

*KATEDRA I KLINIKA ROZRODU ZWIERZĄT WYDZIAŁU MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ AR W LUBLINIE

**CENTRALNE LABORATORIUM DIAGNOSTYCZNE OKRĘGOWEGO SZPITALA KOLEJOWEGO W LUBLINIE

***KATEDRA EPIZOOTIOLOGII WYDZIAŁU MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ ART W OLSZTYNIE

Jan KRZYŻANOWSKI*, Leszek KRAKOWSKI*,
Krystyna BRANECKA**, Andrzej Krzysztof SIWICKI***

Immunostymulujący wpływ glukanu 1,3/1,6 oraz lewamizolu na komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u koni

Immunostimulatory Effect of Glucan 1,3/1,6 and Levamisole on Cellular and Humoral Defenses in
Horses

WSTĘP

W ostatnim okresie obserwuje się w Polsce ekspansję różnych firm farmaceutycznych oferujących całą gamę leków. Najliczniejszą grupę stanowią antybiotyki. W reklamach producenci podkreślają wysoką skuteczność, dobrą tolerancję oraz niską toksyczność oferowanych preparatów. Wiele z obecnych na rynku preparatów pomimo swego leczniczego działania wykazuje jednak ujemny wpływ na organizm. W licznych przypadkach jest to skutek teratogeny, hepatogeny, nefrotoksyczny (14, 16) lub immunosupresyjny (16, 24, 25). Postępująca degradacja środowiska naturalnego w znacznym stopniu potęguje uboczne skutki, np. stosowania antybiotyków (16, 25), co znajduje wyraz w spadku odporności i zachwianiu homeostazy.

W obecnej dobie poważnego znaczenia nabrały choroby o etiologii infekcyjnej, do których dochodzi w wyniku uzjadliwiania się drobnoustrojów warunkowo chorobotwórczych powszechnie występujących w środowisku bytowania człowieka i zwierząt.

Alternatywą dla współczesnych metod swoistej profilaktyki i chemioterapii chorób infekcyjnych zwierząt są preparaty stymulujące nieswoiste mechanizmy obronne i regulujące homeostazę w organizmie (1, 2, 8, 12, 17, 34).

Współczesna immunoprofilaktyka nieswoista wydaje się mieć szczególne znaczenie w zapobieganiu chorobom infekcyjnym (7, 8, 12, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 27, 28, 29, 32, 34, 37). Poznano już wiele preparatów zarówno biologicznych, jak i syntetycznych, które wpływają modulująco na układ immunologiczny. Związki te oddziaływać mogą na organizm immunostymulująco lub immunosupresyjnie, a charakter tego oddziaływania uzależniony jest zarówno od dawki danego preparatu, jak i od stanu odpornościowego pacjenta. Preparaty o działaniu immunostymulującym wpływając na układ odpornościowy nasilają nieswoiste humoralne i komórkowe reakcje obronne (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 15, 18, 32, 33, 35). Efekt ich działania wykorzystuje się nie tylko do potencjacji nieswoistej odporności organizmu, ale także do indukowania silniejszej odpowiedzi immunologicznej na antygeny. Stosunkowo dobrze poznanym immunostymulatorem jest lewamizol (7, 12, 17). Słabiej natomiast jest znane działanie stymulujące mechanizmy obronne glukanu. W dostępnym piśmien-

nictwie niewiele napotkano prac dotyczących reakcji organizmu koniowatych na te immunostymulatory. Celem podjętych badań było określenie wpływu lewamizolu i glukanu na kształtowanie się wybranych wskaźników komórkowej i humoralnej odporności nieswoistej u koni.

MATERIAŁ I METODY

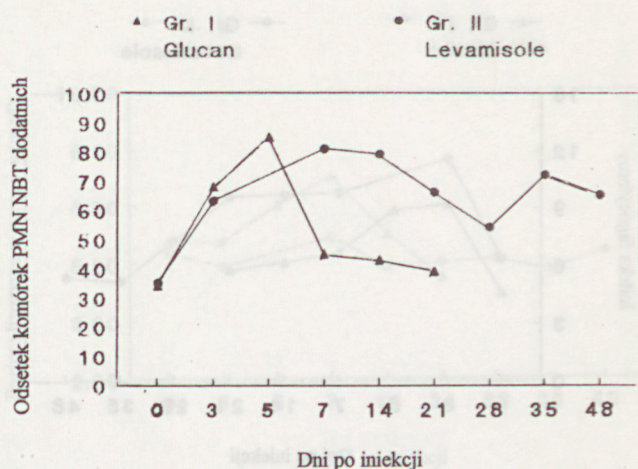
Badania przeprowadzono na 12 klinicznie zdrowych koniach obojga płci w wieku 4-8 lat. Użyte do badań zwierzęta były wolne od pasożytów zewnętrznych i wewnętrznych. Przebywały w podobnych warunkach i były podobnie żywione. Zakwalifikowane do badań konie podzielono losowo na dwie grupy. Koniom jednej grupy podano jednorazowo w iniekcji podskórnej roztwór wodny lewamizolu w dawce 2 mg/kg m.c. Konie drugiej grupy otrzymały także jednorazowo, w iniekcji domięśniowej glukan 1,3/1,6 (TLFN, USDA, Cortland NY USA) w dawce 0,19 mg/kg m.c.

Przed podaniem zwierzętom immunostymulatorów, a następnie po upływie 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35 i 48 dni pobierano krew, w której oznaczono: test NBP metodą cytochemiczną (31), indeks fagocytny metodą cytochemiczną przy użyciu standardowego szczepu *Staph. aureus* 209P (31), procent komórek bójczych według metody Ferrante i Thong (11). Oznaczono także aktywność lizozymu w surowicy metodą turbidymetryczną (30), poziom białka C-reaktywnego (CRP) metodą turbidymetryczną (na aparacie Cobas Mira S firmy La Roche), poziom białka całkowitego i kompleksu gammaglobulin metodą spektrometryczną (23) oraz poziom IgG, IgG(T), IgM i IgA metodą radioimmunodifuzyjną (RID) przy użyciu gotowych kitów (firmy The Binding Site). Wyniki badań poddano analizie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta oznaczając średnią, odchylenie standardowe oraz istotność różnic na poziomie $p \leq 0,05$.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

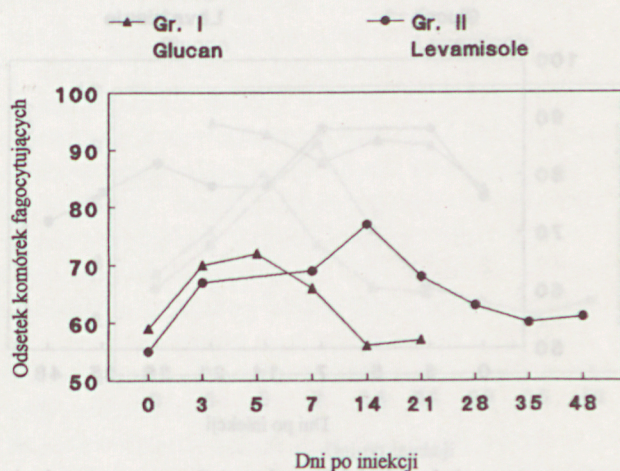
Analiza uzyskanych wyników badań wykazała, że jednorazowa iniekcja glukanu 1,3/1,6 i lewamizolu aktywuje nieswoiste mechanizmy obrony komórkowej i humoralnej u koni. Znalazło to wyraz w kinetyce zmian w procentach komórek PMN NBT dodatnich (ryc. 1), w kinetyce zmian procentu komórek fagocytykujących (ryc. 2), w kinetyce indeksu fagocytnego (ryc. 3) oraz w kinetyce procentu komórek bójczych (ryc. 4). W 3 dniu po iniekcji glukanu 1,3/1,6 i lewamizolu nastąpił statystycznie istotny wzrost parametrów obrony komórkowej. W przypadku glukanu między 7 a 14 dniem obserwowano powrót oznaczanych parametrów odporności komórkowej do wartości przed podaniem tego immunostymulatora. Po podaniu lewamizolu wzrost omawianych parametrów odporności komórkowej utrzymywał się do 21 dnia od podania preparatu. Porównując wpływ glukanu i lewamizolu na komórki fagocytykujące należy stwierdzić, że lewamizol wykazywał znacznie dłuższy okres działania. Należy jednak zaznaczyć, że po podaniu glukanu immunostymulujące działanie na komórkowy układ obronny wystąpiło znacznie szybciej aniżeli po lewamizolu.

Wpływ glukanu i lewamizolu na humoralne mechanizmy nieswoistej obrony wskazuje jednoznacznie, że oba badane preparaty powodowały statystycznie istotny wzrost poziomu lizozymu, białka całkowitego, kompleksu gammaglobulin oraz immunoglobulin klasy IgM. Przedstawiono graficznie kinetykę



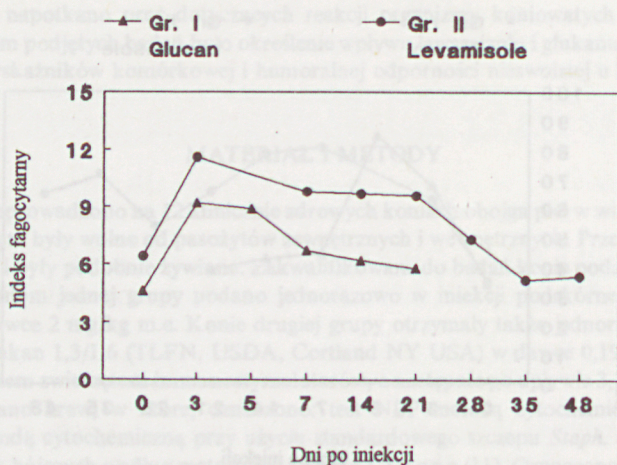
Ryc. 1. Kinetyka zmian w procentach komórek PMN NBT dodatnich po jednorazowej iniekcji glukanu 1,3/1,6 (Gr. I) i lewamizolu (Gr. II) u koni (średnie wartości, $SD \leq 20\%$, $n=6$)

Kinetics of percent PMN cells NBT positive after injection of glucan 1.3/1.6 (Gr. I) and levamisole (Gr. II) in horses (mean, $SD \leq 20\%$, $n=6$)



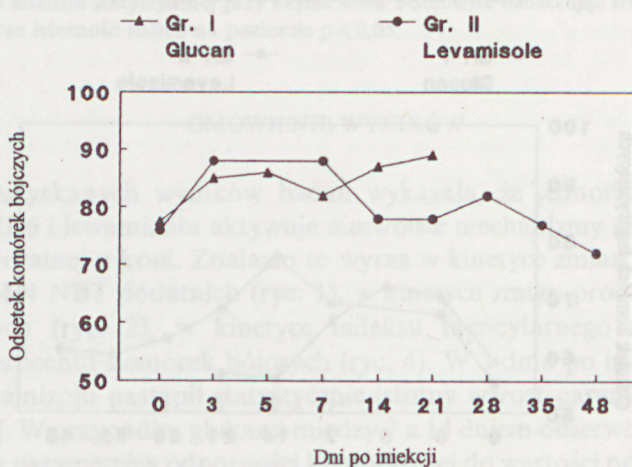
Ryc. 2. Kinetyka zmian w procentach komórek fagocytycznych po jednorazowej dawce glukanu 1,3/1,6 (Gr. I) i lewamizolu (Gr. II) u koni

Kinetics of percent phagocytic cells after injection of glucan 1.3/1.6 (Gr. I) and levamisole (Gr. II) in horses



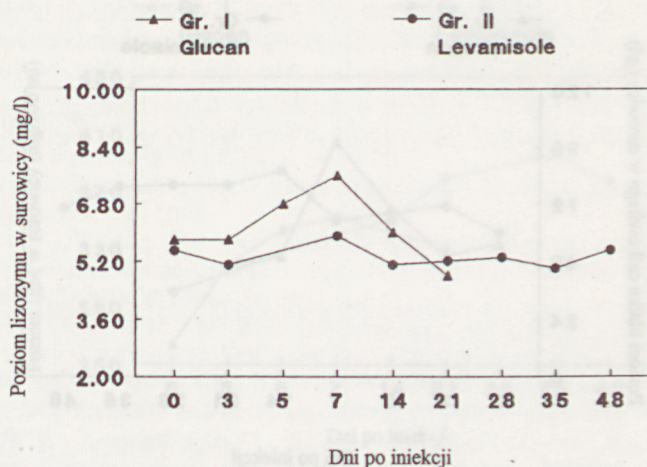
Ryc. 3. Kinetyka indeksu fagocyтары po jednorazowym podaniu glukanu 1,3/1,6 (Gr. I) i lewamizolu (Gr. II) u koni

Kinetics of phagocytic index after injection of glucan 1.3/1.6 (Gr. I) and levamisole (Gr. II) in horses



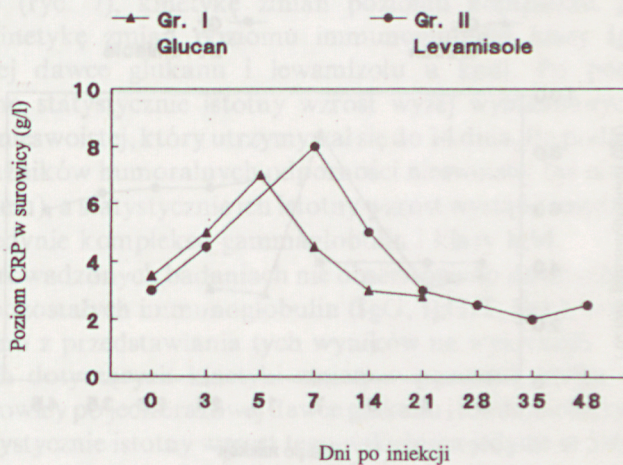
Ryc. 4. Kinetyka zmian w procencie komórek bójczych po jednorazowym podaniu glukanu 1,3/1,6 (Gr. I) i lewamizolu (Gr. II) u koni

Kinetics of percent killing cells after injection of glucan 1.3/1.6 (Gr. I) and levamisole (Gr. II) in horses



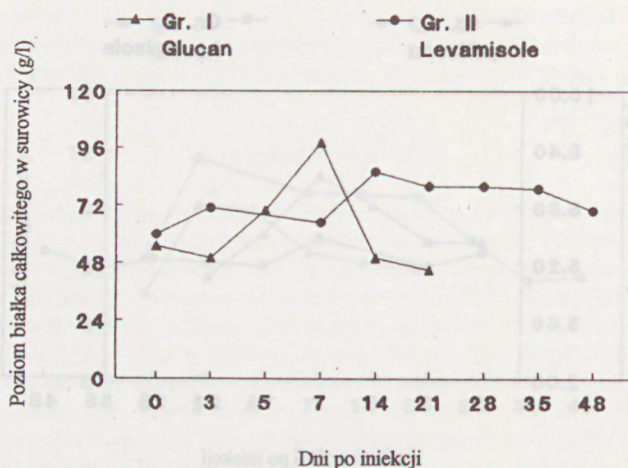
Ryc. 5. Kinetyka aktywności lizozymu w surowicy koni po jednorazowej dawce glukanu 1,3/1,6 (Gr. I) i lewamizolu (Gr. II)

Kinetics of lysozyme activity in serum after injection of glucan 1.3/1.6 (Gr. I) and levamisole (Gr. II) in horses



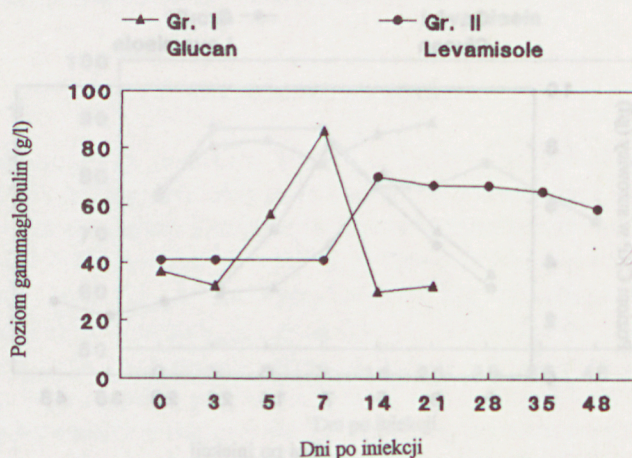
Ryc. 6. Kinetyka poziomu białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy koni po jednorazowej dawce glukanu 1,3/1,6 (Gr. I) i lewamizolu (Gr. II)

Kinetics of CRP level in serum after injection of glucan 1.3/1.6 (Gr. I) and levamisole (Gr. II) in horses



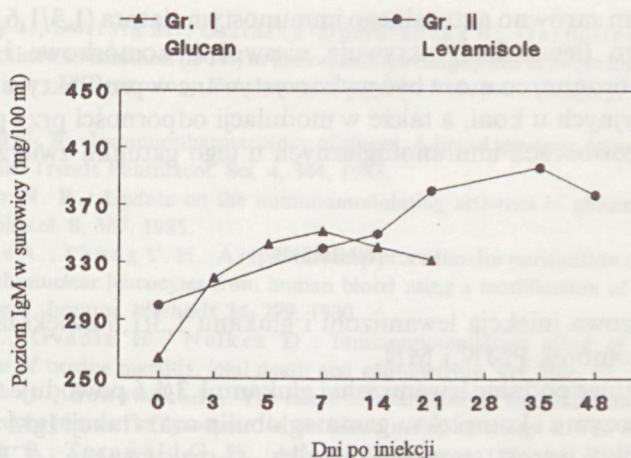
Ryc. 7. Kinetyka poziomu białka całkowitego w surowicy koni po jednorazowej iniekcji glukanu 1,3/1,6 (Gr. I) i lewamizolu (Gr. II)

Kinetics of total protein in serum after injection of glucan 1,3/1,6 (Gr. I) and levamisole (Gr. II) in horses



Ryc. 8. Kinetyka poziomu gammaglobulin w surowicy koni po jednorazowej dawce glukanu 1,3/1,6 (Gr. I) i lewamizolu (Gr. II)

Kinetics of total gammaglobulin level in serum after injection of glucan 1.3/1.6 (Gr. I) and levamisole (Gr. II) in horses



Ryc. 9. Kinetyka poziomu IgM w surowicy koni po jednorazowej iniekcji glukanu 1,3/1,6 (Gr. I) i lewamizolu (Gr. II)

Kinetic of IgM level in serum after injection of glucan 1.3/1.6 (Gr. I) and levamisole (Gr. II) in horses

zmian aktywności lizozymu w surowicy (ryc. 5), kinetykę zmian poziomu białka całkowitego (ryc. 7), kinetykę zmian poziomu kompleksu gammaglobulin (ryc. 8) i kinetykę zmian poziomu immunoglobulin klasy IgM (ryc. 9) po jednorazowej dawce glukanu i lewamizolu u koni. Po podaniu glukanu obserwowano statystycznie istotny wzrost wyżej wymienionych wskaźników odporności nieswoistej, który utrzymywał się do 14 dnia. Po podaniu lewamizolu wzrost wskaźników humoralnych odporności nieswoistej był niższy (w porównaniu z glukaniem), a statystycznie ich istotny wzrost wystąpił między 14 a 48 dniem i dotyczył jedynie kompleksu gammaglobulin i klasy IgM.

W przeprowadzonych badaniach nie obserwowano istotnych zmian w poziomach klas pozostałych immunoglobulin (IgG, IgG/T, IgA), w związku z czym zrezygnowano z przedstawiania tych wyników na wykresach.

Z danych dotyczących kinetyki zmian w poziomie białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy po jednorazowej dawce glukanu i lewamizolu (ryc. 6) wynika, że nastąpił statystycznie istotny wzrost tego wskaźnika jedynie w 5 dniu po podaniu glukanu oraz w 7 dniu po iniekcji lewamizolu. Ten krótkotrwały wzrost białka C-reaktywnego związany był prawdopodobnie ze wzmożoną aktywnością makrofagów i neutrofili mających bezpośredni wpływ na uwalnianie CRP przez hepatocyty. Tylko nieliczne doniesienia na temat kształtowania się poziomu CRP w stanach fizjologicznych i patologicznych u koni (36) wskazują na brak u tego gatunku zwierząt działania cytotatycznego badanych preparatów.

W badaniach własnych najwyższy poziom białka C-reaktywnego nie przekraczał 8 g/l, co mieści się w przedziale wahań fizjologicznych (36). Dopiero wartości powyżej 10 g/l wskazują na toczący się proces zapalny. Tak więc

podanie koniom zarówno naturalnego immunostymulatora (1,3/1,6 glukana), jak i syntetycznego (lewamizolu) aktywuje nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne, co może być wykorzystywane w profilaktyce oraz terapii chorób infekcyjnych u koni, a także w modulacji odporności przy pierwotnych i wtórnych niedoborach immunologicznych u tego gatunku zwierząt.

WNIOSKI

1. Jednorazowa iniekcja lewamizolu i glukanu 1,3/1,6 zwiększa aktywność fagocytarną komórek PMN i MN.
2. Jednorazowe podanie lewamizolu i glukanu 1,3/1,6 powoduje także wzrost aktywności lizozymu i kompleksu gammaglobulin oraz frakcji IgM w surowicy.
3. Niewielki wzrost poziomu białka C-reaktywnego (CRP) między 5 a 7 dniem po podaniu badanych immunostymulatorów jest wyrazem wzrostu aktywności komórek fagocytujących i ich wpływu na hepatocyty.
4. Glukan 1,3/1,6 oraz lewamizol aktywując nieswoiste mechanizmy obrony zwiększają odporność organizmu na choroby tła infekcyjnego i dlatego mogą być wykorzystywane w szeroko pojętej profilaktyce tych chorób.
5. Ze względu na szczególnie szybki wzrost aktywności komórek fagocytujących po podaniu glukanu (3-5 dzień) wydaje się, iż powinien on być wykorzystywany w początkowym okresie chorób infekcyjnych.

PIŚMIENICTWO

1. Almdahl S. M., Bogwald J., Hoffman J., Sjunneskog C., Seljelid R.: The effect of splenectomy of *Escherichia coli* sepsis and its treatment with semisoluble aminated glucan. *Scand. J. Gastroenterol.* **22**, 261, 1987.
2. Almdahl S. M., Bogwald J., Hoffman J., Giercksky K. E., Seljelid R.: Protection by aminated glucan in experimental endogenous peritonitis. *Eur. Surg. Res.* **19**, 78, 1987.
3. Anderson D. P., Siwicki A. K.: Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated glucan or chitosan by injection or immersion. *The Progressive Fish-Culturist* **56**, 258, 1994.
4. Bogwald J., Johnson E., Seljelid R.: The cytotoxic effect of mouse macrophages stimulated *in vitro* by a 1.3 glucan from yeast cell walls. *Scand. J. Immunol.* **15**, 297, 1982.
5. Bogwald J., Gouda I., Hoffman J., Larm O., Larsson R., Seljelid R.: Stimulatory effect of immobilized glycans on macrophages *in vitro*. *Scand. J. Immunol.* **20**, 355, 1984.
6. Bogwald J., Johnson E., Hoffman J., Seljelid R.: Lysosomal glycosidases in mouse peritoneal macrophages stimulated *in vitro* with soluble and insoluble glycans. *Journal of Leukocyte Biology* **35**, 357, 1984.
7. Brunner J., Muskoplat C.: Immunomodulatory effects of levamisole. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **176**, 1159, 1980.

8. Dębowy J., Światała M., Omińska-Domaradzka B., Garbuliński T.: Levamisole Chloromethine and Imuthiol (DTC) as immunostimulating agents in swine European Association for Veterinary Pharmacology Toxicology Congress. Budapest, Hungary, August 28 Sept. 2, 1988.
9. DiLuzio N. R.: Immunopharmacology of glucan. A broad spectrum enhancer of host defense mechanism. Trends Pharmacol. Sci. 4, 344, 1983.
10. DiLuzio N. R.: Update on the immunomodulating activities of glucans. Springer Semin. Immunopathol. 8, 387, 1985.
11. Ferrante A., Thong Y. H.: A rapid one-step procedure for purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood using a modification of the Hypaque-Ficoll Technique. J. Immun. Methods 34, 279, 1980.
12. Flesh J., Ovadia H., Nelken D.: Immunopotentiating effect of levamisole in the prevention of bovine mastitis, fetal death and endometritis. Vet. Rec. 17, 56, 1982.
13. Goranov H., Bonowska H.: The effect of levamisole on the functional and cytochemical state of leucocytes and of lysozyme, in the blood serum of sheep. J. Vet. Sci. 24, 72, 1987.
14. Greco D. S., Turnwald G. H., Adams R., Gossett K. A., Kearney M., Casey H.: Urinary gamma-induced nephrotoxicity. Am. J. Vet. Res. 46, 2332, 1985.
15. Johnson E., Seljelid R., Bogwald J., Larm O., Scholander E.: Endocytosis of agarose in mouse peritoneal macrophages *in vitro*. Scand J. Immunol. 15, 205, 1982.
16. Juskiewicz T.: Toksykologiczne problemy farmakoterapii zwierząt. Acta Pol. Toxicol. 1, 20, 1993.
17. Kimura A., Sherwood R. L., Goldstein E.: Glucan alteration of pulmonary antibacterial defense. R. Reticuloendothel. Soc. 34, 1, 1983.
18. Krzyżanowski J.: Wpływ lewamizolu na niektóre wskaźniki odporności u owiec. Annales UMCS, Sectio DD, 44, 127, 1989.
19. Krzyżanowski J.: Stosowanie lewamizolu w profilaktyce zapaleń wymion u owiec. Annales UMCS, Sectio DD, 45, 51, 1990.
20. Krzyżanowski J.: Wpływ podawania lewamizolu ciężarnym owcom na wskaźniki zdrowotne i hodowlane ich potomstwa. Annales UMCS, Sectio DD, 46, 69, 1991.
21. Krzyżanowski J., Orlik S.: Wpływ lewamizolu na obraz kliniczny oraz zachowanie się nieswoistych mechanizmów obronnych w przebiegu doświadczalnie wywołanego zapalenia wymienia u owiec. Annales UMCS, Sectio DD, 49, 93, 1994.
22. Krzyżanowski J., Siwicki A. K., Tomczyk G.: Immunostimulatory effect of the nonspecific cellular and humoral defence mechanisms in chickens. Annales UMCS, Sectio DD 50, 203, 1995.
23. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.: Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265, 1980.
24. Paape M. J., Miller R. H., Ziv G.: Effects of florfenicol, chloramphenicol, and thiamphenicol on phagocytosis, chemiluminescence, and morphology of bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes. J. Dairy. Sci. 73, 1734, 1990.
25. Sajewicz W., Jacyszyn K.: Polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence as a method for investigating the cytotoxicity of chemical compounds. Acta Pol. Toxicol. 1, 141, 1993.
26. Seljelid R., Bogwald J., Lundwald A.: Glycan stimulation of macrophages *in vitro*. Expl. Cell. Res. 131, 121, 1981.
27. Seljelid R., Bogwald J., Hoffman J., Larm O.: A soluble 1,3-D-Glucan derivative potentiates the cytostatic and cytolytic capacity of mouse peritoneal macrophages *in vitro*. Immunopharmacology 7, 69, 1984.
28. Sharma L. K., Jagadish S., Mulbagal A. N.: Effects of haemorrhagic septicemia vaccination and levamisole administration on the humoral response in cross-bred calves. J. Vet. Pharmacol. Therap. 13, 22, 1990.

29. Siwicki A. K., Anderson D. P., Dixon O.: Comparisons on nonspecific and specific immunomodulatory by oxolinic acid, oxytetracycline and levamisole in salmonides. *Immunology* **23**, 195, 1989.
30. Siwicki A. K., Anderson D. P.: Immunostimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. U.S. Fish and Wildlife Service – I FI Olsztyn 1, 1, 1993.
31. Siwicki A. K., Anderson D. P.: Nonspecific defence mechanisms assay in fish. I. Phagocytic index, adherence and phagocytic ability of neutrophils (NBT test) and myeloperoxidase activity test. *Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods*. FAO-GCP/INT/526/JPN, 105, 1993.
32. Siwicki A. K., Anderson D. G.: Development of *in vitro* to screen potential immunostimulants. Dosage effects of glucan and chitosan on splenic cell from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The Nordic Symposium on Fish Immunology, Lysekil, Sweden 19 May 1993.
33. Trnovec T., Benes L., Masler L., Sandulaj J.: Immunofarmakologia glukanu klinicky perspektivnej immunostimulacnej latky. *Farm. Obzor* **56**, 271, 1987.
34. Williams D. L., Sherwood E. R., McNamee R. B., Jones E. L., DiLuzio N. R.: Therapeutic efficacy of glucan in a murine model of hepatic metastatic disease. *Hepatology* **5**, 198, 1985.
35. Williams D. L., Pretus H. A., McNamee R. B., Jones E. L., Ensley H. E., Browder I. R., DiLuzio N. R.: Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Immunopharmacology* **22**, 139, 1991.
36. Yamashita K., Fujinaga T., Okumura M., Takiguchi M., Tsunoda N., Mizuno S.: Serum C-reactive protein (CRP) in horses: The effect of aging, sex, delivery and inflammations on its concentration. *J. Vet. Med. Sci.* **56**, 1019, 1991.
37. Ziv V., Storper M., Saran A.: The effect of levamisole therapy during the dry period on clinical and subclinical bovine mastitis. *Refuah Vet.* **38**, 108, 1981.

SUMMARY

The studies were performed on 12 clinically healthy horses, both sexes, 4-8 years old in 2 groups, 6 animals in each. The animals from the first group were once intramuscularly injected glucan 1.3/1.6 (TLFN, USDA Cortland NY, USA) at a dose of 0.19 mg/kg b.w. In the second group levamisole was used once, subcutaneously, at a dose of 2.0 mg/kg b.w. The determinations were done with blood before immunostimulation (time 0) and after 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35 and 48 days since immunostimulation. The following parameters were tested: NBP, phagocytic index, internal killing test, lysozyme activity, total protein content, globulin complex, C-reactive protein (CRP), blood level of IgG, IgG(T), IgA and IgM. It was found that one injection of glucan 1.3/1.6 or levamisole significantly stimulates cellular and humoral defenses in the horse.