

BOŻENA OBMIŃSKA-DOMORADZKA, MARCIN ŚWITAŁA, JÓZEF DĘBOWY

# Wpływ wielokrotnego podawania dimeru lizozymu na pierwotną odpowiedź humoralną myszy immunizowanych SRBC

Katedra Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Obmińska-Domoradzka B., Światała M., Dębowy J.

## The effect of lysozyme dimer multiple dose on primary humoral response in SRBC-immunized mice

### Summary

The study aimed at determining the effect of a multiple dose of lysozyme dimer (Lydium-KLP Nika Health Products) on primary humoral response in SRBC – immunized mice. The effects of a single (20 µg/kg) lysozyme dimer administered 2 h prior to antigen injection were compared with those of lysozyme dimer multiple doses (two-four) administered at one week intervals. The results of the study show that lysozyme dimer, irrespective of the number and range of the doses (2, 20 or 200 µg/kg) enhances humoral response to the antigen. The adjuvant action of lysozyme dimer is expressed in the increasing number of splenocytes producing hemolytic antibodies (PFC) and the total and 2-mercaptoethanol resistant level of anti-SRBC hemagglutinins. The strongest activation of the immune response was observed after a single administration and multiple injections at doses of 2 or 20 µg/kg. Three doses of lysozyme dimer (200 µg/kg each) injected at 7-day intervals decreased the number of PFC induced by this drug administered in a single dose of 20 µg/kg 2 h prior to immunization, but maintaining the potentializing impact on anti-SRBC antibody production. The results obtained in the study indicate that multiple doses of lysozyme dimer administered in doses recommended in veterinary practice (2-20 µg/kg), at 7-day intervals do not results in immunological tolerance.

Farmakologiczna modulacja odpowiedzi komórkowej i humoralnej jest obecnie przedmiotem licznych badań eksperymentalnych i klinicznych. W ostatnich latach został wprowadzony do lecznictwa weterynaryjnego nowy preparat o działaniu immunomodulującym Lydium-KLP (Nika Health Products), którego substancją czynną jest wysoce oczyszczony zdimeryzowany lizozym jaja kurzego, otrzymywany przez polimeryzację peptydoglikanu N-acetylmuramylohydrolazy. W badaniach przedklinicznych przeprowadzonych na hodowlach komórek mononuklearnych krwi człowieka stymulowanych *in vitro* konkanawaliną A (Con A) wykazano, że dimer lizozymu w zależności od stężenia wzmacnia wytwarzanie przez te komórki interferonu- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) oraz moduluje syntezę i uwalnianie interleukiny-2 (IL-2), interleukiny-6 (IL-6) i czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) (6). Z kolei w badaniach przeprowadzonych na odsadzonych prosiątach stwierdzono, że jednorazowe podanie dimeru lizozymu w dawce 20 µg/kg powoduje wzrost syntezy i uwalniania przez izolowane z krwi prosiąt komórki mononuklearne takich cytokin jak interleukina-1 (IL-1), IL-2, TNF- $\alpha$  oraz interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (12). W badaniach przeprowadzonych również *in vivo* na myszach immunizowanych antygenem grasiczoza-  
leżnym jakimi są erytrocyty owcy (SRBC) wykazano

potencjalizujące działanie dimeru lizozymu na pierwotną i wtórną odpowiedź humoralną w stosunku do SRBC (9, 10). W badaniach dotyczących wpływu dimeru lizozymu na pierwotną odpowiedź humoralną myszy immunizowanych SRBC wykazano występującą zależność pomiędzy zdolnością potęgowania odpowiedzi na swoisty antygen a wielkością dawki dimeru lizozymu, ilością kolejnych podań, a także momentem podania leku w stosunku do stymulacji antygenem. W badaniach tych stwierdzono, że czterokrotne podanie dimeru lizozymu w dawkach 0,2-20 µg/kg zastosowanych w odstępach 24 godzinnych przed wprowadzeniem antygeny wywiera silniejsze działanie potencjalizujące odpowiedź humoralną wobec SRBC niż jednorazowa iniekcja tego leku w takich samych dawkach. Natomiast czterokrotne podanie dimeru lizozymu w dawce 200 µg/kg nie zmienia wielkości odpowiedzi humoralnej w stosunku do SRBC, ale też nie wywołuje zjawisk o charakterze tolerancji (10). Z kolei w badaniach dotyczących wpływu dimeru lizozymu na wtórną odpowiedź humoralną myszy immunizowanych SRBC stwierdzono przede wszystkim wystąpienie zależności pomiędzy adiuwantowym działaniem leku podanym w najbardziej efektywnej dawce immunostymulującej (20 µg/kg) a momentem podania w stosunku do obu immunizacji (9).

Celem badań było wykazanie czy wcześniejsze (7 lub 21 dni) wielokrotne wprowadzenie dimeru lizozymu w zróżnicowanych dawkach nie zmienia potencjalizującego wpływu jednorazowej dawki tego leku (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) podanej bezpośrednio przed immunizacją SRBC, na swoistą pierwotną odpowiedź humoralną myszy na wprowadzony antygen. Przyjęty układ doświadczalny miał dać odpowiedź na pytanie: czy po stosowaniu dimeru lizozymu nie rozwija się tolerancja na lek.

### Materiał i metody

Badania wykonano na myszach szczepu wosbnego Balb/ć, samcach i samicach, w wieku 8-10 tygodni o wadze 18-20 g pochodzących z licencjonowanej Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Akademii Medycznej we Wrocławiu.

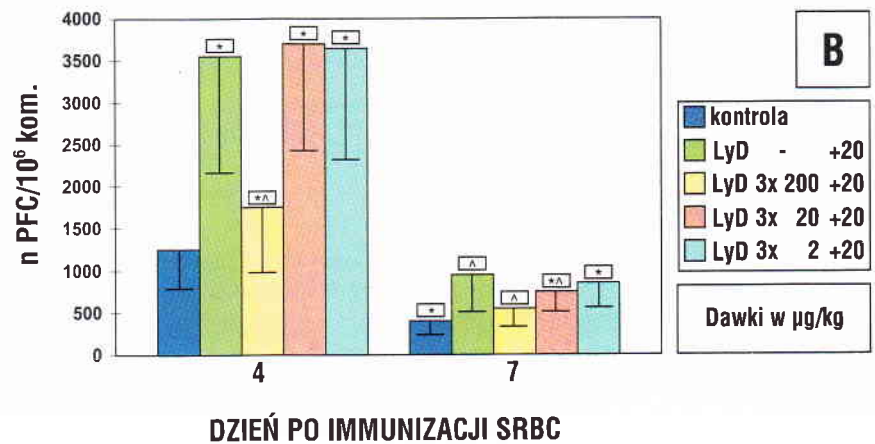
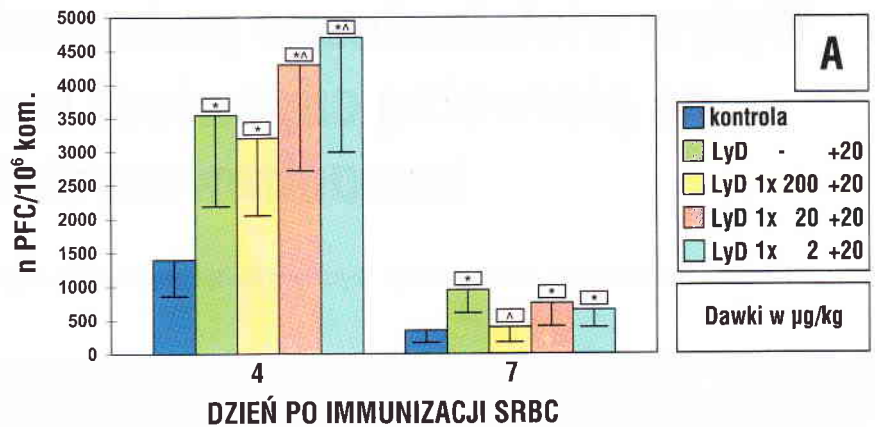
Myszy immunizowano przez dootrzewnowe podanie 0,2 ml 10% zawiesiny erytrocytów owcy (SRBC) w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) tj.  $4 \times 10^8$  erytrocytów/mysz. Do immunizacji myszy używano odpowiednio przygotowanej *ex tempore* zawiesiny SRBC w PBS, które uprzednio pobrano w sposób sterylny do płynu Alsevera i przechowywano w nim co najmniej przez trzy doby w temperaturze 4°C.

Zwierzęta podzielono na 5 grup doświadczalnych – kontrolną i 4 grupy, w których podawano dootrzewnowo dimer lizozymu (Lydium-KLP, Nika Health Products, Szwajcaria seria 644596). We wszystkich czterech grupach podano dimer lizozymu w dawce 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 2 godziny przed immunizacją SRBC. Grupę 1 stanowiły myszy, którym podano dimer lizozymu jedynie w tej dawce. Z kolei w grupach 2, 3 i 4 dimer lizozymu podano również wcześniej tj. jednorazowo 7 dni przed dawką immunostymulującą (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) zastosowaną bezpośrednio przed immunizacją (układ A) lub trzykrotnie w odstępach 7 dniowych (układ B). W obu układach doświadczalnych dimer lizozymu podawano w dawkach 2, 20 lub 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Każda dawka dimeru lizozymu była podana w objętości 0,2 ml. Dla każdego układu doświadczalnego prowadzono badania w grupie kontrolnej, którą stanowiły myszy otrzymujące w miejsce leku sterylny PBS w objętości 0,2 ml/mysz.

Oznaczano ilość splenocytów produkujących przeciwciała anty-SRBC (PFC) we wszystkich grupach układu doświadczalnego A i B po 4 i 7 dni od immunizacji SRBC. Myszy poddane działaniu eteru dwuetylowego zabijano przez przerwanie rdzenia kręgowego. Do sterylnego płynu Hanksa pobierano śledziony. Zawiesinę komórek uzyskanych po przetarciu śledziony przez nylonową siatkę nawarstwiano w stosunku 1:3 na mieszaninę izolacyjną Ficoll

### ŁYSINKI HEMOLITYCZNE (plaque forming cells)

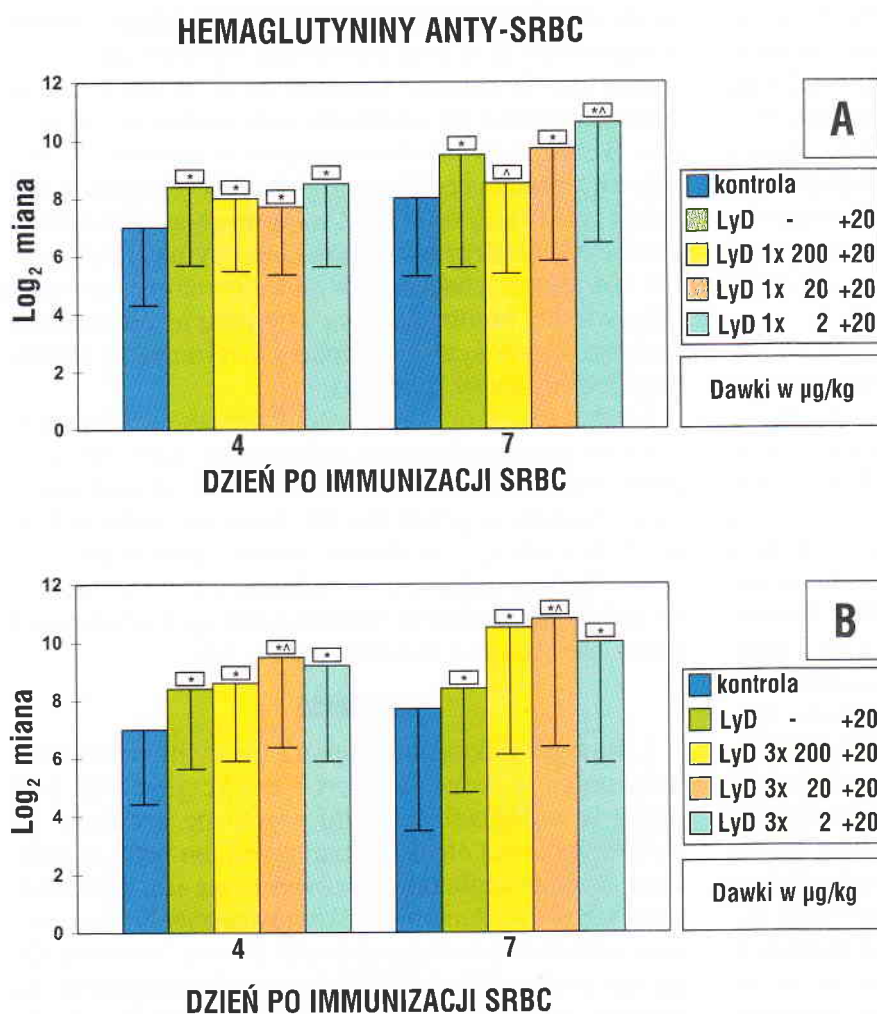


Ryc. 1. Porównanie wpływu jednorazowego i wielokrotnego podania dimeru lizozymu w zależności od wielkości zastosowanej dawki (2-200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) na ilość splenocytów produkujących przeciwciała hemolityczne anty-SRBC (lysinki hemolityczne; PFC)

Objaśnienia: \* zmiana statystycznie istotna przy  $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej, ^ zmiana statystycznie istotna przy  $p < 0,05$  w stosunku do grupy otrzymującej dimer lizozymu jednorazowo bezpośrednio przed immunizacją w dawce 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Każda grupa doświadczalna zawierała 8 myszy.

400/Uropolinum 75% o gęstości 1.071. Po odwirowaniu w temperaturze 4°C zbierano splenocyty z interfazy i płukano dwukrotnie w płynie Hanksa. Następnie splenocyty zawieszano w płynie Hanksa tak, aby w 1 ml było  $1 \times 10^6$  komórek. Oceniano żywotność wyizolowanych splenocytów w mieszaninie przygotowanej *ex tempore* 0,2% błękitu trypanu z 4,25% NaCl w stosunku 4:1. Splenocyty produkujące przeciwciała hemolityczne anty-SRBC oznaczano metodą miejscowej hemolizy w żelu agarowym jako tzw. lysinki hemolityczne (PFC) według Jernego w modyfikacji Mishella i Duttona (7).

Miano hemaglutynin anty-SRBC oznaczano po 4 i 7 dniach od immunizacji SRBC. Krew od myszy znieczulonych eterem dwuetylowym pobierano przez dekapitację. Surowice otrzymane przez odwirowanie uzyskanej krwi. Następnie surowice inaktywowano przez 30 minut w temperaturze 56°C. Oznaczano miano hemaglutynin całkowitych, które odpowiadają klasie IgM przeciwciał oraz opornych na 2-merkaptoetanol odpowiadających klasie IgG



**Ryc. 2.** Porównanie wpływu jednorazowego i wielokrotnego podania dimeru lizozymu w zależności od wielkości zastosowanej dawki (2-200 µg/kg) na produkcję hemaglutynin anti-SRBC

Objaśnienia: \* zmiana statystycznie istotna przy  $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej, ^ zmiana statystycznie istotna przy  $p < 0,05$  w stosunku do grupy otrzymującej dimer lizozymu jednorazowo bezpośrednio przed immunizacją w dawce 20 µg/kg. Każda grupa doświadczalna zawierała 8 myszy.

przeciwciał, według metody hemaglutynacji czynnej przy użyciu mikroptyłek (1).

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta. Na wykresach przedstawiono średnie arytmetyczne otrzymanych wyników i odchylenia standardowe (SD).

### Wyniki i omówienie

Podanie jednorazowe dimeru lizozymu w dawce 20 µg/kg 2 godziny przed immunizacją SRBC potęguje odpowiedź humoralną na wprowadzony antygen, co wyrażone jest wzrostem ilości splenocytów produkujących przeciwciała hemolityczne anti-SRBC (PFC), a także zwiększeniem miana hemaglutynin anti-SRBC całkowitych i opornych na 2-merkaptotoetanol. Potęgujące działanie dimeru lizozymu występuje zarówno w 4 jak i 7 dniu po immunizacji SRBC.

Dimer lizozymu w badanych dawkach (2, 20 i 200 µg/kg) podany jednorazowo 7 dni przed wprowadze-

niem, 2 godziny przed immunizacją SRBC immunostymulującej dawki leku (20 µg/kg) wykazuje zdolność potencjalizacji odpowiedzi humoralnej na podany antygen (układ A). Adiuwantowe działanie leku, zależne od wielkości dawki, wyrażone jest zwiększeniem ilości PFC jak i miana hemaglutynin anti-SRBC całkowitych i opornych na 2-merkaptotoetanol. Dimer lizozymu w dawce 2 lub 20 µg/kg podany jednokrotnie 7 dni przed iniekcją leku w dawce 20 µg/kg wykonaną 2 godziny przed immunizacją istotnie zwiększa ilość PFC w stosunku do grupy myszy, u których zastosowano dimer lizozymu w dawce 20 µg/kg jedynie bezpośrednio przed SRBC. Natomiast podanie dimeru lizozymu w dawce 200 µg/kg 7 dni przed pierwszą iniekcją leku w dawce 20 µg/kg nie zmienia wzrostu ilości PFC wywołanego podaniem dimeru lizozymu bezpośrednio przed immunizacją (ryc. 1). Z kolei nie stwierdzono zmian w potencjalizującym działaniu dimeru lizozymu podanego w dawce 20 lub 200 µg/kg 7 dni przed zastosowaniem immunostymulującej dawki leku (20 µg/kg) na produkcję hemaglutynin anti-SRBC. Natomiast wykazano, że zmniejszenie dawki leku do 2 µg/kg i podanie 7 dni przed immunostymulującą dawką leku (20 µg/kg) zastosowaną bezpośrednio przed SRBC nasila produkcję hemaglutynin anti-SRBC wywołaną podaniem antygeny (ryc. 2).

Dimer lizozymu we wszystkich badanych dawkach (2, 20 i 200 µg/kg) podany trzykrotnie w odstępach 7-

-dniowych myszom immunizowanym SRBC poddanych 2 godziny przed wprowadzeniem antygeny działaniu immunostymulującej dawki leku (20 µg/kg) prowadzi również do nasilenia odpowiedzi humoralnej na SRBC (układ B). Potencjalizujące działanie leku wyrażone jest wzrostem ilości PFC jak również miana hemaglutynin anti-SRBC całkowitych i opornych na 2-merkaptotoetanol.

Efekt działania dimeru lizozymu podanego kilkakrotnie przed immunizacją SRBC zależy od wielkości dawki leku. Podanie trzykrotnie w odstępach 7-dniowych dimeru lizozymu w dawce 20 i 200 µg/kg istotnie obniża wzrost ilości PFC wywołany podaniem leku w dawce 20 µg/kg bezpośrednio przed immunizacją SRBC. Obniżenie ilości PFC w stosunku do grupy myszy, u których podano dimer lizozymu (20 µg/kg) jedynie bezpośrednio przed immunizacją, obserwowano w 4 (dawka 200 µg/kg) i w 7 (dawka 20 i 200 µg/kg) dniu po wprowadzeniu antygeny. Z kolei podanie

trzykrotne w odstępach 7-dniowych dimeru lizozymu w dawce niższej tj. 2 µg/kg nie zmienia stymulującego ilość PFC działania leku podanego w dawce 20 µg/kg bezpośrednio przed SRBC. Natomiast podanie trzykrotne w odstępach 7-dniowych dimeru lizozymu w badanych dawkach (2, 20 i 200 µg/kg) potencjalizuje produkcję hemaglutynin anty-SRBC całkowitych i opornych na 2-merkaptetanol w stosunku do grupy, w której podano dimer lizozymu w dawce 20 µg/kg jedynie bezpośrednio przed SRBC.

W obecnych badaniach przeprowadzonych na myszach immunizowanych antygenem grasiczozależnym (SRBC) wykazano, że dimer lizozymu w zależności od ilości kolejnych podań oraz zastosowanej dawki wzmacnia adiuwantowe działanie wobec SRBC dawki (20 µg/kg), która została podana bezpośrednio przed stymulacją antygenem. Adiuwantowe działanie dimeru lizozymu wyrażone jest spotęgowaniem wzrostu ilości splenocytów produkujących przeciwciała hemolityczne anty-SRBC całkowitych i opornych na 2-merkaptetanol. Najsilniejsze działanie wzmacniające adiuwantowy wpływ wobec SRBC dawki dimeru lizozymu (20 µg/kg) podanej bezpośrednio przed immunizacją obserwowano po jednorazowej iniekcji leku w dawce 2 i 20 µg/kg zastosowanej 7 dni przed pierwszą, immunostymulującą dawką. Zwiększenie dawki dimeru lizozymu do 200 µg/kg podanej trzykrotnie w odstępach 7 dniowych prowadzi do zahamowania potęgującego ilość PFC wpływu immunostymulującej dawki leku (20 µg/kg) zastosowanej bezpośrednio przed stymulacją SRBC, wzmacniając jednak adiuwantowe działanie tej dawki badanego leku na produkcję przeciwciał anty-SRBC. We wcześniej przeprowadzonych badaniach nad adiuwantowym działaniem dimeru lizozymu wobec antygenem grasiczozależnym jakim są erythrocyty owcy wykazano, że lek ten zastosowany w dawce 200 µg/kg jednorazowo lub czterokrotnie w odstępach 24 godzinnych niezależnie od momentu podania w stosunku do SRBC nie zmienia wzrostu ilości PFC i miana swoistych przeciwciał anty-SRBC wywołanego podaniem antygenem (10).

Mechanizm immunostymulującego działania dimeru lizozymu nie jest znany. W obecnie wykonanych badaniach wielkość odpowiedzi humoralnej oznaczano przez określenie ilości PFC, co świadczy o indukcji przez podanie antygenem (SRBC) procesu różnicowania limfocytów B w komórki plazmatyczne, zdolne do produkcji swoistych przeciwciał anty-SRBC. Obecnie przyjmuje się, że sygnał inicjujący aktywację limfocytów B do produkcji przeciwciał na antygen grasiczozależny związany jest bezpośrednio ze stymulacją przez IL-1 immunokompetentnych limfocytów T o funkcji indukująco-pomocniczej (2, 3). Aktywujące działanie IL-1 na dojrzałe limfocyty T nasila się w obecności IL-6. Wykazano bowiem, że IL-6 jest rzeczywistym stymulatorem limfocytów T, natomiast IL-1 wzmacnia jej działanie (5, 14). IL-6 jako stymulator, a IL-1 jako kostymulator limfocytów T, zwiększa-

ją aktywność tych komórek poprzez indukcję syntezy receptora dla IL-2 oraz stymulację wytwarzania tej cytokiny (4). Wykazano również, że IL-6 jest cytokiną odpowiedzialną za ostateczne różnicowanie limfocytów B stymulowanych antygenem w kierunku komórek uwalniających immunoglobuliny głównie klasy IgM i IgG (8). Z kolei IL-2 wspomagając proliferację limfocytów B oraz aktywność sekrecyjną tych komórek ma istotne znaczenie w powstawaniu pierwotnej odpowiedzi humoralnej na stymulację antygenem, podczas której syntetyzowane i uwalniane są immunoglobuliny klasy IgM (13).

Można zatem przypuszczać, że działanie dimeru lizozymu potencjalizujące odpowiedź humoralną na grasiczozależny antygen związane jest ze stymulacją bądź modulacją przez ten lek komórek jednojądrzastych do syntezy i uwalniania takich cytokin jak IL-1, IL-2 i IL-6 co wykazano w badaniach *in vitro* i *ex vivo* na hodowlach komórek mononuklearnych uzyskanych z krwi człowieka i zwierząt (6, 11, 12).

## Wnioski

1. Podanie kilkukrotne dimeru lizozymu w dawkach zalecanych w leczeniu chorób infekcyjnych tj. 2-20 µg/kg w odstępach kilkudniowych nie prowadzi do wytworzenia się efektu tolerancji na ten lek o charakterze immunologicznym, co wyrażone jest zachowaniem lub wzmożeniem adiuwantowego wpływu pierwszej, immunostymulującej dawki dimeru lizozymu (20 µg/kg) podanej bezpośrednio przed antygenem, na swoistą, pierwotną odpowiedź humoralną myszy immunizowanych erythrocytami owcy (SRBC).

2. Zwiększenie dawki dimeru lizozymu do 200 µg/kg prowadzi do osłabienia efektu potencjalizacji swoistej odpowiedzi humoralnej po stymulacji antygenem, co może zmniejszać efekt terapeutyczny dimeru lizozymu.

## Piśmiennictwo

1. Adler F. L.: J. Immunol. 95, 26, 1965.
2. Dinarello C. A.: Blood 77, 1621, 1991.
3. Falkoff R. J., Butler J. L., Dinarello C. A., Fauci A. S.: J. Immunol. 133, 692, 1984.
4. German R. D., Jacobs K. A., Clark S. C., Raulet D. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7629, 1987.
5. Houssian F.: Van Snick. Res. Immunol. 143, 740, 1992.
6. Klein P., Kiczka W.: Życie wet. 69, 142, 1994.
7. Mishell R. J., Dutton R. N.: J. Exp. Med. 126, 423, 1967.
8. Muraguchi A., Hirano T., Tang B., Matsuda T., Horil Y., Nahajima K., Kishimoto T.: J. Exp. Med. 167, 332, 1988.
9. Obmińska-Domaradzka B., Świtła M., Dębowy J.: Immunopharmacol. Immunotoxicol. 19, 489, 1997.
10. Obmińska-Domaradzka B., Świtła M., Dębowy J., Kiczka W., Garbaliński T.: J. Vet. Med. B 44, 591, 1997.
11. Siwicki A. K., Morand M., Klein P.: Materiały II Krajowego Sympozjum Immunologów Weterynaryjnych, Świnoujście, 8-10.05.1997, s. 188.
12. Siwicki A. K., Pejsak Z., Studnicka M., Klein P., Mokrzycka A., Rymuska A., Bownik A.: Materiały II Krajowego Sympozjum Immunologów Weterynaryjnych. Świnoujście, 8-10.05.1997, s. 175.
13. Smith K. A.: Blood, 81, 1414, 1993.
14. Van Snick J.: Ann. Rev. Immunol. 8, 253, 1990.

Adres autora: dr hab. Bożena Obmińska-Domaradzka, prof. nadzw., ul. Mickiewicza 20a, 51-619 Wrocław