

Wpływ suplementacji nukleotydami na humoralną odpowiedź immunologiczną psów na szczepienie przeciwko nosówce u szceniąt

K. KUNGL, J. NICPOŃ, Ł. LEWKOT, A. KUROSAD, K. GLIŃSKA

Katedra Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Kliniką Koni, Psów i Kotów

Wydział Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej we Wrocławiu

Nukleotydy są prekursorami DNA i RNA, a także odgrywają kluczową rolę w wielu reakcjach metabolicznych fundamentalnych dla aktywności komórkowej (Hand, Carver). Nukleotydy mogą być syntetyzowane endogennie i dlatego nie są uważane za niezbędne składniki odżywcze. Rola nukleotydów w żywieniu jest określana jako "warunkowo niezbędna". Warunki, w których te składniki odżywcze mogą stać się niezbędne obejmują głównie szybką replikację komórek: wzrost i dojrzewanie przewodu pokarmowego, naprawę jelit po bieguncie, powrót do zdrowia po hepatektomii, szybki wzrost i wyzwania immunologiczne (Carver, van Buren, Pickering). Saviano et al. sugeruje ograniczoną biodostępność nukleotydów diety, późniejsze badania (Lopez-Navarro), jednak udokumentowane ich znaczące włączenie do wątrobowych puli nukleotydów. Uauy i wsp. stwierdzili podobną zależność między nukleotydami pokarmowymi a zawartością RNA w jelicie cienkim. Niezależnie od zawartości białka w diecie zawartość RNA w jelicie cienkim była istotnie obniżona u zwierząt pozbawionych nukleotydów w diecie. Również aktywność enzymów granicy szczoteczkiowej i utrzymanie generacji komórek krypt nawet podczas głodu białkowego odzwierciedlały, że nukleotydy w diecie wspierają normalny wzrost i rozwój jelit w modelach zwierzęcych i ludzkich (Van Buren 9).

Nukleotydy są stale wymieniane wśród składników odżywczych o działaniu immunomodulującym. Wzmocnienie odporności poprzez dietę osiąga się zazwyczaj poprzez dodanie kwasów tłuszczowych n-3, nukleotydów i argininy do kompletnej pod względem odżywczym formuły (McCowen). Pozbawienie diety nukleotydów (dieta oparta na kazeinie) zwiększa immunosupresję indukowaną lekami, upośledza normalne dojrzewanie limfocytów T i indukcję odpowiedzi interleukiny-2 (Van Buren, Kulkarni 13). W innym badaniu Kulkarni (17) stwierdził, że nukleotydy diety były wymagane do odwrócenia niedożywienia i głodu immunosupresji indukowanej, które nie mogą być osiągnięte przez przywrócenie dodatniego bilansu azotowego u myszy. Ponadto, nukleotydy diety wydają się pomagać odporność na wyzwanie z *Staphylococcus aureus* (Kulkarni 26) i *Candida albicans* głównie poprzez podtrzymywanie bakteriocydalne zdolności komórek fagocytarnych (Fanslow 27,18). Niektóre badania kliniczne na ludziach wykazały znaczenie nukleotydów w diecie u pacjentów intensywnej opieki medycznej, pacjentów z nowotworami i pooperacyjnych pacjentów z nowotworami (Daly 21, Daly 22, Bower 23, Van Buren 24). Badania z udziałem niemowląt testowane diety wymóg nukleotydów w warunkach szybkiego wzrostu. Mechanizm, w którym nukleotydy diety wspierają szybko rosnący organizm jest oszczędność kosztów de novo syntezy i ratowania, ewentualnie optymalizacji funkcji tkanki (van buren). Według Wilsona (55) istnieje silny związek między wiekiem a zdolnością do tworzenia przeciwciał w odpowiedzi na różne bodźce antygenowe, a zatem pomiar odpowiedzi przeciwciał w surowicy na rutynowo podawane szczepionki może dostarczyć użytecznych informacji na temat statusu rozwijającego się układu odpornościowego u niemowląt. Pickering i wsp.

zaobserwowali zróżnicowaną odpowiedź przeciwciał w surowicy na różne szczepionki w grupie niemowląt karmionych preparatem wzbogaconym w nukleotydy (wyższa odpowiedź przeciwciał przeciwko Hib i DIP, ale nie przeciwko OPV i tężcowi). Dodatkowo w tym badaniu spożycie preparatu wzbogaconego w nukleotydy wiązało się z istotnym zmniejszeniem częstości występowania biegunek w porównaniu z grupą kontrolną (preparat wzbogacony w żelazo, oparty na białkach mleka krowiego). W badaniu tym potwierdzono korzystny wpływ diety zawierającej nukleotydy na rozwijający się układ immunologiczny u niemowląt, ale nie przeprowadzono badań klinicznych na zwierzętach.

Nosówka jest wywoływana przez wirus nosówki psów (CDV), należący do rodzaju morbillivirus z rodziny paramyxovirus (Waner, Griot). Mimo, że kliniczne przypadki nosówki są rzadkie, ogniska choroby, zwłaszcza w obiektach hodowlanych, pokazują, że skuteczność nowoczesnych szczepionek nie może być uznawana za pewnik (Bohm). Korelacja pomiędzy mianem przeciwciał a efektem ochronnym po immunizacji szczepionkami przeciwko nosówce wskazuje, że odporność humoralna ma istotne znaczenie w obronie gospodarza przed tym patogenem. Obecnie istnieje wiele szeroko stosowanych żywych atenuowanych szczepionek, które zawierają różne szczepy wirusa CDV (Griot - 10,12). Szczepionki te mogą jednak potencjalnie powodować immunosupresję lub sporadycznie niewystarczającą ochronę z powodu zmiany wirusa podczas pasażu komórek lub obecności matczynych przeciwciał przeciwko CDV. Dlatego też istnieje potrzeba opracowania ulepszonej strategii szczepionkowej, a także zwiększenia poszczepiennej syntezy Ig poprzez zastosowanie immunonutrition, w tym suplementacji nukleotydami. Zwiększyłyby to skuteczność szczepienia lub skróciły krytyczny okres podatności, podczas gdy resztkowe przeciwciała matczyne nie są już ochronne, ale mogą zakłócać poszczepienną reakcję immunologiczną.

Doniesienia o wzmocnieniu funkcji immunologicznych przez nukleotydy oraz szczególnie zapotrzebowanie na nukleotydy w diecie w okresie szybkiego wzrostu skłoniły nas do przeprowadzenia niniejszych badań w celu określenia, czy zdrowe szczenięta karmione mlekiem suki i pełnoporcjową standardową dietą dla szceniąt lub tą samą dietą wzbogaconą o nukleotydy wykazały dowody na wzmocnioną odpowiedź na antygen szczepionki przeciwko nosówce jako miernik odporności.

MATERIAŁY I METODY

Zwierzęta, odrobaczenie i szczepienia

Badanie kliniczne trwało 7 tygodni i zostało przeprowadzone na 18 szczeniętach (9 samców i 9 samic) z 3 różnych miotów. Wszystkie 3 mioty były różnych ras: 12 szceniąt rasy Briard z jednego miotu, 2 szczenięta rasy Owczarek Niemiecki z jednego miotu i 4 szczenięta rasy Miniature Schnautzer z jednego miotu. Szczenięta z tego samego miotu w wieku 4 tygodni zostały losowo i równomiernie przydzielone do 2 grup. W obu grupach znalazło się 9 szceniąt: 6 Briardów, 1 Owczarek Niemiecki i 2 Sznauclery Miniaturowe. W tym czasie szczenięta były ssące i wprowadzono komercyjną pełnoporcjową suchą karmę dla szceniąt w wieku ≤ 3 miesięcy (grupa kontrolna). Grupa nukleotydowa otrzymywała tę samą dietę z dodatkową suplementacją nukleotydów (Ascosan, Chemoforma, Szwajcaria). Szczenięta odsadzono w wieku 6 tygodni i karmiono wyłącznie komercyjną dietą ad libitum.

Przed rozpoczęciem badań wszystkie szczenięta zostały przebadane klinicznie i odrobaczone (14,4 mg embonianu pyrantelu i 15 mg febantelu na 1 kg masy ciała). Suplementację nukleotydami w grupie nukleotydowej rozpoczęto w wieku 4 tygodni.1,5g ascosanu z Potrzebuję tu trochę danych o Ascosanie, (3 tabletki Ascosanu) dziennie było podawane doustnie (rozpuszczone w niewielkiej ilości preparatu mlekozastępczego) w pojedynczej dawce. Po 14 dniach suplementacji w wieku 6 tygodni wszystkie szczenięta zostały zaszczepione przeciwko wirusowi nosówki (CDV) tą samą komercyjną zmodyfikowaną szczepionką zawierającą żywe wirusy (103,5 TCID₅₀). Po szczepieniu szczenięta w grupie otrzymującej nukleotydy otrzymywały 1,0 g nukleotydów ascosan (2 tabletki Ascosan) doustnie raz dziennie przez kolejne 30 dni.

Pobieranie próbek krwi

Pobieranie próbek krwi przeprowadzono czterokrotnie: w dniu szczepienia (dzień 0 - bezpośrednio przed szczepieniem) oraz 6, 14 i 30 dni po szczepieniu. W dniu poprzedzającym pobranie krwi, o godzinie 20.00 usunięto pokarm. W dniu pobrania krwi pokarm rozdawano po pobraniu krwi. Z żyły głowowej pobierano wystarczającą ilość krwi żyłnej, aby zebrać 0,5 ml surowicy. Surowicę pozostawiono do skrzepnięcia, a następnie oddzielono przez odwirowanie. Próbkę podzielono na 2 podwielokrotności po 0,25 ml i przechowywano w stanie zamrożonym w temperaturze -20°C do czasu analizy.

Pod koniec badania, jedna podwielokrotność każdej próbki została wysłana do analizy miana Ig do Państwowego Instytutu Weterynaryjnego (NVRI) w Puławach, Polska, w celu oceny specyficznych mian Ig przeciwko CDV.

Metody analityczne

Przeciwciała swoiste wobec CDV oznaczano metodą immunoperoksydazową (IMPA), zgodnie z wcześniejszymi opisami Zaghawa i wsp. 1990, Mizak i Borowski 1998, Borowski i Kimak 2001 (1-3). W skrócie, każda surowica była seryjnie rozcieńczana (2-krotne rozcieńczenia) i dodawana do mikrostudzienek, które wcześniej były pokryte komórkami Vero zakażonymi szczepem Lederle wirusa CDV. Po inkubacji do mikrostudzienek dodawano królicze immunoglobuliny anty-kaninowe (Ig) znakowane peroksydazą chrzanową i inkubowano płytki. Po dodaniu substratu (3-amino-9-etylokarbazol) reakcje barwne w mikrostudzienkach oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego (powiększenie 100x). Miano IMPA było zapisywane jako odwrotność najwyższego rozcieńczenia surowicy, które wykazało reakcję. Statystyki opisowe (średnia, mediana, odchylenie standardowe, współczynnik zmienności) zostały obliczone dla każdej daty pobrania krwi dla każdej grupy. Istotność różnic między grupami analizowano za pomocą testu T programu Statgraphics ($p \leq 0,05$).

Lokalna Komisja Etyczna

Przez cały czas trwania próby szczenięta były utrzymywane w obiektach hodowlanych. Wszystkie procedury zostały zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Żywych Ssakach. Nr opinii: 57/04.

WYNIKI I DYSKUSJA

Stan zdrowia i przyrosty masy ciała

Przez cały okres badań nie obserwowano objawów chorobowych. Wszystkie zwierzęta chętnie spożywały oferowaną im suchą karmę. Wszystkie szczenięta wykazywały prawidłowy wzrost (przyrosty masy ciała) i rozwój (tab. 1.).

Miana Ig

Wyniki analizy serologicznej przedstawiono w Tab. 2. Ochronne miana Ig przeciwko CDV są trudne do określenia, ponieważ brak jest danych z badań klinicznych (Bohm). Wyniki serologiczne podzielono na trzy kategorie (Bohm, Jozwik): miana ≤ 16 uznano za nieochronne; miana pomiędzy 16 a 100 uznano za prawdopodobnie ochronne (miana graniczne), a miana >100 za ochronne.

Przeciwciała specyficzne dla CDV zostały wykryte w czasie szczepienia (dzień 0) w surowicy 9 szczeniąt (6 i 3 odpowiednio w grupie nukleotydowej i kontrolnej). Wynika z tego, że spośród 18 szczeniąt użytych w eksperymencie w wieku 6 tygodni 50% miało wykrywalne poziomy matczyne miana Ig przeciwko nosówce, jednakże tylko dwa szczenięta (po jednym z obu grup) miały graniczne miana, a wszystkie pozostałe szczenięta uznano za podatne.

W 6 dniu po szczepieniu przeciwciała przeciwko CDV wykazano tylko u jednego psa w grupie nukleotydowej (< 16) i nie wykryto ich w grupie kontrolnej. Wyniki te sugerują, że w wieku 7 tygodni przeciwciała matczyne prawie całkowicie zanikły i nie wystąpiła jeszcze poszczepienna reakcja serologiczna.

16 z 18 szczeniąt biorących udział w eksperymencie wykazało ochronny poziom przeciwciał swoistych dla CDV 14 dni po immunizacji. W tym czasie w grupie suplementowanej u jednego szczeniaka stwierdzono niechroniące miano Ig, a u jednego nie wykryto przeciwciał. Nieochronne miana Ig zostały wykluczone z analizy. U wszystkich pozostałych psów poziom przeciwciał wzrósł do poziomu ochronnego, a średnie miana Ig wynosiły 1965,71 i 1582,22 odpowiednio w grupie nukleotydowej i kontrolnej. Ze względu na duże odchylenie standardowe średnie miana Ig nie wykazały statystycznie istotnej różnicy.

30 dni po immunizacji nie wykryto swoistych dla CDV Ig u trzech psów: dwóch w grupie suplementowanej i jednego w grupie kontrolnej. Jedno szczenię (grupa nukleotydowa) nie zareagowało immunologicznie na immunizację CDV, ponieważ jego miana Ig nie osiągnęły poziomu ochronnego w czasie całego badania. Jedno szczenię (grupa nukleotydów) wykazywało wolniejszą reakcję immunologiczną na immunizację w porównaniu z pozostałymi 16 szczeniętami. Miał niewykrywalne miana Ig w 14 dniu, jednak w 30 dniu miana Ig osiągnęły poziom 10240. Dwa szczenięta (po jednym z obu grup) wykazały ochronne miano Ig w 14 dniu, ale w 30 dniu miano Ig

spadło do niewykrywalnego poziomu. Wszystkie szczenięta wykazujące nieochronne miana Ig zostały wyłączone z analizy. Średnie ochronne miana Ig w 30. dniu wynosiły odpowiednio 5577,14 i 4320,0 w grupie nukleotydowej i kontrolnej (ryc. 1). Ze względu na duże odchylenie standardowe różnice nie były istotne statystycznie, jednak liczby wskazują na wyraźny trend w kierunku wyższych mian Ig w grupie nukleotydów.

Poziomy przeciwciał pochodzących od matki przeciwko CDV były nieochronne lub graniczne do 6 tygodnia życia, co jest zgodne z wynikami McMillen i wsp. Po immunizacji zarówno w grupie suplementowanej jak i kontrolnej ochronne miana Ig obserwowano już w 14 dniu (8 tydzień życia) z dalszym wzrostem u większości szczeniąt w 30 dniu (10 tydzień życia). McMillen i wsp. zaobserwowali ochronne miana Ig w wieku 14-16 tygodni, nawet po wielokrotnej immunizacji w wieku 4 i 6 tygodni u szczeniąt chartów.