

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZDZISŁAW GLIŃSKI, JERZY RZEDZICKI, WIESŁAW DĘPTUŁA

Wpływ niektórych preparatów bodźcowych na poziom i aktywność komórek fagocytujących krwi obwodowej

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

W mechanizmach obrony przeciwbakteryjnej organizmu istotną rolę odgrywa aktywność bakteriobójcza surowicy krwi oraz fagocytoza układu jednojądrzastych fagocytów (23) i granulocytów krwi obwodowej (7). Fagocytoza przez komórki tych układów, w odróżnieniu od fagocytozy warunkowych fagocytów, z reguły przebiega przy współdziałaniu immunoglobulin i dopełniacza (12). Komórki fagocytujące posiadają na swojej powierzchni receptory dla fragmentu Fc immunoglobulin i składowej C3 dopełniacza (5, 21). Proces wiązania cząsteczki z fagocytom ułatwiają przeciwciała cytofilne, opsonizujące potencjał immunoglobulin, dopełniacz oraz inne dotychczas w pełni niezidentyfikowane czynniki osocza.

Ilość komórek fagocytujących, natężenie procesu fagocytozy, jak również poszczególne jej fazy ulegają zmianie pod wpływem czynników wewnątrz- oraz zewnątrzustrojowych. Do czynników wewnątrzustrojowych zalicza się stan odporności humoralnej, równowagę hormonalną, zapalenia i nowotworzenia, natomiast do czynników zewnątrzustrojowych leki o działaniu immunostymulacyjnym lub immunosupresyjnym, a także środowisko zewnętrzne.

Badania eksperymentalne przeprowadzone w ostatnich latach wskazały na rolę jaką odgrywa specyficzna stymulacja immunologiczna i niespecyficzna aktywacja makrofagów w mechanizmach obronnych organizmu (8). W następstwie stymulacji makrofagów organizm nabywa odporności na choroby zakaźne powstałe nie tylko na skutek zakażeń endogennych, ale także na drodze superinfekcji. Natężenie odporności zależy od potencjału cytotoksycznego makrofaga oraz jego zdolności do zwalczania zakażenia. Wprowadzenie supresorów i stymulatorów mechanizmów obronnych umożliwiło prowadzenie dalszych badań dotyczących aktywacji makrofagów bądź osłabienia ich aktywności. Odegard i Lamvin (17) stwierdzili hamujący wpływ fenylbutazonu i chloramfenikolu na fazę pochłaniania i trawienia substancji obcych w procesie fagocytozy, przy czym fenylbutazon silniej hamował w porównaniu do chloramfenikolu trawienie sfagocytowanych cząsteczek. Aktywujący wpływ na makrofagi i inne komórki fagocytujące krwi obwodowej wywierają substancje o działaniu adjuwancyjnym. Unanue (25) i Faivre (10) zwracają uwagę na aktywujące działanie

witaminy A, endotoksyn niektórych drobnoustrojów, szczepionki przeciwko *Bordetella pertussis*, a także estrogenów i fosfolipidów. Substancje te stymulują pojawianie się dużych lizosomów oraz zwiększają aktywność enzymów hydrolitycznych makrofagów. Pod wpływem adjuwantów dochodzi ponadto do wzrostu poziomu lizofosfatydów i wolnych kwasów tłuszczowych w makrofagach. Estrogeny — chlorotrianisen, estradiol, dwuetylostilbestrol wywierają stymulujący wpływ na proces fagocytozy poprzez aktywację makrofagów i pobudzenie ich proliferacji (10). Bezpośredni stymulujący wpływ na fagocytozę wywierają niskocząsteczkowe fosfolipidy w dawkach poniżej 100 µg/kg oraz wyciągi lipidowe z *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, drobnoustrojów z rodzaju *Corynebacterium*, ze szczepu BCG prątka gruźlicy, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Saccharomyces cerevisiae*. Fosfolipidy w wyższych dawkach (ponad 100 µg/kg) wywierają działanie supresyjne.

Stymulujący wpływ na procesy odpornościowe również poprzez aktywację makrofagów i mikroorganizmów wywierają preparaty bodźcowe oparte o zabite drobnoustroje, endotoksyny pochodzenia bakteryjnego i niektóre produkty pochodzenia tkankowego. Pod ich wpływem występuje ponadto leukocytoza i pojawiają się w krwiobiegach krwinki leukergiczne (16). Małe dawki endotoksyny pałeczek jelitowych zawarte w preparatach bodźcowych zwiększają nie tylko zdolności fagocytarne i aktywność glikolityczną granulocytów i monocytów, ale również właściwości bakteriobójcze i opsonizujące surowicy krwi (22). Wykazano również, że u królików, cieląt i prosiąt pod wpływem Neowetadiny ulega zwiększeniu ilość krwinek białych, liczba granulocytów o jądrze segmentowanym oraz miano indeksu fagocytarnego (19).

Zachęcające wyniki uzyskane w badaniach laboratoryjnych i terenowych nad przydatnością Neowetadiny w stymulowaniu odporności nieswoistej u zwierząt były powodem podjęcia badań porównawczych nad wpływem czterech preparatów bodźcowych — Neowetadina, Biowetadina, Panodina i Poliwakcyne na zachowanie się miana indeksu fagocytarnego, liczby monocytów, granulocytów obojętnochłonnych i kwasochłonnych we krwi obwodowej królików.

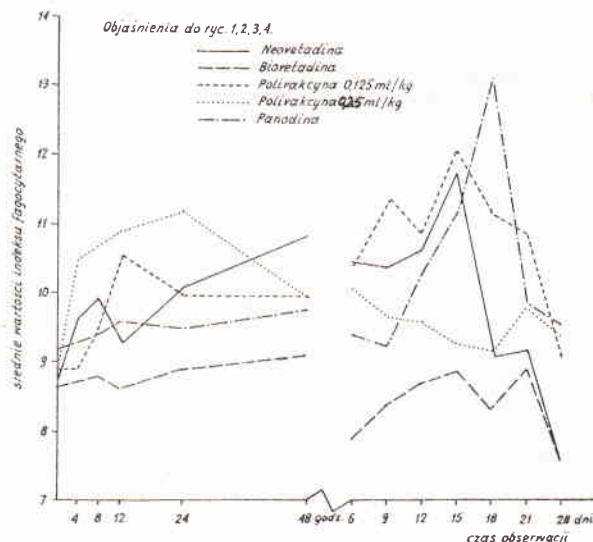
Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 150 królikach rasy mieszananej o średniej wadze 3,5—4,0 kg w 4 grupach doświadczalnych, każda po 30 sztuk, grupa kontrolna liczyła 30 królików. Żywnienie i utrzymanie wszystkich zwierząt było identyczne. W badaniach stosowano następujące preparaty bodźcowe: Neowetadina, Biowetadina, Panodina i Poliwalkyna mite. Preparaty podano jednorazowo domięśniowo w ilości: Neowetadina, Biowetadina i Panodina 1,0 ml/kg wagi ciała, Poliwalkyna 0,125 oraz 0,25 ml/kg wagi ciała.

Indeks fagocytarny określono wg Brzuchowskiej (3) i Ładosza (14), zaś liczbę granulocytów kwaso-, obojętnochłonnych i monocytów oznaczono w obrazie Schillinga metodą rutynową po 4, 12, 24, 48 i 72 godz., następnie pięciokrotnie w odstępach trzydniowych i jednorazowo po tygodniu po podaniu preparatów. Wszystkie oznaczenia powtórzono trzykrotnie, zaś na wykresach przedstawiono wartości średnie z trzech oznaczeń. Wyniki badań poddano analizie statystycznej w systemie „podwójnej krzyżowej nieortogonalnej” dla poszczególnych parametrów w danej grupie obserwacji oraz między grupami.

Wyniki

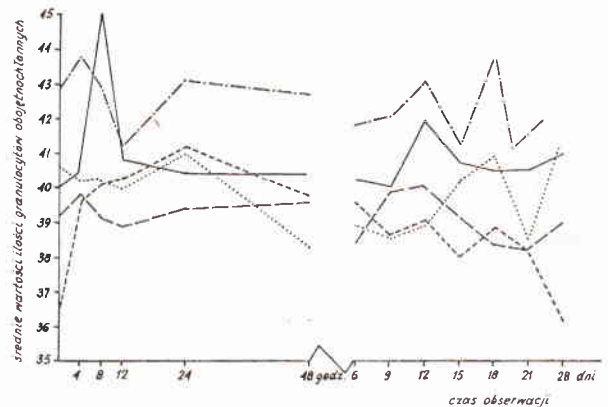
Wyniki badań nad zachowaniem się indeksu fagocytarnego u królików po stosowaniu Neowetadiny, Biowetadiny, Panodiny i Poliwalkyny przedstawiono na (ryc. 1). Analiza statystyczna średnich wartości indeksu fagocytarnego dla każdego preparatu w zależności od czasu badania w stosunku do wartości próby zerowej i wartości dla poszczególnych oznaczeń w grupie kontrolnej wykazała statystycznie znamiennej wzrost wartości indeksu ($P > 0,05$) pod wpływem Neowetadiny, Panodiny i Poliwalkyny w obydwu stosowanych dawkach. Wzrost ten w przypadku Neowetadiny występował między 4 godz. a 15 dniem, Panodiny między 15 i 18 dniem. Poliwalkyny w dawce niższej między 12 godz. i 28 dniem zaś w dawce wyższej między 4 i 24 godz. badania. Zmiany wartości indeksu fagocytarnego w grupie królików, którym podano Biowetadynę nie wykazywały statystycznie istotnych różnic zarówno w odniesieniu do próby zerowej, jak i w odniesieniu do wartości indeksu fagocytarnego królików z grupy kontrolnej. Odchylenia między średnimi wartościami



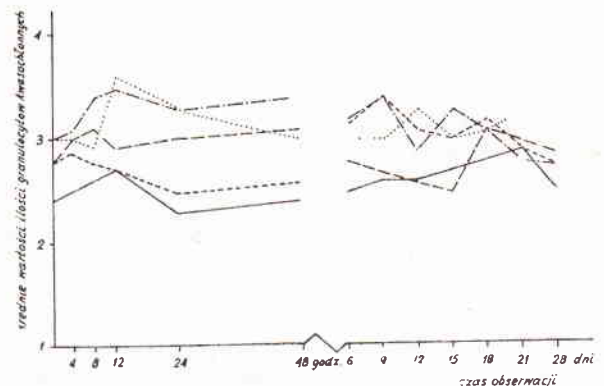
Ryc. 1. Średnie wartości indeksu fagocytarnego we krwi królików po stosowaniu Neowetadiny, Biowetadiny, Poliwalkyny (w dawce 0,125 ml/kg i 0,25 ml/kg) i Panodiny

ciami indeksu fagocytarnego w grupie kontrolnej w zależności od czasu badania nie były statystycznie istotne ($P < 0,01$).

Spośród badanych preparatów bodźcowych, jedynie Poliwalkyna w dawce 0,125 ml/kg powodowała statystycznie istotny wzrost ($P > 0,05$) liczby granulocytów obojętnochłonnych (ryc. 2) i kwasochłonnych (ryc. 3). Wzrost liczby granulocytów obojętnochłonnych występował po 4 godz. i utrzymywał się do 21 dnia obserwacji, natomiast wzrost liczby granulocytów kwasochłonnych występował 9 dnia i utrzymywał się do 21 dnia po podaniu Poliwalkyny.



Ryc. 2. Średnie wartości liczby granulocytów obojętnochłonnych we krwi obwodowej królików po stosowaniu Neowetadiny, Biowetadiny, Poliwalkyny (w dawce 0,125 ml/kg i 0,25 ml/kg) i Panodiny



Ryc. 3. Średnie wartości liczby granulocytów kwasochłonnych we krwi obwodowej królików po stosowaniu Neowetadiny, Biowetadiny, Poliwalkyny (w dawce 0,125 ml/kg i 0,25 ml/kg) i Panodiny

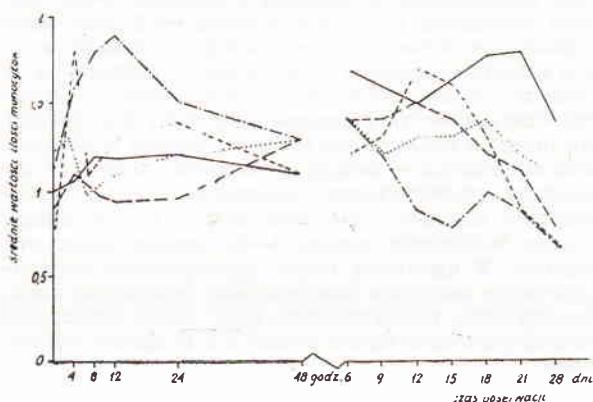
Statystycznie istotne różnice w liczbie monocytów wystąpiły po stosowaniu Neowetadiny, Panodiny i Poliwalkyny w dawce 0,125 ml/kg i Biowetadiny. Liczba monocytów wzrastała po podaniu Neowetadiny między 6—21 dniem, Panodiny między 4—24 godz., Poliwalkyny w dawce 0,125 ml/kg między 4 godz. i 12 dniem i Biowetadiny między 48 godz. i 15 dniem obserwacji (ryc. 4).

Zmiany w ilości granulocytów obojętnochłonnych, kwasochłonnych i monocytów we krwi królików z grupy kontrolnej, nie stymulowanej preparatami bodźcowymi, nie wykazywały statystycznie istotnych różnic ($P < 0,01$).

Omówienie wyników

W zapobieganiu chorobom zakaźnym zwierząt, wywołanym zwłaszcza przez drobnoustroje warunkowo-chorobotwórcze coraz większą rolę odgrywa niespecyficzna stymulacja odporności naturalnej. Nieswoista immunoterapia oparta o preparaty tkankowe została wykorzystana w profilaktyce w tuczu przemysłowym trzody chlewnej i bydła (11, 15). Terapię opartą o stosowanie białek siary i surowicy (26), biotropinę i ceromangan wprowadzono do zapobiegania schorzeniom przewodu pokarmowego i układu oddechowego u cieląt (20, 24).

Dużą rolę w profilaktyce i terapii przypisuje się immunoterapii niespecyficznej przy użyciu preparatów zawierających zabite drobnoustroje i niektóre produkty pochodzenia bakteryjnego, które są zalecane przez producentów do stosowania w ostrych chorobach gorączkowych, niezżytach dróg oddechowych, zapaleniach jelit i biegunkach na tle bakteryjnym.



Ryc. 4. Średnie wartości ilości monocytów we krwi obwodowej królików po stosowaniu Neowetadiny, Biowetadiny, Poliwakcyny (w dawce 0,125 ml/kg i 0,25 ml/kg) i Panodiny

Badania nad mechanizmem działania tych preparatów nie wyjaśniły w pełni roli poszczególnych ich komponent w stymulacji odporności oraz nie umożliwiły pełnej identyfikacji komórek ich docelowego działania. W badaniach laboratoryjnych i obserwacjach terenowych wykazano stymulujące działanie aktywnych biologicznie składników preparatów bodźcowych na układ siateczkowo-śródbłonkowy oraz zdolności żerne i bakteriocydną fagocytów, głównie monocytów, granulocytów kwasochłonnych i obojętnochłonnych. Fagocytoza przez makrofagi krwi obwodowej oraz granulocyty stanowi ważny czynnik w obronie organizmu przed zakażeniami bakteryjnymi, grzybiczymi i wirusowymi (17).

W badaniach porównawczych nad wpływem Neowetadiny, Panodiny, Poliwakcyny mite i Biowetadiny na komórki fagocytyjące krwi ob-

wodowej uwzględniono zachowanie się indeksu fagocytarnego oraz zmiany ilościowe monocytów, granulocytów obojętno- i kwasochłonnych. Indeks fagocytarny oraz zachowanie się liczby makrofagów, w mniejszym stopniu mikro-fagów, umożliwiają z jednej strony dość dokładną ocenę stanu odporności naturalnej, z drugiej strony porównanie wartości preparatów bodźcowych.

Stwierdzono, że z czterech badanych preparatów trzy tj. Poliwakcyna w obydwu stosowanych dawkach, Neowetadina i Panodina stymulowały wzrost miana indeksu fagocytarnego. Wzrost ten w przypadku Poliwakcyny w dawce wyższej występował między 4—24 godz., Neowetadiny między 4 godz. i 15 dniem, Poliwakcyny w dawce niższej między 12 godz. i 21 dniem, zaś Panodiny między 15 i 18 dniem po ich stosowaniu. Wyraźny i długo utrzymujący się wzrost miana indeksu fagocytarnego w przypadku Poliwakcyny w dawce niższej i Neowetadiny można przypisać z jednej strony dodatniemu chemotaktycznemu działaniu składników polisacharydowych zawartych w endotoksynach, z drugiej strony bezpośredniej aktywacji komórek fagocytyjących (16). O możliwościach bezpośredniej stymulacji makrofagów bez współdziałania komórek T zależnych donoszą również Ruitenberg i Steerenberg (18) po iniekcjach szczepionki opartej o *C. parvum*.

Krótkotrwały wzrost miana indeksu fagocytarnego po podaniu Poliwakcyny w wyższej dawce był spowodowany najprawdopodobniej użyciem zbyt wysokiej dawki tego preparatu. Badania Flemminga (10) nad stymulacją układu siateczkowo-śródbłonkowego u myszy lipopolisacharydami wykazały silne obniżenie fagocytozy po 24 godz. po dawce 500 µg/ml. Dawki lipopolisacharydu poniżej 100 µg/ml stymulowały dwufazowy wzrost fagocytozy z maksimum po 2,5 i 24 godz.

Spośród trzech typów komórek fagocytyjących jedynie liczba monocytów wzrastała pod wpływem wszystkich badanych preparatów. Monocytoza występowała po 4 godz. po podaniu Panodiny i Poliwakcyny w dawce 0,25 ml/kg, po 48 godz. po stosowaniu Biowetadiny i po 6 dniach po podaniu Neowetadiny. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach Fauve (9), Evansa (8) i Barecky i wsp. (2). Fauve badając aktywację makrofagów przez fosfolipidy pochodzenia drobnoustrojowego wykazał wzrost odporności organizmu w następstwie aktywacji zdolności żernych i bakteriocydnych makrofagów. Do podobnych wniosków dochodzi również Barecky i wsp. (2) na podstawie zachowania się makrofagów otrzewnej myszek pod wpływem polisacharydów i endotoksyn. Wg Evansa do aktywacji makrofagów dochodzi w przebiegu ostrych i chronicznych zakażeń.

Jedynie Poliwakcyna w dawce 0,25 ml/kg powodowała wzrost ilości granulocytów obojętnochłonnych między 4 godz. i 21 dniem i granulo-

cytów kwasochłonnych między 9—21 dniem badania. Stymulacja granulocytów przez Poliwalkynę jest najprawdopodobniej związana nie tylko z jej składem, ale i z wielkością dawki. Pozostałe preparaty bodźcowe nie wpływały na zmianę ilości badanych granulocytów. Jain (13) obserwował natomiast neutropenię po 1—2 godz. po podaniu endotoksyny *Escherichia coli*, zaś Carrol i wsp. (4) nasilającą się leukopenię po 7—8 godz. po dowymieniowych infuzjach endotoksyny *Klebsiella aerogenes*.

Wydaje się, że granulocytoza eozynofilowa występująca po iniekcji Poliwalkyny w dawce 0,25 ml/kg była następstwem wytwarzania CSF przez stymulowane makrofagi. Wg Cline i wsp. (6) ten mechanizm odgrywa dużą rolę w mobilizacji odporności przeciwbakteryjnej. Należy jednak podkreślić, że w porównaniu z granulocytami obojętnochłonnymi, zarówno aktywność fagocytarna, jak i bakteriobójcza granulocytów kwasochłonnych jest stosunkowo niewielka (1).

Wnioski

1. Poliwalkyna mite w dawce 0,25 ml/kg wagi ciała wywierała działanie stymulujące na organizm królików, które przejawiało się wzrostem miana indeksu fagocytarnego, monocytozą, neutrofilią i acidofilią.

2. U królików po stosowaniu Neowetadiny względnie Panodiny indeks fagocytarny i liczba monocytów wzrastały statystycznie znamienne.

3. U królików w następstwie jednorazowego domięśniowego podania Biowetadiny w dawce 1,0 ml/kg wagi ciała występował statystycznie znamieny wzrost liczby monocytów we krwi obwodowej między 2—15 dniem obserwacji.

Piśmiennictwo

1. Archer G. T. G., Air G., Jackas M., Morell D. B.: *Biochim. biophys. Acta.* 99, 36, 1965.
2. Barecky L., Lackovic V., Fuchsberger N., Hajnicka V.: *Activation of macrophages. Excerpta Med.* Amsterdam, Amer. Elsevier Publ. 111, 1974.
3. Brzuchowska M.: *Immun. Ther.* 14, 127, 1966.
4. Carrol E. J., Schalm O. W., Lasmans J.: *Am. J. vet. Res.* 25, 720, 1969.
5. Christie K. E., Solberg C. O., Larsen B., Grov A., Tonder O.: *Acta path. microbiol. scand. C*, 84, 119, 1976.
6. Cline M. J., Rothman B., Golde D. W.: *J. Cell Physiol.* 84, 193, 1974.
7. Cohn Z. A.: *Adv. Immunol.* 9, 163, 1968.
8. Evans R.: *Activation of macrophages. Excerpta Med.* Amsterdam, Amer. Elsevier Publ. 305, 1974.
9. Faure R. M.: *Activation of macrophages. Excerpta Med.* Amsterdam, Amer. Elsevier Publ. 157, 1974.
10. Flemming K.: *Activation of macrophages. Excerpta Med.* Amsterdam, Amer. Elsevier Publ. 280, 1974.
11. Furtunescu A., Creta V., Buliga M., Perhinski M., Bakensen F., Ruteanu D., Popovici D.: *Zool. Med. Vet.* 5, 87, 1961.
12. Good R. A., Fisher D. W.: *Immunobiology.* Sinauer Ass. Inc. Publ. Stamford, Connecticut 1971.
13. Jain N. C., Schalm J.: *Dissert. Doct.* Hannover 1959.
14. Ladós J.: *Arch. Immun. Ther.* 16, 573, 1973.
15. Martinov P., Konstantinov P., Gerow K.: *Bull. Naucz. Inform. Sofia*, 1, 9, 1962.
16. Myrvik Q. N., Leake E. S., Oshima E. S.: *J. Immun.* 89, 745, 1962.
17. Odegaard A., Lamvik J.: *Acta path. microbiol. scand. C*, 84, 37, 1976.
18. Ruitenberg E. J., Steerenberg P. A.: *Tijdschr. Diergeneesk.* 101, 775, 1976.
19. Rzedzicki J., Gliński Z., Kowalska M., Deptuła W.: *Nowości Wet.* 6, 401, 1976.
20. Sali G.: *Vet-med. Nachr.* 2, 144, 1974.
21. Schmidt M. E., Douglas S. D.: *J. Immun.* 10, 4, 1972.

22. Stavitsky A. B.: *Adv. Immun.* 1, 211, 1961.
23. Stossel T. P.: *N. Engl. J. Med.* 290, 12, 1974.
24. Stryszak A.: *Medycyna Wet.* 26, 193, 1970.
25. Unanue E. R.: *Adv. Immun.* 15, 95, 1972.
26. Weichel D., Andresen P., Maatsch I.: *Prakt. Tierarzt*, 56, 146, 1975.

Adres autora: doc. dr habil. Zdzisław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin.

Глиньский З., Жедзицкий Е., Дептула В. — Влияние некоторых возбуждающих препаратов на уровень и активность фагоцитирующих клеток периферической крови.

Исследования влияния Неоветадина, Биоветадина, Панодина и Поливакцина мите на положение титра фагоцитарного индекса, число моноцитов, нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов периферической крови провели на кроликах. Неоветадин, Биоветадин и Панодин ввели однократно во внутримышечной инъекции в дозе 1,0 мл/кг веса тела. Поливакцин же — в дозе 0,125 мл/кг веса тела и 0,25 мл/кг веса тела. Исследуемые параметры определили через 0, 4, 12, 24, 48 и 72 часа, а затем пятикратно в 3-дневных перерывах и однократно — через неделю после введения препаратов. Исследования показали, что Поливакцин мите в дозе 0,25 мл/кг веса тела вызывал статистически существенный рост титра фагоцитарного индекса в течение 4—24 ч.ч., числа моноцитов в течение 4 часов — 21 дня, нейтрофильных лейкоцитов — между 4 часами и 21 днем и эозинофильных лейкоцитов — между 9 и 21 днями по его введению. После применения Неоветадина статистически существенный рост фагоцитарного индекса наблюдался между 4 часами и 15 днем, числа моноцитов — между 6—21 днями, в случае же Панодина статистически существенный рост фагоцитарного индекса отмечался между 15—18 днями, а числа моноцитов между 4—24 часами после его введения. У кроликов после однократного внутримышечного введения Биоветадина отмечался лишь статистически существенный рост числа моноцитов в периферической крови между 2 и 15 днями наблюдений.

Gliński Z., Rzedzicki J., Deptuła W. — The influence of some stimulating drugs on the level and activity of phagocytosis by cells of peripheral blood cells.

The examinations on the influence of „Neowetadina”, „Biowetadina”, „Panodina” and „Poliwalkyna mite” on phagocytic index, the number of monocytes, neutral-and-acid granulocytes of the peripheral blood were carried out on rabbits. Neowetadina, Biowetadina and Panodina were given once in the form of intramuscular injection at the dose of 1.0 ml/kg of body weight. Poliwalkyna was applied at the dose of 0.125 ml/kg and 0.25 ml/kg of body weight. The above parameters were determined after 0, 4, 12, 24, 48 and 72 hrs, afterwards 5 times every 3 days and later once every week after the drug application. The findings indicated that Poliwalkyna mite at the dose of 0.25 ml/kg caused a significant statistically increase of phagocytic index within 4—24 hours, an increase of monocytes and neutral granulocytes between 4 and 21 days, and acidophilic granulocytes between 9 and 21 days. Neowetadina brought about a statistically significant augmentation of phagocytic index between 4 hours and 15 days and the number of monocytes between 6—21 days. In case of Panodina a significant rise of phagocytic index took place between 15—18 days, and regarding the number of monocytes between 4—24 hours since its injection. In rabbits after a single intramuscular injection of Biowetadina only a significant statistically increase of monocytes was noticed in the peripheral blood between 2 and 15 days of observation.