

# Wpływ lewamizolu i izoprynozyny na odporność nieswoistą u indyków supresorowanych karbarylem

ROMAN WÓJCIK, GRAŻYNA ŚWIĘCICKA-GRABOWSKA, ANDRZEJ KRZYSZTOF SIWICKI

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn

Wójcik R., Święcicka-Grabowska G., Siwicki A. K.

## Effect of levamisol and isoprinosine on non-specific immunity in turkeys suppressed with carbaryl

### Summary

The aim of the study was to evaluate and compare some biochemical and non-specific immunity parameters in carbaryl intoxicated turkeys, vaccinated with Newcastle Disease (ND) virus and fed with one of two synthetic immunity stimulators: isoprinosine or levamisol.

The study tested 30 turkeys (22-24 days old). For 3 subsequent days carbaryl -  $\frac{1}{4}$  TD<sub>50</sub>/kg of b.w. – was administered into their feed prior to morning feeding. Five days prior to intoxication the 29-day-old turkeys were divided into three groups (10 birds each). The first group was given one of the two examined immunity stimulators i.e. levamisol, the second was given isoprinosine and the third was a control group with no stimulator. After a subsequent 7 days, all the birds were vaccinated with a live attenuated Roakin strain of the Newcastle disease. Blood samples were taken from 5 turkeys from each group to evaluate the biochemical parameters and non-specific immunity indicators.

The results indicated that the applied preparations i.e. levamisol and isoprinosine more effectively stimulated the non-specific immunity of the suppressed turkeys to a significant extent than in the previous experiment with birds having proper immunity systems. When comparing the effect of isoprinosine and levamisol, the former was found to be a better stimulator, especially for non-specific cellular forms (test of killing intracellular germs – NBT, transformation of lymphocytes into blastic forms – TB, percentage of phagocyte cells and the phagocytar index) and total protein immunity.

**Keywords:** turkeys, carbaryl, isoprinosine, levamisol, immunity parameters

Ksenobiotyki, w tym także pestycydy, są jednymi z najsilniejszych środowiskowych czynników immunosupresyjnych, co wykazano u ludzi i innych ssaków, ptaków oraz ryb. Wpływają one hamująco na odporność nieswoistą, np.: fagocytozę, ceruloplazminę, interferon, aktywność lizozymu oraz na odporność swoistą humoralną i komórkową, powodując obniżenie mian przeciwciał, zdolności proliferacji limfocytów itp. (1, 7-10, 15, 17, 18, 20, 23, 27). Niebezpieczny jest fakt, że to ich negatywne działanie jest powolne i długotrwałe, co z reguły uchodzi uwadze lekarzy praktyków lub przypisywane bywa innym czynnikom. Efektem końcowym jest spadek kondycji zdrowotnej zwierząt, częste infekcje, gorsze przyrosty masy ciała, a nawet liczniejsze padnięcia zwierząt, co pociąga za sobą straty ekonomiczne. Zanieczyszczenie pasz różnego rodzaju związkami chemicznymi, szczególnie służącymi w rolnictwie do ochrony roślin jest bezsporne (2, 5), a karmienie nimi, zwłaszcza długotrwałe, stad hodowlanych przypuszczalnie prowadzi do immunosupresji. W tych sytuacjach wydaje się pomocne zastosowanie stymulatorów odporności niwelujących negatywne działanie ksenobiotyków.

Jednym z najsilniejszych immunosupresorów wśród pestycydów, co potwierdzono badaniami własnymi i innych autorów jest karbaryl (1, 3, 4, 17, 18, 21, 26, 27).

Należy on do pestycydów organicznych – karbaminianów, które jako inhibitory holinoesteraz stosowane są do zwalczania owadów (insektycyd). Łatwo wchłania się z przewodu pokarmowego i szybko ulega przemianom metabolicznym oraz wydalaniu. Dla ludzi mniej toksyczny niż dla zwierząt, jednak w dużych dawkach działa teratogennie i może ulegać nitrozowaniu, przechodząc w silnie rakotwórcze nitrozwiązki.

Celem badań była ocena i porównanie wybranych parametrów biochemicznych i odporności nieswoistej szczepionych wirusem Newcastle Diseases (ND) indyków intoksykowanych karbarylem, którym podano dwa syntetyczne stymulatory odporności: izoprynozynę i lewamizol.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na indykach obu płci, rasy mięsnej, typu ciężkiego Big 6. Dwudniowe indyczeta odchowano w pomieszczeniach klinicznych sposobem tradycyjnym, na ściółce. Zwierzęta miały stały dostęp do wody oraz paszy przez cały okres doświadczenia. Karmiono je pełnoporcjowymi mieszankami paszowymi – R210, R211, R212, zgodnie z przyjętymi normami.

**Układ doświadczenia.** W badaniach 30 indykom od 22.-24. dnia życia, tzn. przez 3 kolejne dni, podawano karbaryl w ilości  $\frac{1}{4}$  TD<sub>50</sub>/kg m.c., wprowadzany do paszy każdorazowo przed porannym karmieniem. Ptaki oznaczono symbolem „P”.

Po 5 dniach od zakończenia intoksykacji 29-dniowe indyki podzielono na grupy liczące po 10 sztuk, następnie każdej z nich podawano jednorazowo jeden z dwóch badanych stymulatorów odporności. Lewamizol otrzymywała grupa I (PL – pestycyd, lewamizol), grupa II (PI – pestycyd, izoprynozy-na) – izoprynozynę. Pozostałe 10 indyków z 30 intoksykowan-nych karbarylem nie otrzymało żadnego ze stymulatorów i traktowano je jako grupę III (PK) – kontrolną.

Wszystkim ptakom po 7 dniach od podania stymulatorów odporności zaaplikowano żywy, mezogeniczny szczep Roakin „R” wirusa choroby Newcastle, a następnie zabieg ten powtórzono w 100. dniu po pierwszym podaniu. W dniu aplikacji wirusa oraz począwszy od 7. aż do 140. dnia p. i. NDV od 5 indyków z każdej grupy z żyły skrzydłowej pobierano krew do badań w celu oznaczenia parametrów biochemicznych oraz wskaźników odporności nieswoistej.

Zastosowano następujące immunostymulatory syntetyczne: izoprynozynę – substancję czynną w stężeniu 10%, produkowaną przez Grodziskie Zakłady Farmaceutyczne, podawaną domięśniowo w dawce 50 mg/kg masy ciała oraz lewamizol – preparat handlowy firmy Sigma-Aldrich, aplikowany domięśniowo w dawce 0,25 mg/kg masy ciała. Jako ksenobiotyku użyto karbarylu – N-metylokarbaminian-1-naftolu, 99% czystość substancji (Z. Ch. Organika-Azot).

Wirus rzekomego pomoru drobiu: do badań użyto mezo-genicznego szczepu Roakin „R” wirusa rzekomego pomoru drobiu (NDV – Newcastle Diseases Virus). Jego miano zakaźne dla zarodków kurzych wynosiło  $EID_{50} = 10^{9,6}/ml$ , dla hodowli komórek zarodka kurzego  $10^{8,6}/ml$  TCID<sub>50</sub>. Szczep ten używany był do szczepienia indyków przez domięśniową iniekcję w dawce  $10^{5,6}/ml$  EID<sub>50</sub>.

Parametry biochemiczne: poziom białka całkowitego (g/l) oznaczano metodą spektrofotometryczną (14), poziom gammaglobulin (g/l) – metodą precipitacji wg Siwickiego i Andersona (22), aktywność ceruloplazminy (mg%) w surowicy – metodą spektrofotometryczną (19).

Badanie odporności nieswoistej: wewnątrzkomórkową zdolność zabijania sfagocytowanych drobnoustrojów przez granulocyty obojętnochłonne krwi obwodowej oznaczano odczynem NBT (25), aktywność fagocytarną leukocytów – metodą standardową (28) w postaci odsetka komórek fagocy-tujących (%F) i indeksu fagocytarnego (IF), aktywność lizo-zymu (mg/l) – metodą turbidymetryczną (16) w modyfikacji Siwickiego i Andersona (22), zdolność do proliferowania lim-focytów wobec fitohemaglutyniny w teście transformacji blas-tycznej (TB) – metodą Gocha i wsp. (12).

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą jedno-czynnikowej analizy wariancji testem Bonferroni z wykorzy-staniem programu komputerowego GraphPad Prism.

## Wyniki i omówienie

Wybór izoprynozyzny do badań podyktowany był faktem przypisywania jej dwukierunkowego działania, immunostymulującego oraz przeciwwirusowego. Dlatego szczególnie przydatna okazać się ona może przy infekcjach wirusowych, których leczenie stanowi problem ze względu na brak skutecznych chemioterapeutyków. Supresję układu odpornościowego bardzo często towarzyszą wielkostadnej hodowli indyków i są wywołane czę-sto występującymi tam negatywnymi czynnikami, takimi jak: stres, stłoczenie, niedobory żywieniowe, brak dostępu do wody, ksenobiotyki w karmie itp. Wyraża

się to najczęściej zwiększoną wrażliwością stada na różnego rodzaju infekcje, czemu przypuszczalnie zapobiegać mogą dobre stymulatory odporności.

Zastosowanie u indyków izoprynozyzny w takim ukła-dzie badane jest po raz pierwszy, co uniemożliwiło porównanie wyników badań własnych z danymi piśmiennictwa. Dlatego jako kontrolę i punkt odniesienia w ocenie skuteczności izoprynozyzny, podobnie jak w poprzed-nich badaniach (29, 30), zastosowano lewamizol, sty-mulator powszechnie znany i szeroko omawiany w piś-miennictwie.

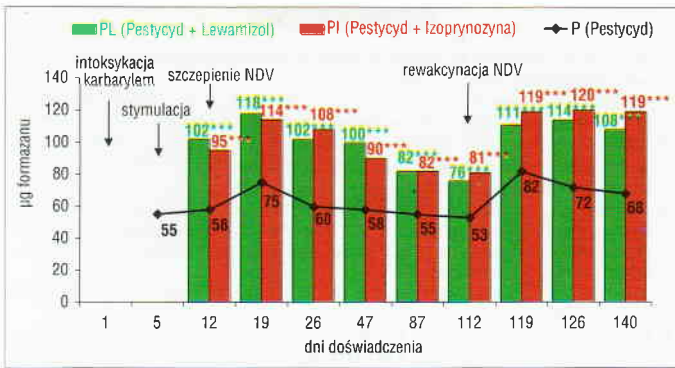
Uzyskane wyniki badań przedstawiono na ryc. 1-5 dotyczących wybranych parametrów odporności nieswo-istej, natomiast na ryc. 6-8 – w zakresie wskaźników biochemicznych.

Badania własne wykonane na supresorowanych ksenobiotykiem indykach potwierdzają fakt, że lewamizol najskuteczniej stymuluje odporność komórkową u osob-ników z osłabionym układem immunologicznym. Stwierdzono to, porównując efekt działania lewamizo-lu u ptaków z prawidłowo działającym układem immu-nologicznym i supresorowanych.

Znacznie bardziej interesujące, bo wskazujące na większą skuteczność niż po zastosowanym lewamizo-lu, są wyniki uzyskane u supresorowanych indyków otrzymujących drugi badany stymulator – izoprynozy-nę. Przede wszystkim znalazło to odzwierciedlenie w re-aktywności komórek leukocytarnych, ich większej aktywności metabolicznej nie tylko w odniesieniu do grupy kontrolnej, lecz także stymulowanej lewamizo-lem. Wyrazem tego jest test zabijania wewnątrzkomór-kowego zarazków (NBT) (ryc. 1) charakteryzujący się wyższymi wartościami niemal przez cały okres doświad-czenia. Podobnie w procesie transformowania w formy blastyczne limfocytów (TB) pod wpływem fitohema-glutyniny (ryc. 2) uzyskano wyższe wartości współczyn-nika RI, sięgające w grupach kontrolnych od 2,1 do 2,2; po lewamizolu od 3,5 do 3,7; zaś po izoprynozyynie od 3,2 do 4,4. Równie dobry stymulujący wpływ mitogenów na komórki T po zastosowaniu izoprynozyzny stwier-dzili Hennessy i wsp. (13) u prosiąt oraz Delafuente i Pa-nush (6) w badaniach *in vitro*.

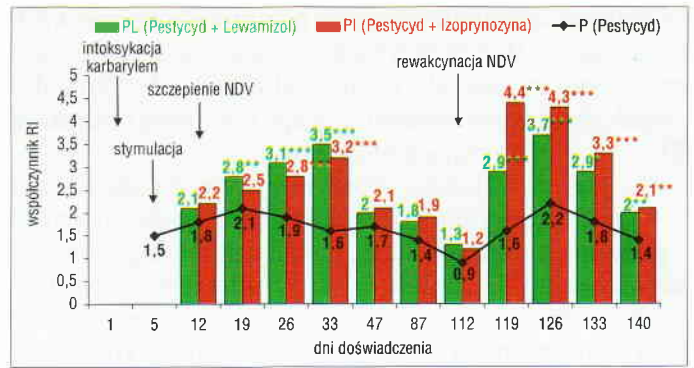
Większą skuteczność w porównaniu z lewamizolem, izoprynozyzna wskazała także w stosunku do aktywno-sci fagocytarnej leukocytów, gdyż zarówno procent ko-mórek fagocytyujących (ryc. 3) przez cały okres trwania doświadczenia, jak i indeks fagocytarny (ryc. 4) przez 60 dni były najwyższe w grupie indyków stymulowa-nych tym związkiem. Flaming i wsp. (11) otrzymali podobne rezultaty badań – zwiększoną aktywność fa-gocytarną leukocytów po podaniu izoprynozyzny u świń zakażonym wirusem choroby Aujeszkyego. Ponadto izoprynozyzna efektywniej korygowała upośledzoną re-aktywność immunologiczną nawet u zwierząt zmienno-cieplnych, co obserwowano Studnicka i wsp. (24) u ryb, nie tylko w odniesieniu do nieswoistej odporności ko-mórkowej, lecz także humoralnej.

W badaniach własnych oceny nieswoistej odporno-sci humoralnej u supresorowanych indyków dokonano



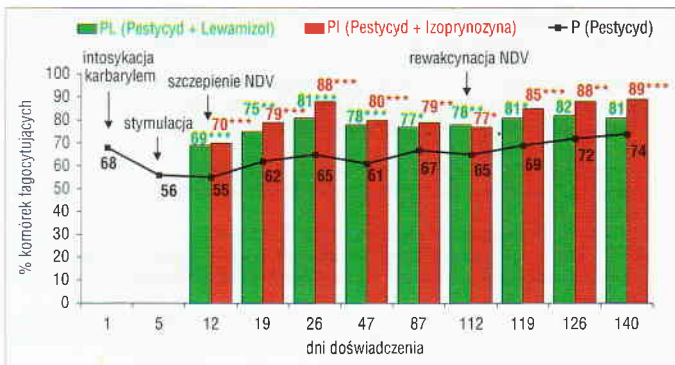
Ryc. 1. Aktywność NBT leukocytów w surowicy krwi indyków intoksykowanych karbarylem

Objaśnienia: \* – statystycznie istotne różnice  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$



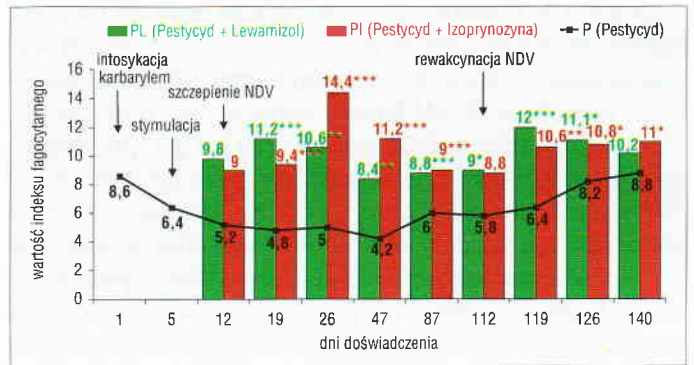
Ryc. 2. Współczynnik reaktywności RI limfocytów stymulowanych fitohemaglutyniną oznaczany w teście transformacji blastycznej u indyków intoksykowanych karbarylem

Objaśnienia: jak na ryc. 1.



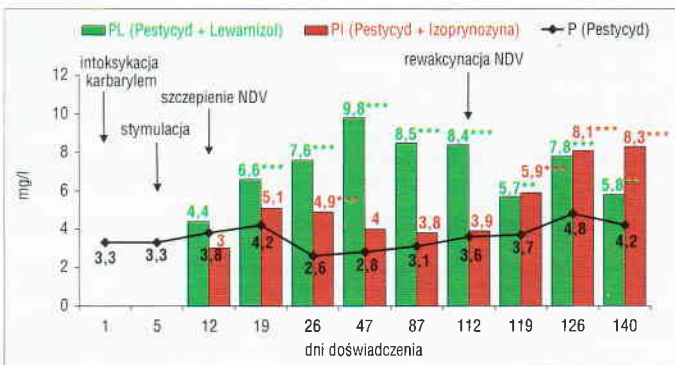
Ryc. 3. Fagocytoza – procent komórek fagocytujących w surowicy krwi indyków intoksykowanych karbarylem

Objaśnienia: jak na ryc. 1.



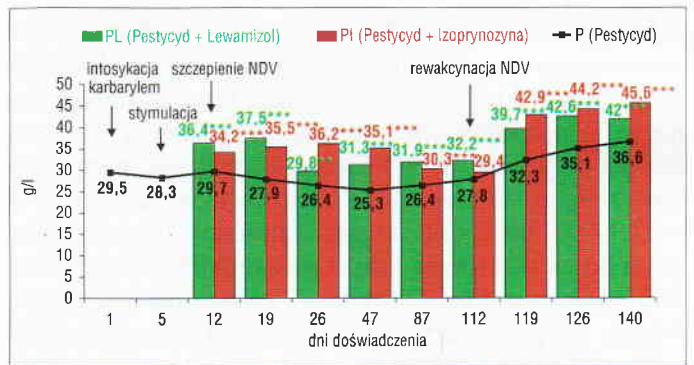
Ryc. 4. Fagocytoza – indeks fagocytarny u indyków intoksykowanych karbarylem

Objaśnienia: jak na ryc. 1.



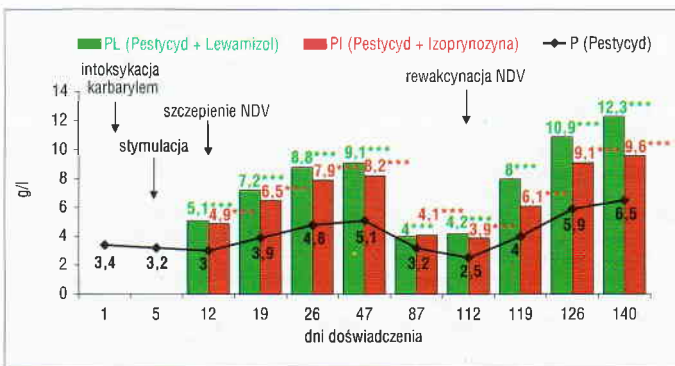
Ryc. 5. Aktywność lizozymu w surowicy krwi indyków intoksykowanych karbarylem

Objaśnienia: jak na ryc. 1.



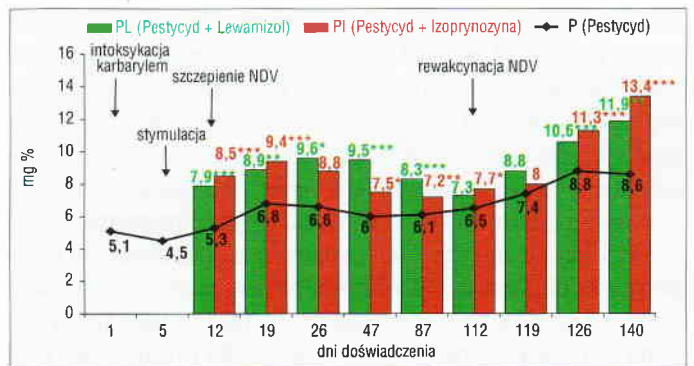
Ryc. 6. Poziom białka całkowitego w surowicy krwi indyków intoksykowanych karbarylem

Objaśnienia: jak na ryc. 1.



Ryc. 7. Poziom gammaglobulin w surowicy krwi indyków intoksykowanych karbarylem

Objaśnienia: jak na ryc. 1.



Ryc. 8. Poziom ceruloplazminy w surowicy krwi indyków intoksykowanych karbarylem

Objaśnienia: jak na ryc. 1.

na podstawie kształtowania się poziomu lizozymu w ich krwi (ryc. 5). W tym przypadku efektywne działanie izoprynozyiny zaznaczało się niemal przez cały okres doświadczenia w porównaniu z grupą kontrolną oraz przez 21 dni – z otrzymującą lewamizol.

Pozytywne działanie izoprynozyiny wyraziło się także w zakresie wybranych wskaźników biochemicznych – poziomu gammaglobulin, białka całkowitego oraz ceruloplazminy. U supresorowanych ptaków otrzymujących ten preparat stwierdzono wyższy poziom wszystkich wymienionych wskaźników niż w grupie kontrolnej.

W porównaniu z lewamizolem izoprynozyina wpływała nieco lepiej na wartość białka całkowitego, którego maksymalny poziom sięgał od 36,2 g/l do 45,6 g/l, podczas gdy w grupie z lewamizolem od 37,5 g/l do 42,6 g/l, a w kontrolnej od 29,7 g/l do 36,6 g/l (ryc. 6). Natomiast lewamizol, w przeciwieństwie do wyżej wymienionego wskaźnika, w odniesieniu do gammaglobulin (ryc. 7) wykazał lepszą skuteczność, bowiem poziom ich kształtował się od 9,1 do 12,3 g/l, po izoprynozyinie 8,2-9,6 g/l, zaś w kontroli tylko 5,1-6,5 g/l.

Poziom ceruloplazminy (ryc. 8), jednego z białek ostrej fazy, przez cały okres doświadczenia wykazywał wyższe wartości w grupach stymulowanych preparatami niż w grupie kontrolnej, przy czym w pewnych dniach nieco skuteczniejszy okazał się lewamizol, w innych natomiast – izoprynozyina.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że izoprynozyina u indyków supresorowanych, podobnie jak we wcześniejszych badaniach własnych u ptaków z prawidłowo działającym układem immunologicznym, stymulowała skuteczniej niż lewamizol odporność nieswoistą. Czynniki tej odporności, zarówno komórkowe, jak i humoralne, stanowią pierwszą barierę ochronną, decydującą o zasiedleniu, namnożeniu i rozprzestrzenianiu się zarazka w organizmie. Na szczególną uwagę zasługuje odporność komórkowa, która odgrywa główną rolę w zakażeniach drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi, zwłaszcza wirusami. Istotny jest przy tym fakt stymulowania przez izoprynozyinę właściwości fagocytarnych leukocytów, które obok zdolności zabijania zarazków mogą np. tak jak makrofagi degradować go i prezentować antygen limfocytom T. Te ostatnie ulegają wówczas swoistej aktywacji i na drodze bezpośredniej (cytotoksyczność) lub pośredniej mogą wchodzić w cykl procesów obronnych. Poza tym większa zdolność limfocytów do transformowania w formy blastyczne pod wpływem czynnika mitogennego wydaje się również istotna w przypadku ewentualnego zadziałania mitogenu swoistego, jakim mogą być pasożyty wewnątrzkomórkowe w zakażonym organizmie.

Przy braku możliwości prowadzenia skutecznej terapii przy zakażeniach drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi stosowanie stymulatorów, takich jak izoprynozyina o małym stopniu toksyczności dla organizmu, wykazujących tak dobry efekt immunostymulacyjny, może nabierać szczególnego znaczenia zarówno w działaniach profilaktycznych, jak i terapeutycznych.

## Piśmiennictwo

1. Anger W. K., Wilson S. M.: Effect of carbaryl on variable interval response rates in rats. *Neurobehav. Toxicol.* 1980, 2, 21-24.
2. Atef M., Abo-Noraga M. A. M., Hanafy M. S. M., Agag A. E.: Pharmacotoxicological aspects of nitrate and nitrite in domestic fowls. *Br. Poult. Sci.* 1991, 32, 399-404.
3. Bavari S., Casale G. P., Gold R. E., Vitzthum E. F.: Modulation of interleukin-2 driven proliferation of human large granular lymphocytes by carbaryl, an anticholinesterase insecticide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1991, 17, 61-74.
4. Casale G. P., Vennerstrom J. L., Bavari S., Wang T. L.: Inhibition of interleukin-2 driven proliferation of mouse CTLL2 cells, by selected carbamate and organophosphate insecticides and congeners of carbaryl. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1993, 15, 199-215.
5. Dan Heller E.: Immunosuppression in chickens. *Proc. 8<sup>th</sup> Poult. Confer., Barcelona* 1985, s. 176-183.
6. Delafuente J. C., Panush R. C.: Pharmacologic immunoenhancement in the elderly: in vitro effects of isoprinosine. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1988, 47, 363-367.
7. Dunier M., Siwicki A. K.: Effects of pesticides and polynuclear aromatic hydrocarbons in the aquatic environment on immunity of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 1992, 1, 1-14.
8. Dunier M., Siwicki A. K.: Effects of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. I. Effects of lindane on antibody secreting cells (ASC) measured by Elispot assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1994, 27, 1-6.
9. Dunier M., Siwicki A. K., Scholtens J., Dal Molin S., Vergnet Ch., Studnicka M.: Effects of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. III. Effects on nonspecific immunity and B lymphocyte functions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1995, 27, 324-334.
10. Fiolka M., Valverde P. J. L.: Zmiany aktywności bakteriobójczej lizozymu w tkankach i surowicy krwi u kurcząt brojlerów połączonych wodą z dodatkiem azotanu i azotynu potasowego. *Wyd. IRS – Biologiczne monitorowanie skażenia środowiska* 1997, 121-125.
11. Flaming K. P., Blecha F., Fedorka-Cray P. J., Anderson G. A.: Influence of isoprinosine on lymphocyte function in virus-infected feeder pigs. *Am. J. Vet. Res.* 1989, 50, 1653-1657.
12. Goch J. H., Tchórzewski H., Niedworak J., Tkaczewski W., Ofierska H., Soszyńska W.: Test transformacji blastycznej limfocytów i zahamowania migracji leukocytów w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia mięśnia sercowego u ludzi. *Immunol. Pol.* 1981, 6, 239-248.
13. Hennessy K. J., Blecha F., Pollman D. S., Kluber E. F.: Isoprinosine and levamisole immunomodulation in artificially treated neonatal pigs. *Am. J. Vet. Res.* 1987, 48, 477-480.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.: Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
15. Madsen C., Claesson M. H., Roepke C.: Immunotoxicity of the pyrethroids insecticides deltamethrin and alpha-cypermethrin. *Toxicology*, 1996, 107, 219-227.
16. Parry R. M., Chandau R. C., Shahani R. M.: A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965, 119, 384-386.
17. Pipy B., Beraud M., Gaillard D.: Phagocytic activity of the reticuloendothelial system in the rat after administration of an anticholinesterase pesticide, carbaryl. *Experientia* 1978, 34, 87-88.
18. Pipy B., de Maroussem D., Beraud M., Derache P.: Evaluation of cellular and humoral mechanisms of carbaryl-induced reticuloendothelial phagocytic depression. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1983, 34, 395-412.
19. Rice E. W., Wagman E., Takenaka Y.: Ceruloplasmin assay in serum: standardization of ceruloplasmin activity in terms of international enzyme units. *Diag. Lab.* 1986, 12, 39-53.
20. Sharma R. P.: Evaluation of pesticide immunotoxicity. *Toxicol. Ind. Health.* 1988, 4, 373-380.
21. Shea T. B., Berry E. S.: Suppression of interferon synthesis by the pesticide carbaryl as a mechanism for enhancement of goldfish virus-2 replication. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, 47, 250-252.
22. Siwicki A. K., Anderson D. P.: Immunostimulation in fish: Measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. *U.S. Fish Wildl. Service-IFI, Olsztyn* 1993, 1, 17.
23. Sopińska A., Lutnicka H., Guz L.: Badania nad działaniem lewamizolu po przewlekłej intoksykacji karpia związkami azotowymi. *Medycyna Wet.* 1994, 50, 612-614.
24. Studnicka M., Dunier M., Siwicki A. K., Morand M.: Application of biostimulants in rectifying of immunological reactivation handicapped by phosphoroorganic pesticides. *Wyd. IRS – Biologiczne monitorowanie skażenia środowiska* 1997, 187-194.
25. Sychłowy A., Lukas A.: Ocena mikroilościowej metody redukcji NBT przez granulocyty krwi obwodowej. *Pol. Tyg. Lek.* 1978, 33, 45-48.
26. Świąćicka-Grabowska G., Wiśniewski J.: Wpływ preparatów IPO-63, karbaryl, foschlor i reglone na namnażanie się wirusa choroby Newcastle w zarodkach kurzych i hodowlach komórek zarodka kurzego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1989, 41, 47-52.
27. Wiltrout R. W., Ercegovich C. D., Ceglowski W. S.: Humoral immunity in mice following oral administration of selected pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1978, 20, 423-431.
28. Wiśniewski J., Grabowska G., Trybała E., Rotkiewicz Z.: Wpływ podania biotropiny i lewamizolu na wybrane wskaźniki odporności swoistej i nieswoistej u świń. *Medycyna Wet.* 1993, 49, 66-68.
29. Wójcik R., Świąćicka-Grabowska G.: Parametry biochemiczne oraz odporności i nieswoistej u indyków uodpornionych szczepem Roakin wirusa NDV po podaniu lewamizolu lub izoprynozyiny. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 713-717.
30. Wójcik R., Świąćicka-Grabowska G.: Parametry odporności swoistej u indyków szczepionych wirusem NDV po podaniu lewamizolu lub izoprynozyiny. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 808-810.