

Wpływ prebiotyków na procesy immunologiczne u zwierząt

MONIKA SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA, DARIUSZ BEDNAREK

Zakład Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Szymańska-Czerwińska M., Bednarek D.

Effect of prebiotics on immunological processes in animals

Summary

Since January 2006, and in accordance with EU legislative procedures, the use of antibiotics as growth promoters in feedingstuff has been prohibited. Withdrawal of antibiotic growth promoters in an animal feeding has resulted in a search for new alternatives such as: prebiotics. At present prebiotics are used mostly for preventing and controlling the negative consequences appearing in the aftermath of the prohibition of antimicrobial applications as animal feed additives. The article presents the effect of prebiotics (mannan-oligosaccharides, fructo-oligosaccharides, galacto-oligosaccharides) on humoral and cellular mechanisms of specific and non-specific immunity in livestock.

Keywords: prebiotics, immunity, livestock

Zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW) w żywieniu zwierząt konsumpcyjnych wprowadzony na podstawie unijnego Rozporządzenia 1831/2003 we wszystkich krajach członkowskich UE spowodował, że powrócono do badań klinicznych i laboratoryjnych dotyczących wykorzystania innych alternatywnych ich zamienników. Do jednych z nich zalicza się prebiotyki. Są to niepoddające się trawieniu w żołądku i jelitach zwierząt monogastrycznych składowe paszy pochodzenia cukrowego (polisacharydy). Stymulują one selektywnie wzrost i/lub aktywność pożądaną mikroflory jelitowej (2, 18). Mniej znanym efektem działania prebiotyków jest również stymulacja sił odpornościowych organizmu m.in. poprzez zrównoważony rozwój pożytecznej mikroflory jelitowej, hamowanie infekcji powodowanych przez bakterie chorobotwórcze lub ograniczanie następstw związanych ze szkodliwym wpływem produkowanych przez nie toksyn. Prebiotyki oddziałują również w sposób bezpośredni na niektóre mechanizmy naturalnej odporności zwierząt, związanej chociażby ze stymulacją zdolności fagocytarnych komórek żernych oraz różnorodnymi mechanizmami nieswoistej odporności humoralnej (10). Do prebiotyków zaliczane są: fruktooligosacharydy (FOS), mannanooligosacharydy (MOS) oraz galaktooligosacharydy (GOS) (4-6). Prebiotyki, a zwłaszcza mannanooligosacharydy, które pozyskiwane są ze ścian komórkowych specyficznych szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* posiadają właśnie wspomniane wyżej immunostymulujące właściwości prezentowane dotychczas w niektórych publikacjach naukowych z tego zakresu (1, 5, 8). Wymieniane związki

posiadają również zdolność do ograniczania kolonizacji w obrębie jelit cienkich i grubych drobnoustrojami chorobotwórczymi posiadającymi fimbrie typu I. Obecność tych fimbrii umożliwia adhezję chorobotwórczych bakterii (*E. coli*, *Salmonella spp.*) do mannozależnych receptorów enterocytów nabłonka ściany jelita (18). Z kolei mannanooligosacharydy, współzawodnicząc w tym wiązaniu, ograniczają skutecznie możliwość adhezji tych bakterii.

Fruktooligosacharydy są prebiotykami nowej generacji występującymi w formie polimerów D-fruktozy połączonych między sobą wiązaniami β . FOS podobnie jak MOS hamują rozwój bakterii patogennych np. *Salmonella Typhimurium*, obniżają syntezę trigliceroli i kwasów tłuszczowych w wątrobie oraz wzmagają absorpcję wapnia w jelitach (7).

Ze względu na pozytywny wpływ prebiotyków na florę jelitową oraz ich immunostymulujące właściwości, a także poszukiwanie nowych alternatyw dla ASW w ostatnim czasie nastąpił wyraźny wzrost zainteresowania stosowaniem tych dodatków do paszy w żywieniu zwierząt, szczególnie młodych. Mechanizm działania prebiotyków, takich jak MOS i β -glukany w procesach immunologicznych organizmu polega na oddziaływaniu ze swoistymi receptorami znajdującymi się na powierzchni komórek efektorowych, tj. makrofagów, monocytów, neutrofilów, limfocytów T i B. Komórki te poprzez swoje receptory rozpoznają strukturę prebiotyków jako antygen i uruchamiają całą kaskadę odpowiedzi immunologicznej zarówno typu komórkowego, jak i humoralnego (9, 11, 14). Spośród najbardziej aktywnych immu-

nologicznie prebiotyków 1-3 i 1-6 β -glukany wiążą się m.in. z receptorami makrofagów, w następstwie czego dochodzi do ich pobudzenia i wydzielania cytokin, a one z kolei włączają kolejny sygnał sekrecyjny. Kluczowe znaczenie odgrywa tu zwłaszcza interleukina-1 (IL-1), która aktywuje następne makrofagi i limfocyty T. Interleukina 1 wydzielana jest głównie przez monocyty i makrofagi różnych tkanek. Odgrywa ona bardzo ważną rolę w rozwoju odpowiedzi immunologicznej poprzez pobudzenie limfocytów T, które następnie uwalniają tzw. cytokiny drugiej generacji, w tym interleukinę 2 (IL-2). W dostępnym piśmiennictwie prezentowane są badania wskazujące na stymulację aktywności proliferacyjnej limfocytów i wzrost aktywności cytokin u różnych gatunków zwierząt, w następstwie podawania im prebiotyków (12, 16, 19). Zmiany w subpopulacjach limfocytów przejawiały się głównie we wzroście odsetka limfocytów T (CD2⁺) zwłaszcza supresorowo/cytotoksycznych (Ts/c, CD8⁺) oraz limfocytów B (WC4⁺) (16). Wzrost liczebności limfocytów Th u zwierząt otrzymujących prebiotyki należy wiązać m.in. z działaniem IL-1, uwalnianej pod wpływem tych stymulatorów. Świadczy to o mobilizacji komórkowych mechanizmów immunologicznych, podczas których dochodzi również do pobudzenia proliferacji i różnicowania limfocytów B. W badaniach własnych przeprowadzonych na cielętach (16), które otrzymywały wraz z paszą dodatek prebiotyków (MOS i β -glukanów) wykazano również wzrost aktywności wspomnianej wyżej cytokiny. Wzrost ten zaobserwowano po 7 dniach podawania cielętom prebiotyków i wyniósł on od wartości wyjściowej bliskiej zero (0,1 pg/ml) do 9,36 pg/ml. Następnie ten podwyższony poziom aktywności badanej cytokiny utrzymywał się do 16. dnia obserwacji. W tym samym czasie u zwierząt kontrolnych nie stwierdzono znaczących zmian w poziomie interleukiny 1 (16). Cytokinowa stymulacja za pośrednictwem IL-1 limfocytów Th dotyczy zarówno subpopulacji Th1, jak i Th2. Pierwsza z tych frakcji komórkowych uczestniczy głównie w mechanizmach odpowiedzi komórkowej, druga natomiast w odpowiedzi humoralnej. Subpopulacja limfocytów Th1 produkuje wspomnianą wcześniej IL-2, która wzmacnia cytotoksyczność limfocytów oraz uczestniczy w aktywacji makrofagów. Z kolei limfocyty subpopulacji Th2 aktywują przede wszystkim limfocyty B (13). W wyniku tego procesu dochodzi do powstania plazmacytów, a w konsekwencji zwiększenia produkcji przeciwciał (15). Wzrost poziomu immunoglobulin zwłaszcza klasy IgG (osocze) i IgA (żółć) u prosiąt otrzymujących w diecie dodatek mannanooligosacharydów został wykazany w niektórych badaniach (18). Ponadto w najnowszych badaniach z tego zakresu (3) zaobserwowano, że dodatek prebiotyków u krów cielnych przed spodziewanym porodem (3 tyg.) w postaci preparatu Bio-Mos zawierającego mannanooligosacharydy powodował istotny wzrost poziomu immunoglobulin w ich surowicy oraz w sianie. Jest to szczególnie ważne z punktu widzenia zdrowotności cieląt, które za pośrednictwem siary otrzymują te immunoglobuliny, a to bezpośrednio decyduje o ich statusie immunologicznym w pierwszym okresie odchowu (2.-8. tydzień życia). Dlatego tak ważne jest, by zawartość przeciwciał w sianie i jej skład jakościowy

były jak najbardziej optymalne. Jak wiadomo bowiem, przeciwciała klasy IgA chronią błony śluzowe poszczególnych układów organizmu przed zakażeniami, natomiast immunoglobuliny klasy G biorą udział w opsonizacji bakterii i ułatwiają w ten sposób proces ich fagocytozy. Podawanie prebiotyków zwierzętom reprodukcyjnym wpływa również na zdrowotność następnego pokolenia. U drobiu zastosowanie oligosacharydów w stadzie rodzicielskim wpływało na wzrost miana przeciwciał nie tylko u stada rodzicielskiego, ale także u ich potomstwa (3).

Spośród cytokin, których uwalnianie z komórek efektorowych jest skutecznie modulowane podawaniem prebiotyków, należy wspomnieć jeszcze o IL-2. Jej receptory znajdują się na limfocytach T i B oraz monocytach. Zdecydowanie najważniejszą funkcją tej cytokiny jest pobudzanie proliferacji limfocytów cytotoksycznych, które na swojej powierzchni zawierają determinantę antygenową CD8⁺, a także aktywacja proliferacji komórek NK. IL-2 mobilizuje również siły obronne organizmu poprzez indukcję wytwarzania neutrofilów (13).

Świnie w okresie odsadzeniowym narażone są na silny stres, który może być przyczyną osłabienia sił odpornościowych organizmu, a to z kolei sprzyja występowaniu różnorodnych zaburzeń tła zapalnego u tych zwierząt. Wówczas to dochodzi zwykle do silnego pobudzenia pierwszej linii obrony organizmu manifestującego się wzrostem liczby neutrofilów we krwi obwodowej (neutrofilia). Badania z udziałem prebiotyków pokazują jednak, że zastosowanie mannanów w takich przypadkach powoduje normalizację liczby neutrofilów, a sprzyja podwyższeniu liczby limfocytów. Fakt ten wskazuje, że zastosowanie diety wzbogaconej mannami w procesie zapalnym u zwierząt wpływa korzystnie na normalizację w układzie immunologicznym oraz skutecznie współdziała w utrzymaniu homeostazy organizmu (1). Z kolei β -glukany zastosowane u swni w okresie odsadzeniowym u których sztucznie indukowano proces zapalny, hamują wydzielanie jednych z ważniejszych prozapalnych cytokin, takich jak IL-6 i TNF- α . Natomiast pobudzają one wydzielanie przeciwzapalnych cytokin, w tym IL-10. Interleukina ta hamuje hiperergiczną odpowiedź zapalną m.in. poprzez blokowanie wytwarzania IL-6 i TNF- α . Tym samym β -glukany wpływają korzystnie na stan zdrowotny zwierząt manifestujący się m.in. lepszymi przyrostami masy ciała trzody chlewnej. W przeciwnym przypadku, wzrost stężenia prozapalnych cytokin powodowałby wydłużenie procesu chorobowego i redukcję przyrostów masy ciała (9).

Prebiotyki, zwłaszcza, β -glukany wywierają również znaczący wpływ na niespecyficzne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej związane z aktywacją komórek żernych (neutrofilów, monocytów i makrofagów). Przeprowadzone do tej pory badania udowadniają, że zastosowanie 1,3- β glukanów w stanach zapalnych wymion u owiec pobudza migrację monocytów i makrofagów do tego gruczołu. Efekt ten związany jest z łączeniem się tego immunostymulatora z receptorami makrofagów (13). Uaktywnione w ten sposób makrofagi odgrywają ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu, uczestnicząc w dezaktywacji nie tylko komórek bakteryjnych,

ale również ewentualnych uszkodzonych i zmutowanych komórek gospodarza. Komórki żerne dysponują kilkoma mechanizmami zabijania drobnoustrojów. Niektóre z nich niszczone są zewnątrzkomórkowo w następstwie degranulacji leukocytów i uwalniania z ich wnętrza różnorodnych czynników bakteriobójczych (enzymów lizosomalnych, metaloproteaz, wolnych rodników). Podstawowy jednak mechanizm polega na fagocytozie i zabijaniu wewnątrzkomórkowym. Drobnoustroje zabijane są wówczas w wyniku działania mechanizmów tlenowych lub pozatlenowych. Dochodzi również do wzrostu aktywności metabolicznej makrofagów, przez zwiększenie zdolności do skutecznego wybuchu tlenowego, a co za tym idzie – również zwiększenia ich aktywności bakteriobójczej (19). W takich przypadkach notuje się wzrost produkcji nadtlenu wodoru i tlenku azotu, które powstają w wyniku pobudzenia neutrofilów. Większość reaktywnych związków tlenu działa w fagolizosomie. Ponadto obserwowany jest wzrost aktywności enzymów lizosomalnych zwłaszcza fosfatazy kwaśnej i β -glukuronidazy. Wszystko to powoduje, że układ immunologiczny w sposób bardziej efektywny eliminuje czynniki patogene, takie jak: bakterie, wirusy, grzyby, pasożyty, a nawet komórki nowotworowe (11, 17, 19). Wiadomo obecnie, że proces fagocytozy stymulują różnorodne prebiotyki, najbardziej jednak 1-3 i 1-6- β -glukany, dzięki którym wzrasta zdolność komórek żernych, takich jak PMN (polimorfonuklearne) i MN (mononuklearne), do wewnątrzkomórkowego zabijania. Działanie tych glukanów na aktywność komórek żernych (makrofagów), jak dowodzą przeprowadzone dotychczas badania eksperymentalne (19), w dużej mierze uzależnione jest od drogi podania, dawki zastosowanych prebiotyków oraz czasu ich stosowania. Badania przeprowadzone na myszach dowiodły m.in., że największy wzrost zdolności fagocytarnej makrofagów obserwowany był po doustnym lub dożylnym podaniu β -glukanów. Natomiast dootrzewnowe podanie prebiotyku nie powodowało zwiększenia aktywności makrofagów (19).

Z badań ostatnio przeprowadzonych na jagniętach, które otrzymywały paszę z dodatkiem β -glukanów, wynika, że prebiotyki wpływają na parametry nieswoistej odporności humoralnej (10). U zwierząt tych obserwowano bowiem wyraźny wzrost aktywności lizozymu, który jest jednym z ważniejszych komponentów nieswoistych mechanizmów immunologicznych. Obecny jest on w ziarnistościach neutrofilów, monocytów i makrofagów. Wzrastają też wartości stężeń gammaglobulin i białka całkowitego, które również świadczą o wzroście nieswoistej odporności typu humoralnego (10). Ponadto zaobserwowano, że glukany wywierają wyraźne stymulujące działanie na przyrosty wagowe zwierząt oraz wywierają również korzystny wpływ na cechy użyteczności mięsnej zwierząt (10, 16).

Reasumując, prebiotyki stwarzają potencjalne możliwości praktycznego ich wykorzystania w nieswoistej immunoprofilaktyce wielu chorób zwierząt, zwłaszcza tych związanych z okresami zwiększonej zapadalności na infekcje, w tym również wirusowe. W chwili obecnej, kiedy zakazane jest stosowanie ASW, mogą stanowić one alternatywne rozwiązanie w wielkostadnych

hodowlach bydła, świń czy drobiu. Mogą one znaleźć zastosowanie w profilaktyce i w leczeniu różnego rodzaju infekcji. Mobilizują bowiem skutecznie układ odpornościowy zwierząt dzięki czemu chronić je mogą przed zapadaniem na różnego rodzaju choroby zakaźne, a także przyspieszać powrót chorych zwierząt do zdrowia. Ponadto preparaty zawierające prebiotyki mogą być z powodzeniem wykorzystywane do korygowania stanów upośledzonej odporności i niedoborów immunologicznych, nierzadko stwierdzanych również u zwierząt. Warto podkreślić przy tym, że końcowe rezultaty stosowania prebiotyków nie odbiegają zasadniczo od uzyskiwanych dotychczas przy wykorzystaniu ASW, osiągane są one jednak odmiennymi drogami, tj. zbliżonymi do naturalnych. Dlatego też zakłada się, że stosowanie prebiotyków nie stwarza zagrożenia dla zdrowia zwierząt, a w rezultacie również konsumenta.

Piśmiennictwo

1. Davis M. E., Maxwell C. V., Erf G. F., Brown D. C., Wistuba T. J.: Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, 1882-1891.
2. Gibson G. R.: Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr.* 1999, 129, 1438S-1440S.
3. Głębocka K., Roszkowski T.: Żywnienie trzody chlewnej w świecie bez antybiotyków stymulatorów wzrostu. *Magazyn Wet. Suplement – Świnie* 2006, 45-48.
4. Grela E.: Optymalizacja żywienia świń z wykorzystaniem nowej generacji dodatków paszowych. *Prace i Mat. Zootech.* 2004, 15, 53-63.
5. Grela E., Semeniuk V.: Konsekwencje wycofania antybiotykowych stymulatorów wzrostu z żywienia zwierząt. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 502-506.
6. Hirayama M.: Novel physiological functions of oligosaccharides. *Pure Appl. Chem.* 2002, 74, 1271-1279.
7. Koncicki A., Jankowski J., Zduńczyk Z., Mazur-Gonkowska B., Krasnodębska-Depta B., Stenzel T.: Wpływ fruktooligosacharydów na przebieg zakażeń indyków wirusem krwotocznego zapalenia jelit i pałeczkami Salmonella Typhimurium. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 1387-1390.
8. Kuprechtova D., Ilek J.: Effect of mannan oligosaccharides supplemented via milk replacer on the immune status and growth of calves. *Slov. Zbr.* 2006, 43, 311-313.
9. Li J., Xing J., Li D., Wang X., Zahao L., LV S., Huang D.: Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on humoral and cellular immunity in weaned pig. *Arch. Anim. Nutr.* 2005, 59, 303-312.
10. Milewski S., Wójcik R., Malaczewska J., Trapkowska S., Siwicki K. A.: Wpływ β -1,3/1,6-D-glukanu na cechy użyteczności mięsnej oraz nieswoiste humoralne mechanizmy obronne jagniąt. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 360-363.
11. Ohno N., Egawa Y., Hashimoto T., Adachi Y., Yadomae T.: Effect of β -glucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 1996, 19, 608-612.
12. Pelizon A. C., Kaneno R., Soares A. M. V. C., Meira D. A., Sartori A.: Immunomodulatory activities associated with β -glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol. Res.* 2005, 54, 557-564.
13. Persson Waller K. P., Colditz I. G.: Effect of infusion of β -1,3-glucan or interleukin-2 on leukocyte subpopulations in mammary glands of sheep. *AJVR* 1999, 60, 703-707.
14. Rios-Hernandez M., Dos-Santos N., Silvia-Cardoso S., Bella-Garciga J. L., Pedrosa M.: Immunopharmacological studies of β -1,3 glucan. *Arch. Med. Res.* 1994, 25, 179-180.
15. Siwicki 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 Nutri. Sci.* 2004, 54, 59-61.
16. Suzuki I., Tanaka H., Kinoshita A., Oikawa S., Osawa M., Yadomae T.: Effect of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. *J. Immunopharmac.* 1990, 12, 675-684.
17. Szymańska M., Bednarek D.: Wpływ dodatku prebiotyków na aktywność interleukiny 1 i zmiany w subpopulacjach leukocytów cieląt. *Medycyna. Wet.* 2007 (w druku).
18. Truszczyński M., Pejsak Z.: Możliwości przeciwdziałania ujemnym skutkom zakażu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu u świń. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 10-13.
19. Wójcik R., Malaczewska J., Trapkowska S., Siwicki A.: Wpływ β -1,3/1,6-D-glukanu na nieswoiste komórkowe mechanizmy obronne jagniąt. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 84-86.

Adres autora: mgr Monika Szymańska-Czerwińska, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: monika.szymanska@piwet.pulawy.pl