

WIESŁAW KRUMRYCH, EUGENIUSZ WIŚNIEWSKI, JANUSZ DANEK

# Wpływ lipopolisacharydu na aktywność fagocytarną neutrofilów koni

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

## Summary

The effect of lipopolysaccharide on the phagocytic activity of neutrophilic granulocytes in horses

The examinations were done on 7 healthy Polish ponies from 1.5 to 14 years of age. The experimental animals were intravenously injected *Escherichia coli* LPS at a dose of 0.1 µg/kg b.w. Clinical observations and blood collection for laboratory examinations from the external neck vein were done just before endotoxin injection and then for 8 hours at one hour intervals and after 24, 48, 72 and 96 hr. from endotoxin application. All horses were examined routinely clinically (rectal temperature, pulse, respiration rate) and hematologically (total number of leukocytes, differential leukocyte count). Phagocytic activity of neutrophilic granulocytes was evaluated on the basis of the percentage of phagocytic cells (KF) and the phagocytic index (IF) using a standard *Staphylococcus aureus* strain. Moreover, the nitrotriazolium blue reduction test (NBT) was done by a microquantity method. Clinical observations and hematological examinations in the experimental animals were typical for endotoxemia of horses. It was also found that LPS of *E. coli* at the administered dose stimulates unspecific immunity because it increases the value of KF, IF and NBT during the whole period of experimentation.

Większość bakterii gramujemnych, stanowiąc przyczynę wielu chorób ludzi i zwierząt, posiada w swej ścianie komórkowej lipopolisacharydy (LPS), które uwalniają się podczas lizy komórki bakteryjnej. Te toksyczne heteropolimery, dzięki zewnętrznej lokalizacji, uczestniczą w interakcjach komórki ze środowiskiem, w tym także z układem immunologicznym. Lipopolisacharydy są bardzo silnymi stymulatorami wielu humoralnych i komórkowych reakcji odpornościowych organizmu. Stwierdzono bowiem, że pobudzają syntezę i uwalnianie szeregu mediatorów, takich jak: interleukina 1 (IL-1), czynnik nekrotyzujący nowotwory (TNF-α), czynnik aktywujący płytki krwi – PAF (11, 12, 14, 19). W wyniku ich działania następuje m.in. aktywacja spoczynkowych komórek T (17), pobudzenie limfocytów B do proliferacji i różnicowania (1), wzrost syntezy białek ostrej fazy (11, 23), zwiększenie aktywności fagocytarnej komórek żernych oraz wytwarzania czynników chemotaktycznych (10).

Wyniki wielu badań wskazują, że konie są gatunkiem szczególnie wrażliwym na działanie endotoksyn (2, 4, 21). Udział LPS w wickłaniu chorób morzyskowych, stanów zapalnych jelit i macicy, a także w patogenezie ochwatu toksycznego oraz we wstrząsie septycznym zo-

stał w pełni udowodniony (3, 5, 15, 16, 18). Pomimo dużego znaczenia lipopolisacharydów w schorzeniach koni, stosunkowo niewiele prac dotyczy tych zagadnień, a szczególnie mało jest ich w piśmiennictwie krajowym. W Polsce większość dotychczas prowadzonych badań dotyczyła problemów klinicznych, hematologicznych i biochemicznych w endotoksemii koni (24-26), natomiast nie ukazała się żadna praca dotycząca wpływu LPS na układ odpornościowy koni. Stało się to przyczynkiem do podjęcia badań nad oceną wpływu LPS na kształtowanie się wybranych wskaźników odporności komórkowej u koni.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 7 klinicznie zdrowych klaczach rasy konik polski w wieku od 1,5 do 14 lat. Do badań użyto liofilizowaną endotoksynę *Escherichia coli* (Kroeger O8), wyprodukowaną przez Krakowską Wytwórnę Surowic i Szczepionek pod nazwą „Pyrogen Standard”. Po rozpuszczeniu w apirogennym, izotonicznym roztworze chlorku sodowego, endotoksynę tę podano 5 koniom doświadczalnym w jednokrotnym wlewie dożylnym w ustalonej przez Wiśniewskiego (25), bezpiecznej dla życia koni dawce 0,1 µg/kg m.c.

Badania kliniczne oraz pobieranie krwi z żyły szyjnej zewnętrznej wykonywano bezpośrednio przed podaniem LPS, a następnie przez kolejnych 8 godzin od wlewu w odstępach 1-godzinnych oraz po 24, 48, 72 i 96 godzinach. Analogicznemu cyklowi badań (bez iniekcji endotoksyny) podlegały 2 zwierzęta kontrolne. Rutynowe badania kliniczne objęły pomiar temperatury rektalnej oraz liczbę tętna i oddechów.

W badaniach hematologicznych określono liczbę krwinek białych (WBC) przy użyciu analizatora ZH 82M2 oraz przeprowadzono ocenę obrazu białokrwińkowego wg Arnetha-Schillinga.

W pełnej krwi żyłnej, pobranej do plastikowej probówki z heparyną (10 j./ml), oznaczono wskaźniki aktywności fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych. Objęły one ocenę zdolności tych krwinek do pochłaniania standardowego szczepu *Staphylococcus aureus* wg Wiśniewskiego i wsp. (27). W rozmazach oglądanych pod imersją określono udział komórek fagocytujących (KF) oraz wartości indeksu fagocytarnego (IF), który przedstawia średnią liczbę bakterii wchłoniętych przez jeden granulocyt. Wyniki obu wskaźników uzyskano oglądając 200 granulocytów obojętnochłonnych w każdym rozmazie.

Wykonano ponadto metodą mikroilościową test redukcji błękitu nitrotriazolowego (NBT) przez komórki żerne wg Ramana i Polanda (20). Wyniki przedstawiono w postaci pomiaru gęstości optycznej (OD), odczytanej przy długości fali światła wynoszącej 546 nm, zredukowanego NBT (formazanu) przez  $10^6$  granulocytów obojętnochłonnych. Następnie wyliczono wartości indeksu stymulacji (SI) redukcji NBT spowodowany iniekcją LPS, korzystając ze wzoru (9):

$$SI (\%) = \frac{OD \text{ stymul.}}{OD \text{ spont.}} \times 100$$

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta przy  $p \leq 0,05$  i przedstawiono w formie tabel.

Tab. 1. Wyniki podstawowych badań klinicznych i hematologicznych u koni doświadczalnych (n=5) po dożylnym wlewie 0,1 µg/kg m.c. LPS *E. coli* ( $\bar{x} \pm s$ )

Czas (h)	Badania kliniczne			Oznaczenia hematologiczne		
	Temp. rekt. (°C)	Tętno (/min.)	Oddechy (/min.)	WBC ( $\times 10^9/l$ )	Limfocyty ( $\times 10^9/l$ )	G. obojętnochł. ( $\times 10^9/l$ )
0	37,50 ± 0,43	38,40 ± 3,29	18,40 ± 1,67	8,94 ± 1,53	4,59 ± 1,55	4,02 ± 1,04
1	37,88 ± 0,29	46,40* ± 6,07	22,40* ± 2,19	4,58* ± 1,90	3,93 ± 1,75	0,47* ± 0,13
2	37,88 ± 0,43	52,00* ± 2,83	26,00* ± 2,00	3,86* ± 1,09	3,03 ± 0,84	0,74* ± 0,25
3	38,02 ± 0,36	49,20* ± 4,82	24,00* ± 2,83	3,78* ± 1,10	2,60 ± 0,79	1,06* ± 0,38
4	38,34* ± 0,39	48,00* ± 8,48	26,00* ± 4,00	3,80* ± 1,51	2,05* ± 0,90	1,66* ± 0,77
5	38,48* ± 0,29	41,20 ± 6,57	22,00 ± 4,00	4,08* ± 1,49	1,73* ± 0,50	2,28 ± 1,15
6	38,44* ± 0,42	38,80 ± 5,21	21,20 ± 2,68	5,06* ± 1,78	1,62* ± 0,64	3,23 ± 1,10
7	38,44* ± 0,41	40,80 ± 4,38	21,60* ± 2,19	5,98* ± 1,69	1,64* ± 0,38	4,20 ± 1,43
8	38,44* ± 0,44	38,00 ± 2,00	18,80 ± 1,79	7,38 ± 1,51	1,77* ± 0,40	5,53 ± 1,26
24	37,64 ± 0,30	41,60 ± 3,58	20,40 ± 2,97	13,60* ± 2,51	4,95 ± 3,14	8,32* ± 2,03
48	37,54 ± 0,18	38,40 ± 1,67	20,40 ± 2,61	13,70* ± 2,12	5,30 ± 2,71	8,03* ± 1,48
72	37,58 ± 0,19	40,40 ± 2,61	19,60 ± 0,89	10,52 ± 3,06	4,71 ± 2,73	5,46 ± 1,76
96	37,66 ± 0,17	38,80 ± 1,79	19,20 ± 1,09	9,00 ± 2,96	4,36 ± 2,43	4,32 ± 1,04

Objaśnienie: \* – różnica statystycznie istotna przy  $p \leq 0,05$ .

### Wyniki i omówienie

Wyniki badań klinicznych oraz oznaczeń hematologicznych u koni doświadczalnych zestawiono w tab. 1. Stwierdzono, że przed podaniem endotoksyny (godz. „0”) oraz w całym przebiegu badań zwierzęta kontrolne nie wykazywały odchyżeń od ogólnie przyjętych norm dla koni zdrowych. Po wlewie 0,1 µg/kg m.c. LPS *E. coli* zarejestrowano wzrost temperatury rektalnej już w pierwszej godzinie, przy czym był on statystycznie istotny w okresie od 4 do 8 godzin. Po 24 godzinach nastąpiło obniżenie temperatury do stanu wyjściowego. Podanie endotoksyny spowodowało także przyspieszenie tętna i oddechów, które utrzymywało się przez 4 godziny. Znaczący wzrost liczby oddechów odnotowano także po 7 godzinach.

Przedstawionym badaniom klinicznym towarzyszył początkowo niepokój koni, dreszcze, oddawanie luźnego kału. Wraz ze wzrostem gorączki zwierzęta były bardziej apatyczne i nie przyjmowały pokarmu. Zarejestrowane objawy kliniczne były typowe i pokrywały się z wcześniejszymi obserwacjami Wiśniewskiego (24, 25).

Analiza wyników badań hematologicznych wykazała już w godzinę po iniekcji endotoksyny spadek WBC. Wyraźna leukopenia utrzymywała się przez 7 godzin, aby po 24 godzinach przejść w leukocytozę, utrzymującą się do 4 dnia doświadczenia. Przedstawiona odpowiedź leukocytna była efektem zmian zachodzących w składzie krwinek białych. Po podaniu LPS stwierdzono bowiem spadek liczby limfocytów, który utrzymywał się w pierwszym dniu badania. Już w godzinę od wlewu endotoksyny zarejestrowano ponadto najniższą liczbę granulocytów obojętnochłonnych, a następnie tendencję wzrostową liczby tych krwinek. W drugiej i trzeciej dobie wystąpiła wyraźna neutrofilia. Wyniki oznaczeń pozostałych elementów składowych obrazu białokrwińskiego (granulocyty kwaso- i zasadochłonne oraz monocyty) nie wykazały różnic statystycznie istotnych.

Spadek liczby granulocytów obojętnochłonnych w krwi spowodowany jest przyleganiem komórek do śródbłonna naczyń krwionośnych oraz ich migracją do otaczających tkanek i przestrzeni międzykankowych (13) lub też ich zatrzymaniem w drobnych naczyniach (22), co indukowane jest za pośrednictwem TNF- $\alpha$  oraz IL-1 (19). Dopiero w późniejszym okresie dochodzi do uruchomienia rezerw tych krwinek ze szpiku kostnego, a co za tym idzie – leukocytozy. Rezultat badań własnych w zakresie oznaczeń hematologicznych jest zatem typowy i koresponduje z wynikami uzyskanymi przez wielu autorów u koni i innych gatunków zwierząt (5-8, 13, 25, 26).

Wyniki badań najważniejszej funkcji czynnościowej granulocytów obojętnochłonnych, jaką jest fagocytoza, przedstawiono w tab. 2. Po podaniu LPS stwierdzono zwiększenie procentowego udziału komórek fagocytujących (KF), które utrzymywało się w ciągu całego doświadczenia, przy czym na przyjętym poziomie istotności, wzrost ten był istotny w okresie od 5 do 8 godzin oraz po 48, 72 i 96 godzinach. Iniekcja endotoksyny spowodowała także wyraźny wzrost innego wskaźnika aktywności fagocytarnej, jakim jest indeks fagocytarny (IF). Statystycznie istotne zwiększenie wartości tego indeksu zarejestrowano już po godzinie i utrzymywało się ono w przebiegu całego doświadczenia.

W czasie trawienia we wnętrzu granulocyta wzrasta zużycie glukozy i tlenu, produkcja kwasu mlekowego,  $H_2O_2$  oraz przyspiesza się fosforylacja glukozy i tworzenie  $CO_2$ . Wszystkie te zjawiska metaboliczne powodują wzrost aktywności oksydazy NADH-zależnej i mają ścisły związek z cyklem glutationu (22). Warunkiem prawidłowego zniszczenia bakterii jest zatem pobudzenie metabolizmu energetycznego komórki. Pośrednią miarą aktywności oksydazy NADH-zależnej jest cytochemiczne badanie redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) do barwnego formazanu. Wyniki przeprowadzonego testu NBT wykazały u koni doświadczalnych już w godzinę

Tab. 2. Średnie wartości oznaczonych wskaźników aktywności fagocytarnej u koni doświadczalnych (n = 5) po dożylnym wlewie 0,1 µg/kg m.c. lipopolisacharydu *E. coli* ( $\bar{x} \pm s$ )

Czas (h)	Udział kom. fagocyt. – KF (%)	Indeks fagocyt. – IF	Test NBT (OD/10 <sup>6</sup> kom. fagocyt.)	Indeks stymul. red. NBT – SI (%)
0	86,00 ± 4,00	13,42 ± 2,99	0,10 ± 0,03	100,00 ± 0,00
1	90,00 ± 4,00	21,69* ± 3,99	0,85* ± 0,17	879,86* ± 287,29
2	89,60 ± 4,56	22,28* ± 6,62	0,66* ± 0,24	690,39* ± 330,56
3	91,60 ± 3,29	19,52* ± 4,04	0,36* ± 0,16	352,64* ± 161,23
4	91,60 ± 4,34	23,17* ± 5,23	0,32* ± 0,12	328,58* ± 153,52
5	92,00* ± 2,83	22,44* ± 3,98	0,18 ± 0,08	179,83 ± 84,22
6	92,80* ± 2,68	24,69* ± 3,61	0,13 ± 0,05	130,03 ± 59,14
7	93,20* ± 2,28	22,96* ± 5,79	0,09 ± 0,03	93,89 ± 31,33
8	91,60* ± 1,67	23,99* ± 3,34	0,10 ± 0,03	103,86 ± 33,24
24	91,20 ± 3,03	24,72* ± 6,04	0,06 ± 0,02	59,44* ± 33,43
48	92,40* ± 2,97	24,60* ± 6,38	0,05 ± 0,02	54,78* ± 21,55
72	92,40* ± 3,29	22,92* ± 5,06	0,05* ± 0,01	54,72* ± 22,26
96	93,20* ± 2,28	24,16* ± 4,33	0,06* ± 0,01	62,42* ± 21,73

Objaśnienie: \* – jak w tab. 1.

po wlewie LPS statystycznie istotny wzrost redukcji NBT, wyrażający się zwiększeniem gęstości optycznej (OD). Stan ten utrzymywał się do 4 godziny i po okresie względnej stabilizacji następował spadek redukcji NBT w 2-5 dobie. Obliczony indeks stymulacji (SI) redukcji NBT, spowodowanej dożylnym wlewie endotoksyny, wykazał także bardzo wyraźne (niemal 9-krotne w 1 godzinie) pobudzenie granulocytów obojętnochłonnych, które trwało przez 4-5 godzin. W kolejnych dniach badania stwierdzono utrzymujący się spadek SI o około połowę w stosunku do wartości początkowej.

Obniżenie aktywności metabolicznej granulocytów obojętnochłonnych, obserwowane w teście NBT (OD, SI), począwszy od 2 doby badań, przypuszczalnie związane jest z uwolnieniem do krwiobiegu, w następstwie gwałtownej mobilizacji, komórek niedojrzałych i (lub) niezdolnych do niszczenia czynnika patogenego. Zdaje się wskazywać na to zarejestrowany w badaniach wzrost ogólnej liczby krwinek białych oraz granulocytów obojętnochłonnych w tym okresie. Interpretacja procesów metabolicznych określanych metodą mikroilościową NBT wymaga zatem równoczesnego uwzględnienia oceny WBC oraz granulocytów obojętnochłonnych.

W podsumowaniu wyników przedstawionych badań należy stwierdzić, że jednorazowe, dożylnie podanie LPS *E. coli* w dawce 0,1 µg/kg m.c. powoduje znaczący wzrost procentowego udziału komórek fagocytujących oraz zwiększenie indeksu fagocyтарnego i redukcji NBT. Badania te dowodzą, że lipopolisacharydy także u koni stymulują aktywność fagocyтарną granulocytów obojętnochłonnych. Uzyskane wyniki w pełni odzwierciedlają reakcje obronne organizmu. Stwierdzono ponadto, że zastosowane metody oznaczania aktywności fagocyтарnej mogą być przydatne w ocenie stanu odporności komórkowej koni.

#### Piśmiennictwo

1. Andersson J., Sjöberg D., Möller G.: Eur. J. Immunol. 2, 349, 1972.
2. Bottoms G. D., Fessler J. F., Roessel O. F., Moore A. B., Frauenfelder H. C.: Am. J. vet. Res. 42, 1514, 1981.
3. Burrows G. E.: Am. J. vet. Res. 31, 1975, 1970.
4. Burrows G. E.: Am. J. vet. Res. 40, 991, 1979.
5. Carroll E. J., Schalm O. W., Wheat J. D.: J. Am. vet. med. Ass. 146, 1300, 1965.
6. Cakala S.: Bull. vet. Inst. Puławy 9, 111, 1965.
7. Deldar A., Naylor J. M., Bloom J. C.: Am. J. vet. Res. 45, 670, 1984.
8. Frauenfelder H. C., Fessler J. F., Moore A. B., Bottoms G. D.: Am. J. vet. Res. 43, 405, 1982.
9. Frymus T., Degórski A., Kowalski B., Crisman M.: Zentbl. Vet. Med. B 32, 280, 1985.
10. Gloode M., Jacques A., Morgenhagen S. E., Rosentreich D. L.: J. Immunol. 119, 162, 1977.
11. Green E. M., Adams H. R.: J. Am. vet. med. Ass. 200, 1834, 1992.
12. Izdebska-Szymona K., Sitnicka E.: Post. Hig. Med. Dośw. 41, 211, 1987.
13. Jain N. C., Lasmanis J.: Res. vet. Sci. 24, 386, 1978.
14. Kondracki M., Bieniek K., Kandefer-Szerszeń M., Szuster-Ciesielska A.: Immunol. Pol. 20, 242, 1995.
15. Koterba A. M., Brewer B. D., Tarplee F. A.: Equine vet. J. 16, 376, 1984.
16. Meyers K., Reed S., Keck M., Clem M., Baylay W.: Am. J., vet. Res. 43, 2233, 1982.
17. Milner E. C. B., Rudbach J. A., Von Eschen K. B.: Scand. J. Immunol. 18, 21, 1983.
18. Moore N. J., Garner H. E., Berg J. N., Sprouse R. F.: Am. J. vet. Res. 40, 722, 1979.
19. Nowicki A., Szwech P.: Immunol. Pol. 19, 263, 1994.
20. Raman U., Poland R. L.: Ped. Res. 9, 334, 1975.
21. Spurlock G. H., Landry S. L., Sams R., McGuiirk S., Muir W. W.: Am. J. vet. Res. 46, 1117, 1985.
22. Szmigielski S.: Diagn. Lab. 10, 289, 1974.
23. Walczak M.: Immunol. Pol. 16, 169, 1991.
24. Wiśniewski E.: Medycyna Wet. 40, 658, 1984.
25. Wiśniewski E.: Wpływ endotoksyny *Escherichia coli* na podstawowe parametry kliniczne oraz wybrane wskaźniki hematologiczne i biochemiczne krwi koni. Praca hab. Inst. Wet. Puławy 1987.
26. Wiśniewski E., Krumrych W.: Medycyna Wet. 41, 483, 1985.
27. Wiśniewski J., Romaniukowa K., Grajewski H.: Bull. vet. Inst. Puławy 9, 140, 1965.

Adres autora: dr Wiesław Krumrych, ul. Juhasów 4/14, 85-792 Bydgoszcz