

ZYGMUNT CYGAN, IRENA BARCZ

## Działanie adiuwancyjne beztlenowców *P. acnes* przy immunizacji myszy antygenem *S. agalactiae*

z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Bezettlenowe pałeczki *P. acnes* (PA) nawet po inaktywacji termicznej (7, 9, 17), formaliną (1, 3, 12) lub fenolem (21) wykazują silną jeszcze aktywność immunostymulacyjną. Przejawia się ona między innymi we wpływie adiuwancyjnym na wprowadzone do organizmu różne antygeny immunizacyjne tj. grasiczo — zależne (16, 19, 24) i grasiczo — niezależne (10, 12). Dotychczas działanie takie było badane w stosunku do antygenów przeważnie niebakteryjnych (2, 16, 18, 19, 24). Najczęściej stosowana dawka adiuwantu PA wynosiła 1,4 mg/mysz (5, 8, 20). Stopień immunostymulacji zależał również od ilości wprowadzonego antygeny immunizacyjnego (15, 24).

W związku z powyższym celem badań własnych było określenie wpływu adiuwantu PA na wzrost miana aglutynacyjnego u myszy immunizowanych różnymi dawkami — niesprawdzonego jeszcze w takim układzie doświadczalnym — antygeny *S. agalactiae* (SA).

### Materiał i metody

Myszy. Stosowano myszy linii CBA, zarówno samce jak i samice, wagi 18–20 g.

Szczepy. Jako adiuwant użyto wyosobniony z ropni wątroby gęsi szczep „IB 18” beztlenowców *P. acnes* I, a w charakterze antygeny immunizacyjnego wykorzystano — uzyskany z przypadku „mastitis acuta” — szczep *S. agalactiae*. Obydwa izolaty, przed sporządzeniem preparatów iniekcyjnych, zostały sprawdzone na brak zanieczyszczeń przypadkową mikroflorą oraz na jednolitość morfologiczną kolonii.

Preparaty adiuwancyjne i immunizacyjne. Namnożone w ciągu 3–5 dni w podłożu Wrzoska (z dodatkiem 0,5% surowicy końskiej) beztlenowce *P. acnes* (szczep „IB 18”), wirowano w ciągu 45 minut przy 3000 obr./min., a uzyskany osad, po zawieszeniu w 0,85% NaCl z dodatkiem 0,4% formaliny, był przetrzymywany w 37°C przez 18 godzin. Następnie komórki bakteryjne ponownie odwirowywano i suszono w 37°C. Wyszuszony osad tych bakterii stanowił tzw. adiuwant (preparat) PA, przetrzymywany do dalszych badań w 4°C. Podobnie uzyskiwano preparat SA tj. suchą masę paciorkowców *S. agalactiae*. Powyższe bakterie namnażano przez 48 godzin w bulionie z 1% surowicy końskiej.

Immunizacja. W celu wykazania efektu adiuwancyjnego preimmunizowano dożylnie myszy stałą dawką 1,4 mg adiuwantu PA w objętości 0,25 ml, po czym w 10 dni później podawano również dożylnie antygen immunizacyjny SA (ilości — 0,05 mg, 0,2, 0,5, 1 i 3 mg). Dla każdej dawki stosowano grupę 6 myszy badanych i kontrolnych (wstępnie nieimmunizowanych PA). Ocenę wzbudzonej przez preparat PA potencji odpowiedzi immunologicznej na antygeny SA przeprowadzono przez zbadanie w 7 dniu wysokości miana aglutynacyjnego u myszy preimmunizowanych PA i kontrolnych tj. uodpornionych jedynie SA.

### Wyniki i omówienie

Rezultaty przeprowadzonych badań nad wpływem adiuwancyjnym preparatu PA (*P. acnes*) na wprowadzony myszom antygen SA (*S. agalactiae*) przedstawiono w załączonej tabeli. Wynika z niej, że preimmunizacja myszy antygenem PA powodowała wyraźny wzrost odpowiedzi immunologicznej na preparat SA w różnych dawkach tj. od 0,2 mg do 3 mg. Najróżniejszy wzrost miana aglutynin antypaciorkowcowych wystąpił w grupie myszy otrzymujących 0,5 i 1 mg SA. W tych bowiem warunkach wysokość miana u wszystkich preimmunizowanych myszy wynosiła 32, przy wartości dla myszy kontrolnych od 0 do 2. Oznaczało to 16–32-krotną potencjację odpowiedzi immunologicznej przez preparat PA. Mniej regularną amplifikację miana, wynoszącą u poszczególnych myszy od 8 do 32, stwierdzono przy dawkach 0,2 i 3 mg SA. Natomiast brak różnic w wysokości miana u wszystkich zwierząt wykazano przy 0,005 mg SA/mysz.

Tab. 1. Efekt adiuwancyjny beztlenowców *P. acnes* (PA) na podany myszom antygen *S. agalactiae* (SA)

Dawka <i>S. agalactiae</i> (SA) w mg	Myszy preimmunizowane PA						Myszy kontrolne (niepreimmunizowane)					
	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
3	16	16	8	16	16	32	2	1	—	2	1	—
1	32	32	32	32	32	32	—	1	2	2	—	1
0,5	32	32	32	32	32	32	1	1	—	—	—	—
0,2	32	8	16	8	16	8	2	—	1	2	—	—
0,05	—	2	—	1	—	1	—	1	—	2	—	—

Objaśnienia: cyfry arabskie = wysokość miana aglutynacyjnego, oznaczenie literowe = myszy badane, — = ujemny odczyn aglutynacji.

Poznane „spectrum” aktywności adiuwancyjnej beztlenowców *P. acnes* (PA) odnoszono dotychczas tylko do 3 grup antygenów tj. erytrocytów owczych (5, 15, 20, 24), albuminy surowiczej (16) i wielocukrowego haptenu pneumokoków typu III (10). Niniejsze badania własne wykazały, że preparat PA podwyższa poziom aglutynin przy uodpornianiu myszy również antygenem *S. agalactiae* (SA). W warunkach wstępnej preimmunizacji preparatem PA, wyprzedzającej na 10 dni podanie antygeny SA, stwierdzono 16–32-krotny wzrost poziomu aglutynin antypaciorkowcowych (przy jednorazowej dawce 0,5 i 1 mg SA/mysz). Działanie adiuwancyjne nie występowało wobec ilości 0,05 mg SA/mysz. Podobnie Warr i Slijvic

(24) nie obserwowali wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej na małe dawki haptenu pneumokoków typu III. Większe ilości, a mianowicie 3 mg SA/mysz, nie wywoływały dalszego wzrostu miana, lecz wpływały na pewien jego spadek. Może to wskazywać na początek supresji w stymulowanej odporności. Na podkreślenie zasługuje, że Nagova i wsp. (15) oraz Warr i Slijvic (24) wskazywali na zależność wzbudzonego przez *P. acnes* efektu adiuwacyjnego od dawki użytych antygenów immunizacyjnych. W tej reaktywności znaczenie posiada także czas podania adiuwantu PA w stosunku do antygeny immunizacyjnego (6, 10, 11, 15, 24). Przyjęcie w badaniach własnych 10-dniowej przerwy — za optymalny interwał — było pewnym kompromisem, mającym na celu sprzężenie okresu „apogeum” stymulowanych komórek tworzących łyśinki „PFC” („Plaque Forming Cells”) z czasem średniego pobudzenia makrofagów. Co prawda szereg autorów podaje, że szczyt wytwarzania PFC i pobudzenia przez PA fagocytarnych funkcji makrofagów przypada na 4—7 dzień (1, 8, 14, 15). Jednak Dreser (4), Scott (22), Keller (13) oraz Waldman i Goltieb (23) przestrzegają przed możliwością wtórnej inhibicji limfocytów B w okresie maksymalnej stymulacji makrofagów. W niniejszej pracy spełniono postulat — tych autorów — wybierając jako optymalny czas iniekcji SA 10 dzień od preimmunizacji (nie w szczycie aktywności makrofagów).

### Wnioski

1. Zabite komórki beztlenowców *P. acnes* mogą wywoływać efekt adiuwacyjny wobec słabych immunogennie antygenów *S. agalactiae* (SA).

2. W układzie immunizacyjnym, umożliwiającym 16—32-krotny wzrost miana aglutynin antypaciorkowcowych, zastosowano 10-dniowy przedział czasowy pomiędzy iniekcją PA i SA oraz dawki 0,5 mg SA i 1,4 mg PA/mysz.

### Piśmiennictwo

1. Adlam C., Scott M. T.: J. med. Microbiol. 6, 261, 1972.
2. Biozzi G., Stiffel C., Mouton D., Bouthillier Y., Decense — fond C.: Immunology 14, 7, 1968.
3. Castro J. E., Sadler T. E., Jones P. D. E.: Develop. Biol. Stand. 38, 277, 1978.
4. Dreser D. W.: Europ. J. Immun. 2, 50, 1972.
5. Ghaffar A., Sigel M. M.: Immunology 35, 685, 1978.
6. Glasgow L. A., Crane J. L., Schleupner C. J., Kern E. R., Younger J. S., Finegold D. S.: Infect. Immun. 23, 19, 1979.
7. Glasgow L. A., Fischbach J., Bryant S. M., Kern E. R.: J. infect. Dis. 135, 763, 1977.
8. Halpern B. N., Prevot A. R., Biozzi G., Stiffel C., Mouton D., Morard J. C., Bouthillier Y., Decensefond C.: J. Reulobendotnel. Soc. 1, 77, 1966.
9. Hanazawa S., Kato H., Yamaura K., Yamaguchi Y.: Microbiol. Immun. 22, 155, 1978.
10. Howard J. G., Christie G. H., Scott M. T.: Cell Immun. 7, 290, 1973.
11. James K.: Develop. Biol. Stand. 38, 173, 1978.
12. James K., Ghaffar A., Milne I.: Br. J. Cancer 29, 11, 1974.
13. Keller R.: Cell Immun. 17, 542, 1975.
14. Mantovani A., Teglabue A., Vecch A., Spreafico F.: Europ. J. Cancer 12, 113, 1976.
15. Nagova T., Kobayashi T., Nomoto K.: Microbiol. Immun. 21, 33, 1977.

16. Neven T., Branellec A., Bozzi G.: Annls Inst. Pasteur, Paryż 106, 771, 1964.
17. Nussenzweg R. S.: Expl Parasit. 21, 224, 1976.
18. Pike M. C., Snyderman R.: J. Immun. 117, 1243, 1978.
19. Pinecrard R. N., Weir D. M., McBride W. H.: Clin exp. Immun. 2, 343, 1967.
20. Raynaud M., Kouznetzowa B., Bizzini B., Chermann J. C.: Annls Inst. Pasteur, Paryż 122, 695, 1972.
21. Russell R. J., McInroy R. J., Wilkinson P. C., White R. G.: Immunology 30, 955, 1976.
22. Scott M. T.: Cell Immun. 5, 469, 1972.
23. Walman S. R., Goltieb A. A.: Cell Immun. 9, 142, 1973.
24. Warr G. W., Slijvic V. S.: Clin. exp. Immun. 17, 519, 1974.

Adres autora: doc. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Zelazowej Wolfi 6 m. 13, 20-854 Lublin.

Цыган З., Барч И. — Адиуванционное действие анаэробов *P. acnes* при иммунизации мышей антигеном *S. agalactiae*.

Исследовали адиуванционное действие убитых клеток *P. acnes* (PA) при иммунизации мышей инктивированным антигеном *S. agalactiae* (SA). В применной системе опыта, т.е. при дозе 1,4 мг PA/мышь, введенной на 10 дней до времени иммунизации антигеном SA (0,5-1 мг/мышь), получили 16—32-кратный рост титра противострептококковых агглютининов. В случае дозы 3 мг SA/мышь адиуванционный эффект был слабее, а при 0,05 мг SA вообще не отмечался. В работе предискутирован предполагаемый механизм этого действия.

Cygan Z., Barcz I. — Adjuvantive action of Propionibacterium acnes in the course of mice immunization with the antigen of *S. agalactiae*.

The adjuvantive action of killed cells of *P. acnes* (PA) was examined during mice immunization with the antigen of *S. agalactiae* (SA). It was found a 16-32 times increase of agglutinins against streptococci if PA was given 10 days before immunization in a dose of 1.4 mg per mouse and the dose of SA — 0.5-1.0 mg. At a higher dose of SA (3 mg per mouse) the adjuvantive effect was less significant and at a dose of 0.05 mg did not appear at all. The mechanism of adjuvantive action of PA has been discussed.

PRESCOTT J. F., JOHNSON J. A., MARKCHAM R. J. F.: Badania doświadczalne nad patogenizacją zakażeń *Corynebacterium equi* u źrebiąt. (Experimental studies on the pathogenesis of *Corynebacterium equi* infection in foals). Can. J. comp. Med. 44, 280—288, 1980 (3).

Badania nad patogenizacją zakażeń wywołanych przez *Corynebacterium equi* przeprowadzono na 4 jednomiesięcznych źrebiątach zakażonych doustnie 75 ml zawiesiny *C. equi* ( $5 \times 10^8$  kom./ml). U 2 źrebiąt poddanych ubojowi po 10 dniach po zakażeniu stwierdzono niewielkie ilości *C. equi* w węzłach okężniczo-ślepych. *C. equi* nie izolowano z narządów wewnętrznych źrebiąt poddanych ubojowi 20 dnia po zakażeniu. W drugim doświadczeniu 4 źrebięta w wieku 1 miesiąca zakażono doustnie *C. equi* przez 5 kolejnych dni. U dwóch źrebiąt poddanych ubojowi 10 dnia po zakażeniu wystąpiło owrzodzenie jelit cienkich i jelit grubych, obrzęk i ropnie w węzłach chłonnych okężnicy i jelita ślepego oraz powiększenie kręzkowych węzłów chłonnych. Jedno źrebię padło na ostre wrzodzące zapalenie jelit i okężnicy 22 dnia po zakażeniu. Podobne zmiany wystąpiły u drugiego źrebięcia poddanego ubojowi 25 dnia po zakażeniu.

G.