

ФІЗІОЛОГІЧНА РОЛЬ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН МОЛОКА, АПОПТОЗ ТА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ

Шаповалов С.О.¹, Россо Л.М.¹, Русько Н.П.¹, Мезхер К. Фател²

*Інститут тваринництва НААН України¹
Харківська державна зооветеринарна академія²*

У статті викладені матеріали огляду літератури з питань фізіологічної ролі соматичних клітин, апоптоза та «кисневого вибуху» нейтрофілів у тканинах молочної залози та її секреті.

Ключові слова: апоптоз, вільнорадикальні процеси, «кисневий вибух», молоко, соматичні клітини.

Physiological role of somatic cells in milk, apoptosis and free radical processes. Shapovalov S.O., Rosso L.M., Rusko N.P., Mezher K. Fatel – Review of publications on physiological role of somatic cells, apoptosis, and “oxygen explosion” of neutrophils in the tissues of mammary gland and its secretion.

Key words: apoptosis, “oxygen explosion”, milk, somatic cells.

ВСТУП

Огляд сучасної літератури показав, що рівень соматичних клітин у молоці розглядається як індикатор здоров'я молочної залози, ступінь виділення із вимені «учасників» запального процесу як забруднення молока соматичними клітинами та їх вмістом, що вивільняється при апоптозі та «кисневому вибуху» нейтрофілів. У результаті багатьох досліджень у молоці не виявлено сталої субпопуляції соматичних клітин. За своїм складом соматичні клітини молока представлені епітелієм альвеол і молоковивідних шляхів молочної залози та лейкоцитами (поліморфноядерними гранулоцитами), лімфоцитами та макрофагами. У вимені корів відбувається постійне оновлення епітеліальної тканини. У молоці, одержаному від здорових корів, масова частка епітеліальних клітин знаходиться в межах від 2 до 10 %, а решта припадає на лімфоцити, макрофаги та поліморфноядерні гранулоцити. У табл. 1 наведені показники масової частки різних типів клітин у молоці здорових корів за даними ряду авторів.

Гранулоцити найбільш спеціалізовані, проте їм властива поліфункціональність, тобто не тільки фагоцитарна, але й секреторна функція: виділення цитокінів та інших біологічно важливих продуктів для неклітинного цитолізу. Функціональні особливості нейтрофілів та макрофагів видно з таблиці 2.

Таблиця 1

Масова частка різних типів клітин у молоці здорових корів

Тип клітин	Lee C. S., et al., 1980	Conch A.C., 1986	Robert J Harmon, 2001	Білик Р.І.	Ognean L. (вівці та кози), 2007
ПМЯ нейтрофіли	0–11	10		28–59	25,6–47,9
Макрофаги	66–88	60	30–70	5–7	
лімфоцити	10–27	30			
Епітеліальні клітини	0–7	2	0–7	11–23	7,1–8,3

Таблиця 2

Функціональні особливості нейтрофілів та макрофагів

Властивість	Нейтрофіли	Макрофаги
Темп мобілізації та активації	Швидкий (хвилини)	Більш подовжений (години)
Термін активації	Короткий (хвилини)	Довгий (години)
Строк життя (та виявлення активності)	Короткий (2-3 доби)	Довгий (2-3 тижні)
Здатність до піноцитозу	Помірний	Високий
Регенерація мембрани	Відсутня	Відбувається
Реутилізація фагосом	Неможлива	Можлива
Fc- рецептори	FcγR II, III	FcγR II, III
Рецептори для компліменту	CR1,3,4	CR1,3,4,5
Нелізосомна секреція	Відсутня	Присутня (наприклад, секреція цитокінів)

Зрілі гранулоцити знаходяться у циркуляції 8-10 годин, а потім надходять у тканини. Швидкість поновлення нейтрофілів – $1,6 \cdot 10^9$ клітин на 1 кг маси.

Підвищений вміст соматичних клітин, як правило, спостерігається у молоці корів на початку лактації, у період запуску та тічки. Суттєве збільшення соматичних клітин у молоці пов'язане з субклінічними та клінічними формами маститу, що виникли, в тому числі, як наслідок дії патогенних чинників.

Вважається, що співвідношення масової частки епітеліальних клітин поліморфноядерних нейтрофілів лейкоцитів, лімфоцитів та макрофаги найбільш повно відображає реальний стан процесів у молочній залозі [11]. Як приклад різного співвідношення морфологічного складу соматичних клітин молока можна навести дані при різному рівні забруднення молока соматичними клітинами (табл. 3).

Таблиця 3

Морфологічний склад клітинного пулу соматичних клітин молока при різному рівні його забруднення

	Вміст СК	
	< 500 тис/см ³	> 500 тис/см ³
Гранулоцити	56,6±16,7	79,3±6,4
Макрофаги	26,6±7,1	13,6±5,7
Лімфоцити	21,9±11,0	7,3±2,6

Вважається, що кількість соматичних клітин у здоровому неінфікованому вимені корів повинна бути меншою, ніж 200 тис/см³ [18]. Проте більшість дослідників наполягають, що нормальне функціонування секреторної тканини вимені характеризується екскрецією соматичних клітин у молоко меншою, ніж 100 тис/см³. Якщо кількість соматичних клітин знаходиться в межах від 200 тис/см³ до 300 тис/см³ то це є вказівкою на те, що молочна залоза інфікована. Але Папе і Вайланд (1988) спостерігали відсутність інфекції залози при вмісті в середньому 500 тис/см³ соматичних клітин у молоці.

У зв'язку з тим, що рівень соматичних клітин у молоці негативно впливає на його якість та технологічні властивості, у всіх країнах, що займаються молочним скотарством, встановлені гранично допустимі показники забруднення товарного молока соматичними клітинами (табл. 4).

Таблиця 4

Гранично допустимий вміст соматичних клітин у молоці

Країна	СК тис/см ³	Країна	СК тис/см ³
Австралія	140-170	Польща	400-500
Австрія	80	Фінляндія	150-180
Аргентина	400	Швеція	180
Данія	300	Росія	300-500
Нова Зеландія	190	Норвегія, Англія	150
Нідерланди	150	США	225
Європейські країни	400	Україна	400-600

При запаленні молочної залози підвищується рівень соматичних клітин у молоці та спостерігаються зміни його хімічного складу (зменшується рівень лактози, загальна кількість сухих речовин, казеїну, солей кальцію, калію, фосфору, магнію, вітамінів; збільшуються

рівні Tru і Total протеїнів та водорозчинних фракцій білка (альбуміну, глобуліну), іонів хлору, натрію, ферментів (каталази, редуктази, фосфатази), підвищується концентрація водневих іонів (рН зрушується в лужний бік) та ін.). Окрім того, змінюється органолептичні властивості молока: з'являється солонувато-гіркий смак, змінюється колір та аромат і погіршуються технологічні властивості, зокрема, сиропридатність, стійкість до нагрівання, інертність сичужного та інших ферментів, порушується технологія пастеризації, термізації та стерилізації молока внаслідок утворення так званих «повітряних мішків» на місці скупчення соматичних клітин, що не дає змогу повністю знешкодити мікроорганізми.

Зважаючи на вищенаведене, соматичні клітини є чинником, що суттєво знижує якість молочної сировини, з одного боку, а з іншого — соматичні клітини можна розглядати як захист молочної залози від деструктивних процесів, викликаних метаболітами патогенної мікрофлори.

Життєздатні поліморфноядерні нейтрофіли лейкоцитів здатні ефективно боротися з інфекцією всередині молочної залози [8, 20]. Основною причиною більш низької функціональності поліморфних ядерних нейтрофілів лейкоцитів молока може бути апоптоз у порівнянні з їх копіями в крові [9, 15, 17]. Було доведено, що процентний вміст поліморфноядерних нейтрофілів лейкоцитів у молоці з апоптотичними рисами (34.0-41. 2%) набагато більший у порівнянні з кров'ю (5.3-15. 1%) [19]. Завдяки фагоцитозу компонентів молока, жиру та казеїну, поліморфноядерні нейтрофіли лейкоцитів молока стають більш активними щодо запуску раптової стимуляції окисного процесу. Підвищена активність окислювального процесу прискорює запрограмовану смерть клітини [21]. Нещодавно встановлено великі коливання у процентному вмісті некротичних поліморфних ядерних нейтрофілів лейкоцитів у молоці корів на ранній, середній і пізніх стадіях лактації [8, 20]. При проведенні даного дослідження була також виявлена різниця у процентному вмісті некротичних клітин у різних фракціях молока: некроз поліморфних ядерних нейтрофілів лейкоцитів був найбільшим у фракціях 1, 2 і 3, оскільки ці клітини знаходилися у молочному оточенні більш тривалий період часу (10—12 годин) [20]. Ці поліморфноядерні нейтрофіли лейкоцитів, які мігрували з крові через циркуляцію в молочну залозу, є клітинами кінцевого етапу з високою компромісною життєздатністю, фагоцитарною та бактерицидною функціями завдяки всмоктуванню кульок жиру та казеїну [13].

Функціональні особливості нейтрофілів, що характеризують їх високу мобільність, обсяги клітинної інфільтрації, цито- та гістотоксичний потенціал, визначають даний клітинний тип як цікавий об'єкт для наукових досліджень. Пріоритетність комплексного підходу в оцінці стану популяції нейтрофілів визначається відсутністю цілісної інформації про взаємозв'язок ключових подій у житті цих ефекторних клітин — міграції, продукції активних форм кисню (АФК), апоптоза, що пояснює труднощі визначення участі нейтрофілів у різних патологічних процесах [6, 5].

Апоптоз привертає увагу дослідників як потенційний патогенетичний фактор при різних захворюваннях [1, 2, 4]. Фактично цей вид загибелі клітин дозволяє видаляти потенційно небезпечні нейтрофіли з вогнищ запалення й сприяє їхньому обмеженню, оскільки фагоцитоз апоптозних клітин за допомогою резидентів-макрофагів виявляє імуносупресивний ефект [3].

Апоптозна загибель клітин пов'язана з активацією каскаду апоптозних протеаз, названих каспазами. Сигнал загибелі передається всередину клітини через ряд адапторних білків, які організують комплекс з однією із ініціаторних каспаз — каспазою-8, що веде до активації останньої. Активна каспаза-8 сприяє включенню ефекторних каспаз, що завершують апоптозну програму. Враховуючи це, інгібування каспаз значно підвищує виживання різних типів клітин, у тому числі нейтрофілів, за рахунок затримки апоптоза. Отже, вивчення рівня апоптозної загибелі гранулоцитів дозволить не тільки оцінити напруженість запальних реакцій при маститі, а й прогнозувати їхній перебіг. Оскільки апоптоз — дуже складно регульований процес, то кількість сигнальних шляхів, ефекторних субстанцій і месенджерів, що беруть участь у цьому явищі, досить значна.

Доведено, що нейтрофіли, як одна з найчисельніших популяцій соматичних клітин, здатні до апоптоза не тільки у молочній залозі, а й безпосередньо у виділеному секреті, тобто у молозиві чи молоці.

Швидкість мобілізації нейтрофілів доповнюється їх здатністю протягом секунд розвивати метаболічні процеси, що призводять до «кисневого вибуху». Після апоптоза нейтрофілів із цитоплазмою виходить у навколишній простір вміст клітини, що містить кисневі радикали, ендонуклеази, цистеїнові та серинові протеази, нейротрансмітери, гормони, мієлопероксидази, що при значних кількостях клітин у молоці, залучених у цей процес, може впливати на обмінні процеси організму при споживанні такого молока.

Література

1. Маянский А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге /Маянский А.Н., Маянский Д.Н. // Новосибирск: Наука. – 1989. – 340 с.
2. Маянский А. Н. Апоптоз нейтрофилов /[Маянский А. Н., Маянский Н. А, Заславская М. И., Поздеев Н.М.] //Иммунология. – 1999. – №19. – С.6–11.
3. Маянский Н.А. Каспазозависимый механизм апоптоза нейтрофилов: апоптогенный эффект туморнекро-тического фактора / Маянский Н.А. // Иммунология. – 2002. – № 23(1). – С.15-18.
4. Пасечник А.В. Апоптоз нейтрофилов как параметр воспалительной реакции при патологии различного генеза/ [Пасечник А.В., Фролов В.А., Гвоздь Н.Д. и др. // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2004. – Р.103–105.
5. Апоптоз нейтрофилов как параметр воспалительной реакции при патологии различного генеза. /[Пасечник А.В., Фролов В.А., Гвоздь Н.Г. и др.] // Вестник РУДН. Серия: Медицина. – 2004. – №1(25). – 103с.
6. Сайгитов Р.Т. Комплексный анализ миграции, эффекторной функции и апоптоза нейтрофилов. Автореф. дис... канд. мед. наук. 2001. – Москва, 30 с.
7. Conch A.C. Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions – a review of literature. / Conch A.C. // Nord. Vet. Med. – 1986. – 257p.
8. Dosogne H. Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. /Dosogne, H. Vangroenweghe F., Mehrzad J., Massart-Leen A. M. & Burvenich C. J. Dairy Sci. 2003. – 86:828-834.
9. Kent G. M. Phagocytosis and related phenomena in polymorphonuclear leukocytes from cow's milk. / Kent G. M. & Newbould, F. H. S. // Canadian Journal of Comparative Medicine. – 1969. –V.33. – 214-19.
10. Lee C.S. Identification properties and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows / Lee C.S. F. B. P. Woodingand P. Kemp. J. Dairy Res. 1980. – 47:39.
11. O'Brien B. Relationship between somatic cell count and neutrophils in milk / O'Brien B., Fitzpatrick, C, Meaney, W. j. & Joyce, P. 38, 288-96. Irish Journal of Agricultural Food Research. – 1999.
12. Ognean L. Aspects concerning morphophysiology of cell population from small ruminants' milk. Lucrari stiintifice medicina veterinara vol. XL, 2007, Timisoara.
13. Paape M.J. & Tucker, H. A. Somatic cell content variation in fraction-collected milk. Journal of Dairy Science. – 1966. – 49, 265-7.
14. Paape, M.J. & Weinland, B. T. Effect of abraded intramammary device on milk yield, tissue damage and cellular composition. Journal of Dairy Science. –1988. – 71, 250-6.
15. Paape, M.J. & Guidry, A.J. Effect of fat and casein on intracellular killing of Staphylococcus aureus by milk leukocytes. Proceedings of the Society of Experimental Biological Medicine. – 1977. – 155, 588-93.

16. Robert J. Harmon Somatic cell Counts: a primer National Mastitic Council Annual Meeting Proceedings, 2001. – p. 3-9.

17. Salgar S. K. Flow cytometric study of oxidative burst activity in bovine neutrophils / Salgar, S. K, Paape, M. J., Alston-Mills, B. & Miller, R. H. American Journal of Veterinary Research. – 1991. – 52, 1201-7.

18. Ssmith K. L. Standards for somatic cells in milk: physiological and regulatory. Mastitis Newsletter, Newsletter of the IDF, No. 144, p. 7. – 1996.

19. Van Oostveldt K. Apoptosis and necrosis in blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and mid-lactating cows / [Van Oostveldt K, Vangroenweghe, F., Dosogne, H. & Burvenich C.] // Veterinary Research 32, 617-22. – 2001.

20. Vangroenweghe, F. Effect of milk sampling techniques on milk composition, bacterial contamination, viability and functions of resident cells in milk / [Vangroenweghe, F., Dosogne, H., Mehrzad, J. & Burvenich, C.] // Veterinary Research. – 2001. – V.32. – P. 565–79.

21. Watson R. W. G. Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement / [Watson R. W. G, Rotstein, O. D., Nathens, A. B. et all.] // Journal of Immunology. – 1997. – V.158. – P.945–53.

Физиологическая роль соматических клеток в молоке. Апоптоз и свободнорадикальные процессы. Шаповалов С.О., Россо Л.М., Русько Н.П., Мезхер К. Фател – В статье изложены материалы обзора литературы по физиологической роли соматических клеток, апоптоза и «кислородного взрыва» нейтрофилов в тканях молочной железы и ее выделениями.

Ключевые слова: апоптоз, кислородный взрыв, молоко, свободнорадикальные процессы, соматические клетки.