

16. Marchioli C. C., Yancey R. J., Wardley R. C., Thomsen D. R., Post L. E.: Am. J. vet. Res. 48, 1577, 1987.
17. Mc Gregor S., Easterday B. C., Kaplan A. S., Ben Porat T.: Am. J. vet. Res. 46, 1494, 1985.
18. Mengeling W. L., Paul P. S., Pirtle E. C.: Arch. Virol. 78, 213, 1983.
19. Mettenleiter T. C., Lukacs N., Rziha H. J.: J. Virol. 56, 307, 1985.
20. Paul P. S., Mengeling W. L., Pirtle E. C.: Arch. Virol. 73, 193, 1982.
21. Pittler H.: Jahrestagung Fachgruppen. „Schweinekrankheiten und Tierseuchenrecht“ Hannover, 1989, s. 34.
22. Quint W., Gielkens A., Van Oirschot J. V., Berns A., Cuypers T.: J. gen. Virol. 68, 523, 1987.
23. Sabo A.: Aujeszského choroba. VEDA, Bratislava, 1981.
24. Schreurs Ch., Simon A. C., Mettenleiter T. C., Rziha H. J.: Proc. 13th Int. Herpesvirus workshop. Univ. of California Irvin 1983, s. 213.
25. Szweida W., Janowski H., Grzechnik R.: Proc. 6th Int. Congress Anim. Hyg. Skara, 1988, s. 245.
26. Thacker B., Maes R., Bartkoski M., Kolar J.: Proc. IPVS Congress, Rio de Janeiro, 1983, s. 183.
27. Thawley D. G., Gustafson D. P., Beran G. W.: J. Am. vet. med. Assoc. 181, 1513, 1982.
28. Thawley D. G., Morrison R. B.: J. Am. vet. med. Assoc. 183, 184, 1988.
29. Thow D.: Proc. IPVS Congress Rio de Janeiro 1983, s. 194.
30. Van der Valk P.: Proc. IPVS Congress Rio de Janeiro, 1988, s. 195.
31. Van Oirschot J. T., De Leeuw P. W., Tiessink J. W. A.: Zbl. Vet. Med. B. 32, 173, 1985.
32. Van Oirschot J. T., Rziha H. J., Moonen P. J., Van Zaane.: J. gen. Virol. 67, 1179, 1986.
33. Van Oirschot J. T., Houwers D. J., Rziha H. J.: Proc. 13th World Vet. Congress, Montreal, 1987, s. 283.
34. Van Oirschot J. T., De Waal C. A.: Vet. Rec. 121, 365, 1987.
35. Van Oirschot J. T., Wijsmuller J. M.: Proc. IPVS Congress Rio de Janeiro, 1983, s. 172.
36. Van Oirschot J. T.: Vet. Rec. 122, 371, 1988.
37. Van Oirschot J. T.: Proc. EEC Seminar „Vaccination and Control of Aujeszky Disease“. Brussels 1988.
38. Vannier P.: J. Rech. Porc. France 20, 73, 1988.
39. Visser N., Lütticken D., Baars J. C.: Proc. IPVS Congress Rio de Janeiro, 1983, s. 186.
40. Wardley R. C., Berlinski P. J., Thomsen D. R.: Proc. IPVS Congress Rio de Janeiro 1983, s. 179.
41. Wardley A. L., Meyer P. J., Berlinski D. R., Thomsen E. A., Petruskis L., Poot E.: Proc. 13th Int. Herpesvirus workshop. Univ. of California, Irvine, 1988, s. 252.
42. Wathen L. M. K., Platt K. B., Wathen M. W., Van Deussen R. A., Whetstone C. A., Pirtle E. C.: Virus Res. 4, 19, 1985.
43. Wiśniewski J., Siemionek J.: Medycyna Wet. 44, 81, 1988.
44. Wittmann G.: Proc. 11th O. I. E. Conf. Vienna 1984, s. 3.
45. Zuckermann F. A., Mettenleiter T. C., Ben Porat T.: Proc. 13th Int. Herpesvirus workshop. Univ. of California, Irvine, 1983, s. 256.

Adres autora: doc. dr hab. Zygmunt Pejsak, ul. Kościuszki 12/9, 24-100 Puławy

MAREK JANIĄK, ANTONI J. FUROWICZ\*, DANUTA CZERNOMYSY-FUROWICZ\*\*

## Właściwości immunomodulacyjne preparatów bakteryjnych *Propionibacterium* sp.

Międzyzakładowa Pracownia Pomiarów Izotopowych Wojskowego Instytutu Higieny  
i Epidemiologii, ul. Szaserów 123, 00-909 Warszawa  
\* Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Zootechnicznego AR,  
ul. Doktora Judyma 12, 71-460 Szczecin  
\*\* Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Wincentego Pola 2 b, 71-342 Szczecin

Według Zigelboima i Berda (90) beztlenowe, Gram-dodatnie bakterie rodzaju *Propionibacterium* zostały podzielone w opraciu o różnice w zakresie biochemizmu, budowy ściany komórkowej (peptydoglikanu) oraz homologii DNA na 5 grup. Pierwsze cztery grupy obejmują kolejno gatunki: *P. acnes* typ I, *P. acnes* typ II, *P. avidum*, *P. granulosum*; do grupy piątej zalicza się tzw. „klasyczne” propionibakterie, nie posiadające właściwości immunomodulacyjnych (90). Pierwotnie, bakterie czterech pierwszych gatunków były określane jako *Corynebacterium parvum* (2). Aktualnie nazwą tą jest określany w niektórych pracach referencyjny szczep *P. acnes* CN 6134 (54). Wśród bakterii tych występują szczepy o różnej aktywności biologicznej; do najaktywniejszych pod względem działania immunostymulacyjnego należą *P. acnes* typ I (szczep CN 6134, preparat handlowy: Coparvax), *P. avidum* oraz niektóre szczepy *P. granulosum*. W 1984 roku Halpern i wsp. wykazali po raz pierwszy stymulujący wpływ *C. parvum* na układ siateczkowo-śródbłonkowy (33). Dwa lata później Woodruff i Boak stwierdzili, że szczep ten hamuje rozwój nowotworów przeszczepialnych u myszy (89). Dalsze badania wykazały, że przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne działanie propionibakterii może być wynikiem aktywizacji różnych mechanizmów odpornościowych, przede wszystkim typu nieswoistego (80). Dotyczy to zarówno zwierząt laboratoryjnych, jak i człowieka oraz ssaków hodowlanych (25, 37, 90).

W roku 1973 Pulverer i Ko (65) przebadali kilkadziesiąt szczepów propionibakterii i stwierdzili, że jednym z najbardziej aktywnych pod względem właściwości immunostymulujących i przeciwnowotworowych jest preparat ścian komórkowych szczepu *P. granulosum* KP-45 (Pg KP-45). Wiele danych doświadczalnych wskazuje, że aktywność biologiczna propionibakterii związana jest z niektórymi składnikami ich ścian bakteryjnych, przede wszystkim peptydogli-

kanami i polisacharydami (12, 16, 29). Najczęściej wymienia się N-acetylo-muramyl-dwupeptyd oraz 6,6 dwumykoilo-trehalozę (cord factor) (90).

### Występowanie *Propionibacterium* sp. u zwierząt i człowieka

Najwięcej danych na ten temat poświęconych jest *P. acnes* (90). Szereg szczepów tego gatunku występuje jako flora saprofityczna na powierzchni skóry człowieka i innych ssaków (49, 53). Gatunek ten oraz *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium lipophylicum* i *Pityrosporum* sp., rozkładając obojętne lipidy do wolnych kwasów tłuszczowych, chronią powierzchnię skóry przed kolonizacją bakterii ropotwórczych (51, 52). Pomimo, że *P. acnes* należy do normalnej flory skóry, to w pewnym okresie życia, gdy zwiększa się aktywność gruczołów, dochodzi do zatkania ich ujść przez komórki łojowe, co stwarza wewnątrz gruczołu warunki sprzyjające intensywnemu namnażaniu się bakterii beztlenowych, prowadzącemu do powstania zmian trądzikowych (50). Schorzenie to występuje u około 80% ludzi w wieku od 13 do 19 roku życia (51). Przeciwciała przeciwko antygenom *Propionibacterium* wykrywane odczynem immunoelektroprecypitacji pojawiają się u młodzieży w wieku powyżej 14 lat; częściej jednak oraz w wyższym mianie występują one dopiero u osób w wieku powyżej 20 lat (50). Powyższe fakty, jak również dobre rezultaty zapobiegania trądzikowi w wyniku podania swoistej szczepionki, mogą świadczyć o powiązaniu tego schorzenia z niektórymi szczepami *P. acnes* oraz *P. granulosum* (49, 52). Hattori i Mori stwierdzili fizjologiczne występowanie *P. acnes* w szpiku mostka u człowieka (37). Odnotowali, iż bakterie te znikają ze szpiku u ludzi chorych na różne rodzaje nowotworzenia i inne choroby wyniszczające. Dotyczy to zwłaszcza raka przewodu pokarmowego. Równoległe do zaostżenia prze-

biegu raka żołądka stwierdzono gwałtowny spadek częstości izolacji tych bakterii ze szpiku (38). Stąd też sugestie autorów co do immunoregulacyjnego znaczenia *P. acnes* w organizmie ludzkim. Obecność tego gatunku stwierdza się również w zakresie mikroflory przedżołądków ssaków przeżuwiających. Fonty i wsp. (21) zwrócili uwagę na pierwszoplanową rolę *P. acnes* w zasiedlaniu żwacza u jagniąt noworodków. Należały one do pierwszych gatunków bakteryjnych, kolonizujących żwacz już w drugim dniu po urodzeniu. Trudno w tej chwili określić, jaką rolę odgrywają one w kształtowaniu odporności oseska. To samo dotyczy szczepów występujących fizjologicznie (flora autochtoniczna) na skórze człowieka i innych ssaków (90).

#### Stymulacja układu jednojądrzastych fagocytów (siateczkowo-śródbłonkowego)

Charakterystycznym efektem ogólnego tj. dożylnego lub dootrzewnowego podania preparatów propionibakterii jest wzrost masy śledziony i wątroby, a w mniejszym stopniu węzłów chłonnych i płuc (2, 48, 58, 68). Powiększenie tych narządów pojawia się po kilku dniach i najwyraźniej zaznaczone jest po ok. 2 tygodniach od wstrzyknięcia *P. acnes* CN 6134 lub Pg KP-45 (2, 48, 81). Badania histologiczne wykazały, że splenomegalia jest wynikiem przyspieszonej proliferacji makrofagów, histiocytów i komórek krwiotwórczych (57), natomiast powiększenie wątroby związane jest z napływem monocytów i limfocytów, bez wyraźnej proliferacji komórek Kupffera (28, 57). Hepato- i splenomegalia rzadko występują po podskórnym podaniu *C. parvum*; wyraźnie jednak wzrasta wtedy masa okolicznych węzłów chłonnych wskutek napływu i proliferacji limfocytów, histiocytów i makrofagów (74, 82).

Kontakt komórek żernych z propionibakteriami *in vitro* i *in vivo* prowadzi do pobudzenia metabolizmu i różnych funkcji tych komórek. Już Halpern i wsp. (33) wykazali pobudzenie aktywności fagocytarnej makrofagów myszy po dożylnym lub dootrzewnowym wstrzyknięciu zabitych komórek bakteryjnych szczepu *C. parvum*. W badaniach własnych makrofagi myszy i królików otrzymujących różne preparaty propionibakterii (*P. acnes*, *P. avidum* i *P. granulolum*) wykazywały pobudzenie funkcji żernej oraz metabolizmu tlenowego, przy czym efekt ten był najwyraźniej zaznaczony po podaniu wyizolowanych ścian komórkowych *P. granulolum* (48, 70). Inni autorzy również opisywali nasilone usuwanie obcych cząstek z krwi zwierząt otrzymujących propionibakterie, co było skorelowane ze wzrostem masy wątroby i śledziony (15, 56, 86). Makrofagi stymulowane przez propionibakterie wykazywały ponadto zwiększoną przyczepność podłoża, wakuolizację cytoplazmy, labilizację błon lizosomalnych oraz zmiany strukturalne w błonach komórkowych (66). Pobudzenie makrofagów może tłumaczyć przeciwbakteryjny efekt podania preparatów propionibakterii w zakażeniach wywołanych przez *S. aureus* (1), *S. enteritidis* (15), *Listeria monocytogenes* (18), *Bordetella pertusis* (19) i *Brucella abortus* (34). Działanie przeciwbakteryjne makrofagów stymulowała również frakcja fosfolipidowa ściany komórkowej propionibakterii (20).

Obecnie przeważa pogląd, że stymulacja układu fagocytów jednojądrzastych jest podstawowym mechanizmem immunomodulacyjnego, przeciwbakteryjnego, przeciwwirusowego i przeciwnowotworowego działania propionibakterii. Pobudzenie komórek tego układu, poczynając od uruchomienia funkcji żernej i produkcji różnych cytokin (interferon, interleukina 1), a kończąc na reakcjach cytotoksycznych i supresyjnych, prowadzi wtórnie do aktywacji swoistych i nieswoistych procesów odpornościowych mediowanych

przez limfocyty B, T oraz komórki NK (natural killer) (48, 81).

#### Wpływ na odporność typu humoralnego

Wiele danych doświadczalnych wskazuje, że propionibakterie mogą działać *in vivo* jako tzw. pierwszy sygnał w indukcji reakcji limfocytów B na różne antygeny, czyli wykazują właściwości adjuwantowe. Stwierdzono, że dożylny lub dootrzewnowy podanie *C. parvum* nasila produkcję przeciwciał zarówno dla antygenów grasiczniezależnych, takich jak polisacharydy bakteryjne lub dwunitrofenol (17, 44), jak też grasiczozależnych, np. erytrocytów barana lub albuminy bydłowej (7, 45). W tym pierwszym przypadku stymulacja dotyczyła zarówno pierwotnej, jak i wtórnej reakcji humoralnej (IgM i IgG) i była prawdopodobnie niezależna od aktywacji makrofagów. Badania Szmigielskiego i wsp. (81) również nie wykazały korelacji między produkcją przeciwciał dla antygenów grasiczniezależnych a stopniem pobudzenia w układzie fagocytów jednojądrzastych. Istnieją dane wskazujące, że w przypadku takich antygenów propionibakterie stymulują limfocyty B bez pośrednictwa komórek T helper lub makrofagów (35, 91).

Pobudzenie makrofagów i (lub) komórek T przez preparaty propionibakterii wyraźnie nasila produkcję przeciwciał dla antygenów grasiczozależnych. Wiener (87) wykazał, że makrofagi pochodzące od myszy, którym wstrzyknięto *C. parvum* silniej stymulują reakcję humoralną na erytrocyty barana niż makrofagi pobrane od zwierząt kontrolnych. W warunkach *in vivo* fagocyty jednojądrzaste aktywowane przez propionibakterie mogą wiązać krążące limfocyty, przede wszystkim w śledzionie (tzw. lymphocyte trapping), i w ten sposób prowadzić do ich stymulacji (22). Pobudzenie limfocytów B może być także wynikiem działania monokin (interferon, interleukiny) wytwarzanych przez makrofagi pod wpływem trawienia i (lub) przetwarzania (processing) antygenów propionibakterii (84). Makrofagi mogą być również odpowiedzialne za pobudzenie reakcji humoralnych na erytrocyty barana u myszy bezgrasicznych, które otrzymywały zabite komórki *C. parvum* (34).

Stymulacja produkcji przeciwciał przez propionibakterie zależy zarówno od dawki antygeny, jak i od czasu, który upływa między wstrzyknięciem bakterii a podaniem odpowiedniego antygeny (85). Najsilniejszy efekt adjuwantowy obserwowano, gdy preparaty bakteryjne podawane były 4–7 dni przed immunizacją dużymi dawkami antygeny (86). Ważna jest także droga podania propionibakterii — dożylny lub dootrzewnowy wstrzyknięcie *C. parvum* niemal jednakowo silnie pobudzało czynność limfocytów B w odpowiedzi na antygen, gdy tymczasem podanie podskórne tylko w niewielkim stopniu wywierało ten wpływ (60).

#### Wpływ na reakcje komórkowe typu swoistego

W przeciwieństwie do reakcji humoralnych odporność komórkowa mediowana przez swoście uczulone limfocyty T ulega najczęściej zahamowaniu po ogólnym podaniu propionibakterii. Wykazano, że takie podanie *C. parvum* prowadzi u myszy do zablokowania reakcji nadwrażliwości typu późnego (DTH) na oksazolony, chlorek pikrylu lub krwinki czerwone barana (3, 4); opóźnione było również odrzucanie przeszczepu skórny oraz wydłużał się okres przeżycia po przeszczepie u myszy otrzymujących *C. parvum* (13, 58). Propionibakterie hamowały też wystąpienie reakcji przeszczep-przeciw-biorcy (GvH) u myszy heterozygotycznych, którym wstrzyknięto komórki rodzicielskiego szpiku (28, 44). Zahamowanie to było prawdopodobnie spowodowane bloko-

waniem przez propionibakterie proliferacji limfocytów dawcy w śledzionie biorcy, co jest warunkiem powstawania odpowiedniej liczby komórek T czynnych w reakcji GvH.

Inną przyczyną upośledzenia funkcji komórek T w reakcjach miejscowych (np. DTH) po ogólnym podaniu preparatów propionibakterii może być przemieszczanie się komórek efektorowych do innych narządów i tkanek, co prowadzi do ich niedoboru w miejscu reakcji. Scott (73) wykazał na przykład, że zahamowanie nadwrażliwości skórnej na erytrocyty baranie wywołane przez *C. parvum* nie występuje u myszy z usuniętą śledzioną. Ponieważ w śledzionie dochodzi do zatrzymywania krążących limfocytów przez pobudzone makrofagi, więc usunięcie tego narządu może zapobiegać zubożeniu miejsca reakcji immunologicznej (w tym przypadku — okolicy wstrzyknięcia antygeny w skórze) w efektorowe komórki T. Podobnie, Roszkowski i wsp. (69) wykazali, że dożylnie podanie Pg KP-45 prowadzi do zwiększonego gromadzenia się limfocytów w wątrobie, co było hamowane przez czynniki blokujące funkcje makrofagów. Z drugiej strony, inni autorzy nie stwierdzali zmian liczby limfocytów T w śledzionie i węzłach chłonnych po podaniu *C. parvum* (13).

Większość badaczy uważa, że pobudzenie swoistych reakcji komórkowych ma znaczenie przede wszystkim przy miejscowym, tj. podskórnym lub — w przypadku istnienia nowotworu — doguzowym podawaniu propionibakterii. Jednakże ogólne, np. dootrzewnowe wstrzyknięcie *C. parvum* prowadzi do pobudzenia aktywności cytotoksycznej limfocytów T (CTL) (34). Również Hojo i wsp. (43) stwierdzili, że dootrzewnowe podanie *P. avidum* szczurom z guzem pęcherza moczowego przeszczepionym podskórnym prowadzi do wyraźnej stymulacji funkcji cytolytycznej swoście pobudzonych komórek T, pochodzących z usuniętego nowotworu. Wydaje się, że skojarzone stosowanie preparatów propionibakterii razem z zabitymi komórkami guza może prowadzić do pobudzenia swoistych reakcji odpornościowych, skierowanych przeciwko antygenom nowotworowym (80).

#### Wpływ na nieswoistą funkcję cytotoksyczną makrofagów i komórek NK

Makrofagi aktywowane do funkcji cytobójczej oraz sponadycznie cytotoksyczne limfocyty NK (natural killer) pełnią *in vivo* rolę nadzorczą nad rozwojem i rozprzestrzenianiem się niektórych typów nowotworów oraz zakażeń wywołanych różnymi mikroorganizmami chorobotwórczymi (39, 41, 46, 48, 83). Istnieje kilka istotnych różnic czynnościowych między tymi dwoma typami komórek cytobójczych. Po pierwsze — makrofagi działają litycznie wyłącznie w stosunku do komórek nowotworowych, podczas gdy spektrum docelowe dla limfocytów NK (morfologicznie są to tzw. duże ziarniste limfocyty — LGL) obejmuje ponadto komórki zakażone wirusami, bakteriami lub pierwotniakami, a także niektóre dojrzewające komórki prawidłowe (40, 46, 77). Po drugie — pobudzenie makrofagów do działania cytotoksycznego jest procesem złożonym i wymaga kilku następujących po sobie bodźców (sygnałów) aktywacyjnych (48, 77). W przeciwieństwie do tego, potencjał cytobójczy spoczynkowych, dojrzałych limfocytów NK (LGL) uruchamiany jest natychmiast po kontakcie z komórką docelową, bez konieczności uprzedniej stymulacji. Wreszcie — proces niszczenia komórki docelowej przez aktywowane makrofagi trwa dłużej niż liza typu NK i nie jest prawdopodobnie związany z powstawaniem kanałów (porów) w błonie atakowanej komórki (40, 77).

Propionibakterie należą do tych czynników egzogennych, które bezpośrednio pobudzają makrofagi do funkcji cyto-

toksycznej, a więc są źródłem zarówno pierwszego (priming), jak i drugiego (triggering) sygnału indukującego tę aktywność (8, 78). W niektórych przypadkach jednak *C. parvum* aktywność makrofagi za pośrednictwem limfocytów T, czyli w sposób typowy dla większości adjuwantów (76).

Dożylnie lub dootrzewnowe podanie myszom propionibakterii prowadzi do pojawienia się cytotoksycznych makrofagów w jamie otrzewnowej, śledzionie, wątrobie i płucach. Efekt ten występuje już po 4—5 dniach, osiąga maksymalne nasilenie między 7 a 12 dniem i może utrzymywać się na wysokim poziomie przez kolejne 2—3 tygodni (11, 48, 62, 64). Zanik funkcji cytobójczej makrofagów po tym okresie jest, jak się wydaje, wynikiem działania czynników hamujących (supresyjnych) wytwarzanych przez same makrofagi, ale także limfocyty T (27, 31, 54). Wielokrotne dawki propionibakterii na ogół nie prowadzą do większego pobudzenia aktywności cytobójczej makrofagów niż dawki jednorazowe, ale nie wywołują też zjawiska hiporeaktywności, typowego np. dla komórek NK (9, 48).

Jedną z najwcześniejszych obserwowanych zmian w układzie odpornościowym wywołanych podaniem *C. parvum* lub Pg KP-45 jest pobudzenie naturalnej aktywności cytotoksycznej limfocytów NK (LGL). Już po 2—4 dniach od ogólnego wstrzyknięcia tych preparatów czynność komórek NK jest maksymalnie nasiloną we krwi, płucach, śledzionie, wątrobie, jamie otrzewnowej i węzłach chłonnych (8, 47, 48, 59, 61). Wyraźne pobudzenie funkcji cytotoksycznej typu NK obserwowano także *in vitro*, po inkubacji zawiesin limfocytów pochodzących z różnych narządów z preparatami zabitych komórek *C. parvum* (67). Zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* aktywność ta szybko obniża się do poziomu spoczynkowego, a nawet ulega zahamowaniu wskutek uruchomienia różnych mechanizmów supresyjnych (5, 32, 42). W wielu badaniach wykazano obecność supresywnie działających limfocytów i makrofagów, których aktywność była wyraźnie pobudzona między 7 a 12 dniem od ogólnego podania *C. parvum* lub Pg KP-45 (10, 54, 72). Zahamowanie funkcji cytobójczej komórek NK jest najwyraźniej zaznaczone w śledzionie, która w tym czasie ulega powiększeniu. Efekt supresyjny w tym narządzie nie może być jednak tłumaczony „rozcieńczeniem” komórek NK przez proliferujące lub napływające limfocyty i makrofagi, ponieważ nadjedowane preparaty *C. parvum*, które nie wywołują splenomegalii, również prowadzą do depresji aktywności typu NK w śledzionie (36). W badaniach własnych nie stwierdzono pobudzenia aktywności komórek NK w śledzionie w ciągu 10 dni od dootrzewnowego podania Pg KP-45, pomimo stwierdzanego w tym narządzie wzrostu liczby komórek typu LGL oraz pobudzenia funkcji enzymów lizosomalnych i mitochondrialnych w tych komórkach (48). W porównaniu ze śledzioną, pobudzenie czynności limfocytów NK wyraźnie zaznaczone jest w jamie otrzewnowej, co może być związane z blokującym działaniem propionibakterii na licznie występujące tam naturalnie komórki supresorowe (71).

Ogólnie biorąc, dożylnie podanie propionibakterii słabiej pobudza aktywność komórek NK w śledzionie i szybciej prowadzi do zahamowania tej funkcji niż podanie dootrzewnowe (55); z drugiej strony, jednorazowa dawka dożylna silnie stymuluje czynność cytotoksyczną płucnych komórek NK, czego nie stwierdza się po dawce dootrzewnowej (10, 48). Podskórne wstrzyknięcie preparatów propionibakterii stymuluje aktywność typu NK jedynie w okolicznych węzłach chłonnych, ale nie w węzłach i narządach bardziej oddalonych od miejsca iniekcji (42). Wielokrotne podawanie *C. parvum* nie tylko nie pobudza na ogół aktywności NK, lecz prowadzi nawet do stanu zmniejszonej wrażliwości komórek efektorowych (hiporeaktywności) na bodźce stymulu-

jące, takie jak interferon i jego induktory (9, 75). Zjawisko to stanowić może poważną przeszkodę w stosowaniu propionibakterii jako czynnika immunostymulującego w leczeniu chorób zakaźnych i nowotworowych.

Wiele danych wskazuje, że pobudzenie aktywności komórek NK przez preparaty bakteryjne, w tym również propionibakterie, odbywa się za pośrednictwem interferonu. Przemawiają za tym: a) szybki wzrost aktywności komórek NK po podaniu tych preparatów, b) podwyższony poziom interferonu (IFN) we krwi w okresie pobudzonej funkcji komórek NK, oraz c) zależność pobudzenia aktywności typu NK od obecności komórek szeregu monocyt/makrofag (25, 54, 79). Ponadto propionibakterie działają na komórki NK tak samo jak interferon, tzn. przyspieszają proliferację prekursorów oraz zwiększają potencjał lityczny i recyrkulacyjny dojrzałych komórek efektorowych (55, 88). Istnieją jednak dowody, że IFN nie musi być czynnikiem związanym z modyfikującym wpływem propionibakterii na komórki NK. Po pierwsze — stwierdzono, że ogólne podanie *C. parvum* prowadzi do stosunkowo niewielkiego (w porównaniu z efektem wywołwanym przez induktory interferonu lub wirusy) wzrostu miana IFN we krwi w czasie, gdy aktywność typu NK jest maksymalnie pobudzona (14, 42, 79). Po drugie — w okresie zahamowania funkcji komórek NK we krwi i śledzionie, tj. po 7–8 dniach od podania *C. parvum*, poziom IFN w tych narządach i tkankach nie ulegał znacznemu obniżeniu (54). Wreszcie — jodowane preparaty *C. parvum*, które nie pobudzają makrofagów, równie silnie stymulują aktywność komórek NK co preparaty niejodowane (36). Wydaje się więc, że propionibakterie mogą aktywować limfocyty NK bezpośrednio (obecność receptorów dla struktur powierzchniowych tych beztlenowców?) lub w drodze indukcji cytokin odmiennych od interferonu (interleukiny 1 i 2). Wykazano np., że *C. parvum* pobudza *in vitro* limfocyty T do produkcji czynnika stymulującego aktywność komórek NK, ale nie posiadającego właściwości przeciwwirusowych (63). Podobnie, w badaniach własnych nie stwierdzono mierzalnego wzrostu poziomu IFN w surowicy myszy otrzymujących jednorazowe dawki ogólne preparatu Pg KP-45 (dane niepublikowane).

#### Wpływ na układ odpornościowy zwierząt hodowlanych

W związku z tym, iż stymulacja *P. acnes* (PA) powoduje wzrost poziomu interferonu gamma oraz wpływa na proliferację i aktywację komórek NK, makrofagów oraz cytotoksycznych limfocytów T, powstała koncepcja wypróbowania takiego zabiegu w leczeniu i zapobieganiu bronchopneumonii cieląt. Wykazano korzystne oddziaływanie inaktywowanej formaldehydem zawiesiny PA (CN 5936) na krowy immunizowane podskórnie w ostatnim miesiącu ciąży i ich potomstwo (23). Odnotowano także pozytywny wpływ tego preparatu na wzrost odporności u bukatów (30). W badaniach przeprowadzonych na populacji cieląt obejmującej 2560 chorych osobników (iniekcje podskórne lub jednoczesne — podskórne i śródskórne), stwierdzono u 2150 sztuk (85,6%) pomyślny wpływ PA na ustępowanie objawów choroby, u 60 (2,7%) brak efektów, a u 40 sztuk (1,8%) zastrzeżenie procesu chorobowego (24). W innych badaniach, stymulując PA 10 cieląt (iniekcje podskórne) z klinicznymi objawami bronchopneumonii, stwierdzono wzrost swoistej i nieswoistej odporności komórkowej, szybsze ustępowanie objawów choroby oraz zachowanie w lepszej kondycji zwierząt po przechorowaniu. W grupie kontrolnej leczonej antybiotykami rezultatów takich nie zaobserwowano (25). U większości zwierząt poddanych immunomodulacji obserwowano: aktywację fagocytarnej funkcji granulocytów obojętnochnonnych, pobudzenie komórkowego systemu obrony nieswoistej,

zwiększenie populacji limfocytów T oraz wzrost ich właściwości proliferacyjnych (23, 25). Poza uaktywnieniem mechanizmów odporności komórkowej, odnotowano w surowicy krwi i siary wzrost frakcji gamma (30). Zwrócono uwagę na korzystny wpływ PA w leczeniu kolibakteriozy cieląt noworodków oraz listeriozy owiec i szynszyli (24). Stymulacja tymi drobnoustrojami hamowała zakażenia u białych myszy, wywołwane przez *L. monocytogenes* oraz *Salmonella typhimurium*. U zwierząt tych odnotowano wzrost parametrów składających się na mechanizmy swoistej i nieswoistej odporności komórkowej (90).

#### Piśmiennictwo

1. Adam C., Broughton E. S., Scott M. T.: Nature New Biol. 235, 219, 1972.
2. Adam C., Scott M. T.: J. Med. Microbiol. 6, 261, 1973.
3. Allwood G. G., Asherson G. L.: Clin. Exp. Immunol. 11, 579, 1972.
4. Asherson G. L., Allwood G. G.: Clin. Exp. Immunol. 9, 249, 1971.
5. Bärlein E., Leser H. G., Delmann W., Gerns D.: Int. Archs Allergy Appl. Immunol. 66 (suppl. 1), 180, 1981.
6. Biozzi G., Howard J. G., Mouton D., Stiffel C.: Transplantation 3, 170, 1965.
7. Biozzi G., Stiffel C., Mouton D., Bouthillier Y., Decreusefond C.: Ann. Inst. Pasteur 122, 685, 1972.
8. Bomford R., Olivetto M.: Int. J. Cancer 14, 226, 1974.
9. Budzyński W., Janiak M.: Immunol. Pol. 12, 213, 1987.
10. Budzyński W., Janiak M., Radzikowski C., Szmigielski S.: Immunobiology, 176, 73, 1987.
11. Campbell P. A., Czupryński C. J., Cook J. L.: J. Leukocyte Biol. 36, 293, 1984.
12. Cantrell J. L., Wheat R. W.: Cancer Res. 39, 3554, 1979.
13. Castro J. E.: Eur. J. Cancer 10, 115, 1974.
14. Chmielarczyk W., Kirchner H., Ernst R., Storch E.: Immunobiology 169, 403, 1985.
15. Collins F. M., Scott M. T.: Infect. Immunity 9, 863, 1974.
16. Cummins C. S., Hall P.: Current Microbiol. 14, 61, 1986.
17. DelGuercio P.: Nature 238, 213, 1972.
18. Fauve R. M., Hevin H. B.: Ann. Inst. Pasteur 120, 399, 1971.
19. Fauve R. M., Hevin H. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 573, 1974.
20. Fauve R. M.: Stimulating effect of *Corynebacterium parvum* and *C. parvum* extract on the macrophage activities against *S. typhi* murium and *Listeria monocytogenes*. Red. Halpern B. w: Application in experimental and clinical oncology. Plenum Press, New York 1975.
21. Fonty G., Gouet P., Jouany J. P., Rieu F., Senaud J., Citron A., Breton A.: Microbial colonization of the rumen in young lambs. Red. Doubourgier H. C., Albagnac G., Montreuil J. w: Biology of anaerobic bacteria, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1986.
22. Frost P., Lance E. M.: Immunopotential, t. 18, CIBA Found. Symp., London 1973, s. 29.
23. Furowicz A. J., Gos Z., Sulkowski Z., Łoczewski P.: Mat. V Zjazdu PTI, Immunol. Pol. 11, 249, 1986.
24. Furowicz A. J., Lewandowska S., Łoczewski P., Sulkowski Z.: Mat. V Zjazdu PTI, Immunol. Pol. 11, 250, 1986.
25. Furowicz A. J., Gos Z., Grupiński T., Czernomysy-Furowicz D.: Medycyna Wet. (w druku).
26. Gallagher M. T., Nasrallah A. G., Datta S. K., Priest E. L., Trentin J. J.: Exp. Hematol. 9, 149, 1981.
27. Gerns D.: Lymphokines, t. 4, red. Pick E., Acad. Press, New York, 1981, s. 335.
28. Gil J.: Badania doświadczalne i kliniczne nad działaniem preparatu *Propionibacterium granulosum* w zakażeniach wirusowych wątroby ze szczególnym uwzględnieniem PAZW HBsAg(+). Praca hab. CWSK CKP WAM, 1984.
29. Gocuel A. F., Lespinais G., Nauciel C.: J. Natl. Cancer Inst. 68, 657, 1982.
30. Gos Z., Furowicz A. J., Hejman A.: Medycyna Wet. 40, 206, 1984.
31. Grimm W., Seitz M., Kirchner H., Gerns D.: Cell. Immunol. 40, 419, 1978.
32. Hall T. J., Chen S. H., Proff J., Lydhard P. M.: Clin. Exp. Immunol. 54, 493, 1983.
33. Halpern B., Prevot A. R., Biozzi G., Stiffel C., Mouton D., Morard J. C., Bouthillier Y., Decreusefond C.: J. Reticuloendothel. Soc. 1, 77, 1964.
34. Halpern B., Frau A., Crepin Y., Platca O., Lorinet A. M., Rebouardin A., Sparros L., Isaac R.: Immunopotential, t. 18, CIBA Found. Symp., London, 1973.
35. Halpern B.: Application in Experimental and Clinical Oncology, Red. Halpern B. w: *Corynebacterium parvum*, Plenum Press, New York, 1975.
36. Hanna N.: Cancer Res. 42, 1337, 1982.
37. Hattori T., Mori A.: Gann 64, 7, 1973.
38. Hattori T., Mori A.: Gann 64, 15, 1973.
39. Herberman R. B.: Immunopathology 1, 96, 1985.
40. Herberman R. B.: Ann. Rev. Immunol. 4, 651, 1986.
41. Jibbs J. B., Chapman H. A., Weinberg J. B.: J. Reticuloendothel. Soc. 24, 549, 1978.
42. Hisano G., Hanna N.: J. Natl. Cancer Inst. 69, 665, 1982.
43. Hojo H., Endoh Y. S., Hashimoto Y.: Jpn. J. Cancer Res. 76, 53, 1985.
44. Howard J. G., Christie G. H., Scott M. T.: Cell. Immunol. 7, 290, 1973.
45. James K., Ghaffar A., Milne I.: Brit. J. Cancer 29, 11, 1974.
46. Janiak M., Lipski S.: Post. Hig. Med. Dośw., 36, 95, 1982.
47. Janiak M., Budzyński W., Gnatowski B., Radzikowski C., Szmigielski S., Jeltaszewicz J., Pulverer G.: Immunobiology 167, 328, 1984.

48. Janiak M.: Modyfikacja nieswoistej reakcji cytotoksyczności komórkowej pod wpływem preparatu *Propionibacterium granulosum* KP-45. Praca hab., WIHIE, Warszawa, 1988.
49. Kafuzewski S., Kasproutcz A.: Med. Dośw. Mikrobiol. 39, 137, 1987.
50. Kasproutcz A.: Post. Hig. 33, 97, 1979.
51. Kasproutcz A., Heczko P., Kłostński A., Bulanda M.: Post. Mikrobiol. 19, 39, 1980.
52. Kasproutcz A., Pryjma K., Heczko P.: Med. Dośw. Mikrobiol. 36, 145, 1984.
53. Kasproutcz A., Hoeffler M., Heczko P. B.: Med. Dośw. Mikrobiol. 36, 197, 1984.
54. Kirchner H., Storch E., Schindler L.: Bacteria and cancer. Red. Jeljaszewicz J., Pulverer G., Roszkowski W., Acad. Press, London 1983.
55. Macfarlan R. I., Ceredig R., White D. O.: Infect. Immunity 26, 832, 1979.
56. McBride W. H., Jones J. T., Weir D. M.: Brit. J. exp. Pathol. 55, 38, 1974.
57. Milas L., Hunter N., Withers H. R.: Cancer Res. 34, 613, 1974.
58. Milas L., Basic I., Kogelnik H. D., Withers H. R.: Cancer Res. 35, 2365, 1975.
59. Nasrallah A. G., Gallagher M. T., Priest E. L., Trentin J. J.: Cancer Res. 40, 4159, 1980.
60. Neveu T., Branellec A., Biozzi G.: Ann. Inst. Pasteur, 106, 771, 1964.
61. Oehler J. R., Lindsay L. R., Nunn M. E., Holden H. T., Herberman R. B.: Int. J. Cancer 21, 210, 1978.
62. Otu A. A., Russell R. J., White R. G.: Immunology 32, 255, 1972.
63. Peter H., Dallüge H., Euler S., Kirchner H., Zawatzky R., Leibold W.: Natural cell-mediated immunity against tumors. Red. Herberman R. B., Acad. Press, New York 1980.
64. Puccetti P., Holden H. T.: Int. J. Cancer 23, 123, 1979.
65. Pulverer G., Ko H. L.: Appl. Microbiol. 25, 222, 1973.
66. Puvion F., Fray A., Halpern B.: J. Ultrastruct. Res. 54, 95, 1976.
67. Reynolds C. W., Herberman R. B.: J. Immunol. 126, 1581, 1981.
68. Roszkowski W., Kobus M., Łuczak M., Ko H. L., Szmigielski S., Laskowska B., Pulverer G., Jeljaszewicz J.: Zbl. Bakt. Hyg. 246, 405, 1980.
69. Roszkowski W., Ko H. L., Szmigielski S., Jeljaszewicz J., Pulverer G.: Med. Microbiol. Immunol. 169, 1, 1980.
70. Roszkowski W., Szmigielski S., Ko H. L., Janiak M., Wrembel J. K., Pulverer G., Jeljaszewicz J.: Zbl. Bakt. Hyg. 246, 393, 1980.
71. Saito T., Ruffmann R., Wekler R. D., Herberman R. B., Chirigos M. A.: Cancer Immunol. Immunother. 19, 130, 1985.
72. Santoni A., Riccardi C., Barlozzari T., Herberman R. B.: NK cells another natural effector cells. Red. Herberman R. B., Acad. Press, New York 1982.
73. Scott M. T.: J. Natl. Cancer Inst. 53, 855, 1972.
74. Scott M. T.: Cell. Immunol. 13, 251, 1974.
75. Seidel H. J., Stoltz W.: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 107, 199, 1984.
76. Sijovic V. S., Watson S. R.: J. Exp. Med. 145, 45, 1977.
77. Somers S. D., Johnson W. J., Adams D. O.: Innovative approaches to therapy. Red. Herberman R. B. w: Cancer immunology, Martinus Nijhoff Publ., Boston 1986.
78. Stern K.: A comprehensive treatise. Red. Herberman R. B., t. 5, w: The reticuloendothelial system, Plenum Press, New York 1983.
79. Storch E., Baumgart D., Kirchner H.: Nat. Immun. Cell Growth Regul. 3, 134, 1983/84.
80. Szmigielski S., Gil J., Roszkowski W., Ko H. L., Pulverer G., Jeljaszewicz J.: Drugs Exp. Clin. Res. 8, 387, 1982.
81. Szmigielski S., Roszkowski W., Roszkowski K., Ko H. L., Jeljaszewicz J., Pulverer G.: Bacteria and cancer. Red. Jeljaszewicz J., Pulverer G., Roszkowski W., Acad. Press, London 1983.
82. Tuttle R. L., North R. J.: J. Natl. Cancer Inst. 55, 1403, 1975.
83. Urban J., Schreiber H.: Contemporary topics in immunobiology. Red. Adams D. O., Hanna M. w: Macrophage activation, t. 12, Plenum Press, New York 1984.
84. Virelizier J. L., Arenzana-Seisdedos F.: Med. Biol. 63, 149, 1985.
85. Warr G. W., Sijovic V. S.: Clin. Exp. Immunol. 17, 519, 1974.
86. Warr G. W., Sijovic V. S.: J. Reticuloendothel. Soc. 16, 193, 1974.
87. Wiener E.: Cell. Immunol. 19, 1, 1975.
88. Wiltrout R. H., Mathieson B. J., Talmadge J. R., Reynolds W., Zhang S. U., Herberman R. B., Ortaldo J. R.: J. Exp. Med. 160, 1431, 1984.
89. Woodruff M. F. A., Boak J. L.: Brit. J. Cancer 20, 345, 1966.
90. Zigelboim J., Berd D.: Immunology of *Corynebacterium parvum*. Red. Mitchell H. S., w: The modulation of immunity, Pergamon Press, New York 1985.
91. Zola H.: Clin. Exp. Immunol. 22, 514, 1975.

Adres autora: doc. dr habil. Marek Janiak, ul. Szaserów 128, 00-909 Warszawa

PIOTR SZELESZCZUK, EWA KARPIŃSKA, WANDA BORZEMSKA, ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ\*

## Zawartość wybranych kationów w płynach płodowych zarodków kurzych eksperymentalnie zakażonych subletalnymi dawkami wirusa CELO\*

Zakład Chorób Drobiu Katedry Epizootologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,  
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa  
\* Zakład Badania Chorób Drobiu Instytutu Weterynarii,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

### Summary

The content of some cations in embryonic fluids of chick embryos experimentally infected with sublethal doses of CELO virus

The embryonic fluids of SPF chicken embryos experimentally infected at the day 6 of life with CELO virus at a dose of  $10^{1.5}$  and  $10^{0.5}$  EID<sub>50</sub> were examined for the content of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  and  $Cu^{2+}$  between 7 and 13 day after infection. The content of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  increased and the content of  $Na^+$  decreased. The level of  $K^+$  sharply increased during the first days of observation and then it decreased to the level noted in control embryos. The above changes manifested more profoundly in embryos infected with a higher dose of the virus and they appeared earlier in amniotic than in allantoic fluid.

W przebiegu zakażenia embrionów kurzych wirusem CELO (FAV-1) obok typowych objawów patologicznych w zarodkach, dochodzi również do widocznych makroskopowo zmian w błonach i płynach płodowych (2, 7). Charakter tych zmian może sugerować zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej embrionów.

Po raz pierwszy Kos i wsp. (4) zaproponowali, aby badanie składu mineralnego wód płodowych stało się nowym wskaźnikiem określającym wpływ różnych (zakaźnych i środowiskowych) czynników uszkadzających metabolizm zarodków.

Opierając się na powyższych przesłankach we wcześniejszych badaniach własnych (6) podjęto próbę oceny zmian zawartości kationów w płynach owodniowych i omocznio- wych zamarych zarodków pochodzących od kur naturalnie zakażonych adenowirusami ptasimi. Wykazano, że istotnym zmianom ulega stężenie jonów  $Ca^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Zn^{++}$  i  $Cu^{++}$ . W niniejszej pracy, w celu wyeliminowania wpływu czynników przypadkowych, przeprowadzono analogiczne doświadczenie z użyciem kurzych zarodków SPF, które zakażano subletalnymi dawkami wirusa CELO.

### Materiał i metody

Do badań użyto 70 jaj SPF (Phylaxia, WRL), które inkubowano w inkubatorze laboratoryjnym (W-200) w warunkach przewidzianych dla lęczenia jaj kurzych. Do zakażeń użyto standardowego szczepu Phelps 1 adenowirusa CELO (FAV-1) o mianie  $10^{7.5}$  EID<sub>50</sub> w 0,1 ml (5). Utworzono trzy grupy doświadczalne. Pierwszą grupę zarodków zakażono w 5 dniu inkubacji dawką  $10^{1.5}$  EID<sub>50</sub> wirusa CELO, drugą grupę w tym samym dniu inokulowano dawką  $10^{0.5}$  EID<sub>50</sub>. Zarodkom trzeciej grupy podano 0,1 ml PBS-u. Od 7 dnia po iniekcji przez 7 kolejnych dni od padłych lub schłodzonych zarodków pobierano płyny płodowe. Ze względów technicznych poczynając od 10 dnia po zakażeniu pobierano łącznie płyn owodniowy i omocznio- wy. Przebieg procesu replikacji wprowadzanego wirusa obserwowano mierząc jego koncentrację w wodach płodowych. Miano wirusa określano mikrometodą w hodowli komórek nerki zarodków kurzych na płytkach Cooka wg zasad podanych przez Grimesa i wsp. (3). W pobranych płynach płodowych oznaczano

\* Badania finansowane w ramach programu RR-II-24.