

*Zakład Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Akademii Rolniczej w Lublinie

**Prywatna Lecznica dla Zwierząt, ul. Kielecka 17, 26-060 Chęciny

MICHAŁ KRAKOWSKI**, KRZYSZTOF KOSTRO*

*Wpływ immunostymulacji na odporność nieswoistą
samic lisów polarnych w drugiej połowie ciąży
i zdrowotność ich potomstwa*

Stimulation of nonspecific immunity in female polar foxes
in the second part of pregnancy and health state of their progeny

STRESZCZENIE

Dwukrotne podanie preparatu Isoprivet lub Levamisole w dawkach stymulujących układ immunologiczny samic ciężarnych lisów polarnych nie wywołuje niepożądanych efektów. Zastosowanie aktywnej immunostymulacji u samic w drugiej połowie ciąży zwiększa aktywność metaboliczną, fagocytarną i bójczą neutrofilów oraz surowiczy poziom lizozymu i IgG, co świadczy o dużej skuteczności tej metody w przywracaniu zaburzonych funkcji komórkowych i humoralnych mechanizmów odporności nieswoistej. Stwierdzona korelacja pomiędzy kształtowaniem się surowiczego poziomu lizozymu i IgG może być jednym z kryterium oceny stanu zdrowotnego samic lisów polarnych w okresie ciąży oraz stanowić przydatny wskaźnik w prognozowaniu wystąpienia zaburzeń okresu okołoporodowego.

Słowa kluczowe: immunopotencjalizacja, odporność nieswoista, lis polarny, ciąża, okres okołoporodowy

WSTĘP

Infekcje bakteryjne układu moczowo-płciowego są jedną z głównych przyczyn zaburzeń w reprodukcji lisów, przynoszących duże straty w hodowli. U samic ciężarnych są one przyczyną obumierania i resorpcji zarodków, mumifikacji płodów, późnych ronień, rodzenia martwych szczeniąt oraz wysokiej śmiertelności osesków w pierwszych dniach po urodzeniu [Kostro i in. 1997, Masihi 2000, Krakowski i in. 2002].

Stosowanie antybiotyków i chemioterapeutyków w leczeniu zakażeń bakteryjnych układu rozrodczego u ciężarnych samic lisów hodowlanych nie przynosi często spodziewanych efektów. Ponadto niektóre antybiotyki stosowane przez dłuższy okres u samic ciężarnych działają toksycznie i teratogennie na płód [Milano i in. 1991, Krakowski 1996, Śmiełewska-Łoś 1998, Kostro i in. 2001].

W rozwoju infekcji bakteryjnych kluczowe znaczenie ma sprawność mechanizmów odporności naturalnej. Ich znajomość pozwala na prowadzenie kontrolowanej potencjalizacji nieswoistej odporności naturalnej, odpowiedzialnej w dużym stopniu za niewrażliwość zwierząt na infekcje. Pomyślnie wyniki uzyskane przez wielu autorów w profilaktyce schorzeń w okresie okołoporodowym u sów i koni po immunostymulacji samic ciężarnych wskazują zarówno na bezpieczeństwo stosowania, jak i dużą skuteczność tej metody [Hennessy i in. 1987, Krakowski 1996, Krakowski i in. 1999, 2002].

Celem badań była ocena wpływu dwóch immunomodulatorów: Isoprivetu lub Levamisolu na wybrane parametry odporności nieswoistej u samic lisów polarnych w drugiej połowie ciąży oraz skuteczności tej metody w poprawie zdrowotności ich potomstwa.

MATERIAŁ I METODY

Zwierzęta doświadczalne

Badania przeprowadzono w fermie liczącej 150 samic lisów polarnych stada podstawowego, w której od 3 lat notowano znaczną śmiertelność noworodków oraz niską średnią odchowanych szczeniąt od samicy. Badaniem objęto 30 samic będących w drugiej połowie ciąży, niepoddanych stymulacji przed okresem zbliżającej się rui. Zwierzęta podzielono na dwie grupy doświadczalne (grupa I i II) oraz grupę kontrolną (grupa III) po 10 sztuk w każdej. Samice były utrzymywane w tych samych warunkach i żywione systemem tradycyjnym, według zalecanych dla lisów polarnych norm, z uwzględnieniem dodatków mineralno-witaminowych oraz miały stały dostęp do wody.

Preparaty immunostymulujące

Do immunostymulacji użyto preparatu Isoprivet (firmy Vet-Agro), stanowiącego 20% wodny roztwór izoprynozyny [syntetyczny kompleks inozyny, 1-dimetyloaminopropano-2-olu (DIP) i 4-acetamidobenzoesanu (PacBA)] do iniekcji oraz preparatu Levamisole (firma Biowet Gorzów Wlkp.), stanowiącego 7,5% roztwór *levamisolum hydrochloricum* do iniekcji.

W 41. dniu ciąży samicom grupy I podano Levamisole podskórnie, dwukrotnie w odstępach 4-dniowych, w dawce 2,5 mg substancji czynnej/kg m.c. Natomiast samice grupy II otrzymały preparat Isoprivet domięśniowo dwukrotnie w tym samym przedziale czasowym, w dawce 10 mg substancji czynnej/kg m.c. Grupę kontrolną (grupa III) stanowiły samice, będące w tym samym okresie ciąży, które nie otrzymały immunostymulatora.

Samice obserwowano do rozwiązania, a następnie przez pierwszych 7 tygodni po porodzie, tj. do odsadzenia potomstwa, zwracając uwagę na liczbę prawidłowo wykończonych samic, liczbę urodzonych szczeniąt w miocie, ich żywotność i liczbę odchowanych zwierząt do odsadzenia.

Metody badań immunologicznych

Test redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) wykonano metodą Parka i in. [1968] w modyfikacji Kostro [1993], w dwu wariantach: spontanicznym i stymulowanym. Do stymulacji redukcji NBT przez neutrofile użyto zymosanu (Zymosan A, Sigma) opsonizowanego surowicą homologiczną, przygotowanego metodą opisaną przez Kostro [1993]. Wyniki testu NBT przedstawiono jako procent komórek wykazujących obecność formozanu NBT w 100 liczonych kolejno neutrofilach.

Odczyn fagocyтары i bóćzości. Zdolność pochłaniania bakterii przez neutrofile oraz odczyn bóćzości granulocytów określono w stosunku do wzorcowego szczepu *Staphylococcus aureus* Oxford 209P metodą opisaną przez Kostro [1993]. Do odczynów używano surowicy homologicznej inaktywowanej (56°C – 30 min), uzyskanej z krwi pobranej od 10 zdrowych lisów

polarnych w wieku 1 roku. Surowice, w objętości 1 ml, do chwili użycia przechowywano w -20°C . Wyniki odczynu fagocytarnego przedstawiono w postaci procentu komórek fagocytujących oraz indeksu fagocytarnego. Przy ustalaniu indeksu fagocytarnego liczono średnią liczbę gronkowców sfagocytowanych przez jeden neutrofil, obliczając gronkowce w 100 kolejnych neutrofilach w dwu preparatach z jednej próbki krwi. Natomiast aktywność bójczą granulocytów wyrażono w procentach, który obliczano według wzoru:

$$I - \text{średnia liczba kolonii w próbce badanej} / \text{średnia liczba kolonii w kontroli} \cdot 100$$

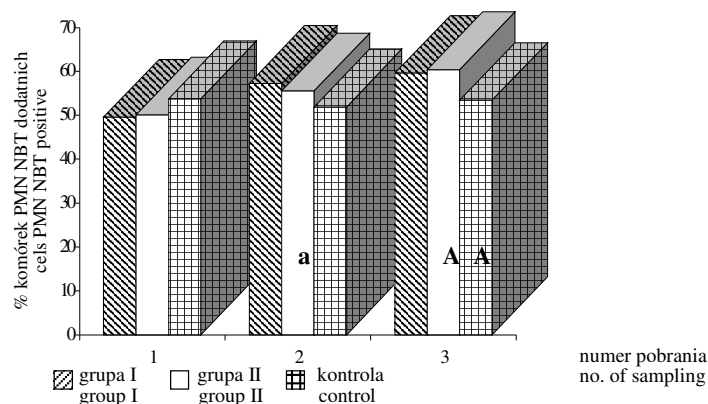
Bakteriolityczną aktywność lizozymu (LZM) w surowicy określono metodą płytkową wobec *Micrococcus luteus* (Serva), metodą Grahama opisaną przez Zawistowskiego [1975].

Poziom przeciwciał klasy IgG określono metodą radioimmunodfuzyjną przy użyciu komercyjnego zestawu Binding Site RID (firmy Binding Site, England), przeznaczonego do oznaczania poziomu IgG w surowicy psów.

Wymienione testy wykonano przed podaniem preparatu Levamisole lub Isoprivet, tj. w 41. dniu ciąży (1. pobranie), a następnie w 4. dniu po podaniu pierwszej (2. pobranie) i drugiej (3. pobranie) dawki jednego z wymienionych preparatów (45. i 49. dzień ciąży). Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, obliczając średnią i odchylenie standardowe oraz istotność różnic pomiędzy grupami testem t-Studenta.

WYNIKI I OMÓWIENIE

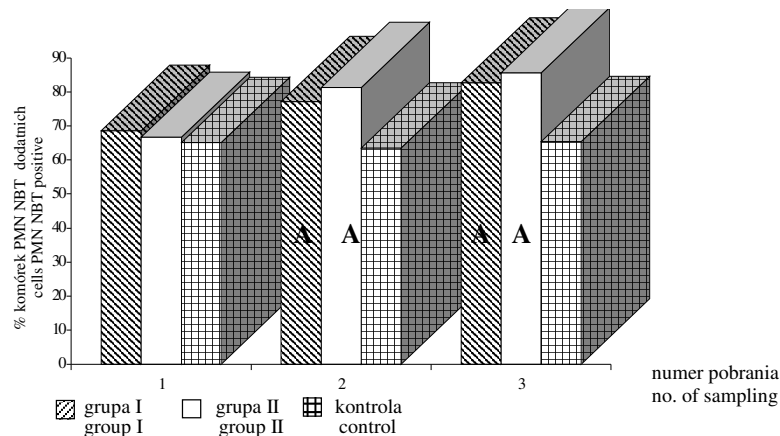
Zmiany dotyczyły wszystkich badanych parametrów nieswoistej odporności komórkowej samic lisów polarnych w drugiej połowie ciąży pod wpływem preparatów Levamisole lub Isoprivet. Dwukrotne podanie lewamizolu lub izoprynozyny samicom grupy I i II spowodowało istotny wzrost odsetka neutrofilów NBT dodatnich w porównaniu z wartościami początkowymi i grupą kontrolną (rys. 1). Wzrost średnich wartości testu NBT



Rys. 1. Odsetek komórek PMN krwi obwodowej samic lisów polarnych w II połowie ciąży redukujących NBT w teście spontanicznym po immunostymulacji lewamizolem lub izoprynozyna a – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupami doświadczalnymi a kontrolą przy $\alpha \leq 0,05$; A – przy $\alpha \leq 0,01$

Fig. 1. Percentage of PMN cells in peripheral blood of female polar foxes in the second half of pregnancy reducing NBT in a spontaneous test after immunostimulation with Levamisole and Isoprivet; a – statistically significant differences between experimental groups and control ($\alpha \leq 0.05$) A – $\alpha \leq 0.01$

w wersji stymulowanej zymosanem notowano w tych samych terminach oznaczeń, co w teście spontanicznym u samic` stymulowanych (rys. 2). U samic grupy kontrolnej (grupa III) średnie wartości testu NBT w obu jego wersjach utrzymywały się stale na poziomie zbliżonym do wyjściowego.



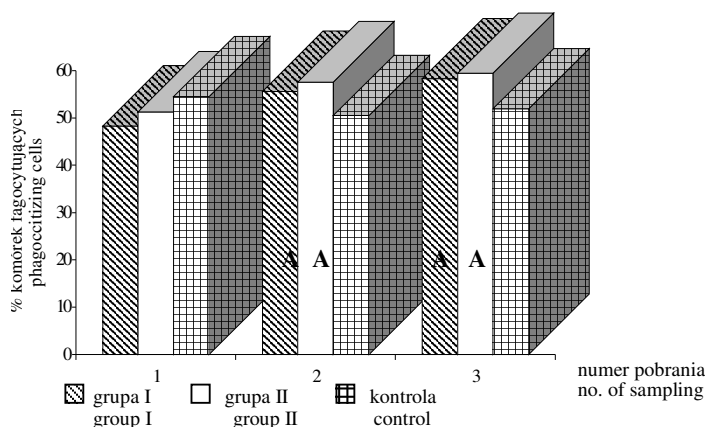
Rys. 2. Odsetek komórek PMN krwi obwodowej samic lisów polarnych w II połowie ciąży redukujących NBT w teście stymulowanym po immunostymulacji lewamizolem lub izoprynozyną A – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupami doświadczalnymi a kontrolą ($\alpha \leq 0,01$)

Fig. 2. Percentage of PMN cells in peripheral blood of female polar foxes in the second half of pregnancy reducing NBT in a spontaneous test after immunostimulation with Levamisole and Isoprivet; A – statistically significant differences between experimental groups and control ($\alpha \leq 0,01$)

W grupach samic stymulowanych nastąpił także statystycznie istotny wzrost odsetka komórek fagocytarnych i indeksu pochłaniania oraz odsetka komórek bójczych (rys. 3, 4, 5). Wzrost badanych wskaźników obserwowano w 4. dniu po podaniu I i II dawki ocenianych preparatów. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo wysoki wzrost indeksów fagocytarnych i bójczości.

Wskaźniki nieswoistej odporności humoralnej u samic lisów polarnych w drugiej połowie ciąży po podaniu immunostymulatorów ilustrują rysunki 6 i 7. Po dwukrotnej aplikacji jednego z wymienionych preparatów średnie wartości stężenia IgG u samic w grupie I i II nie uległy istotnym zmianom i kształtowały się na poziomie zbliżonym do wartości wyjściowych (41. dzień ciąży). Natomiast różniły się istotnie w stosunku do średnich wartości grupy kontrolnej. U samic niestymulowanych w 45. i 49. dniu ciąży poziom IgG osiągał najniższe wartości w ciągu całego okresu prowadzonych badań.

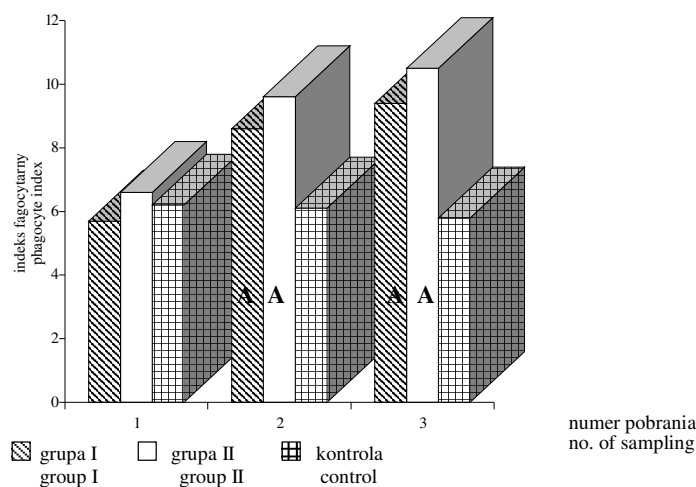
W grupach samic stymulowanych już po pierwszej dawce obu badanych preparatów wzrosła istotnie bakteriolityczna aktywność lizozymu (rys. 6). Druga dawka, podana w odstępie 4 dni, spowodowała dalszy wzrost jego średnich wartości, lecz nie był on statystycznie istotny w porównaniu z wartościami uzyskanymi po pierwszej dawce. U samic niestymulowanych średnie wartości lizozymu były niskie w poszczególnych terminach oznaczeń i zbliżone do wartości wyjściowych.



Rys. 3. Odsetek komórek PMN fagocytujących krwi obwodowej samic lisów polarnych w II połowie ciąży po immunostymulacji lewamizolem lub izoprynozyną

A – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupami doświadczalnymi a kontrolą ($\alpha \leq 0,01$)

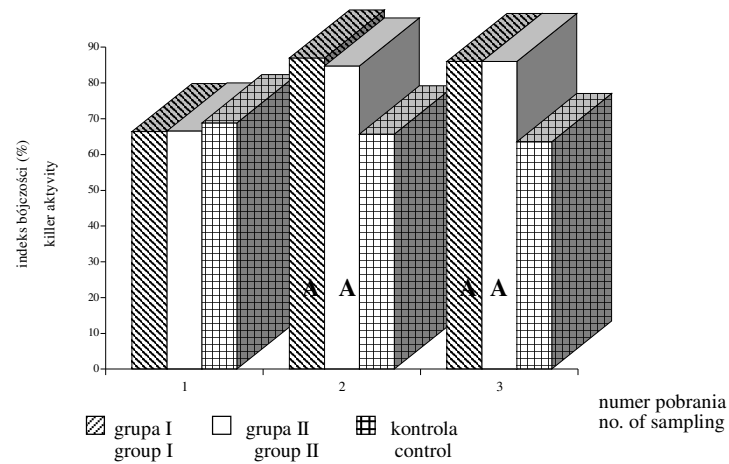
Fig. 3. Percentage of PMN phagocytizing cells in peripheral blood of female polar foxes in the second half of pregnancy reducing NBT in a spontaneous test after immunostimulation with Levamisole and Isoprivet; A – statistically significant differences between experimental groups and control ($\alpha \leq 0.01$)



Rys. 4. Wskaźniki indeksu fagocytafny komórek PMN krwi obwodowej samic lisów polarnych w II połowie ciąży po immunostymulacji lewamizolem lub izoprynozyną

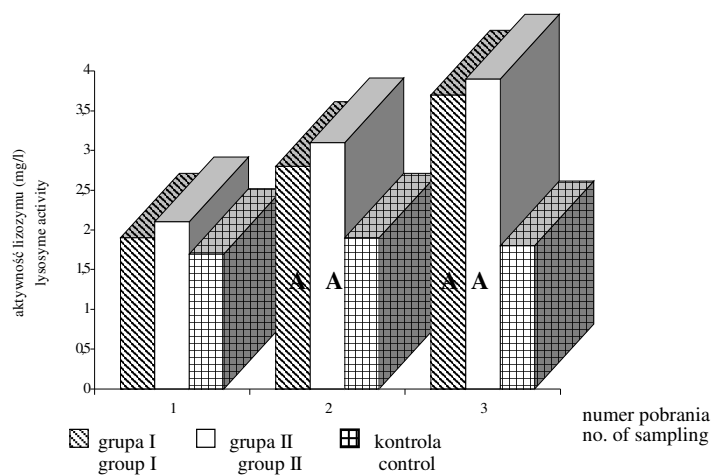
A – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupami doświadczalnymi a kontrolą ($\alpha \leq 0,01$)

Fig. 4. Values of phagocyte index of PMN cells of peripheral blood in female polar foxes in the second half of pregnancy after immunostimulation with Levamisole or Isoprivet; A – statistically significant differences between experimental groups and control ($\alpha \leq 0.01$)



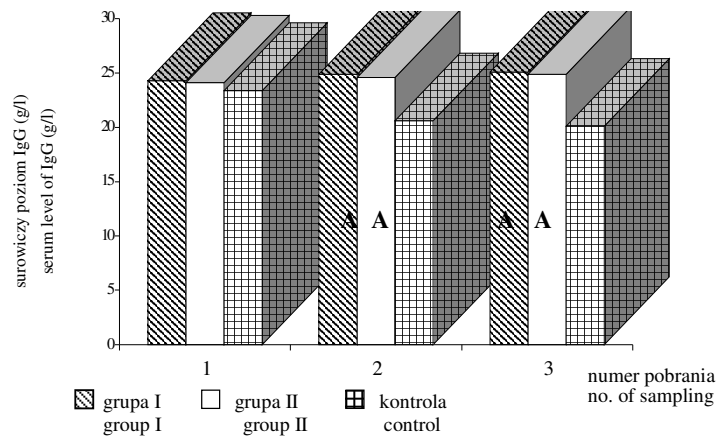
Rys. 5. Aktywność bójezości granulocytów krwi obwodowej samic lisów polarnych w II połowie ciąży po immunostymulacji lewamizolem lub izoprynozyną

A – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupami doświadczalnymi a kontrolą ($\alpha \leq 0,01$)
 Fig. 5. Killer activity of granulocytes of peripheral blood in female polar foxes in the second half of pregnancy after immunostimulation with Levamisole or Isoprivet; A – statistically significant differences between experimental groups and control ($\alpha \leq 0.01$)



Rys. 6. Bakteriolytyczna aktywność lizozymu w surowicy krwi samic lisów polarnych w II połowie ciąży po immunostymulacji lewamizolem lub izoprynozyną

A – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupami doświadczalnymi a kontrolą ($\alpha \leq 0,01$)
 Fig. 6. Bacteriolytic activity of lysosyme of peripheral blood in female polar foxes in the second half of pregnancy after immunostimulation with Levamisole or Isoprivet; A – statistically significant differences between experimental groups and control ($\alpha \leq 0.01$)



Rys. 7. Surowiczy poziom IgG u samic lisów polarnych w II połowie ciąży po immunostymulacji lewamisolem lub izoprinyzną

A – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupami doświadczalnymi a kontrolą ($\alpha \leq 0,01$)

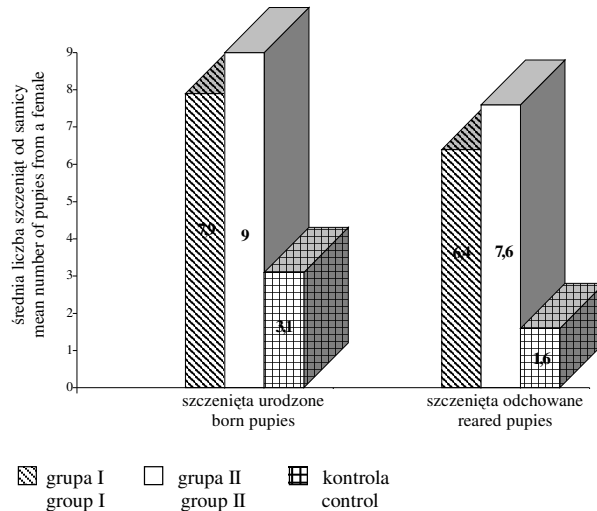
Fig. 7. Serum level IgG in female polar foxes in the second half of pregnancy after immunostimulation with Levamisole or Isoprivet;

A – statistically significant differences between experimental groups and control ($\alpha \leq 0,01$)

Preparaty Levamisole lub Isoprivet podane dwukrotnie w dawce immunostymulującej samicom lisów polarnych w drugiej połowie ciąży (grupa I i II) nie wywoływały objawów niepożądanych. W zestawieniu porównawczym przedstawionym na rys. 8 stwierdzono istotne różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną w liczbie samic roniących oraz tracących potomstwo w pierwszych 3–4 dniach po wykończeniu. W grupach samic doświadczalnych (grupa I, II) nie notowano przypadków ronień, natomiast w grupie kontrolnej (grupa III) odsetek samic roniących w ostatnim tygodniu przed spodziewanym porodem był dość wysoki i wynosił 30%. Samice grupy I i II pomyślnie urodziły i odchowwały potomstwo. Ponadto u samic tych nie notowano przypadków zapalenia gruczołu mlekowego w pierwszych dniach po porodzie oraz objawów bezmleczności w okresie laktacji. Natomiast w grupie kontrolnej (grupa III) odsetek samic tracących potomstwo w pierwszych 3–4 dniach po wykocie był wysoki i wynosił 40%. Szczęnięta rodziły się słabe, nie wykazywały chęci do ssania i ginęły w pierwszych dniach po urodzeniu. Miarodajny wskaźnik rozrodu, określany stosunkiem liczby odsadzonych do liczby szczeniąt urodzonych, wynosił 80,7% w grupie samic stymulowanych preparatem Levamisole (grupa I) i 84,1% preparatem Isoprivet (grupa II). Natomiast w grupie kontrolnej (grupa III) wynosił on 51,6%. Wskaźnik odchowu szczeniąt w momencie odsadzenia (7 tygodni) kształtował się średnio na samicę – w grupie I 6,4, natomiast w grupie II 7,6 (rys. 8). W grupie kontrolnej wskaźnik ten był 4-5-krotnie niższy w porównaniu z grupami doświadczalnymi i wynosił 1,6.

Sterowanie układem immunologicznym, zwłaszcza w aspekcie praktycznym, jest przedmiotem licznych badań doświadczalnych i klinicznych. Dotyczą one zwłaszcza „środków potęgujących lub korygujących reaktywność immunologiczną” przez wpływ na

mechanizmy odporności naturalnej oraz wzmaganie odpowiedzi immunologicznej [Davila Velazquez i in. 1998, Krakowski i in. 1999, Kostro i in. 2001]. Badania własne przeprowadzone na samicach lisów polarnych w drugiej połowie ciąży umożliwiły prześledzenie zachowania się nieswoistych komórkowych i humoralnych mechanizmów obronnych po zastosowaniu aktywnej nieswoistej immunostymulacji. Stwierdzono immunopotencjalizujący wpływ lewamizolu i izoprinozyny na aktywność metaboliczną, fagocytarną i bójczą neutrofilów. Okazało się, że hamowane w prawidłowym przebiegu ciąży mechanizmy odporności komórkowej, na korzyść czynników humoralnych, zostają pobudzone i biorą udział w reakcjach obronnych [Burns i in. 1999].



Rys. 8. Porównawcze wyniki średniej liczby szczeniąt urodzonych i odchowanych w grupie samic stymulowanych i w kontroli

Fig. 8. Comparative results of the mean number of puppies born and reared in a group of stimulated females and in control

Wyniki uzyskane u samic stymulowanych, dotyczące kształtowania się surowiczego poziomu IgG wskazują, że u zwierząt z prawidłowym przebiegiem ciąży obniżenie się poziomu IgG w surowicy w końcowym okresie ciąży jest następstwem zwiększonego biernego transportu tego białka do układu rozrodczego, czemu sprzyja wzrost poziomu estrogenów, zwiększających przepływ krwi w układzie rozrodczym oraz proces kolostro-genezy. U samic niestymulowanych podczas całego doświadczenia stężenie IgG utrzymywało się na istotnie niższym poziomie w stosunku do grup doświadczalnych, a najniższe jego wartości stwierdzono w 45. i 49. dniu oznaczeń (ciąży). Takie zachowanie IgG można wiązać z występowaniem odczynów zapalnych w macicy, wywołanych nasilającą się infekcją bakteryjną i związane z nimi wzmożone przenikanie immunoglobuliny klasy IgG z surowicy do ogniska zapalnego. Wyraźny spadek poziomu IgG przy równoczesnym 2-3-krotnym wzroście IgA obserwowano u krów i suk z nieprawidłowym przebiegiem okresu okołoporodowego [Śmiełowska-Łoś 1998, Kostro i in. 2000].

W badaniach nad bakterolityczną aktywnością lizozymu u samic stulowanych w drugiej połowie ciąży obserwowano istotny wzrost jego stężenia w stosunku do wartości wyjściowych oraz grupy kontrolnej, co świadczy o aktywacji komórek układu fagocytarnego pod wpływem zastosowanych immunostymulatorów, które są głównym źródłem jego produkcji. Stwierdzona w badaniach własnych korelacja pomiędzy kształtowaniem się surowiczego poziomu lizozymu i IgG może być jednym z kryterium oceny stanu zdrowotnego macy u samic lisów polarnych w okresie ciąży oraz stanowić przydatny wskaźnik w prognozowaniu wystąpienia zaburzeń okresu okołoporodowego. Z uzyskanych danych wynika, że kształtowanie się poziomu badanych wskaźników nieswoistej odporności humoralnej w surowicy samic lisów polarnych jest również przydatne w ocenie efektów zastosowania immunostymulacji nieswoistej.

PIŚMIENNICTWO

- Burns D.N., Nourjah P., Wright D.J., Minkoff H., Landesman S., Rubinstein A., Goedert J.J., Nugent R.P. 1999. Changes in immune activation markers during pregnancy and postpartum. *J. Reprod. Immunol.* 42, 147.
- Davila Velazquez J.R., Santos Preciado J.I., Martinez Cairo S. 1998. Effect of levamisole on microbicidal activity and chemotaxis in polymorphonuclear cells. *Revista Alergia Mexico*, 45, 43.
- Hennessy K.J., Blecha F., Kluber E.F. 1987. Isoprinosine and levamisole immunomodulation in artificially reared neonatal pigs. *Am. J. Vet. Res.* 48, 477.
- Kostro K. 1993. Wpływ wybranych parametrów na aktywność fagocytarną i bójczą granulocytów krwi obwodowej lisów polarnych *in vitro*. *Annales UMCS. sec. DD*, 48, 147.
- Kostro K., Majer-Dziedzic B., Wawrzkiwicz J. 1997. *Corynebacteria* of group A. A frequent pathogen of breeding foxes in the perinatal period. *Scientifur*, 21, 215.
- Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K., Krakowski L. 2000. Immunologiczne i immunopatologiczne mechanizmy zapalenia. *Medycyna Wet.* 56, 479.
- Kostro K., Krakowski L., Gliński Z., Krakowski M. 2001. Stymulacja odporności nieswoistej – alternatywną metodą w profilaktyce i terapii zakażeń układu rozrodczego lisów hodowlanych. *Annles UMCS sec. DD*, 57, 159.
- Krakowski L. 1996. Wpływ podawania lewamizolu i glukanu 1.3/1.6 ciężarnym klaczom na wybrane wskaźniki odporności nieswoistej u źrebiąt. Praca doktorska, Akademia Rolnicza w Lublinie.
- Krakowski L., Krzyżanowski J., Siwicki A.K., Wrona Z. 1999. Immunostimulation of pregnant sows with isoprinosine or levamisole and parameters of unspecific cellular and humoral immunity in piglets during first weeks of their life. *Polish J. Vet. Sci.* 2, 27.
- Krakowski L., Krzyżanowski J., Wrona Z., Kostro K., Siwicki A.K. 2002. Influence of nonspecific immunostimulation of pregnant sows on the immunological value of colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 89.
- Masihi K.N. 2000. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 14, 181.
- Milano S., Dieli M., Millott S., Miceli M.D., Maltese E., Cillari E. 1991. Effect of isoprinosine on IL-2, IFN-gamma and IL-4 production *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Immunopharmacol.* 13, 1013.
- Mizak B., Rzeżutka A., Matras J. 1998. Potencjalne czynniki zaburzeń w rozrodzie samic lisów hodowlanych. *Medycyna Wet.* 54, 271.
- Śmiełowska-Łoś E. 1998. Analiza zakaźnych przyczyn zaburzeń w rozrodzie lisów hodowlanych. *Zesz. Nauk. AR, Wrocław. Wet.* 344, 55.

- Paape M.J., Nickerson S.C. 1990. *In vivo* effects of chloramphenicol and tetracycline and gentamicin on bovine neutrophil function and morphologic features. *Am. J. Vet. Res.* 7, 1055.
- Park B.H., Fikrig S.M., Smithwick E.M. 1968. Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. *Lancet*, 2, 532.
- Wawron W., Szczubiał M. 2000. Stymulacja układu odpornościowego krów i świń w okresie okołoporodowym. *Medycyna Wet.* 56, 764.
- Zawistowski S. 1975. *Technika histologiczna, podstawy histologii oraz histologia*. PZW, Warszawa.

SUMMARY

Isoprivet and Levamisole used twice at therapeutic doses were well tolerated by pregnant polar foxes. Used at the second part of pregnancy by increasing the metabolic, phagocytic and bactericidal activity of neutrophils, serum level of lysozyme and IgG they restored the disturbed functions of cellular and humoral nonspecific defense mechanisms of pregnant foxes. The existing strong correlation between the level of serum lysozyme and IgG may be used to evaluate the health state of foxes at the second part of pregnancy. It can also be used for a prognosis of the disturbances of the periparturient period in polar foxes.

Key words: immunopotentialization, nonspecific immunity, polar fox, pregnancy, periparturient period