

Wpływ β -1,3/1,6-D-glukanu na nieswoiste komórkowe mechanizmy obronne jagniąt

ROMAN WÓJCIK, JOANNA MAŁACZEWSKA, SYLWIA TRAPKOWSKA, ANDRZEJ K. SIWICKI

Zespół Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Katedry Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 9, 10-957 Olsztyn

Wójcik R., Małaczewska J., Trapkowska S., Siwicki A. K.

Influence of β -1,3/1,6-D-glucan on non-specific cellular defence mechanisms in lambs

Summary

The aim of the study was to estimate the influence of β -1,3/1,6-D-glucan applied in feed on non-specific cellular immunity in lambs.

The study examined twenty six 21-28 day old lambs in two groups: I – control and II – experimental (7 rams and 6 ewes in each group). The animals were kept under identical zoohygienic and nutritional conditions. Lambs from group I were fed a basal control diet and lambs from group II were fed a diet containing β -1,3/1,6-D-glucan, at doses of 80 mg/kg/day. Blood was taken from the control and experimental groups before the lambs were fed a diet containing β -1,3/1,6-D-glucan, and 15, 30 and 60 days after administration of the diet. The respiratory burst activity (RBA) and potential killing activity (PKA) of blood phagocytes and proliferative response of blood lymphocytes (MTT) stimulated by mitogens concanavalin A (ConA) and lipopolisaccharide (LPS) were examined.

The results indicated that when β -1,3/1,6-D-glucan was applied to food it statistically significantly increased the blood phagocyte and lymphocyte activity in the lambs until the end of experiment, compared to the control group.

Keywords: lambs, β -1,3/1,6-D-glucan, cellular immunity

Od wielu lat prowadzone są liczne badania laboratoryjne i kliniczne dotyczące skuteczności profilaktycznej i terapeutycznej preparatów modulujących układ odpornościowy różnych gatunków zwierząt. Na szczególną uwagę zasługują tu preparaty immunostymulujące pochodzenia naturalnego – biostymulatory (11, 20), które przede wszystkim można wykorzystywać w ekologicznej hodowli zwierząt, gdzie wymaga się absolutnej rezygnacji z suplementacji diety zwierząt syntetycznymi stymulatorami. Poza tym w hodowlach takich dąży się do metod nieinwazyjnego oddziaływania na organizmy zwierzęce, a więc podawania m.in. stymulatorów odporności, jeżeli jest to możliwe, w formie najbardziej wygodnej, tzn. w paszach. Istotną grupę stanowią tutaj β -glukany (16, 20, 21, 26), a wśród nich β -1,3/1,6-D-glukan, wchodzący w skład ściany komórkowej drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*. Generalnie wykazano, że β -glukany stymulują znacząco odporność organizmu przeciw różnorodnym infekcjom wywołanym przez wirusy, bakterie, grzyby i pasożyty u wielu gatunków zwierząt (3, 8, 19, 24, 25). Jednak w dostępnym piśmiennictwie odnotowano zaledwie dwie pozycje dotyczące ochronnego efektu beta-glukanu u owiec w trakcie eksperymentalnie wywołanego zapalenia wymienia (3) oraz wpływu beta-glukanu na subpopulacje leukocytów w gruczole mlekowym (24).

Niniejsze opracowanie stanowi kontynuację wcześniejszych badań, w których wykazano pozytywny wpływ dodatku β -1,3/1,6-D-glukanu do pasz na cechy użytkowości mięsnej oraz nieswoiste humoralne mechanizmy obronne jagniąt (9). Uzyskane efekty stymulacji odporności humoralnej, stanowiły zachętę do oceny oddziaływania tego preparatu na kształtowanie się parametrów nieswoistej odporności komórkowej.

Celem badań była ocena wpływu β -1,3/1,6-D-glukanu podawanego w paszy na nieswoiste komórkowe parametry odporności jagniąt.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na owcach pochodzących ze stada hodowlanego Zakładu Produkcyjno-Doświadczalnego w Bałcynach, w gospodarstwie Zajęczki. Materiał zwierzęcy stanowiło 26 jagniąt ssących owcy kamienieckiej, w wieku 21 ± 7 dni, urodzonych w kotelni w 2005 r.

Układ doświadczenia. Owce podzielono na 2 analogiczne grupy: I – kontrolną i II – doświadczalną, według następujących kryteriów: masa ciała, płeć, data urodzenia, a także wiek ich matek. W każdej grupie było po 13 jagniąt – 7 tryczków i 6 maciorek, wszystkie pochodzące z miotów bliźniaczych. Jagnięta obu grup dokarmiano do 30. dnia życia sianem łąkowym i mieszanką treściwą C-J do woli, a następnie żywiono zgodnie z normami dla jagniąt hodowlanych, wprowadzając do zestawu pasz sianokiszonkę z traw i roślin motylkowatych. W grupie doświadczalnej jagniąt od samego początku badań

zastosowano dodatek β -1,3/1,6-D-glukanu. Krew do badań pobierano z żyły jarzmowej przed dodaniem β -1,3/1,6-D-glukanu do paszy oraz w 15., 30. i 60. dniu podawania tej substancji, w celu oznaczenia i porównania kształtowania się wskaźników nieswoistej odporności komórkowej.

Zastosowano immunostymulator naturalny: Biolex-Beta HP firmy Inter Yeast Poland zawierający β -1,3/1,6-D-glukan separowany ze ścian komórkowych drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*. Zaletą tego preparatu jest duża efektywność biologiczna i stopień czystości – 85% β -1,3/1,6-D-glukan. Dodawano go do składu mieszanki treściwej C-J w ilości 0,5%. Dzienna dawka glukanu pobranego przez jagnięta kształtowała się na poziomie 80 mg/kg masy ciała.

Ocena parametrów nieswoistej odporności komórkowej.

Badanie aktywności metabolicznej fagocytów – Respiratory Burst Activity (RBA) na podstawie wewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego po stymulacji PMA (Phormol Myristate Acetate) metodą spektrofotometryczną (OD 620 nm) wg Chung i Secombes (5), badanie zdolności do wewnątrzkomórkowego zabijania przez komórki żerne (polimorfonuklearne – PMN i mononuklearne – MN) metodą spektrofotometryczną (OD 620 nm) PKA (Potential Killing Activity) wg Rooka i wsp. (15), badanie odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów stymulowanych mitogenami (ConA – konkanawalina, LPS – lipopolisacharyd, PHA – fitohemaglutynina) przy pomocy metody MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide - 3-[4,5-dimetylo-2-tiazolilo]-2,5-difenylo-2H-tetrazolinowy bromek) opisanej pierwotnie przez Mosmanna (10).

Wyniki opracowano statystycznie w układzie jednoczynnikowym ortogonalnym. Istotność różnic między grupami wyryfikowano przy pomocy testu t-Studenta.

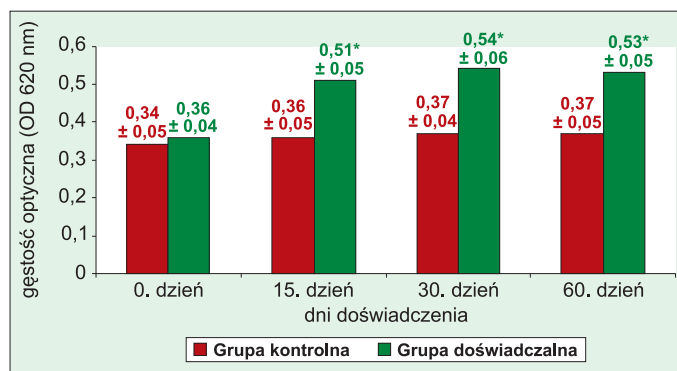
Wyniki i omówienie

W badaniach przeprowadzonych na ovcach, po raz pierwszy w takim układzie u tego gatunku zwierząt, oceniono efekt stymulacyjnego działania naturalnego immunostymulatora – β -1,3/1,6-D-glukanu, na wybrane wskaźniki nieswoistej odporności komórkowej.

Mechanizm działania β -1,3/1,6-D-glukanu polega na wzajemnym jego oddziaływaniu ze swoistymi receptorami, znajdującymi się na powierzchni makrofagów, komórek NK (Natural Killer), limfocytów B i T oraz innych komórek immunokompetentnych. Komórki te identyfikują specyficzną strukturę powierzchni tych cząstek jako obcą (antygen) i uruchamiają nieswoistą odpowiedź immunologiczną za pomocą czynników swoistych – przeciwciał. Ponadto beta-glukan aktywuje dopełniacz oraz pobudza wytwarzanie IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 i TNF- α (1, 7, 13, 17, 23). Efektem tego jest podwyższony stan gotowości układu odpornościowego do obrony organizmu przeciwko różnym czynnikom patogennym (wirusy, bakterie, grzyby, pasożyty).

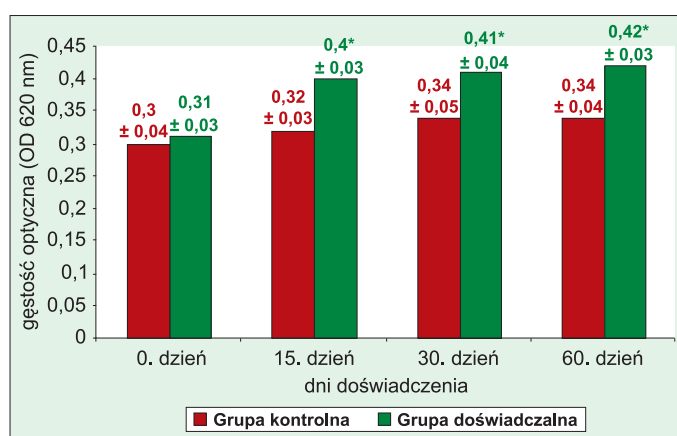
Uzyskane w trakcie doświadczenia wyniki badań, wskazują na istotny wpływ β -1,3/1,6-D-glukanu na wybrane parametry odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów i granulocytów u jagniąt.

W grupie doświadczalnej jagniąt od 15. do 60. dnia eksperymentu obserwowano statystycznie istotny wzrost aktywności metabolicznej fagocytów krwi (RBA) w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 1). Wyższe wartości RBA świadczą o tym, że komórki fagocy-



Ryc. 1. Aktywność metaboliczna fagocytów krwi (RBA) jagniąt karmionych paszą z dodatkiem β -1,3/1,6-D-glukanu

Objaśnienia: * – różnica statystycznie istotna $p < 0,05$ w stosunku do kontroli i badania 0

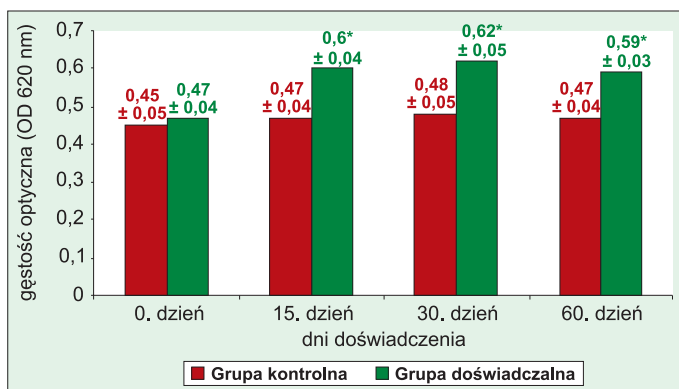


Ryc. 2. Wewnątrzkomórkowa aktywność bójcza fagocytów krwi (PKA) jagniąt karmionych paszą z dodatkiem β -1,3/1,6-D-glukanu

Objaśnienia: jak na ryc. 1.

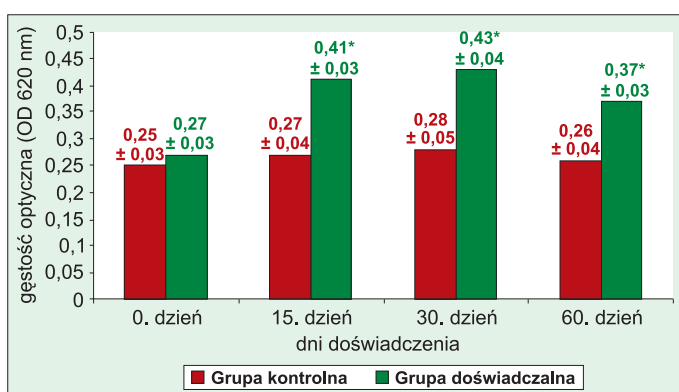
tujące są bardziej sprawne, tzn. zdolne do skutecznego wybuchu tlenowego, a więc bardziej efektywnej eliminacji czynnika patogennego. Suzuki i wsp. (22) otrzymali podobne rezultaty badań – zwiększoną produkcję nadtlenu wodoru (H_2O_2) oraz wzrost aktywności enzymów lizosomalnych w makrofagach myszy po doustnym podaniu beta-glukanu. Ten preparat, jak zauważyli Ohno i wsp. (12) oraz Tokunaka i wsp. (23), wzmacniał także w makrofagach myszy wytwarzanie kolejnego czynnika wybuchu tlenowego – tlenku azotu (NO), jak też aktywował enzymy lizosomalne (21). Ponadto beta-glukan wykazuje zróżnicowany wpływ na aktywność komórek fagocytarnych, w zależności od drogi jego aplikacji, co obserwował Sakurai i wsp. (18) u myszy. Makrofagi tych zwierząt, po dożylnym (i.v.) wprowadzeniu beta-glukanu, zwiększyły produkcję H_2O_2 i interleukiny I (IL-1) oraz swoją aktywność fagocytarną w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast w grupie myszy traktowanych beta-glukanem dootrzewnowo (i.p.) takiego zjawiska nie odnotowano.

W badaniach własnych u owiec stwierdzono również w grupie doświadczalnej, między 15. a 60. dniem podawania preparatu, statystycznie istotny wzrost (o 30%) wewnątrzkomórkowej aktywności bójczej fagocytów krwi (PKA) w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 2).



Ryc. 3. Aktywność proliferacyjna limfocytów krwi stymulowanych ConA jagniąt karmionych paszą z dodatkiem β -1,3/1,6-D-glukanu

Objaśnienia: jak na ryc. 1.



Ryc. 4. Aktywność proliferacyjna limfocytów krwi stymulowanych LPS jagniąt karmionych paszą z dodatkiem β -1,3/1,6-D-glukanu

Objaśnienia: jak na ryc. 1.

Podobne zjawisko opisali również inni autorzy u myszy (17, 18) oraz u krewetek (4).

Pozytywne działanie beta-glukanu wyraziło się także wpływem na aktywność proliferacyjną limfocytów krwi (MTT) jagniąt stymulowanych zarówno ConA (ryc. 3), jak i LPS (ryc. 4), która mimo iż była w obu przypadkach statystycznie istotnie wyższa w grupach stymulowanych β -1,3/1,6-D-glukanem niż w grupach kontrolnych przez cały okres doświadczenia, to jednak odnotowano różnice w zależności od zastosowanego mitogenu. W przypadku ConA był to 25%, a LPS prawie 50% wzrost aktywności proliferacyjnej limfocytów. Równie pozytywny stymulujący wpływ miogenów (ConA, LPS, PHA) na limfocyty po zastosowaniu beta-glukanu stwierdzili inni autorzy u myszy i szczurów w badaniach *in vivo* i *in vitro* (2, 6, 14, 21).

Uzyskane u jagniąt wyniki badań, dotyczące immunomodulujących właściwości β -1,3/1,6-D-glukanu, wskazują na możliwość praktycznego wykorzystania tego preparatu w immunoprofilaktyce tych zwierząt, zwłaszcza w okresie zwiększonej zapadalności na infekcje bakteryjne i wirusowe. Dodatkowo stanowią zachętę do dalszych badań nad ewentualnym wykorzystaniem tego preparatu do korygowania upośledzonej odporności u jagniąt, jak i osobników dorosłych.

Piśmiennictwo

1. Abel G., Czop J. K.: Stimulation of human monocyte beta-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1 beta. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992, 14, 1363-1373.
2. Bousquet M., Escoula M., Peurière S., Pipy B., Roubinet F., Chavant C.: Immunopharmacologic study in mice of 2 beta-1,3, beta-1,6 polysaccharides (scleroglucan and PSAT) on the activation of macrophages and T lymphocytes. *Ann. Rech. Vet.* 1989, 20, 165-173.
3. Buddle B. M., Pulford H. D., Ralston M.: Protective effect of glucan against experimentally induced staphylococcal mastitis in ewes. *Vet. Microbiol.* 1988, 16, 67-76.
4. Chang C. F., Chen H. Y., Su M. S., Liao I. C.: Immunomodulation by dietary beta-1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 2000, 10, 505-514.
5. Chung S., Secombes S. J.: Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comp. Biochem. Physiol.* 1988, 89B, 539-544.
6. Hashimoto K., Suzuki I., Yadomae T.: Oral administration of SSG, a beta-glucan obtained from *Sclerotinia sclerotiorum*, affects the function of Peyer's patch cells. *Int. J. Immunopharmacol.* 1991, 13, 437-442.
7. Kim H. M., Han S. B., Oh G. T., Kim Y. H., Hong D. H., Yoo I. D.: Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmacol.* 1996, 18, 295-303.
8. Li J., Xing J., Li D., Wang X., Zhao L., Lv S., Huang D.: Effects of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on humoral and cellular immunity in weaned piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 2005, 59, 303-312.
9. Milewski, S., Wójcik R., Malaczewska J., Trapkowska S., Siwicki A. K.: Wpływ β -1,3/1,6-D-glukanu na cechy użyteczności mięsnej oraz nieswoiste humoralne mechanizmy obronne jagniąt. *Medycyna Wet.* (w druku).
10. Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55-63.
11. Nartowska J., Skopińska-Różewska E., Siwicki A. K.: Nowe immunomodulatory pochodzenia roślinnego, [w:] Siwicki A. K., Skopińska-Różewska E., Świderski F. (red.): *Immunomodulacja – nowe możliwości w ochronie zdrowia*. Olsztyn, Edycja 2004, s. 7-21.
12. Ohno N., Egawa Y., Hashimoto T., Adachi Y., Yadomae T.: Effect of beta-glucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 1996, 19, 608-612.
13. Pelizon A. C., Kaneno R., Soares A. M., Meira D. A., Satori A.: Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol. Res.* 2005, 54, 557-564.
14. Rios-Hernández M., Dos-Santos N. J., Silvia-Cardoso, Bello-Garciga J. L., Pedrosa M.: Immunopharmacological studies of beta-1,3-glucan. *Arch. Med. Res.* 1994, 25, 179-180.
15. Rook G. A., Steele W., Umar J., Dockrell H. M.: A simple method for the solubilization of reduced NBT and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma interferon. *J. Immunol. Meth.* 1995, 82, 161-167.
16. Sahoo P. K., Mukherjee S. C.: Effect of dietary beta-1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). *Fish Shellfish Immunol.* 2001, 11, 683-695.
17. Sakurai T., Hashimoto K., Suzuki I., Ohno N., Oikawa S., Maruda A., Yadomae T.: Enhancement of murine alveolar macrophage functions by orally administered beta-glucan. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992, 14, 821-830.
18. Sakurai T., Ohno N., Yadomae T.: Intravenously administered (1-3)-beta-D-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 augments murine peritoneal macrophage functions *in vivo*. *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40, 2120-2124.
19. Siwicki A. K., Kazuń K., Głabski E., Terech-Majewska E., Baranowski P., Trapkowska S.: The effect of beta-1.3/1.6-glucan in diets on the effectiveness of anti-Yersinia ruckeri vaccine – an experimental study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2004, 54, 59-61.
20. Siwicki A. K., Klein P., Morand M.: Immunomodulacja – aktualny stan wiedzy, [w:] Siwicki A. K. (red.): *Wpływ ksenobiotyków na organizm zwierząt i człowieka*. Olsztyn, IRS 1999, 93-102.
21. Suzuki I., Hashimoto K., Ohno N., Tanaka H., Yadomae T.: Immunomodulation by orally administered beta-glucan in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 1989, 11, 761-769.
22. Suzuki I., Tanaka H., Kinoshita A., Oikawa S., Osawa M., Yadomae T.: Effect of orally administered beta-glucan on macrophage function in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 1990, 12, 675-684.
23. Tokunaka K., Ohno N., Adachi Y., Tanaka S., Tamura H., Yadomae T.: Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1-3)-beta-D-glucan, CSBG from *Candida* spp. *Int. J. Immunopharmacol.* 2000, 22, 383-394.
24. Waller K. P., Colditz I. G.: Effect of intramammary infusion of beta-1,3-glucan or interleukin-2 on leukocyte subpopulations in mammary glands of sheep. *Am. J. Vet. Res.* 1999, 60, 703-707.
25. Xiao Z., Trincado C. A., Murtaugh M. P.: Beta-glucan enhancement of T cell IFN gamma response in swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, 102, 315-320.
26. Yadomae T.: Structure and biological activities of fungal beta-1,3-glucans. *J. Pharmaceut. Soc. Japan* 2000, 120, 413-431.

Adres autora: dr Roman Wójcik, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn; e-mail: brandy@uwm.edu.pl