

MASTITİSLİ İNEK SÜTLERİNDE LÖKOSİTLERİN SELÜLER SAVUNMADAKİ ROLÜ

Aytekin ÖZER*
Mine YAKIŞIK**

ÖZET

Memelilerde perifer kanda, vücut sıvılarında ve meme bezi dokusunda yabancı mikroorganizmalara ve cisimlere karşı organizmanın Celluler Savunma görevini üstlenen hücreler Polymorphonuclear Leukocyt'ler, Macrophage'lar ve Lenfocyt'lerdir. Normal inek sütlerinde sayısal değer açısından Macrophage'lar ilk sırayı alırlar. Acut mastitisli inek sütlerinde ilk değişme PMNL'lerin infiltrasyonundaki artıştır. İlerlemiş mastitis vakalarında ise sütte her üç hücre sayısında da büyük artışlar gözlenir. Mastitisli sütlerde özellikle PMNL'lerin fagositoz aktivitelerini baskılayan faktörler vardır. Bu faktörler sütteki Lipid-Casein seviyesinin yüksekliği immunoglobulin eksikliği ile ortaya çıkan Opsonization yetersizliği şeklinde karakterize edilebilir.

SUMMARY

Immunocellular Defensive Role of Polymorphonuclear Leukocytes Present in The Milk of Cows Suffering From Mastitis

The cells being charged with immunocellular defense against all kinds of Foreign microorganisms and foreign bodies in the blood and body fluids of mammalian animals are mainly macrophages, polymorphonuclear leukocytes (PMNL) and lymphocytes. The macrophages are the most common cells seen in the normal cow milk. The earliest sign of increase in the number of inflammatory cells is noted in the amount of PMNL, in the milk obtained from acutely infected cows. However the number of all the three types of cells are increasing with the time elapsed from infection. There are several factors inhibiting the phagocytic activity of PMNL. These factors characterized as the increase in the level of Lipid-Casein in the milk, and decreased opsonization potential due to immunoglobulin deficiency.

GİRİŞ

Memelilerde Celluler savunma denilince akla ilk gelen hücreler polymorphonuclear leukocytler (PMNL) ve Macrophage'lardır. PMNL'ler memelilerde perifer

* Doç. Dr.; Uludağ Univ. Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı, Bursa.

** Araş. Gör.; Uludağ Univ. Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı, Bursa.

kanda günün değişik zamanlarında farklı sayılarda olmakla birlikte türlere göre değişik miktarlarda karşımıza çıkarlar. PMNL'ler vücut boşluklarında toplanan sıvılarda, bağ dokuda, kan ve lenf sıvısında celluler savunmada görev alabildiği gibi, büyük memeli hayvanlarda enfeksiyonlara ve yabancı maddelere karşı mücadelede süte milyonlarca sayıda bulunarak görevlerini sürdürürler. Örneğin klinik mastitis vakalarında memelerin her bir lobunda 1 ml. süte yaklaşık 50 milyon PMNL çoğunlukla mevcuttur¹. Tedaviye kimyasal ajanlarla başlanmış akut veya kronik mastitis vakalarında memeye ve süte bulaşmış olan mikroorganizmalar canlılıklarını muhafaza edebilmişlerdir.

Süte veya meme dokusunda bu kadar çok sayıda phagositik yetenekli hücre olmasına karşın, mastitis enfeksiyonunun gelişmesini nasıl sürdürüp yayılma kaydedildiği, üzerinde düşünülmesi gereken bir konudur.

Bu çalışmada ineklerin meme bezlerindeki yapısal ve fizyolojik özellikleri incelenerek PMNL'lerin mastitisli memelerde fagositik kapasitelerinde bir azalmanın söz konusu olup olmayacağı konusunda açıklık getirilmeye çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Çalışmada, akut ya da kronik mastitisli oldukları loblarından alınan süt örneklerinin California Mastitis Testinin (CMT) pozitif sonuç vermesiyle anlaşılan inek sütleri kullanıldı. Alınan örnekler 1000 devir/dakikalık santrifugasyon işleminden geçirildikten sonra, paraformaldehid tesbit sıvısı ile ön tesbite alındılar. Ozmik asit ile son tesbitleri yapılan süt hücreleri Noble agar içine alınarak pelet haline getirildiler ve bu peletler Epon gömme materyalinde bloğa alındılar. Bloklardan elde edilen ince kesitler REYNOLDS² yöntemine göre kontrastlanarak Carl Zeiss EM, elektron mikroskopuyla incelendiler.

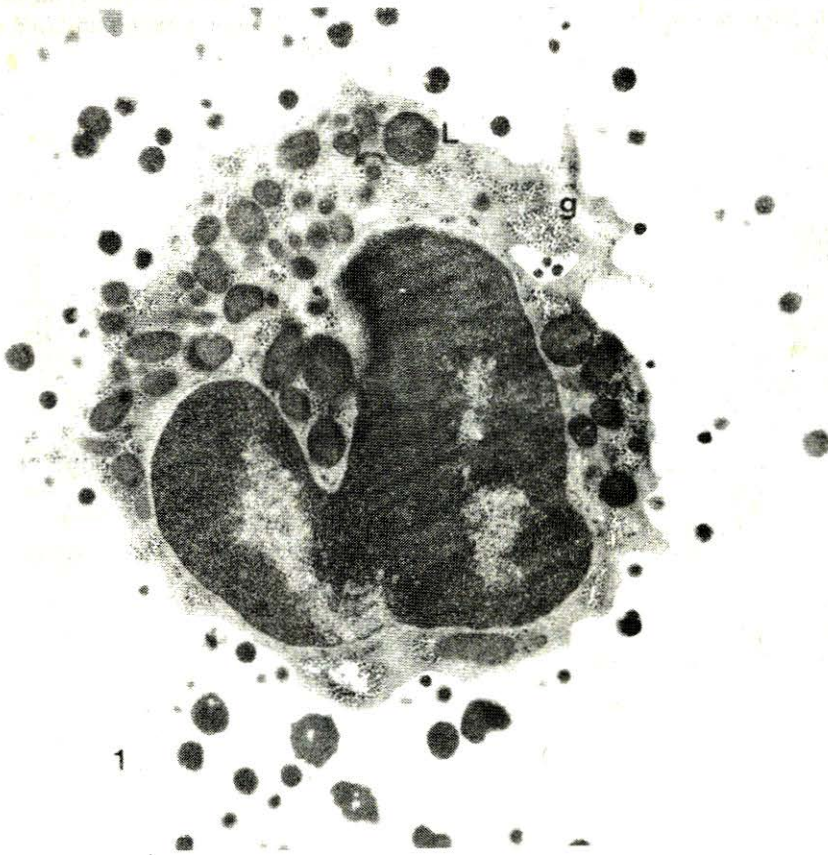
SONUÇLAR

Fagositozis, hücrelerin kendilerine yabancı gelen maddelere, enfeksiyon kaynağı olabilecek mikroorganizmalara karşı gösterdikleri bir kısım reaksiyonların ard arda sıralandığı olaylar zinciridir. Bu işlevi yapabilen hücreler retikuloendothelial sistem hücreleri olarak isimlendirilen bir grup içinde sınıflandırılırlar. Bu sınıftaki hücrelerden Polymorphonuclear Leukocytler ve macrophage'lar vücut sıvıları ve dokularda en çok karşılaşılan belli başlı fagositik hücrelerdendir. Meme bezinde Laktasyon döneminde en çok görülen fagositik hücreler PMN Leukocytlar ve macrophage'lardır. Meme bezi istirahat halinde iken PMN Leukocyt'lerin yerini macrophage'lar alırlar^{3,4}. Fagositozis olayı birkaç bölümde incelenebilir. Birinci bölüm fagosite edilecek materyalin fagositik hücreler tarafından tanınmasıdır. Buna kısaca opsonation adını verebiliriz.

Mononuclear Leukocyt'lerden B tipi Lenfocyt'ler bu aşamada fagositik hücrelere yardımcıdırlar. Ürettikleri antikorlarla (İmmunoglobulinler) fagosite edilecek materyalin işaretlenmesini sağlarlar. İkinci bölüm fagosite edilecek materyal ile fagositik hücre yüzeyleri arasında bir yapışmanın meydana gelmesidir. Üçüncü bölüm fagositik hücrelerin pseudopod'lar çıkartarak fagositik materyali araması, dördüncü bölüm materyalin phagosom olarak hücre içine alınması (yutulma) ve cytoplasma-

sında bulunan Lysosomların phagosom ile birleşerek phagolysosom'un oluşmasını sağlamasıdır. Fagosite edilecek materyal phagolysosom içinde eritilerek organizmanın yıkımdan zarar görmemesi sağlanmış olur.

PMN Leucocyt'ler belirgin çok loplü çekirdekleri ve iki ayrı tipteki granülleri ile göze çarparlar. Bu granüller azurophilic ya da primer granüller ile spesifik ya da seconder granüllerdir. Bu granüllerin iki tipi de bactericidal etkisi olan öldürücü ve sindirici materyal içerirler. Bunların dışında PMN Leucocyt'lerin cytoplasmalarında glycogen adacıkları mevcuttur (Resim 1). Fagositozis boyunca glycogen, hexosemonophosphate'a dönüşen ve NADPH oluşmasını sağlayan glikozun kaynağıdır. Hydrogenperoxid NADPH'in son ürünüdür ve NADPH'nin oksidasyonu hücrelerde antimikrobial sistemin önemli bir komponentidir.



Resim: 1

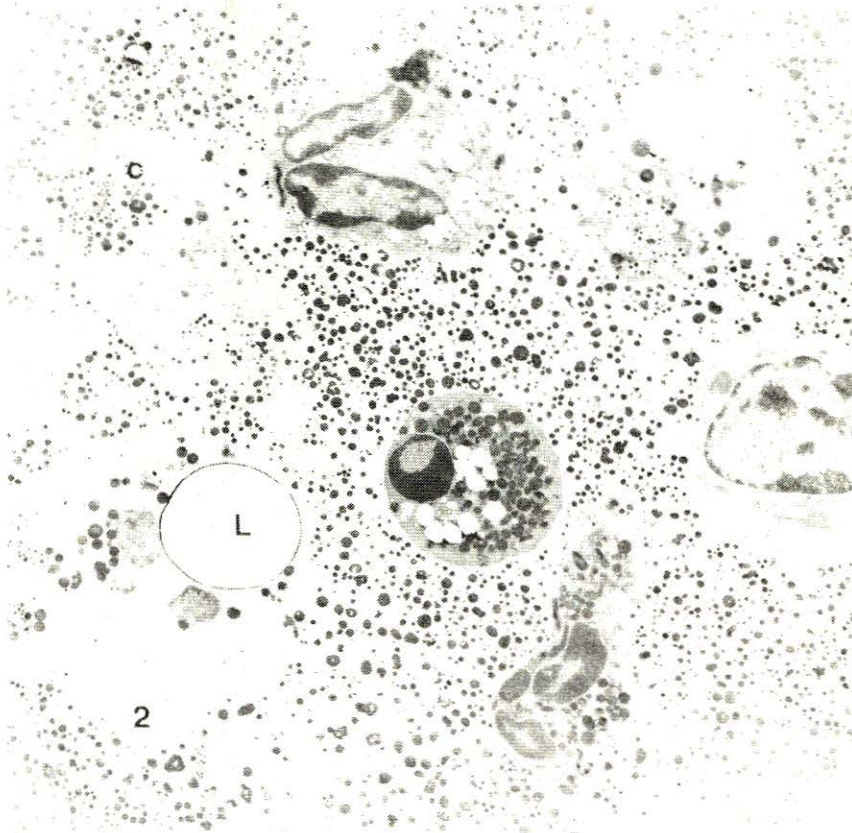
Mastitisli İnek Sütünden İzole Edilen Bir PMN Leucocyt'te Bulunan Lysosom (L) ve Glikojen (g) Partikülleri X 24000

(Figure 1. PMN Leucocyte containing Lysosoms (L) and glycogen particles (g) which was isolated milk taken from cow with mastitis X 24000)

Meme dokusuna bir enfeksiyon bulaşması halinde göze çarpan ilk değişiklik PMN Leukocyt'lerin infiltrasyonunun artışıdır. PAAPE et al.⁵ yaptığı bir çalışmada 0,5 mg. E. Coli endotoxininin meme dokusuna infuzyonu ile lokal bir Leukocytosis oluşturulduğunu PMN Leukocyt'lerin sayılarının 53×10^6 PMNL/ml. ulaştığını belirtmiştir. Bir başka araştırmacı ise⁶ Stafilococcal mastitislerde PMN Leukocyt'lerin sayılarında % 90-95'lik bir artış görüldüğünü belirtmiştir.

Fagositik hücreler (PMNL ve Macrophage'lar) IgM ve IgG için bir takım reseptörlere sahiptir. Bakteriler immunoglobulin molekülleri ile ya da Complementlerin bazı unsurları ile opsonize edilirler, bu moleküller ve Componentlerle de fagositik hücrelerin yüzeyindeki reseptörler bağlantı yaparlar. Fagositozisin gerçekleşmesi büyük ölçüde bu bağlantının oluşmasına bağlıdır.

Mastitisli sütlerden elde edilen preparatların incelenmesi sırasında PMN Leukocyt'lerin büyük çoğunluğu sütte bulunan Lipid molekülleri ve Caseini fagosite eder halde bulunmuştur (Resim 2). Hücrelerin içinde buldukları ortam Lipid ve

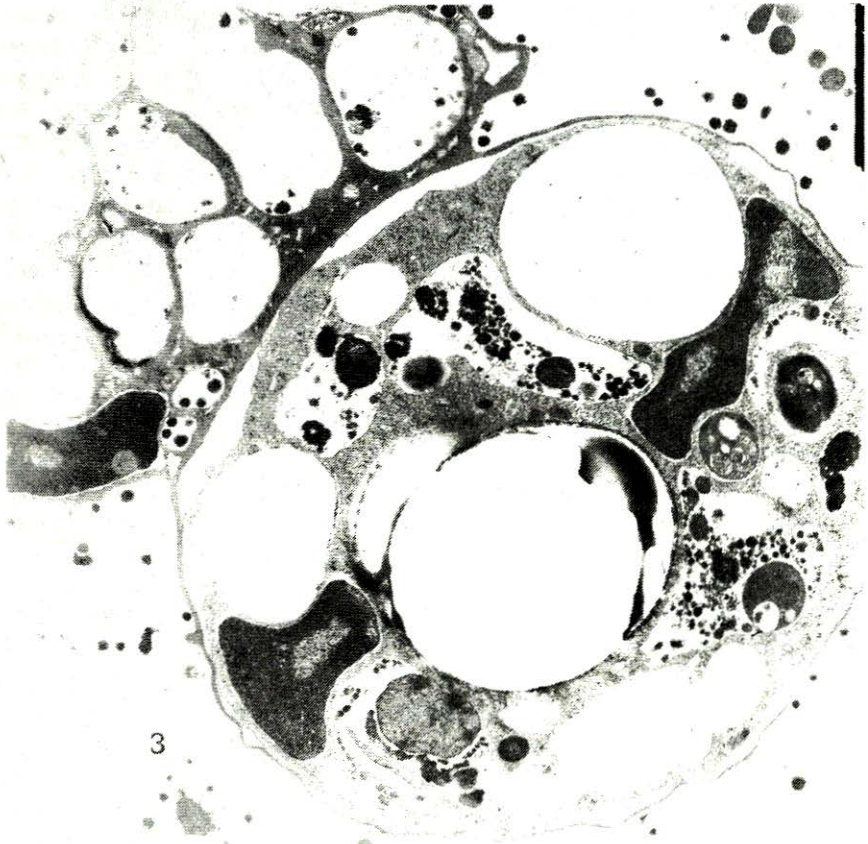


Resim : 2

Mastitisli İnek Sütünden İzole Edilen PMN Leukocyt'lerde Fagosite Edilmiş Lipid Globülleri (L) ve Casein (C) Partikülleri X 6000

(Figure 2. PMN Leukocytes containing ingested Lipid globules (L) and Casein particles (C) which were isolated milk taken from cow with mastitis X 6000)

Casein cisimciklerinden zengin bir ortamdır. PMNL için, B tipi Leukocyt'lerle opsonize edilmiş olan bakterilere ulaşip reseptörleriyle bağlantı kurmak ancak çevrelerini tamamen kuşatmış olan Lipid ve Casein cisimciklerinin fagositozundan sonra mümkün olabilecektir. Bu aşamada sitoplazması Lipid ve Casein cisimcikleriyle dolu olan hücrede fagositozis'in son devresinin tamamlanabilmesi için granüllerin (Lizozomlar) تماما yakını phagosom'larla birleşmekte, böylece hücre fagositoz gücünü büyük ölçüde yitirmiş inaktif bir hücre haline dönüşmektedir (Resim 3). Hücrelerin tekrar glycogen depolayabilmesi, yeniden granül üretebilmesi ya uzun bir zaman alacaktır ya da, fagosite ettiği Lipid ve Casein cisimciklerinin sindirilmesi tüm yaşam süresini kaplayacaktır. İşte mastitisli sütlerde PMN Leukocyt'lerin sayılarındaki artış ne olursa olsun, onların fonksiyonlarını baskılayıcı bu tür engeller mevcuttur.

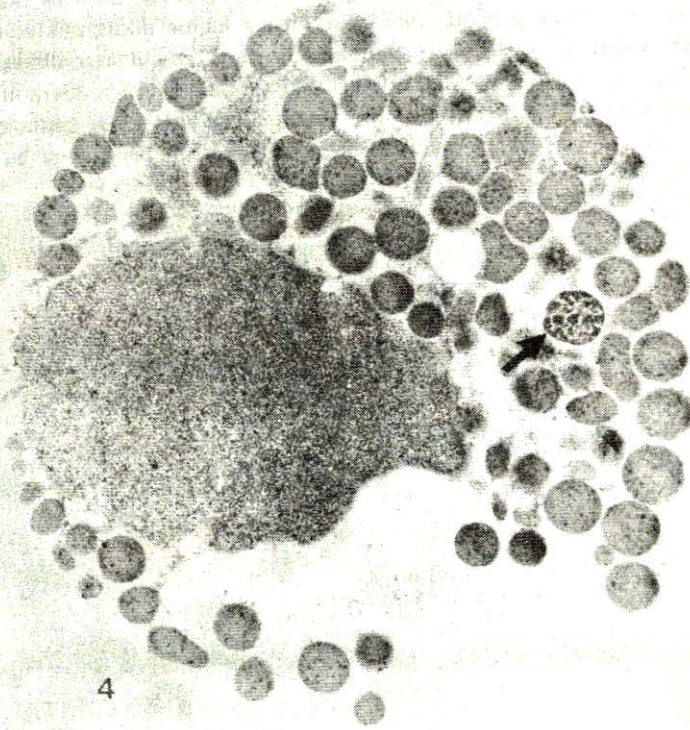


Resim : 3

Mastitisli İnek Sütünden İzole Edilen Sitoplazması Fagosomlarla Dolu Granüllerini Kaybetmiş Bir PMN Leucocyte X 15600

(Figure 3. Degranulated PMN Leucocyte containing several phagosomes which was isolated milk taken from cow with mastitis X 15600)

Mastitisli sütlerde, bakteri fagosite edebilme şansına sahip hücre sayısı oldukça azdır (Resim 4). Böyle hücrelerde cytoplasma içinde Lipid ve Casein cisimciklerine rastlanmaması fagositozis olayının baskılanmasında bu iki cisimciğin rolünün büyük olduğunu ortaya koymaktadır.



Resim: 4

Bakteri (*S. aureus*) Fagosite Etmiş Bir PMN Leucocyte. X 24000
(Figure 4. PMN Leucocyte which phagocytosed bacteri (*S. aureus*). X 24000)

TARTIŞMA

İnek sütlerinde PMNL'ler ve Macrophage'lar Celluler Savunmada en önde gelen hücrelerdir. Bu hücrelerin yanında Lenfocyt'ler fagositozis işleminin tamamlanmasında görev alan hücrelerdir. Laktasyon periodunda; normal inek sütünün 1 ml'sinde bu hücrelerden % 60 oranında Macrophage'ların, % 12 oranında PMNL'lerin ve % 28 oranında Lenfocyt'lerin mevcut olması^{7,8} fagositozis olayının en az seviyede tutulmuş olmasına en çarpıcı örnektir.

Normal sütteki bu oranlarda değişme, sütte yağın ve Casein konsantrasyonunun yükseldiği dönemlere rastlar ki, bu dönemde Colostrumun meme bezinde ya-

pıldığı dönemdir. Bu dönemde 1 ml. sütte % 50 oranında Macrophage'lara, % 25 oranında Lymphocyt'lere ve % 25 oranında PMNL'lere rastlanmaktadır⁹.

Bu sonuçlardan, herhangi bir infection almamış inek sütlerinde bulunan fagositik hücrelerin sayılarındaki artışların sütte bulunan Lipid ve Casein miktarıyla paralellik göstermektedir kanısını çıkartmak mümkündür.

Acut mastitis vakalarında dokuya özellikle PMNL'lerin infiltre olmaları göze çarpıcıdır^{1.10}. Bu infiltrasyonun saptanması ilk üç saat içinde mümkündür¹¹.

Coc'al mastitislerde 1 ml. sütte, % 53 oranında PMNL'ler, % 34 Macrophage'lar ve % 13 Lymphocyt'ler tesbit edilmiştir. Bu sayılar da hastalığın seyrine göre artış gösterir.

Mastitis'in meme bezinde yayılma ve seyrinde ilerleme görüldükçe PMNL'lerin sayılarındaki artış, fagositozis olayında bu hücrelerin ön planda rol aldığı kanısını kuvvetlendirmektedir. Bazı araştırmacılar^{4.12} sütte bulunan PMNL'lerin, kan PMNL'lerine göre daha az oranında glikojen içerdiğini öne sürmektedirler. Yaptığımız çalışmada sütte bulunan PMNL'lerde glikojen adacıklarının sitoplazma içinde çok miktarda mevcut olduğunu gördük, ancak glikojen azlığı fagositozis aktivitesi yüksek hücrelerde göze çarptı. Böyle hücrelerde sitoplazmada glikojen azalmasını fonksiyona yönelik normal bir olay olarak değerlendirdik.

WINSKOWSKI et al¹², DE CUENINCK¹⁴ enfekte sütte immunoglobulinlerin ve complementin düşük seviyede olması PMNL'lerin fagositik performansının geri planda kalmasına neden olmaktadır demektirler. Aynı araştırmacılar özel opsoninlerin yangı boyunca oluşturulması halinde fagositozisin daha yüksek seviyede gerçekleşebileceğine değinmektedirler. NEWBOULD¹⁵ kaymağı alınmış süte immun serum ilavesiyle PMNL'lerin Stafilococları fagosite etme olanaklarında bir yükselme görülmüştür demektir. PAAPE et al.⁸ de bu yargıya katılmaktadır. GUIDRY et al.¹⁶ süt PMNL'leri ile S. aureus'u bir serum içinde in vitro olarak inkube ederek Stafilococların PMNL'ler tarafından fagosite edilme oranının % 62'ye çıktığını belirtmiştir. Buna karşılık RUSSEL ve REITER¹⁷ kaymağı alınmış süte, normal sığır serumu ve Stafilococ ilave etmekle PMNL'lerin phagositik yeteneklerinin azaldığını, bu azalmanın sütteki opsonin eksikliğinden ileri gelmediğini ileri sürmektedir.

PAAPE et al.¹ meme başına steril irritan bir madde enjekte edildikten sonra PMNL'lerin % 68'inin 1/2 oranında fagosite yağ globulleri içerdiğine dikkat çekmiştir. Aynı araştırmacı kandan izole edilen PMNL'ler ve Staphylococ kültürünün sütte inkube edildiklerinde, yağı alınmış süte göre fagositozis oranlarının % 44'e düştüğünü, aynı şekilde yağı alınmış süte krema eklenince de fagositozis oranında düşme görüldüğünü belirtmiştir.

Aynı araştırmacı 1977 yılında yaptığı çalışmada⁴ sütteki casein'in fagositozu baskılayıcı bir etkisinin görülmediğini ancak, inkubasyon periyodunun artması ile Casein'in fagositozise müdahale ettiği görüşünün son zamanlarda ortaya atıldığını ileri sürmüştür. Aynı araştırmacı 1979 da yaptığı çalışmada¹ süttten izole edilen PMNL'lerde fagosite edilmiş Casein misellerine rastlandığını, incelenen 5 inekten 3'ünde hücrelerde casein misellerine rastlanırken, yağ globullerinin tüm hücrelerde görüldüğünü belirterek fagositozisin inhibasyonunun casein misellerinin hücre membran yüzeyini sarması ve hücre içine alınırken de hücrelerin granüllerini kaybetmesiyle karakterize olduğunu ortaya koymuştur.

Yaptığımız çalışmada, mastitisli süttten izole edilen PMNL'lerde fagosite edilmiş çok miktarda yağ globulleri ve casein miselleri gördük. Enfeksiyon nedeni olan bakterilerin de çok bol olduğu ortamda PMNL'lerin sadece Lipid ve Casein'le dolu olması fagositozisin inhibasyonunun Caseinle birlikte Lipid'ler tarafından opsonizasyonunun engellenmesi, hücreler tarafından bol miktarda fagosite edilerek degranülasyona neden olma şeklinde karakterize olduğu kanımızı kuvvetlendirmiştir.

İncelemelerimizde mastitisli sütlerde fagositoz yapan macrophage'lara rastlanmamıştır. MULLAN et al.¹⁸'na Stafilococların macrophage'lar tarafından fagosite edildiklerini ancak, bunun PMNL'lerdeki gibi kapsamlı olmadığına değinmiştir.

KAYNAKLAR

1. PAAPE, M.J., WIRGIN, W.P., GUIDRY, A.J. and PEARSON, R.E.: Leukocytes-Second Line of defense against invading mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 62: 135-153, (1979).
2. REYNOLDS, E.S.: The use of Lead citrate et high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208-212, (1963).
3. CONCHA, C.: Cell types and their immunological functions in Bovine mammary tissues and secretions-a review of the Literature. *Nord Vet.-Med.* 38: 257-272, (1986).
4. PAAPE, M.J., and WIRGIN, W.P.: The Leukocyte as a defense mechanism. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 170: 1214, (1977).
5. PAAPE, M.J., CARROL, P.V., KRAL, A.J., MILLER, R.H. and DESJERDINS, C: Corticosteroids, Cüculating Leukocytes and erythrocytes in Cattle: Diurnal changes and effects of bacteriologic Status, stage of lactation, and milk Yield on response to adrenocorticotropin. *Amer. J. Vet. Res.* 35: 355, (1974).
6. SCHALM, O.W., CARROL, E.J. and JAIN, N.C.: Number and types of somatic cells in normal and mastitic milk. in: *Bovine mastitis* 94-127. Philadelphia, Lea and Febiger (1971).
7. LEE, C.S., WOODING, F.B. and KEMP, P.: Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dairy cows secretions, Colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy. Res.* 47: 39-50, (1980).
8. PAAPE, M.J., WIRING, W.P., GUIDRY, A.J. and SCHULTZ, W.D.: Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. In: *The ruminant Immun System.* Ed. J.E. Butler. *Adv. Exp. Med. And Biol.* 137: 558-78, (1981).
9. JENSEN, D.L. and EBERHART, R.J.: Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *Amer. J. Vet. Res.* 42: 743-747, (1981).
10. JAIN, N.C.: Neutrophil Leukocytes and inflammation of the bovine mammary gland. *Theriogenology* 6: 153-173, (1976).
11. SCHALM, O.W.: Pathologic changes in the milk and udder of Cows with mastitis. *Javma*, Vol. 170 No: 10 (2) (1979).

12. NAIDU, T.C. and NEWBOULD, F.H.S.: Glycogen in Leukocytes from bovine blood and milk. *Can. J. Comp. Med.* 37: 47-55, (1973).
13. WISNIOWSKI, J., ROMANIKOWA, K. and GROJEWSKI, H.: Phagocytosis phenomenon in the mammary glands of cows. 1. Opsonizing factor and the phagocytic activity of Leukocytes in milk and blood. *Bull. Vet. Pulawy* 9:140-144, (1965).
14. DE CUENINCK, B.J.: Immune mediated inflammation in the Lumen of the bovine mammary gland. *Int. Archs. Allergy appl Immun.* 59: 394-402, (1979).
15. NEWBOULD, F.H.S.: Enhancement of phagocytosis in bovine milk Leukocytes in vitro. *Can. J. Comp. Med.* 34: 261-264, (1970).
16. GUIDRY, A. J., PAAPE, M.J. and PEARSON, R.E.: The effect of local immunization of the mammary gland on phagocytosis and intracellular kill of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci. Suppl.* 60: 135, (1977).
17. RUSSEL, M.W. and REITER, B.: Phagocytic deficiency of bovine milk Leukocytes: An effect of casein. *J. Reticuloendothelial soc.* 18: 1, (1975).
18. MULLAN, N.A., CARTER, E.A. and NGUYEN, K.A.T.: Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from nonlactating mammary glands. *Res. Vet. Sci.* 38: 160-166, (1985).