywność makrofagów ma dużo większe znaczenie w obronie niespecyficznej niż ich aktywność fagocytarna.

Lipopolisacharyd jest antygenem wiązany przez receptory immunoglobulinowe limfocytów B (BCR), a konsekwencją jest aktywacja tych komórek. Jest on też mitogenem dla limfocytów B. Lipopolisacharyd cechuje się dużą zmiennością co do wpływu na syntezę cytokin. Ten efekt związany jest ze zróżnicowaniem strukturalnym lipidu A u poszczególnych drobnoustrojów (5). Charakteryzuje się on szeroką aktywnością jako immunostymulator, która obejmuje m. in. indukcję syntezy interleukiny-12 (IL-12) w makrofagach i produkcji interferonu-gamma (IFN- $\gamma$ ) oraz aktywację odpowiedzi komórkowej (Th1).

Cytokiny uwalniane przez komórki immunokompetentne, w odpowiedzi na aktywację receptorów rozpoznających wzorce, warunkują różnicowanie pomocniczych limfocytów T (Th) w kierunku jednej z subpopulacji – typu 1 lub typu 2 (Th1, Th2), determinującej dalszy przebieg odpowiedzi odpornościowej. Różnicowanie limfocytów Th zależne jest więc od środowiska cytokinowego. IL-12 jest cytokiną różnicowania limfocytów w kierunku Th1, które z kolei syntetyzują i uwalniają m.in. IFN- $\gamma$  – cytokinę o działaniu prozapalnym. Aktywacja transbłonowego TLR4 stymuluje sekrecję interleukin (IL-1, IL-12, IL-18), co również promuje rozwój odpowiedzi Th1 (7).

Polaryzacja komórek Th1 i Th2 jest hamowana przez IL-10, cytokinę o działaniu przeciwzapalnym, hamującą wydzielanie cytokin prozapalnych przez makrofagi.

Pomimo różnic strukturalnych ligandów schemat aktywacji odpowiedzi zapalnej i jej przebieg są podobne. TLR4 do wiązania LPS wymaga koreceptora – białka MD2 oraz białka mCD14. W transdukcji sygnału, po związaniu cząsteczki LPS, bierze też udział TLR2, który cechuje się zdolnością tworzenia heterodimerów z innymi TLR (8).

Gruczoł mlekowy jest narządem wyodrębnionym zarówno anatomicznie, jak i funkcjonalnie. Przy sprawnych mechanizmach odporności nieswoistej reakcja immunologiczna w wymieniu może być nierozpoznana przez organizm. Odpowiedź immunologiczna gruczołu mlekowego zależy też od patogenów

będących czynnikami etiologicznymi mastitis (9). W zdrowym gruczole mlekowym dominującymi komórkami są makrofagi. Stanowią one 70% komórek somatycznych, a ich żywotność wynosi 2–3 miesiące. Makrofagi mogą być pierwszymi komórkami „natrafiającymi” na patogeny, które wtargnęły do gruczołu mlekowego.

Inmufort Bov to preparat, którego substancją czynną jest lipopolisacharyd *Ochrobactrum intermedium* (10).

LPS *Ochrobactrum intermedium* szczepu LMG3306 cechuje się szeroką aktywnością jako środek immunostymulujący, który m.in. indukuje produkcję IL-12 w makrofagach, pobudza aktywację limfocytów TH1 i wytwarzanie IFN- $\gamma$ . Poziomy TNF- $\alpha$  indukowane przez LPS *Ochrobactrum intermedium* są znacznie niższe w porównaniu do stężeń będących efektem działania LPS *E.coli*, co nie daje efektu patologicznego. Wykorzystywany jest też jako adjuwant w okresach deficytów immunologicznych (11).

Źródłem IL-12 w wymieniu są przede wszystkim makrofagi, limfocyty B, monocyty i neutrofile. Cytokina ta pełni rolę mediatora między odpornością wrodzoną i nabytą poprzez regulację różnicowania limfocytów T. Sprzyja to polaryzacji komórek TCD4+ i TCD8+ odpowiednio do Th1 i komórek cytotoksycznych produkujących IFN- $\gamma$ . Działa również jako czynnik wzrostu dla aktywowanych komórek NK i wzmacnia ich aktywność cytotoksyczną. Poprzez stymulowanie wytwarzania IFN- $\gamma$ , zarówno przez komórki T, jak i komórki NK, przyczynia się do aktywacji makrofagów.

IL-12 wpływa także na odpowiedź humoralną poprzez zwiększenie produkcji immunoglobulin (IgG2) uczestniczących w opsonizacji, a także ułatwia odpowiedź komórkową, jednocześnie upośledzając wytwarzanie przeciwciał (IgG1) uczestniczących w humoralnej odpowiedzi immunologicznej Th2. Podobnie jak IFN- $\gamma$ , reguluje syntezę innych cytokin, jak TNF- $\alpha$ , IL-8 i IL-10 (12,4).

Dzięki tym właściwościom Inmufort Bov znajduje zastosowanie w leczeniu i prewencji chorób infekcyjnych. W obserwacjach terenowych potwierdzono aktywność immunostymulującą preparatu u bydła, w tym u krów wysokomlecznych. Badania przeprowadzono w stadzie liczącym 42 krowy, znajdujące się pod kontrolą użyteczności mlecznej, w ciągu czterech miesięcy. W miesiącu poprzedzającym podanie preparatu liczba komórek somatycznych (lks) w mleku zbiorczym wynosiła 820 tys./ml, a dominującym problemem były zapalenia podkliniczne powodowane przez drobnoustroje środowiskowe. Preparat podawano według schematu zalecanego przez producenta. W ostatnim miesiącu jego podawania zanotowano spadek lks o 71% (13, 14). Zalecana aplikacja domięśniowa preparatu jest istotna z racji obecności dużej liczby komórek dendrytycznych w tkance mięśniowej i skórze właściwej. Po jego zastosowaniu obserwowano wzrost aktywności bakteriobójczej komórek żernych i zwiększoną syntezę przeciwciał klasy IgA i IgG2 w wymieniu. Nie wiązało to się jednak ze zwiększonym napływem komórek fagocytujących do gruczołu, a tym samym nie obserwowano wzrostu liczby komórek somatycznych (lks) w mleku.

W badaniach *in vitro* (15) wykazano, że LPS *Ochrobactrum intermedium*, nawet w wysokich stężeniach, nie wpływa na zwiększone wydzielanie IL-10 przez komórki nabłonkowe. Koncentracja IL-12 i TNF- $\alpha$  jest jednak zależna od stężenia tego lipopolisacharydu. Z kolei stężeniezależny wzrost syntezy TNF- $\alpha$  przez makrofagi jest 500  $\times$  mniejszy niż ten wywołany przez LPS *E. coli*. Obserwowany wzrost stężenia TNF- $\alpha$  ma działanie immunostymulujące i nie wywołuje toksycznego efektu powodowanego przez LPS *E. coli*, w postaci szoku endotoksycznego. Podobnie stężenie IL-12 jest stabilne, pomimo stymulacji komórek nabłonkowych coraz wyższą koncentracją LPS. Dane te potwierdzają bezpieczeństwo stosowania omawianego immunostymulatora. Zwraca się uwagę na możliwość wykorzystania LPS *Ochrobactrum intermedium* w leczeniu i zapobieganiu sepsie oraz endotoksemii. W badaniach *in vivo* (15) wykazano znaczący wzrost udziału procentowego limfocytów B i T w mleku we wczesnym stadium po podaniu, a w późniejszym wzrósł odsetek makrofagów i neutrofilii. LPS różnych gatunków bakterii cechuje się zdolnością indukowania różnicowania makrofagów, co wiąże się ze zmniejszeniem ich aktywności proliferacyjnej. Jednak LPS *Ochrobactrum intermedium* powoduje zależne od dawki zahamowanie różnicowania tych komórek.

Inmufort Bov pobudza odporność nieswoistą i ma to wymierny efekt w postaci spadku liczby komórek somatycznych w mleku nawet o 70%, w przypadku zakażeń wymienia powodowanych przez patogeny niezasiadające tkanki gruczołowej. Preparat ten istotnie wpływa na zmniejszenie częstotliwości występowania podklinicznych zapaleń gruczołu mlekowego, jak również zmniejsza natężenie klinicznych objawów zapalenia.

Znajduje on szerokie zastosowanie w leczeniu i profilaktyce chorób zakaźnych. W badaniach terenowych potwierdzono aktywność immunostymulującą u bydła, głównie u krów mlecznych. Modułacja odpowiedzi immunologicznej polega na zwiększeniu immunokompetencji zwierzęcia. Podawanie Inmufortu Bov ma na celu indukcję odpowiedzi komórkowej, warunkującej zdrowotność gruczołu mlekowego. Inmufort Bov wpisuje się w konwencję racjonalnego stosowania antybiotyków. Pozwala on nie tylko na radykalne zmniejszenie zużycia antybiotyków stosowanych w leczeniu *mastitis*, ale również wpływa w istotny sposób na poprawę skuteczności leczenia.

## Piśmiennictwo

1. Klaas I., Zadoks R.: An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transbound Emerg Dis.* 2017,1–20. DOI: 10.1111/tbed.12704.
2. Paduch J., Krömker V.: Colonization of the teat skin and the teat canal of lactating dairy cattle by mastitis pathogens. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere.* 2011,39,71–6.
3. Wellnitz O., Bruckmaier R.: The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet. J.* 2012,192,148–152.
4. Burton J., Erskine R.: *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.* 2003, 19, 1–45. DOI: 10.1016/0749-0720(02)00073-7.
5. Futoma-Kołoć B., Godlewska U., Pędłowski M.: Lipopolisacharyd bakteryjny jako obiekt najnowszych badań nad endotoksemią. *Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski* 2014, 7–8, 37–41.
6. Bhattarai D., Worku T., Dad R., Rehman Z.U., Gong X., Zhang S.: Mechanism of pattern recognition receptors (PRRs) and host pathogen interplay in bovine mastitis. *Microb. Pathog.* 2018, 120, 64–70.
7. Shibata T., Motoi Y., Tanimura N., Yamakawa N., Akashi-Takamura S., Miyake K.: Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages senses Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes. *Int. Immunol.* 2011, 23, 503–510.
8. Czerkies M., Kwiatkowska K.: Toll-like receptors and their contribution to innate immunity: focus on TLR4 activation by lipopolysaccharide. *Advances in Cell Biology* 2014, 4, 1–24.
9. Petzl W., Zerbe H., Günther J., Yang W., Seyfert H., Nürnberg G., Schuberth H.: *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet. Res.* 2008, 39, 18. DOI: 10.1051/vetres:2007057
10. Velasco, J; Romero, C; López-Goñi, I; Leiva, J; Díaz, R; Moriyón, I (1998). "Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp". *Int. J. Syst. Microbiol.* 1998, 48, 759–768.
11. European Patent Specification – EP 2 437 754 B1. Lipopolysaccharide of *Ochrobactrum intermedium* and their use as immunostimulant of mammals.
12. Alnakip M.E., Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernández-No I., Caamaño-Antelo S., Calo-Mata P., Barros-Velázquez J.: The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *J. Vet. Med.* DOI.org/10.1155/2014/659801.
13. Redondo J., Monge A., Suárez J.: Influencia sobre la calidad de la leche de la aplicación de un inmunomodulador en un rebaño comercial de ganado vacuno lechero. *Comunicación Libre XVII Congreso Internacional De Medicina Bovina –Anembe 2012*, 176–178.
14. Suárez J.: Beneficios del control de células somáticas con el empleo de un inmunomodulador: un caso práctico. *Comunicación Libre VI Congreso Internacional De Medicina Bovina –Anembe 2000*, 234–235.
15. Suárez J., Llamas M.A.: Study of populations cell and interleukins in milk from cows treated with LPS from *Ochrobactrum intermedium*. *Comunicación Libre XVII Congreso Internacional De Medicina Bovina –Anembe 2012*, 96–98.

Dr hab. Hanna Markiewicz prof. nadzw.,  
e-mail: hannamar@op.pl