

PHOCAS MUKEZAMFURA, MARTA FIOŁKA, PRZEMYSŁAW ZIĘBA, TADEUSZ STUDZIŃSKI

Wpływ Lydium KLP i LPS na regulację temperatury oraz odpowiedź humoralną u królików

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Summary

The influence of KLP and LPS on temperature regulation and on the humoral immune response of rabbits

Lydium KLP (dimer lysozyme) used in veterinary practice as an immunostimulator has different effects of action on humoral immunity of rabbits compared with endotoxin (LPS) activity. *E. coli* endotoxin (Kroeger O8) given intravenously induced humoral immunity in rabbits after its first injection while the first administration of Lydium KLP hardly stimulated humoral immunity in comparison to the second dose. LPS is commonly regarded as a pyrogen while Lydium KLP is not. The results obtained indicate different effects of Lydium KLP and LPS on antibody production and on temperature release.

Endotoksyna jest lipopolisacharydowym (LPS) składnikiem ścian bakterii Gram-ujemnych (3, 24). Jej cząsteczka składa się z lipidu A, odpowiedzialnego za właściwości toksyczne i immunostymulacyjne, wielocukrowej części rdzeniowej i łańcucha O zbudowanego z podjednostek cukrowych, warunkującego swoistość antygenową (3, 12, 26). W warunkach naturalnych endotoksyna jest uwalniana dopiero po uszkodzeniu bakterii, a także w fazie szybkiego ich wzrostu (3). Wybitne właściwości pirogenne i immunostymulacyjne LPS wykorzystywane są w badaniach nad gorączką, która wzbudziła w ostatnich latach szerokie zainteresowanie fizjologów jak również klinicystów (11, 12, 23).

LPS po przedostaniu się do organizmu łączy się z białkiem wiążącym lipopolisacharyd (LBP – Lipopolisaccharide Binding Protein), a kompleks ten wychwytywany jest następnie przez receptory CD14 makrofagów, co indukuje z kolei wytwarzanie cytokin, takich jak interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworów (TNF – Tumor Necrosis Factor), interferony (IFN), które pełnią funkcje pirogenów endogennych (1, 3, 11, 26). Przyjmuje się, że cytokiny te przechodzą barierę krew-mózg na wysokości organu naczyńowego blaszki końcowej (O.V.L.T. – *Organum Vasculosum Laminae Terminalis*) i indukują wytwarzanie PGE₂ w podwzgórzu, która powoduje przestawienie termostatu fizjologicznego termowrażliwych neuronów na wyższy, czyli gorączkowy poziom termoregulacji (3, 11, 25).

Kilkakrotne podawanie małych dawek endotoksyny prowadzi do wytworzenia tolerancji w organizmie, a po krótkim czasie przerwy występuje zjawisko nadwrażli-

wości (12, 28). Dawka, która wywołuje umiarkowaną gorączkę, wywołuje wtedy wtórnie, w stanie nadwrażliwości, wysoką gorączkę z ciężkimi objawami ogólnego szoku, mogącego prowadzić do zejścia śmiertelnego (1, 6, 13).

Celem badań było porównanie właściwości immunostymulujących LPS i Lydium KLP (dimer lizozymu) na wytwarzanie przeciwciał oraz ich wpływ na wyzwalanie gorączki i regulację temperatury.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 20 królikach o masie ciała ok. 3 kg, rasy mieszanej płci męskiej. Króliki karmiono standardową paszą LSK z Wytwórni Pasz w Motyczu k. Lublina. Pasza i woda były podawane *ad libitum*. Króliki podzielono na 5 grup po 4 sztuki. Doświadczenia rozpoczęto po dwóch tygodniach aklimatyzacji. Otrzymane wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy pomocy testu t-Studenta.

Użyto do badań endotoksyny produkowanej ze szczepu *E. coli* Kroeger O8 przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek w Krakowie, którą podawano dożylnie królikom w dawce 15 mg/kg m.c., zaś Lydium KLP (Nika Health Products) w dawce 0,02 mg/kg m.c. również dożylnie.

Przed podaniem Lydium KLP i LPS, mierzono temperaturę rektalną, pobierano krew do badań i mierzono ponownie temperaturę rektalną po upływie 2, 3, 48 i 72 godzin od podania.

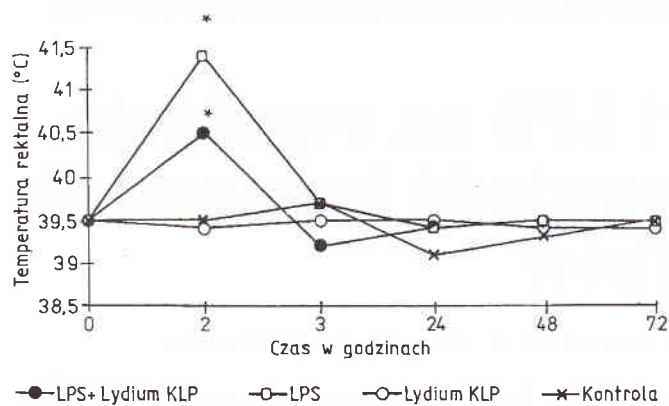
Badania hematologiczne królików prowadzono przez trzy kolejne dni, obliczając liczbę erytrocytów i leukocytów oraz analizując różnicowy obraz krwinek białych. Odporność humoralna swoista była badana według metody hemaglutynacji aktywnej (18), przy wykorzystywaniu jako kontroli dodatniej, króliczej surowicy hemolitycznej wobec erytrocytów barana o mianie 3200 pochodzącej z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Krakowie (18).

Pierwszego dnia wszystkie króliki, oprócz grupy kontrolnej 5, otrzymały domięśniowo 0,5 ml 50% zawiesiny erytrocytów barana w płynie fizjologicznym. Przed sporządzeniem tej zawiesiny, erytrocyty barana przepłukiwano trzykrotnie w płynie fizjologicznym w celu usunięcia przeciwciał i antygenów powierzchniowych. Miano przeciwciał hemaglutynujących określano jeden raz w tygodniu przez cały okres 8 tygodni badania.

Dnia 28-go królikom powtórnie podano domięśniowo erytrocyty barana. Grupa 1 otrzymała dodatkowo Lydium KLP razem z LPS, a grupa 2 wyłącznie LPS, zaś grupa 3 wyłącznie Lydium KLP.

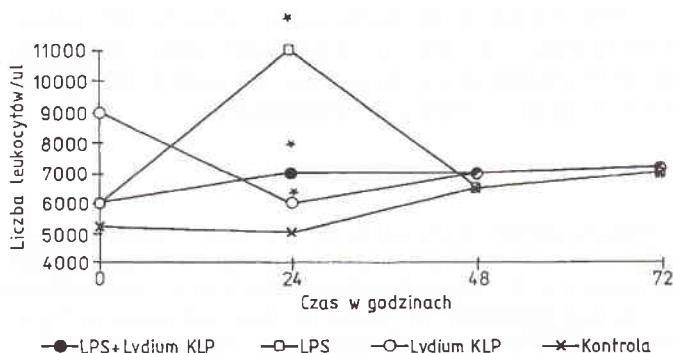
Wyniki i omówienie

Króliki otrzymujące LPS, wykazywały najwyższy wzrost temperatury rektalnej, która wynosiła 41,4°C (ryc. 1). Podanie królikom LPS wraz z Lydium KLP powodowało również wzrost temperatury rektalnej, który był jednak mniejszy o ok.



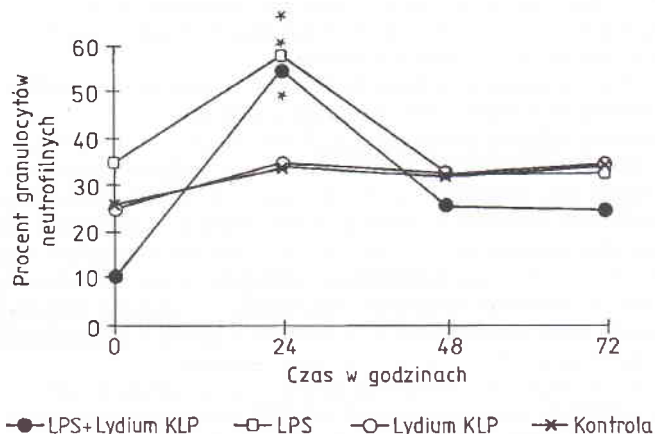
Ryc. 1. Temperatura rektalna u królików otrzymujących dożylnie LPS, Lydium KLP oraz LPS wraz z Lydium KLP

* Różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$)



Ryc. 2. Liczba leukocytów we krwi królików otrzymujących dożylnie LPS, Lydium KLP oraz LPS wraz z Lydium KLP

* Różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$)



Ryc. 3. Procent granulocytów neutrofilnych we krwi królików otrzymujących dożylnie LPS, Lydium KLP oraz LPS wraz z Lydium KLP

* Różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$)

1,0°C (40,5°C) (ryc. 1). Samo Lydium KLP nie powodowało wzrostu temperatury rektalnej u królików grupy 3 (ryc. 1).

Wyłączne podanie LPS królikom (grupa 2) powodowało znaczne podwyższenie liczby leukocytów we krwi w czasie 24 godzin od iniekcji i spadek po kolejnych 24 godz. do wartości wyjściowych i kontrolnych (ryc. 2). Łączne podanie LPS z Lydium KLP powodowało nieznaczne podwyższenie liczby leukocytów po 24 godzinach od czasu iniekcji (ryc. 2). Podanie Lydium KLP powodowało spadek ogólnej liczby leukocytów po 24 godzinach, a następnie powolny powrót do wartości wyjściowych (ryc. 2). Notowano przejściowy wzrost

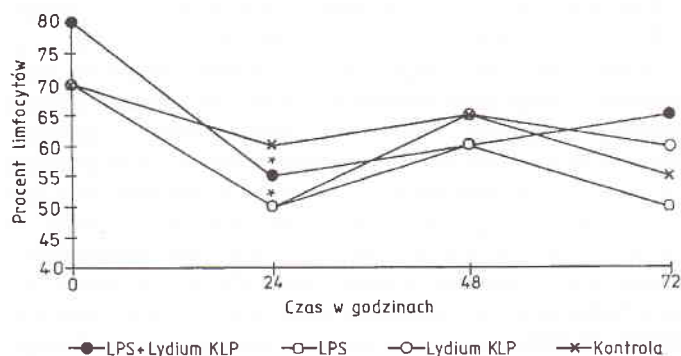
procentu granulocytów neutrofilnych po 24 godzinach u królików grupy 1, którym podano LPS z Lydium KLP oraz u królików grupy 2, które otrzymały wyłącznie LPS (ryc. 3). Po 48 godz. wartości te powracały do wyjściowego poziomu w obydwu tych grupach (ryc. 3). LPS i Lydium KLP nie miały istotnego wpływu na liczbę granulocytów kwasochłonnych. Stwierdzono natomiast wyraźny spadek procentu limfocytów po podaniu LPS z Lydium KLP (gr. 1).

Hemaglutynacja aktywna

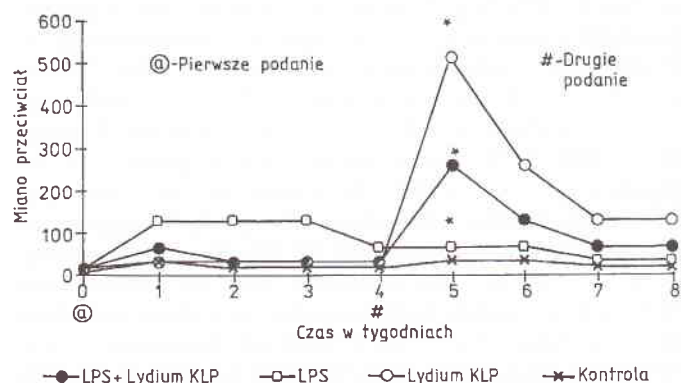
Lydium KLP podawane pierwszy raz łącznie z LPS stymulowało odpowiedź humoralną w sposób mniejszy od stymulacji przez sam LPS i większy od stymulacji przez Lydium KLP. Stymulacja była większa po drugim podaniu ale była dalej mniejsza od stymulacji po LPS. Po pierwszym podaniu LPS wyraźnie stymulował odpowiedź humoralną w porównaniu z grupą kontrolną, ale nie miał wpływu na odpowiedź humoralną po powtórным podaniu. Króliki grupy kontrolnej wykazywały miano 32, a grupy otrzymującej LPS 128. Mimo, że LPS nie stymulował odpowiedzi humoralnej po powtórным podaniu, miano przeciwciał było jednak dwa razy większe od miana grupy kontrolnej (ryc. 5).

Po pierwszym podaniu Lydium KLP wykazywał stymulacyjny wpływ na odpowiedź humoralną, miano przeciwciał było dwa razy większe od miana grupy kontrolnej. Rola stymulacyjna po powtórным podaniu Lydium KLP była zdecydowanie zwiększona. Trzy tygodnie po ponownym podaniu Lydium KLP, kiedy miano przeciwciał ustabilizowało się, miano grupy Lydium KLP wynosiło 128, a grupy kontrolnej 16.

Wyniki Garbulińskiego (7) i Kiczki (15), wykazały, że dimer lizozymu jakim jest Lydium KLP, charakteryzuje się niską toksycznością i wyzwała większe efekty immunosty-



Ryc. 4. Procent limfocytów we krwi królików otrzymujących LPS, Lydium KLP oraz LPS wraz z Lydium KLP



Ryc. 5. Miano przeciwciał hemaglutynujących we krwi królików otrzymujących LPS, Lydium KLP oraz LPS wraz z Lydium KLP

* Różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$)

mulacyjne *in vivo* w porównaniu z monomerem lizozymu, który występuje naturalnie w tej formie (7, 15). W warunkach fizjologicznych jednak wiele związków jest aktywnych dopiero pod postacią dimerów lub polimerów. Na przykład IgA występuje zarówno jako dimer, jak też jako trimer, a IgM występuje jako pentamer; dimerem jest także ludzka interleukina-5 (IL-5), natomiast czynnik nekrotyzujący nowotworów (TNF – Tumor Necrosis Factor) występuje jako trimer i prawdopodobnie jako dimer (7, 15).

LPS należy do antygenów grasicznie niezależnych, posiadających cechy poliklonalnych aktywatorów limfocytów B i stymulujących odpowiedzi immunologiczne nawet u noworodków mysich, u których reaktywność immunologiczna nie jest jeszcze rozwinięta (13). Badania własne przeprowadzone na królikach wykazały, że LPS stymuluje odpowiedź humoralną po pierwszym podaniu i nie wpływa na odpowiedź humoralną po powtórznym podaniu. Stanowi to potwierdzenie badań Lewisa (19) w których stymulowano *in vitro* monocyty do wytwarzania lizozymu. Do stymulacji monocytów Lewis używał LPS, TNF a i IFN γ . Stymulowane monocyty wytwarzały lizozym, a kiedy stymulacja trwała dłużej, tzn. od 3 do 7 dni, w przypadku LPS i IFN γ monocyty nie wytwarzały lizozymu (19). Wiadomo jak interferony działają na komórki – po przyłączeniu do receptora komórkowego, IFN jest wciągany do cytoplazmy razem z receptorem, który zostaje następnie strawiony. W takiej sytuacji nie ma już dostępnych receptorów komórkowych, a komórka staje się wtedy niewrażliwa na IFN. Żeby odzyskać wrażliwość na IFN, komórka musi znów wytworzyć receptory. Dotychczas nie wyjaśniono dlaczego LPS stymuluje odpowiedź humoralną po pierwszym podaniu a nie po drugim. Fakt ten nie może być tłumaczony przyspieszonym usunięciem LPS z organizmu w okresie tolerancji ponieważ *in vitro*, gdzie nie ma możliwości usunięcia LPS, ta tolerancja występuje także (13, 16).

Lydium KLP stymuluje odporność bez wyzwolenia gorączki. Natomiast LPS wywołuje gorączkę, mimo że podnosi ona odporność organizmu na infekcje, ma jednak negatywne oddziaływanie, gdyż wywołuje złe samopoczucie, brak łaknienia, osowiałość, sennaść, utratę masy ciała wynikającą zarówno ze zmniejszenia masy mięśniowej jak i odwapnienia kości (6) oraz zmniejszonego przyjmowania pokarmu (16, 26). Wyniki stosowania terapeutycznego LPS produkowanego z *E. coli* jako immunostymulatora nie uzyskały jednoznacznych ocen z powodu zróżnicowania wrażliwości gatunkowej i osobniczej (1, 8).

U różnych gatunków zwierząt, wrażliwość na LPS jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia rozwoju filogenetycznego, a w obrębie tego samego gatunku, istnieje dalsze zróżnicowanie tej wrażliwości (1).

Stwierdzone w przeprowadzonych badaniach na królikach zróżnicowane efekty immunostymulacyjnego i gorączkowego działania Lydium KLP i LPS z *E. coli*, wymagają dalszych badań z uwzględnieniem innych dodatkowych wskaźników odporności zarówno u królików jak i innych gatunków zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Berczi I., Bertók L., Bereznai T.: Can J. Microb. 12, 1070, 1966.
2. Beutler B., Milsark F. W., Cerami A. C.: Sci. 229, 888, 1985.
3. Bieniek K.: Medycyna Wet. 50, 147, 1994.
4. Bull D. F., Brown R., King M. G., Husband A. G.: Physiol. Behav. 49, 1229, 1991.
5. Casey L. C., Balk R. A., Roger C.: An. Int. Med. 119, 771, 1993.
6. Cook M. E., Miller C. C., Park Y., Pariza M.: Sci. 72, 1301, 1993.
7. Garbulinski T.: Życie wet. 69, 17, 1994.
8. Goldstein J., Hoffman T., Golding i wsp.: Inf. Immunol. 60, 1385, 1992.
9. Hellerstein M. K., Mejdani S. K., Ken Wu, Dinarello C.: Am. Soc. Clin. Invest. 84, 228, 1989.
10. Herring B., Herion J. C., Walker R. I., Palmer J. C.: J. Microb. Inf. 42, 79, 1963.
11. Iriki M.: Jap. J. Physiol. 38, 2533, 1988.
12. Jachymek W.: Post. Hig. 49, 171, 1995.
13. Jakóbsiak M.: Immunologia PWN, Warszawa 1, 32, 1995.
14. Kawasaki H., Moriyana M. i wsp.: Inf. Immun. 55, 2574, 1987.
15. Kiczka W.: Życie wet. 69, 5, 1994.
16. Kluger J.: Physiol. Rev. 71, 93, 1991.
17. Kozak W.: Post. Hig. 46, 67, 1992.
18. Letourneur Ph.: Immunologie Générale Masson, Paris 1982.
19. Levis C. E., Mc Carthy S. P., Lorenzen J., Mc Gee O'D. J.: Immun. 69, 402, 1992.
20. Mandrup Paulsen T., Bendtzen K., Dinarello C. A., Narup J.: J. Immun. 138, 4077, 1987.
21. Masiulanis J., Mukezamfura P., Zipser J., Studziński T.: Annales UMCS Lublin DD 50, 125, 1995.
22. Miert Van A. S. J. P. A. M., Duin Van C. I. M., Wessing T.: J. Vet. Med. A 35, 101, 1988.
23. Nara K., Hodagiri H.: Cancer Immunother. 25, 1226, 1987.
24. Sebbag H.: Rev. Med. Vet. 145, 436, 1994.
25. Stefaniak T., Ługowski C., Chelmońska-Sojta A. S.: Zesz. nauk. AR, Wrocław, Konferencje IV, Nr 250, 1994.
26. Studziński T., Mukezamfura P., Valverde Piedra J. L.: Medycyna Wet. 51, 371, 1995.
27. Waage A., Bakke O.: Immunol. 63, 299, 1988.
28. Whyte R. I., Shaw Warren H. i wsp.: Immunol. 139, 4077, 1987.

Adres autora: lek. wet. Phocas Mukezamfura, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Nowe numery telefonów Redakcji „Medycyny Weterynaryjnej”

W grudniu, przypuszczalnie 1.12.1996 r. zmienione zostaną w Lublinie numery telefonów.

Podajemy zaktualizowane numery Redakcji:

- ☎ Redaktor Naczelny tel/fax – 533-29-12
- ☎ Z-ca Redaktora Naczelnego – 537-68-91
- ☎ Sekretarz Administracyjny – 537-69-00
- ☎ Redakcja – sekretariat – 537-66-76