

PIOTR OSTASZEWSKI, BOŻENA BAŁASIŃSKA, MAŁGORZATA PODGURNIAN, WIESŁAW BAREJ

## Kwas 3-hydroksy-3-metylomastłowy (HMB) w reakcjach immunologicznych alergii pokarmowej u świnek morskich

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa

### Summary

#### 3-hydroxy-3-methylbutyric acid (HMB) in immunological reactions generated by nutritional allergy in guinea pigs

The systemic immune responses were examined in parenterally milk-sensitized guinea pigs. This type of sensitization simulating alimentary allergy led to positive passive cutaneous anaphylactic (PCA) responses and high IgG titers against beta lactoglobulin (beta-LG). A further increase in IgG titers induced by a dietary supplement of HMB was observed. These results indicate that HMB increases immune responses of parenterally milk-sensitized guinea pigs as expressed by IgG beta-LG antibodies and PCA titers. What concerns the alimentary, this effects is not of an advantage and suggests that HMB – treated animals can be more allergic to food consumption.

Kwas 3-hydroksy-3-metylomastłowy (HMB) został po raz pierwszy opisany przez Nissena i wsp. w 1990 r. (6). Związek ten jest metabolitem leucyny i jej pochodnej, kwasu 2-oksoizokapronowego (KIC). Większość tego kwasu jest utleniana w mitochondriach do izowalerylo-CoA. Mniej znana, alternatywna droga przekształceń KIC zachodzi w cytozolu, prowadząc do powstania kwasu HMB. Nissen i wsp. (6) postawili hipotezę, że jakkolwiek niespełna 20 procent KIC ulega przekształceniu do HMB, powstający związek jest odpowiedzialny za większość efektów biologicznych przypisywanych leucynie i KIC. Istnieją doniesienia dotyczące wpływu leucyny i jej pochodnych na procesy odpornościowe. W badaniach *in vivo* wykazano supresyjny wpływ wysokich stężeń leucyny dodawanej z pokarmem na limfocyty szczurów (2), kur (10) i owiec (5) wyrażony zahamowaniem syntezy DNA. Z kolei pokarmowy KIC pobudzał blastogenezę limfocytarną u rosnących jagniąt (5). U bydła w badaniach *in vitro* nie obserwowano zmian syntezy DNA limfocytarnego po podaniu KIC i HMB do medium inkubacyjnego (7). Wobec niejednoznacznych wyników badań *in vivo* i *in vitro* dotyczących odpowiedzi immunologicznej zwierząt otrzymujących pochodne leucyny postanowiono sprawdzić, czy HMB może odgrywać rolę w przebiegu alergii pokarmowej zwierząt. W tym celu posłużono się modelem CMA (cow's milk allergy), tj. alergii występującej często u dzieci po spożyciu mleka krowiego (12).

### Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono łącznie na 30 świnkach morskich, samcach rasy Dunkin-Hartley, o masie ciała 200–250 gramów, trzymanych w klimatyzowanym pomieszczeniu o cyklu świetlnym 12/12 i o swobodnym dostępie do paszy i wody. Wszystkie zwierzęta otrzymywały taką samą standardową paszę UAR (prod. francuska) pokrywającą potrzeby zwierząt. Dla pełnej realizacji celów badawczych wyodrębniło następujące podgrupy zwierząt:

I – zwierzęta w tej podgrupie przez cały okres doświadczenia otrzymywały w pokarmie dodatek HMB w ilości 0,25% w

stosunku do suchej masy paszy; wszystkie zwierzęta tej podgrupy były poddane immunizacji mlekiem krowim,

II – zwierzęta tej podgrupy były karmione paszą bez dodatków oraz immunizowane identycznie jak w podgrupie I,

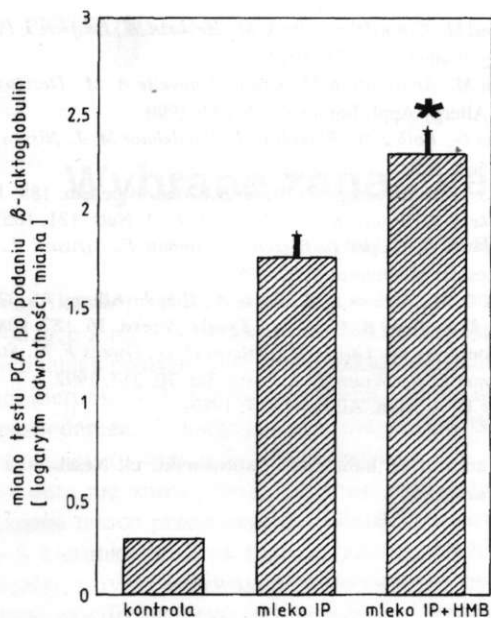
III – zwierzęta tej podgrupy nie były immunizowane.

Pozostałe zwierzęta wykorzystano w teście biernej anafilaksji skórnej.

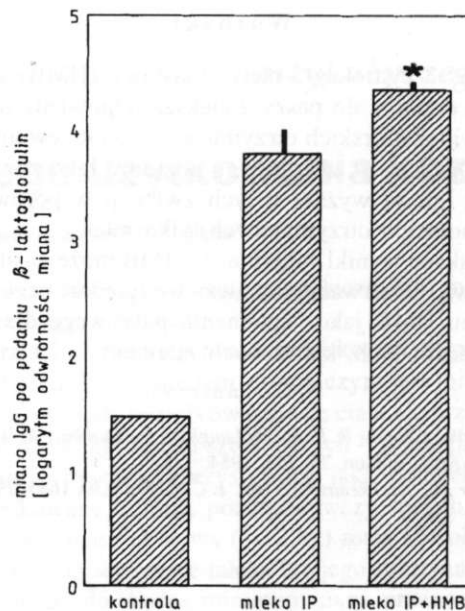
Immunizacja. Świnki morskie z podgrupy I i II immunizowano dwukrotnie, w odstępach piętnastodniowych, podając dootrzewnowo 1 ml świeżego, pasteryzowanego mleka krowiego. Do dalszych badań używano zwierząt po 8 dniach od drugiego podania mleka.

Test biernej anafilaksji skórnej (PCA). Test ten wykonywano na zwierzętach kontrolnych, przy czym krew do testu pobierano zarówno od zwierząt immunizowanych (podgrupa I i II), jak i zwierząt nie immunizowanych. Postępowanie przy wykonywaniu testu było następujące: pobierano z serca 2 ml krwi, umieszczano w heparynizowanych probówkach, odwirowywano i uzyskane osocze rozcieńczano roztworem fizjologicznym w stosunku od 1:2 do 1:256. Równolegle przygotowywano grupę świnek morskich nie uczestniczących wcześniej w doświadczeniu, którym usuwano okrywę włosową na grzbiecie. Zwierzętom tym wstrzykiwano śródskórną po obydwu stronach kręgosłupa po 100 µl osocza z każdego rozcieńczenia. Następnie po upływie 48 godzin każde zwierzę z tej grupy otrzymywało do sercowo 2,5 mg β-laktoglobuliny rozpuszczonej w 1% roztworze błękitu Evansa (0,5 ml). Po dalszych 30 minutach przeprowadzano pomiar średnicy plamek barwnych powstających w miejscu śródskórnego wstrzyknięcia rozcieńczonego osocza. Za wynik dodatni przyjmowano najwyższe rozcieńczenie, przy którym średnica plamki barwnej wynosiła co najmniej 4 mm. Wartość tę przedstawiano jako logarytm z odwrotności miana.

Test ELISA. Posłużono się zmodyfikowanym testem wg Heyman i wsp. (4) dla oceny stężenia przeciwciał IgG we krwi badanych zwierząt. W tym celu plastikowe płytki z wgłębieniami (Nunc, Polylabo, Francja) pokrywano β-laktoglobuliną (200 ng/wgłębienie) i pozostawiano na 1 godzinę w temperaturze 37°C. Następnie płytki przemywano buforem fosforanowym o pH 7,4 z dodatkiem 0,05% Tweenu (150 µl na wgłębienie) i wysuszano do sucha. Do każdego wgłębienia dodawano 100 µl 1% żelatyny, po czym płytki pozostawiano na kolejną godzinę w temperaturze 37°C. Płytki ponownie przemywano tym samym buforem. Równocześnie przygotowywano rozcieńczenia osocza pobranego i zamrożonego przy wykonywaniu testu PCA. Poszczególne rozcieńczenia osocza od 1:30 do 1:196 000 наносzono na płytki i inkubowano 1,5 godziny w temperaturze 37°C. Po kolejnym, tym razem trzykrotnym przemyciu buforem, do każdego wgłębienia dodawano 100 µl koniugatu peroksydazy-IgG otrzymanego od królików immunizowanych surowicą świnek morskich i następnie rozcieńczonego 1:20 000 (Sigma, A-9167). Tak przygotowane płytki pozostawiano na 1 godzinę w temperaturze 37°C, a następnie przemywano trzykrotnie buforem. Aktywność peroksydazy obliczano przeprowadzając reakcję barwną z diaminoo-ortofenylenem (0,4 mg/ml) rozpuszczonym w buforze cytrynianowym o stężeniu 0,05M z dodatkiem 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reakcję tę, przeprowadzoną w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, przerywano po 15 minutach 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbpcję mierzono przy długości fali 492 nm posługując się czytnikiem płytek (Flow Laboratories, Wielka Bry-



Ryc. 1. Rozmiar reakcji immunologicznej wyrażonej testem PCA u świnek morskich kontrolnych, nie immunizowanych oraz u zwierząt traktowanych mlekiem krowim (n=5). Gwiazdka wskazuje różnicę statystycznie istotną w porównaniu z grupą zwierząt immunizowanych nie otrzymujących HMB ( $p < 0,01$ )



Ryc. 2. Przeciwciała IgG skierowane przeciwko  $\beta$ -laktoglobulinom określone testem ELISA u świnek morskich kontrolnych, nie immunizowanych oraz u zwierząt traktowanych mlekiem krowim (n=5). Gwiazdka wskazuje różnicę statystycznie istotną w porównaniu z grupą zwierząt immunizowanych nie otrzymujących HMB ( $p < 0,05$ )

tania). Za wynik dodatni przyjmowano najwyższe rozcieńczenie osocza, przy którym gęstość optyczna próby badanej dwukrotnie przewyższała gęstość próby ślepej. Wartość tę, podobnie jak poprzednio, przedstawiono jako logarytm z odwrotności miana.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta. Obliczone zostały również współczynniki korelacji między testem PCA a testem ELISA.

#### Wyniki i omówienie

Na ryc. 1 przedstawiono wyniki testu biernej anafilaksji (PCA). Miano tego testu wyrażone obecnością przeciwciał homocytotropowych było istotnie wyższe u świnek morskich otrzymujących dootrzewnowo mleko krowie w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej, nie immunizowanych ( $p < 0,01$ ). Świniki morskie karmione paszą z dodatkiem HMB wykazywały dalszy, istotny wzrost miana PCA w stosunku do zwierząt z grupy immunizowanej mlekiem ( $p < 0,01$ ). Wyniki testu znakowania enzymami, tzw. ELISA, potwierdziły wartości uzyskane w teście PCA, przy czym różnice między grupami immunizowanymi były istotne na poziomie  $p < 0,05$ . Obliczono również korelacje między mianem PCA i mianem IgG dla poszczególnych grup zwierząt. Miana te były skorelowane na granicy istotności dla wszystkich 3 grup, co może wskazywać, że wyniki testu PCA są związane z obecnością IgG we krwi zwierząt.

Jedną z metod rozróżniania termoopornych przeciwciał IgG od termowrażliwych IgE jest podgrzewanie osocza, ponieważ podwyższona temperatura niszczy przeciwciała IgE. Próbe taką podjęli w swoich badaniach Heyman i wsp. (4), którzy wykazali, że podanie świnkom morskim osocza uprzednio ogrzewanego przez 2 godziny w temperaturze  $56^{\circ}\text{C}$  powoduje istotny spadek miana PCA u tych zwierząt w porównaniu do świnek morskich, którym wstrzyknięto osocze nie ogrzewane. Autorzy ci wnioskujeją, że wzrost miana testu PCA obserwowany u zwierząt immunizowanych mlekiem był spowodowany m.in. zwiększeniem stężenia przeciwciał IgG i IgE we krwi

tych zwierząt. W przeprowadzonych obecnie badaniach nie podgrzewano osocza; należy jednak sądzić, że obserwowany wzrost miana testu PCA u zwierząt immunizowanych mlekiem wynikał nie tylko ze wzrostu stężenia przeciwciał IgG, o czym świadczą wyniki testu ELISA, ale również ze wzrostu przeciwciał IgE. Nie wiadomo natomiast, czy dalsze podniesienie miana PCA u zwierząt otrzymujących HMB było związane ze zmianami stężenia przeciwciał IgE; zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Przedstawione wyniki są pierwszą próbą oceny wpływu HMB na tworzenie przeciwciał IgG (i prawdopodobnie IgE) we krwi zwierząt otrzymujących silny alergen pokarmowy, jakim są  $\beta$ -laktoglobuliny mleka krowiego. Wcześniejsze badania obejmowały udział HMB i KIC w mitogennie stymulowanej syntezy DNA i dały niejednoznaczne wyniki (5, 7). Zastosowane w obecnym doświadczeniu metody badawcze są powszechnie przyjęte w literaturze (np. 1, 3, 4) i pozwalają ocenić przebieg alergii pokarmowej u zwierząt w warunkach ekstremalnych, tj. w warunkach szoku anafilaktycznego. Temu celowi służyła parenteralna droga podania mleka dająca wyższe miano testu PCA i stężenia IgG niż droga pokarmowa (9). HMB jest związkiem, który wykazuje wielorakie działanie na organizm zwierzęcy, a to poprzez poprawę tempa przyrostu zwierząt (8), ograniczenie spożycia paszy i spadek zawartości tłuszczu w tuszy (11). Związek ten doczekał się już kilku patentów, na przykład 2 patenty amerykańskie: nr 5.028.440 mówiący o korzystnym wpływie HMB na rozwój chudej tkanki mięśniowej u przeżuwaczy i nr 4.992.470 wskazujący na podobudzenie układu odpornościowego u ssaków. Należy zatem przypuszczać, że po opanowaniu produkcji HMB na skalę przemysłową związek ten stanie się powszechnie dostępnym suplementem paszowym wykorzystywanym w hodowli i produkcji zwierzęcej. Wyniki przedstawione w obecnej pracy sugerują niestety, że HMB nasila alergię pokarmową, co może mieć istotne znaczenie u młodych zwierząt otrzymujących z mlekiem znaczne ilości alergenów lub karmionych paszami zawierającymi alergeny.

## Wnioski

1. Kwas 3-hydroksy-3-metylomasłowy (HMB) stosowany w formie dodatku do paszy zwiększa odpowiedź immunologiczną świnek morskich otrzymujących dootrzewnowo mleko krowie. Oznacza to, że zarówno poziomy IgG, jak i prawdopodobnie IgE są wyższe u tych zwierząt w porównaniu do świnek morskich otrzymujących tylko mleko.

2. Uzyskane wyniki sugerują, że HMB może nasilać alergię pokarmową. Obserwacje te należy uwzględnić przy szerszym stosowaniu HMB jako suplementu paszowego dla zwierząt, zwłaszcza młodych, karmionych mlekiem.

## Piśmiennictwo

1. Baird A. W., Coombs R. R. A., McLaughlan P., Cuthbert A. W.: *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 75, 255, 1984.
2. Chevalier Ph., Aschkenasy A.: *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 1645, 1977.

3. Gotteland M., Crain-Denoyelle A. M., Heyman M., Desjeux J. F.: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 97, 78, 1992.
4. Heyman M., Andrianisoa M., Crain-Denoyelle A. M., Desjeux J. F.: *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92, 242, 1990.
5. Kuhlman G., Roth J. A., Flakoll P. J., Vandehaar M. J., Nissen S.: *J. Nutr.* 188, 1564, 1988.
6. Nissen S., Van Koevering M., Webb D.: *Anal. Biochem.* 188, 17, 1990.
7. Nonnecke B. L., Franklin S. T., Nissen S. L.: *J. Nutr.* 121, 1665, 1991.
8. Ostaszewski P., Papet I., Nissen S., Glomot F., Grizard J., Arnal M.: *Journees des Herbivores* 8, 20, 1993.
9. Poulsen O. M., Nielsen B. R., Basse A., Hau J.: *Allergy* 45, 321, 1990.
10. Tinker K. J., Gous R. M.: *S-Afr. Tydskr. Veekd.* 16, 187, 1986.
11. Van Koevering M., Gill D. R., Dolezal H. G., Owens F. N., Strasia C. A., Buchanan D. S., Nissen S.: *J. Anim. Sci.* 70, 217, 1992.
12. Walker W. A.: *Ann. Allergy* 59, 7, 1987.

Adres autora: dr hab. Piotr Ostaszewski, ul. Neseberska 4 m. 137, 02-758 Warszawa

## KSZTAŁCENIE WETERYNARYJNE

MARIA PROST  
Lublin

artykuł dyskusyjny

### O nauczaniu biologii na studiach weterynaryjnych

W numerze 12, 1994 „Medycyny Weterynaryjnej” ukazał się artykuł prof. Zdzisława Larskiego pt. „Biologia molekularna w programie studiów weterynaryjnych”. Treść artykułu była dla mnie bardzo interesująca. Przez wiele bowiem lat byłam wykładowcą biologii na Wydziale Weterynaryjnym w Lublinie i drogą doświadczeń dydaktycznych i własnych przemyśleń opracowałam program nauczania tego przedmiotu, który według mojej opinii zapewnia nabycie odpowiedniej wiedzy przez nowoczesnie wykształconego lekarza weterynarii. A oto moje refleksje na ten temat.

W zupełności podzielam opinię prof. Larskiego o braku potrzeby nauczania na wydziałach weterynaryjnych biologii molekularnej w formie osobnego przedmiotu. Jest ona bowiem wykładana, w większym czy mniejszym zakresie, w ramach innych dyscyplin, jak histologia i embriologia, biochemia, genetyka, patofizjologia czy mikrobiologia. Każda z tych dyscyplin czerpie jednak z biologii molekularnej głównie te dane, które są nieodzowne dla zrozumienia wykładanych przez nią procesów. Nie podzielam jednakże poglądu prof. Larskiego, że wymienione przedmioty mogą zapoznać studentów z porównawczą ewolucją. Dla jej przekazu dydaktycznego nieodzowna jest osobna dyscyplina, jaką jest biologia. W ramach tego właśnie przedmiotu z procesem ewolucji porównawczej można bowiem zapoznać studentów na licznych przykładach rozwoju filogenetycznego organizmów roślinnych i zwierzęcych. Na praktycznych zajęciach z biologii może być demonstrowany rozwój poszczególnych narządów roślin i zwierząt od form najprostszych do najwyżej zorganizowanych. Tego rodzaju przegląd dowodów ewolucji w świecie roślin i zwierząt jest przedmiotem nauczania w ramach ćwiczeń z biologii na Wydziale Weterynaryjnym w Lublinie. Młodzi ludzie rozpo-

czynający studia mają już podstawowe wiadomości z botaniki i zoologii wyniesione ze szkoły średniej. Zadaniem biologii na studiach weterynaryjnych jest natomiast poszerzenie wiedzy o kierunki i przyczyny ewolucji u różnych grup roślin i zwierząt. Przykładowo wymienię tylko procesy i ich skutki związane z przejściem z trybu życia wodnego do lądowego, który cechuje się wieloma podobieństwami u roślin i zwierząt.

Innym celem nauczania (głównie na wykładach) biologii na studiach weterynaryjnych powinno być przekazanie studentom wiedzy o jedności świata żywego na ziemi. Wyraża się ona wspólnymi zależnościami roślin i zwierząt oraz podobieństwami wielu ich cech i funkcji. Jednym z podstawowych dowodów jedności świata żywego jest np. podobna struktura molekularna układu genetycznego oraz jednakowa jego rola tak u roślin, jak i u zwierząt. Stąd też całościowo ujętą biologię molekularną przekazać można jedynie w ramach osobnego przedmiotu, jakim jest biologia, a nie poprzez fragmentaryczny przekaz informacji w obrębie wymienionych już dyscyplin. Takie ujęcie pozwoli przyszłym lekarzom wet. na głębsze zrozumienie istoty życia na ziemi. Rolą biologii jest bowiem poznanie źródła i mechanizmu życia – tak podobnych w całym świecie żywym. Są nimi molekularne struktury kwasów nukleinowych, zwłaszcza DNA, stanowiący układ genetyczny, mechanizmem zaś są dwa rodzaje informacji genetycznej: przekazywanie cech właściwych dla gatunku z pokolenia na pokolenie oraz ukierunkowanie syntezy białek według jednokowego u roślin i zwierząt kodu genetycznego. Poznanie roli i funkcji struktur genetycznych pozwoli również studentom i przyszłym lekarzom weterynarii na zrozumienie istoty mechanizmu procesu ewolucji wszystkich żywych organizmów. Proces ten bowiem to nic innego, jak zdolność układu gene-