

Wpływ tolerancji endotoksynowej na wewnętrzny i zewnętrzny tor krzepnięcia krwi koni

JOLANTA DĄBROWSKA, EUGENIUSZ WIŚNIEWSKI, WIESŁAW KRUMRYCH

Zakład Chorób Koni Bydgoskiego Oddziału Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach,
Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Dąbrowska J., Wiśniewski E., Krumrych W.

The influence of endotoxin tolerance on the coagulation systems in horses

Summary

The aim of the study was to elaborate an endotoxin model, which would lead to endotoxin tolerance and, as well, to test whether tolerance refers to reactions of intrinsic and extrinsic coagulation systems. The studies were carried out on 10 healthy mares, of the Polish Primitive Horse breed of which 8 were experimental and 2 were control animals. *E. coli* endotoxin was given to the horses i.v. four times in a dose of 0,1 µg/kg body weight in a physiological saline solution (three times at 24-hourly intervals and a week after the last infusion). At the same time, the control horses were given a physiological solution of NaCl only. Clinical examinations were carried out and blood samples collected before endotoxin infusion and 1, 2, 3, 5, 7, hours after injection. In plasma citrate, caolin-kephalin time (indicator of intrinsic coagulation system) was determined. Caolin-kephalin time was considerably prolonged in the first hour and then shorted five hours after the first endotoxin infusion. Each successive infusion of LPS induced attenuation of reaction in the intrinsic coagulation system. Probably this was result of early-phase endotoxin tolerance. Low doses of LPS (0,1µg/kg body weight) do not cause the tolerance phenomenon in extrinsic coagulation system reactions in horses according to this model of endotoxemia.

Keywords: blood, endotoxins, horses.

Konie są zwierzętami szczególnie wrażliwymi na działanie endotoksyn wytwarzanych przez bakterie gram ujemne (1, 6, 7, 9, 13, 14). Przeprowadzono już wiele badań zmierzających do ustalenia przebiegu i konsekwencji endotoksemii u koni, ale niewielu badaczy zwróciło uwagę na opisywaną głównie u zwierząt laboratoryjnych tolerancję endotoksynową (13, 15-19, 22). Wykazano, że po każdej kolejnej iniekcji lipopolisacharydu (LPS) reakcja organizmu zwierząt jest coraz słabsza. Ta rozwijająca się adaptacja ustroju na działanie LPS przebiega w dwóch fazach: wczesnej i późnej. Wczesna faza tolerancji jest krótka (od kilku godzin do kilku dni) i wiąże się z indukcją przez LPS produkcji i uwalniania cytokin. Wśród nich najczęściej wymienia się: czynnik nekrotyzujący nowotwory (TNF), interleukiny (szczególnie IL-1 i IL-6) oraz interferony (1, 2, 4, 18, 20). Po kolejnych iniekcjach LPS, stężenie tych mediatorów w krwi znacznie spada. Późna faza tolerancji rozwija się po około 7 dniach stosowania endotoksyny, co wiąże się z produkcją przeciwciał antyendotoksynowych (1, 17).

Zarówno badania innych autorów jak i własne dowodzą, że w przebiegu endotoksemii dochodzi do zaburzeń krzepnięcia krwi (5-7, 9, 11, 13, 14, 21). Eks-

perymenty prowadzone wcześniej przez autorów tego artykułu dotyczyły zaburzeń hemostazy po jednorazowej dawce LPS *E. coli* lub wywołanych przez kilkakrotny wlew endotoksyny w dawkach wzrastających (5, 6). Taki model doświadczeń nie daje odpowiedzi na pytanie, czy zjawisko tolerancji w endotoksemii u koni dotyczy także parametrów krzepnięcia krwi. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że tolerancja rozwija się po wielokrotnym podaniu LPS w równych dawkach i zależy nie tylko od dawki ale też od odstępów czasowych, w jakich ponawia się kolejne wlewy. Niższe dawki endotoksyny utrzymują wytworzoną tolerancję, a wyższe ją przełamują (17).

Celem badań było opracowanie takiego modelu endotoksemii u koni, który zmierzałby do wytworzenia tolerancji endotoksynowej i prześledzenie, czy zjawisko to dotyczy reakcji wewnętrzny i zewnętrzny toru krzepnięcia krwi.

Material i metody

Badania prowadzono na 10 klinicznie zdrowych klaczach rasy konik polski w wieku 2-9 lat, w dobrym stanie odżywienia i utrzymania, z których 8 było zwierzętami doświadczalnymi, zaś 2 stanowiły grupę kontrolną.

Do badań użyto liofilizowany lipopolisacharyd z *Escherichia coli* serotyp O55:B5 (Sigma Chemical Co.). Po rozpuszczeniu w 500 ml apirogenego, fizjologicznego roztworu NaCl, endotoksynę podawano dożylnie koniom doświadczalnym. Zwierzęta te, otrzymywały LPS *E. coli* czterokrotnie w dawkach po 0,1 µg/kg m.c. (3 razy w odstępach 24-godzinnych oraz po tygodniu od ostatniego wlewu). Koniom kontrolnym podano tylko fizjologiczny roztwór NaCl według schematu zastosowanego u zwierząt doświadczalnych.

Każdego dnia badań w żyłę szyjnej zewnętrznej wszystkich koni umieszczano katetry (Secalon® Kathy 1 – firmy Viggo) i tą drogą dokonywano wlewów endotoksyny oraz pobierano krew do oznaczeń. Obserwacje kliniczne oraz pobieranie krwi wykonywano bezpośrednio przed podaniem endotoksyny oraz po 1, 2, 3, 5 i 7 godzinach od iniekcji.

Krew pobierano na 3,8% cytrynianu sodu w stosunku 1:9, a następnie wirowano przy $1500 \times g$ przez 10 minut. W ciągu 2 godzin od pobrania krwi w osoczu cytrynianowym oznaczono czas kaolinowo-kefalinowy przy użyciu zestawu do oznaczania czasu kaolinowo-kefalinowego firmy HYDREX i czas protrombinowy metodą Quicka w oparciu o tromboplastynę mózgow króliczych (Biomed w Warszawie). Pomiarów dokonano na koagulometrze typ 104.

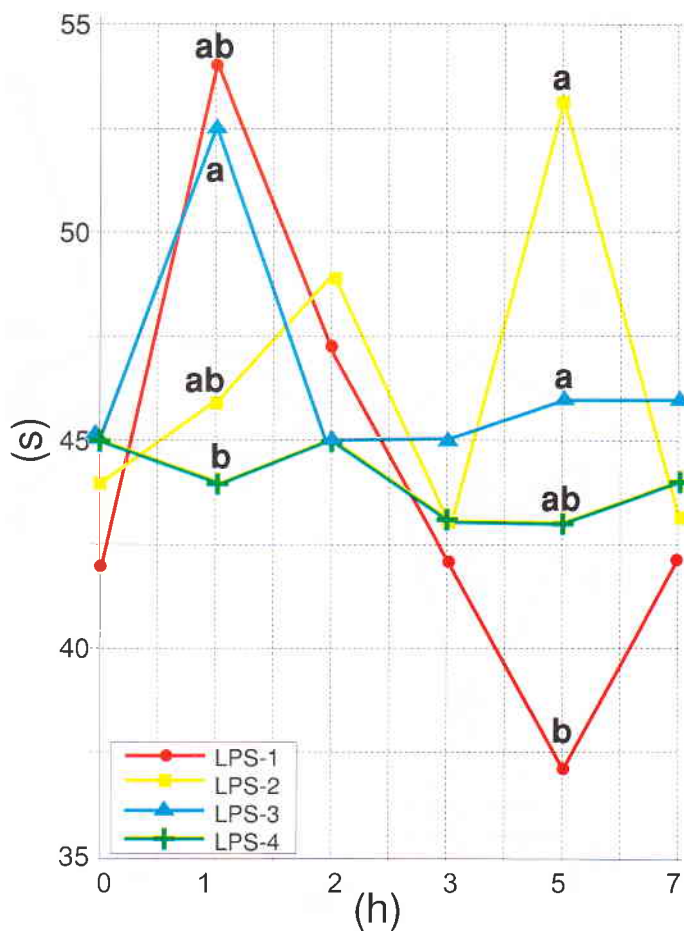
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta przyjmując różnicę pomiędzy dwoma wynikami za statystycznie istotną przy $p \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

Funkcjonowanie wewnątrzpochodnego toru krzepnięcia krwi można ocenić przy pomocy czasu kaolinowo-kefalinowego (z ang. PTT-partial thromboplastin time).

Po pierwszym wlewie endotoksyny (LPS-1) doszło do wydłużenia się czasu kaolinowo-kefalinowego z $42 \pm 5,4$ s do $54 \pm 22,3$ s, a potem czas ten sukcesywnie skracał się osiągając w piątej godzinie wartość $37 \pm 6,3$ s (ryc. 1). Druga iniekcja LPS spowodowała pierwsze nieznaczne wydłużenie się PTT w drugiej godzinie (z $44 \pm 5,3$ do $49 \pm 22,7$ s), ale maksimum wzrostu ($53 \pm 20,4$ s) zanotowano dopiero w 5 h po podaniu LPS-2. W tym przypadku i po wszystkich kolejnych dawkach nie zaobserwowano drastycznego skrócenia się czasu kaolinowo-kefalinowego. Reakcja na trzecią dawkę LPS przebiegała jeszcze inaczej tzn. doszło do wydłużenia się PTT po 1 godzinie od wlewu z $45 \pm 10,8$ s do $53 \pm 21,2$ s, a następnie wartości tego wskaźnika powróciły do normy. Kiedy w tydzień po podaniu LPS-3 dokonano czwartego wlewu endotoksyny, zanotowano już minimalne odchylenia od normy czasu kaolinowo-kefalinowego, mieszczące się w granicach wartości fizjologicznych. Statystycznie istotne różnice w reakcji na tę samą dawkę endotoksyny (0,1 µg/kg m.c.) podaną czterokrotnie, zanotowano w 1 godzinie badań pomiędzy LPS-3 i LPS-4 i w 5 godzinie pomiędzy LPS-1 i LPS-2 oraz LPS-1 i LPS-3.

Czas protrombinowy jest miarą funkcjonowania zewnątrzpochodnego toru krzepnięcia krwi. Procesy krzepnięcia są inicjowane w tym przypadku po prze-



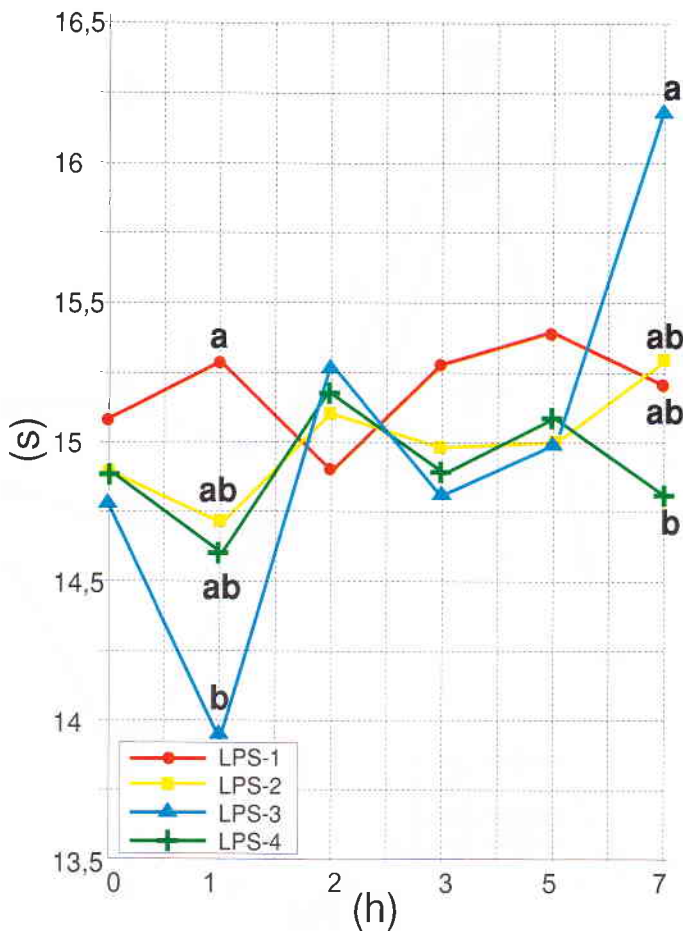
Ryc. 1. Wpływ tolerancji endotoksynowej na wewnątrzpochodny tor krzepnięcia krwi (czas kaolinowo-kefalinowy) u koni

Objaśnienie: a, b – średnie arytmetyczne oznaczone różnymi literami różnią się w sposób statystycznie istotny przy $p \leq 0,05$.

niknięciu do krwi tromboplastyny tkankowej zwanej obecnie czynnikiem tkankowym. Tromboplastyna tkankowa należy do integralnych składników błon komórkowych, a szczególnie bogate są w nią mózg, płuco i łożysko. Komórki śródbłonna naczyń, monocyty i makrofagi nie pobudzone, wykazują małą zawartość tej substancji, ale odpowiadają dużym wzrostem jej wytwarzania pod wpływem między innymi: interleukiny 1, TNF, endotoksyn i kompleksów immunologicznych (7).

Wyniki pomiarów czasu protrombinowego (z ang. PT-prothrombin time) przedstawia ryc. 2. Jedynie po trzecim wlewie LPS doszło do skrócenia PT w pierwszej godzinie badań (z $14,8 \pm 0,8$ do $13,9 \pm 1,8$ s, a następnie w 7 godzinie czas ten wydłużył się do wartości $16,2 \pm 1,0$ s. Wszystkie pozostałe iniekcje endotoksyny (LPS-1, LPS-2, LPS-4) nie wywołały wyraźnych zmian w długości czasu protrombinowego. Statystycznie istotne różnice dotyczyły reakcji organizmu zwierząt w zakresie PT na LPS-1 i LPS-3 (w pierwszej godzinie po wlewie endotoksyny) oraz LPS-3 i LPS-4 (w 7 godzinie badań).

W trakcie eksperymentu zaobserwowano kliniczne objawy endotoksemii (wzrost temperatury wewnętrz-



Ryc. 2. Wpływ tolerancji endotoksynowej na zewnątrzpochodny tor krzepnięcia krwi (czas protrombinowy) u koni
Objaśnienie: jak w ryc. 1.

nej oraz liczby tętna i oddechów, niepokój, a potem posmutnienie, oddawanie papkowatego, cuchnącego kału itp.). Najbardziej były te objawy nasilone po pierwszej dawce LPS, a po kolejnych znacznie słabły (10).

Przejawem tolerancji na działanie substancji endogennej jest osłabienie reakcji organizmu na każdą kolejną dawkę jak również opóźnienie tej reakcji. Tolerancja nigdy nie jest całkowita i jest procesem przejściowym. Podstawowym warunkiem jej utrzymania jest ciągłe podawanie pirogeny, co jednak jest ryzykowne bo może w pewnym momencie doprowadzić do reakcji uczuleniowej Shwartzmana (3). Z chwilą przerwania iniekcji pirogeny zanika stopniowo, a po okresie około 3 tygodni, zwykle nie obserwuje się już efektu tolerancji (17).

Analiza przedstawionych wyników pozwala przypuszczać, że w trakcie doświadczenia wytworzyły się mechanizmy tolerancji na podaną endotoksynę hamując wykrzepianie krwi w wewnątrzpochodnym torze krzepnięcia. Po pierwszej dawce LPS doszło do gwałtownego wydłużenia się PTT, a następnie czas ten skrócił się znacznie poniżej wartości prawidłowych, ale po 7 godzinach wrócił do normy. Kolejna dawka en-

dotoksyny (LPS-2) spowodowała osłabienie i przesunięcie w czasie reakcji wydłużenia PTT, oraz nie wystąpiła faza skracania tego czasu. Trzeci wlew LPS wywołał niewielkie wydłużenie się czasu kaolinowo-kefalinowego, ale już po 2 godzinach powrócił on do wartości prawidłowych. Wydaje się, że opisane zjawiska są związane z tzw. wczesną fazą tolerancji. Kiedy po tygodniu dokonano czwartego wlewu LPS, czas kaolinowo-kefalinowy przez siedem godzin prowadzonych obserwacji przyjmował wartości mieszczące się w granicach uznawanych za prawidłowe. Wskazuje to na utrzymywanie się u koni wczesnej fazy tolerancji jeszcze w tydzień od trzeciego wlewu LPS.

Wydaje się, że zjawisko tolerancji w mniejszym stopniu dotyczy zewnątrzpochodnego toru krzepnięcia krwi. Dopiero trzecia dawka LPS spowodowała reakcję tych mechanizmów krzepnięcia krwi, co wyrażało się najpierw skróceniem czasu protrombinowego, a następnie jego znacznym wydłużeniem w ostatniej godzinie badania. Być może zastosowana dawka LPS (0,1 µg/kg/m.c.) była niewystarczająca do uwolnienia tromboplastyny tkankowej w ilości powodującej wyraźny wzrost krzepliwości krwi. Tę tezę zdają się potwierdzać wyniki badań prezentowanych przez autorów we wcześniejszej publikacji opisującej działanie LPS w łącznej dawce 0,5 µg/kg m.c. gdzie uzyskano u koni wyraźną reakcję wskazującą na aktywację zewnątrzpochodnego toru krzepnięcia krwi (6). W dostępnym piśmiennictwie znaleziono tylko jedną publikację dotyczącą badań nad tolerancją endotoksynową u koni z uwzględnieniem parametrów krzepnięcia krwi (11). Wspomniani autorzy dokonywali wlewu dożylnych endotoksyny z *Salmonella typhimurium* w dawce 0,5 µg/kg m.c. przez 5 godzin (wlew kroplowy) kilkudniowym źrebkom. W trakcie podawania endotoksyny zaobserwowano powrót do wartości prawidłowych temperatury wewnętrznej, czasu kaolinowo-kefalinowego i liczby neutrofilów. Zaistniałe zjawisko tłumaczono rozwinięciem się wczesnej fazy tolerancji endotoksynowej. Podobnie jak w przedstawionych badaniach własnych tolerancja ta nie dotyczyła czasu protrombinowego.

Tolerancja endotoksynowa jest formą adaptacyjną układu odpornościowego, pełniącą prawdopodobnie ważną rolę w utrzymaniu homeostazy. Fizjologiczne mechanizmy aktywowane w stanie tolerancji zostały przypuszczalnie wykształcone w toku ewolucji. Powstanie tolerancji uwarunkowane jest współdziałaniem systemu neuroendokrynnego i odpornościowego. W efekcie tego współdziałania określany jest stopień zagrożenia organizmu danym antygenem oraz uruchamiane są mechanizmy „dopasowujące” reakcję obronną. Można zatem przypuszczać, że w stanie tolerancji zostaje wyznaczony nowy próg pobudliwości układu obronnego na określoną ilość i rodzaj pirogeny. Jedyne zwiększenie dawki lub pojawienie się w organizmie pirogeny o odmiennej strukturze przywraca peł-

ną reakcję obronną (17). Indukowanie tolerancji przy użyciu endotoksyny bakteryjnej stwarza możliwości lepszego zapobiegania i leczenia skutków reakcji organizmu na endotoksynę w naturalnych przypadkach zachorowań (1).

Reasumując z przedstawionego materiału wynika, że zaproponowany model endotoksemii pozwala u koni na rozwinięcie się tolerancji endotoksynowej. Prócz parametrów klinicznych zjawisko tolerancji dotyczy również mechanizmów krzepnięcia krwi szczególnie w wewnątrzpochodnym torze krzepnięcia. W toku badań udowodniono, że u koni wczesna faza tolerancji występuje jeszcze po tygodniu ale celowym byłoby ustalenie jak długo się utrzymuje.

Piśmiennictwo

1. Allen G. K., Campbell-Beggs C., Robinson J. A., Johnson P. J., Green E. M.: Equine vet. J. 28, 269, 1996.
2. Barton M. H., Collatos C., Moore J. N.: Equine vet. J. 28, 382, 1996.
3. Berg D. J., Kühn R., Rajewsky K., Müller W., Menon S., Davidson N., Grünig G., Rennick D.: J. Clin. Invest. 96, 2339, 1995.
4. Bieniek K.: Medycyna Wet. 50, 147, 1994.
5. Dąbrowska J., Wiśniewski E., Danek J., Krumrych W.: Mat. XXI Konf. Sekcji Fizjologii i Patologii Konia PTNW. Czerniejewo, 1995, s. 51.

6. Dąbrowska J., Wiśniewski E., Krumrych W., Danek J., Janiszewski J.: Medycyna Wet. 51, 212, 1995.
7. Dunkan S. G., Meyers K. M., Reed S. M., Grant B.: Am. J. vet. Res. 46, 1287, 1985.
8. Janicki K.: Hematologia kliniczna. PZWL Warszawa, 1992, s. 169.
9. Johnston I. B., Blackwell T. E.: Can. vet. J. 25, 195, 1984.
10. Krumrych W., Dąbrowska J., Wiśniewski E., Danek J., Soszyński D.: Bull. vet. Inst. Puławy (w druku).
11. Lavoie J. P., Madigan J. E., Cullor J. S., Powell W. E.: Equine vet. J. 22, 23, 1990.
12. Mengozzi M., Ghezzi P.: Eur. cytokine Netw. 4, 89, 1993.
13. Morris D. D., Beech J.: J. Am. vet. med. Ass. 183, 1067, 1983.
14. Prasse K. W., Topper M. J., Moore J. N., Welles E. G.: J. Am. vet. med. Ass. 203, 685, 1993.
15. Roth J., McClellan J. L., Kluger M. J., Zeisberger E.: J. Physiol. 477, 177, 1994.
16. Schade F. U., Schlegel J., Hofmann K., Brade H., Flach R.: J. Endotoxin Res. 3, 455, 1996.
17. Soszyński D.: Fizjologiczne mechanizmy tolerancji pirogenowej u królików. Praca dokt., Akademia Medyczna, Bydgoszcz, 1991.
18. Soszyński D., Kozak W., Kluger M. J.: Physiol. Behav. 63, 689, 1998.
19. Spolarics Z., Spitzer J. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 211, 340, 1995.
20. Studziński T., Mukezamfura P., Piedra J. L. V.: Medycyna Wet. 51, 371, 1995.
21. Wiśniewski E.: Wpływ endotoksyny *Escherichia coli* na podstawowe parametry kliniczne oraz wybrane wskaźniki hematologiczne i biochemiczne krwi koni. Praca hab., Instytut Wet. Puławy, 1987.
22. Zuckerman S. H., Evans G. F., Butler L. D.: Infect. Immun. 59, 2774, 1991.

Adres autora: dr Jolanta Dąbrowska, ul. Ujejskiego 64/137, 85-168 Bydgoszcz

❖❖❖❖ RECENZJE I BIBLIOGRAFIA ❖❖❖❖

OIE: Contamination of animal products: prevention and risks for public health. (Zanieczyszczenie produktów zwierzęcych: zapobieganie i ryzyko dla zdrowia publicznego). Scientific and Techn. Review, Vol 16/2/, 1997 r. str. 424, ISBN 0253-1933.

Wydawnictwo monograficzne Międzynarodowego Biura ds. Epizootii poświęcone jest problemom zanieczyszczeń żywności oraz ich zapobieganiom i niebezpieczeństwom dla zdrowia społecznego. Temu problemowi poświęcone są 42 przeglądy referatowe, różnych autorów, związanych tematycznie z wym. przewodnim motywem. Referaty dotyczą następujących grup tematycznych:

- Generalny problem zdrowia publicznego w aspekcie żywności zwierzęcego pochodzenia,
- Koncepcja zapobiegania ryzykom zdrowia publicznego,
- Bydło i jego produkty,
- Mięso małych przeżuwaczy,
- Mleko i jego produkty,
- Wieprzowina i jej produkty,
- Produkty drobiarskie,
- Mięso i jego produkty od innych gatunków,
- Ryby, mięczaki, skorupiaki,
- Pozabiologiczne zanieczyszczenia żywności.

Jest to, w ogólnej ocenie bardzo wartościowe dla służby wet. opracowanie.

OIE: Genetic resistance to animal diseases (Genetyczna oporność na choroby zwierzęce) Scientific & Technical Review Vol. 17 (1), 1998. str 392.

Kolejny zeszyt monograficzny Międzynarodowego Biura ds. Epizootii ukazał się w kwietniu 1998 r. Zawiera on w swej treści 27 monografii związanych z podanym w tytule problemem. Zostały one uszeregowane w następujące grupy tematyczne:

- Wprowadzenie do problemu oporności w chorobach zakaźnych,
 - Mechanizmy obrony przeciw chorobom zakaźnym,
 - Oporność genetyczna w chorobach pasożytniczych,
 - Oporność w chorobach zakaźnych,
 - Niekonwencjonalne czynniki zakaźne – priony,
 - Konwencjonalne programy hodowlane,
 - Selekcja genetyczna w hodowli zwierząt,
 - Studia nad opornością genetyczną,
 - Oporność genetyczna poprzez transfer genowy.
- Wszystkie referaty prezentują najnowszą wiedzę.