

WYSTĘPOWANIE KOMÓREK TYPU PFC
(PLAQUE FORMING CELLS) WE KRWI I MLEKU KRÓW,
PO DOŻYLNYM LUB DOWYMIENIOWYM
PODANIU ZAWIESINY CZERWONYCH KRWINEK BARANA

Krystyna Romaniukowa

Zakład Higieny Zwierząt, Instytut Weterynarii, Bydgoszcz

Procesy immunologiczne zachodzące w gruczole mlecznym interesują od dawna immunologów. Znaczne ilości przeciwciał jakie stwierdzano w mleku, a zwłaszcza w siarze często w mianach przekraczających miana surowicy krwi [7] budziły różne domysły. Przez wiele lat przeważał pogląd, że przeciwciała te dzięki istnieniu odpowiednich mechanizmów w gruczole mlecznym przechodzą selektywnie z surowicy krwi do siary. Dopiero ostatnio, głównie dzięki wykryciu w mleku przeciwciał nieobecnych w surowicy krwi [1, 5, 8], a także uzyskiwaniu większej ilości przeciwciał w ćwiartkach gruczołu mlecznego immunizowanych w porównaniu z nieimmunizowanymi, wielu autorów doszło do wniosku, że przeciwciała obecne w mleku pochodzą nie tylko z krwi, ale mogą być również produkowane w gruczole mlecznym [4-6, 12].

Metody badań, jakimi posługuje się współczesna immunologia pozwalają przybliżyć się do tych problemów na drodze doświadczalnej. Jedną z najlepszych do tego celu metod, jest metoda wykrywania komórek typu PFC (metoda Jernego). Komórki PFC występują w stałych zgrupowaniach tkanki limfoidalnej takich jak śledziona, węzły chłonne, mogą także występować w nacieku limfoidalnym tworzonym doraźnie, a także we krwi obwodowej. Daje to możliwość ciągłej obserwacji procesów immunologicznych na poziomie komórkowym, zwłaszcza że przebiegają one równolegle do tych samych procesów w śledzionie [2].

Celem uzyskania dalszych informacji dotyczących opisywanych zjawisk przeprowadzono obserwacje nad pojawianiem się komórek PFC w płynach ustrojowych po dożylnym lub dowymieniowym podaniu zawiesiny czerwonych krwinek barana.

MATERIAŁ I METODY

Wykonano dwie serie badań, używając krów z tej samej obory oraz stosując antygen o różnym stężeniu.

Seria I. Do badań w tej serii użyto 5 krów rasy nizinno-czarno-białej, w wieku 4-6 lat, będących w połowie lub końcowym okresie laktacji, wolnych od gruźlicy i brucelozy;

1) trzy krowy otrzymały dowymieniowo po 100 ml 10-procentowej zawiesiny czerwonych krwinek barana do każdej zdrowej ćwiartki;

2) dwu krowom podano dożylnie po 20 ml 10-procentowej zawiesiny erytrocytów barana.

Seria II. Doświadczenie to wykonano rok później na sześciu krowach rasy nizinno-czarno-białej, w wieku 3-5 lat; krowy były zdrowe klinicznie, wolne od gruźlicy i brucelozy, w połowie lub końcowym okresie laktacji;

1) dwie krowy otrzymały dowymieniowo po 100 ml 10-procentowej zawiesiny erytrocytów barana do każdej ćwiartki;

2) dwie krowy uodporniono jak wyżej, lecz wprowadzając po 100 ml 15-procentowej zawiesiny antygeny;

3) dwu krowom podano dożylnie po 50 ml antygeny — jednej 10- a drugiej 15-procentową zawiesinę czerwonych krwinek barana.

Po dowymieniowej infuzji antygeny krów nie doiono przez 24 godziny.

Przygotowanie antygeny. Używano 10- lub 15-procentową zawiesinę czerwonych krwinek barana, przemytych trzykrotnie 0,9-procentowym roztworem NaCl i zawieszonych w tym roztworze. Antygen ten przygotowywano dzień przed infuzją i przechowywano do dnia następnego w chłodni.

Komórki krwi (białe ciała) otrzymywano wg metody Hałasy [2]. Pobierano 1 ml krwi z żyły jarzmowej do 0,6 ml heparyny w roztworze NaCl (1 : 50) i schładzano. Po odwirowaniu i zebraniu kożuszka, płukano go dwukrotnie w płynie Parkera z dodatkiem 10-procentowej surowicy cielęcej. Po ostatnim odwirowaniu komórki zawieszano w 1 ml płynu Parkera. Tak przygotowaną zawiesinę komórek przetrzymywano w chłodni aż do posiewu.

Komórki mleka otrzymywano w sposób następujący. Z każdej ćwiartki wymienia pobierano jałowo około 20 ml mleka do probówki i natychmiast je schładzano, wstawiając do wody z lodem. Następnie mleko odwirowywano przez 10 min przy 3,5 tys. obrotów na minutę, a osad przepłukiwano dwukrotnie płynem Parkera z dodatkiem 10-procentowej surowicy cielęcej. Po ostatnim odwirowaniu osad zawieszano w 1 ml płynu Parkera i przechowywano w probówce w wodzie z lodem aż do wysiania.

Oznaczanie komórek produkujących przeciwciała (PFC). Zawiesinę komórek krwi i mleka w płynie Parkera mieszano z agarem i rozlewano na płytki Petriego, zgodnie z modyfikacją Sterzla et al. techniki Jerne et al. [3, 10]. Po inkubacji przez 18 godz w temp. 37°C, agar na płytce zalewano komplementem (surowica świnki morskiej) w rozcieńczeniu 1:10. Po 1-godzinnej inkubacji w temp. 37°C liczono PFC, tj. małe, okrągłe miejsca (plaque) powstałe w wyniku zhemolizowania erytrocytów barana przez obecną w środku tego miejsca komórkę produkującą przeciwciała.

WYNIKI

Dowymieniowa infuzja 10- lub 15-procentowej zawiesiny czerwonych krwinek barana w ilości 100 ml na jedną ćwiartkę, wywołała u wszystkich krów zapalenie wymienia charakteryzujące się takimi objawami jak obrzęk, miejscowe podniesienie ciepłoty oraz zwiększoną liczbę komórek w mleku.

Komórki PFC wykryto wśród komórek mleka u wszystkich krów po dowymieniowej infuzji antygeny. W I serii badań zaobserwowano, że ilość wykrywanych komórek PFC w mleku z poszczególnych ćwiartek wymienia tej samej krowy w danym dniu badania była różna. Najwięcej komórek PFC wykrywano w mleku wszystkich krów w czwartym dniu po infuzji antygeny, w następnych dniach liczba wykrywanych komórek PFC szybko malała. W mleku z ćwiartek wymienia, do których antygeny nie wprowadzono (kontrolne), komórek PFC nie wykrywano (tab. 1). U jednej, spośród trzech dowymieniowo uodpornionych krów, komórki PFC pojawiły się także we krwi, lecz w mniejszej liczbie niż w mleku, odpowiednio: 2,4 i 3,6 PFC na milion komórek. Największa liczba wykrytych komórek w mleku wynosiła 14,6 PFC na milion komórek obecnych w mleku.

Po dożylnym podaniu antygeny, we krwi obu krów wykryto komórki PFC czwartego dnia w liczbie 21,9 i 20,0 PFC na milion. W następnych dniach badania ilości te szybko malały (tab. 2). U jednej z dwu użytych do doświadczenia krów wykryto komórki PFC także w mleku.

W II serii badań prowadzono dłuższą obserwację zwierząt (do 14 dni). Po dowymieniowej infuzji 10-procentowej zawiesiny czerwonych krwinek barana, komórki PFC pojawiły się trzeciego dnia, a u niektórych krów stwierdzano je jeszcze ósmego dnia po podaniu antygeny. U wszystkich badanych krów komórki PFC wykrywano zarówno we krwi jak i w mleku niezależnie od drogi wprowadzenia antygeny. Natomiast w zależności od drogi podania antygeny znajdowano większe ilości komórek PFC w mleku po dowymieniowym podaniu antygeny i we krwi po uod-

Tabela 1

Pojawianie się komórek PFC w mleku i krwi po dowymieniowej infuzji 10-procentowej zawiesiny czerwonych krwinek barana (100 ml na ćwiartkę)

Nr krowy	Ćwiartki uodpornione	Dni po podaniu antygeny	Liczba PFC w krwi	Liczba PFC w mleku (10^6)				
				ćwiartki kontrolne	a	b	c	d
108	a, b, c	4	0	0	12,0	14,6	7,4	—
		5	0	0	2,7	0	0,5	—
		6	0	0	4,1	1,4	0,8	—
155	a, b, c, d	4	2,4	—	2,8	4,4	5,1	2,1
		5	0,8	—	3,3	0	0	4,6
		6	0	—	0,8	0,9	0	0
135	a, d	4	0	0	12,4	—	—	10,3
		5	0	0	2,8	—	—	0
		6	0	0	3,7	—	—	0

Tabela 2

Pojawienie się komórek PFC we krwi i mleku krów po dożylnym podaniu 10-procentowej zawiesiny czerwonych krwinek barana w ilości 20 ml na krowę

Nr krowy	Dni po podaniu antygeny	Liczba PFC we krwi (10^6)	Liczba PFC w mleku z 4 ćwiartek (10^6)
154	4	21,9	0
	5	10,4	0
	6	7,7	0
94	4	20,0	3,4
	6	7,0	0

Tabela 3

Pojawianie się komórek PFC w mleku krów, którym podano dożylnie lub dowymieniowo zawiesinę czerwonych krwinek barana o różnym stężeniu

Nr krowy	Antygen	Droga podania antygeny	Liczba PFC (10^6) w x dniu po podaniu antygeny						
			3	4	5	6	7	8	9
18	10-procentowa	dowymieniowo	3,0	26,5	14,0	2,7	3,6	0,9	0
17	zawiesina	100 ml na ćwiartkę	4,2	6,0	8,0	1,1	0	0	0
362	erytrocytów	dożylnie 50 ml	1,2	1,9	7,0	0	0	0	0
220	15-procentowa	dowymieniowo	0	nb	18,0	1,1	3,0	4,8	1,3
271	zawiesina	100 ml na ćwiartkę	0,3	nb	2,2	1,8	6,3	21,9	0
3	erytrocytów	dożylnie 50 ml	0	nb	1,1	2,1	3,1	9,4	0

Tabela 4

Pojawianie się komórek PFC we krwi krów, którym podano dożylnie lub dowymieniowo zawiesinę czerwonych krwinek barana o różnym stężeniu

Nr krowy	Antygen	Droga podania antygeny	Liczba PFC (10^6) w x dniu po podaniu antygeny							
			3	4	5	6	7	8	9	10
18	10-procentowa zawiesina erytrocytów	dowymieniowo 100 ml na ćwiartkę dożylnie 50 ml	14,1	9,5	7,6	0	8,0	0	0	0
17	10-procentowa zawiesina erytrocytów	dowymieniowo 100 ml na ćwiartkę	10,8	3,9	0,7	3,2	3,4	0	0	0
362		dożylnie 50 ml	25,4	40,0	8,0	7,6	8,0	4,0	0	0
220	15-procentowa zawiesina erytrocytów	dowymieniowo 100 ml na ćwiartkę dożylnie 50 ml	0	nb	2,5	7,3	2,5	14,0	12,1	0
271	15-procentowa zawiesina erytrocytów	dowymieniowo 100 ml na ćwiartkę	5,8	nb	18,1	nb	2,8	6,6	1,5	0
3		dożylnie 50 ml	5,5	nb	25,7	19,8	10,0	17,8	9,0	0

porównaniu dożylnym (tab. 3 i 4). Podanie 15-procentowej zawiesiny czerwonych krwinek barana opóźniło pojawienie się PFC u niektórych krów o jeden dzień.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W przedstawionej pracy nie zaobserwowano różnic w nasileniu procesu zapalnego wymienia w zależności od użytych do wywołania *mastitis* różnych stężeń czerwonych krwinek barana. Przebieg tego procesu zapalnego był zbliżony do procesu zapalnego wymienia, wywołanego 0,9-procentowym roztworem NaCl [9].

Analizując wpływ wielkości dawki antygeny na pojawianie się komórek PFC w płynach ustrojowych, zaobserwowano pewne różnice. U krów uodpornianych 10-procentową zawiesiną czerwonych krwinek barana, komórki PFC pojawiły się już trzeciego dnia, zarówno we krwi, jak i w mleku u wszystkich badanych zwierząt. Natomiast po podaniu 15-procentowej zawiesiny erytrocytów komórki PFC pojawiły się trzeciego dnia tylko u niektórych krów.

Zaobserwowano różnice w długości okresu, w którym wykrywano komórki PFC. Krowy, które otrzymały 15-procentowy antygen, wykazywały obecność PFC we krwi jeszcze dziewiątego dnia. Natomiast u krów, które otrzymały 10-procentową zawiesinę erytrocytów barana, komórki PFC zanikały wcześniej i ósmego dnia wykryto je tylko u jednej krowy w mleku i u jednej we krwi.

Liczba wykrywanych komórek PFC była różna w mleku z poszczególnych ćwiartek wymienia tej samej krowy w danym dniu badania. Jest to jeszcze jedna obserwacja potwierdzająca autonomię poszczególnych

ćwiartek wymienia, objawiającą się m. in. tym, że reagują one różnie na taki sam czynnik drażniący [1, 2].

Zaobserwowano, że poziom komórek PFC był wyższy w tym z płynów do którego wprowadzono antygen. To spostrzeżenie potwierdza poglądy tych autorów, którzy uważają że przeciwciała mogą być tworzone w gruczole mlecznym [4, 5, 6, 12].

Interesujące jest, że w obu badanych grupach zwierząt komórki PFC wykrywano w mleku krów, którym antygen podano dożylnie, i we krwi krów, które otrzymały antygen dowymieniowo. Proces zapalny wymienia, wynikły w efekcie dowymieniowej infuzji antygeny, sprzyja proliferacji jak i migracji komórek także do krwi obwodowej. W przypadku uodpornienia dożylnego, immunologicznie kompetentne komórki mogą być zdeponowane w wymieniu.

PISMIENNICTWO

1. Duncan J. R., Wilkie B. N., Hiestand F., Winter A. J.: *J. Immunol.*, 108, 965, 1972.
2. Hałasa J.: *Folia Microbiol.*, 13, 256, 1968.
3. Jerne N. K., Nordin A., Henry C.: The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. In Amos B., Koprowski H.: *Cell-bound antibodies*, The Wistar Inst. Press, Philadelphia, p. 109, 1963.
4. Lascelles A. K., Outteridge P. M., Mackenzie D. D. S.: *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 44, 169, 1966.
5. Mach J. P., Pahud J. J.: *Immunol.*, 106, 552, 1971.
6. Outteridge P. M., Mackenzie D. D. S., Lascelles A. K.: *Arch. Bioch. Bioph.*, 126, 105, 1968.
7. Pierce A. E., Feinstein A.: *Immunology*, 8, 106, 1965.
8. Porter P.: *Immunology*, 17, 617, 1969.
9. Romaniukowa K.: *Bull. vet. Inst. Puławy*, 14, 48, 1970.
10. Sterzl J., Vesely J., Jilek M., Mendel L.: The inductive phase of antibody formation with isolated cells. In Sterzl: *Molecular and cellular basis of antibody formation*, Publ. House of Czechosl. Acad. Sci., Prague, 463, 1965.
11. Sterzl J.: *Nature*, 208, 858, 1965.
12. Wiśniowski J., Grajewska P., Romaniukowa K., Grajewski H., Drożdżyńska M.: *Pol. Arch. wet.*, 13, 53, 1970.

К. Романюкова

ПОЯВЛЕНИЕ ОБРАЗУЮЩИХ ЩИТКИ КЛЕТОК ((PFC) В КРОВИ И МОЛОКЕ
КОРОВ ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОЙ И ВНУТРИВЫМЕННОЙ ПОДАЧИ ВЗВЕСИ
ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА

Резюме

В двух опытах II коровам подавали внутривенно или внутривыменно 10 и 15%-ную взвесь эритроцитов барана. Клетки PFC в крови и молоке коров выявляли техникой Иерни и др. в модификации Стерцеля и др. У коров после внутривыменной инфузии антигена наблюдался местный воспалительный процесс, причем в молоке и крови появлялись клетки PFC. Также после внутривенной подачи антигена клетки PFC появлялись в крови и молоке. Число клеток PFC было обычно выше в той из жидкостей, в которую вводили эритроциты, что свидетельствовало бы о местном происхождении клеток PFC и выявляемых в молоке. После подачи 15%-ной взвеси эритроцитов барана, клетки PFC появлялись позже и удерживались более долгое время в испытываемых жидкостях.

K. Romaniukowa

OCCURRENCE OF PLAQUE-FORMING CELLS (PFC) IN BLOOD AND MILK
OF COWS AFTER INTRAVENOUS AND INTRAMAMMARY ADMINISTRATION
OF THE SUSPENSION OF ERYTHROCYTES OF A RAM

Summary

In the experiments 10 and 15% suspension of erythrocytes of a ram were administered intravenously or intramammarily to 11 cows. The PFC cells in blood and milk were detected by the technique of Jerne et al. modified by Sterzl et al. In cows after the intramammary infusion of the antigen, a local inflammation process was observed, at which PFC cells appeared in milk and blood. Also after the intravenous administration of the antigen the PFC cells could be detected in blood and milk. The PFC count was usually higher in that of the liquids, into which erythrocytes were introduced, what would bear evidence of local origin of the m cells of PFC detected in milk. After the application of 15% suspension of ram erythrocytes, the PFC cells appeared later on and were present longer in the liquid tested.