

Wpływ meloksykamu na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u bydła

ROMAN WÓJCIK, WŁODZIMIERZ MARKIEWICZ*, JOANNA MAŁACZEWSKA, MAŁGORZATA CHROSTOWSKA*, TOMASZ MAŚLANKA*, ZOFIA ROTKIEWICZ, JERZY JAROSZEWSKI*, ANDRZEJ KRZYSZTOF SIWICKI

Zespół Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Katedry Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn

*Zespół Farmakologii Katedry Patologii i Farmakologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

Wójcik R., Markiewicz W., Małaczewska J., Chrostowska M., Maślanka T., Rotkiewicz Z., Jaroszewski J., Siwicki A. K.

Influence of meloxicam on cellular and humoral defense mechanisms

Summary

The aim of the study was to determine the influence of meloxicam – a nonsteroid anti-inflammatory drug, on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms in cows.

Ten heifers in two groups (experimental and control) were examined. Meloxicam was given once only to the experimental group during the course of the study. The levels of lysozyme activity and total protein as well as ceruloplasmine, gamma globulin and metabolic activity (RB A), the killing activity of macrophages (PKA) and proliferate response of lymphocyte were measured in the blood.

The results indicate the immunosuppressive effect of Meloxicam on nonspecific cellular and humoral responses which, in practice, could appear as an increased sensitivity to infection, a decrease in post-vaccine immunity as well as the occurrence of various asymptomatic infections.

Keywords: cows, meloxicam, cellular and humoral response

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) są jedną z najczęściej przepisywanych przez lekarzy i stosowanych przez pacjentów grupą leków. Są one również coraz częściej stosowane w weterynarii i to zarówno u małych, jak i u dużych zwierząt. Powszechnie wiadomo o ich właściwościach przeciwzapalnych, przeciwbólowych oraz przeciwgorączkowych. Mechanizm działania NLPZ był praktycznie nieznan do roku 1971, kiedy to John Vane (18) wykazał, że działanie aspiryny polega na hamowaniu syntezy prostanoidów poprzez blokowanie enzymu zwanego cyklooksygenazą (COX). W organizmie ssaków prostanoidy powstają z kwasu arachidonowego przy udziale COX. Obecnie znane są dwie izoformy tego enzymu, tj. COX-1 (tzw. izoforma konstytutywna), która występuje praktycznie we wszystkich tkankach ssaków i warunkuje różnorodne procesy fizjologiczne np. agregację płytek krwi, ochronę błony śluzowej żołądka oraz wiele innych funkcji decydujących o utrzymaniu homeostazy w organizmie oraz COX-2 (tzw. izoforma indukowana), której ekspresja jest wzbudzana przez cytokiny, mitogeny oraz endotoksyny i jest odpowiedzialna za zwiększoną produkcję prostaglandyn (pG) w stanach zapalnych (6-8). Udowodniono, że PG dzia-

łają supresyjnie na odpowiedź obronną organizmu, hamując aktywację komórek NK (Natural Killer) i limfocytów cytotoksycznych u ludzi (15). Natomiast brak jest danych dotyczących działania NLPZ na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u bydła. Dlatego celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu jednego z NLPZ – meloksykamu na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne krów.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na dojrzałych płciowo jałówkach (n=10), będących krzyżówką rasy czarno-białej z 50-90% udziałem genetycznym rasy holsztyńsko-fryzyskiej, o średniej masie ciała 320-410 kg, w wieku 14-17 miesięcy. Jałówki karmione były sianokiszoną własnej produkcji, miały nieograniczony dostęp do wody i przetrzymywane były w takich samych warunkach. Wszystkie zwierzęta użyte w doświadczeniu były klinicznie zdrowe i pochodziły ze stada wolnego od chorób inwazyjnych (Stacja Dydaktyczno-Badawcza UWM z siedzibą w Bałdach, woj. warmińsko-mazurskie).

Układ doświadczenia. Zwierzęta podzielono na 2 grupy liczące po 5 krów. W grupie I – (doświadczalnej) podawa-

no meloksykam w iniekcji do żyły szyjnej zewnętrznej. W grupie II – (kontrolnej) podawano płyn fizjologiczny w analogiczny sposób.

Dobę przed iniekcją meloksykamu lub płynu fizjologicznego oraz w 5., 10. i 15. dniu po podaniu tych substancji z żyły szyjnej zewnętrznej pobierano krew do badań, w celu oznaczenia i porównania kształtowania się wskaźników nieswoistej odporności.

Niesterydowy lek przeciwpalny – meloksykam (Metacam® Bydło 5 mg/ml; Boehringer Ingelheim Vet-medica GmbH, Niemcy) podawano w dawce 0,5 mg/kg m.c. (1 ml preparatu/10 kg m.c.). Płyn fizjologiczny (Nartium Chloratum 0,9% – inj; Polfa Kutno, Polska), podawano w ilości 1 ml/10 kg m.c.

Ocena parametrów nieswoistej odporności komórkowej. Badanie aktywności metabolicznej fagocytów – Respiratory Burst Activity (RBA) na podstawie wewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego po stymulacji PMA (Phormol Myristate Acetate) metodą spektrofotometryczną (OD 620 nm) wg Chung&Secombes (5), badanie zdolności do wewnątrzkomórkowego zabijania przez komórki żerne (polimorfonuklearne – PMN i mononuklearne – MN) metodą spektrofotometryczną (OD 620 nm) PKA (Potential Killing Activity) wg Rooka i wsp. (14), badanie odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów stymulowanych mitogenami (ConA – konkawalina, LPS – lipopolisacharyd, PHA – fitohemaglutynina) przy pomocy metody MTT (3-[4, 5-dimethylthiazoly-2yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromie) opisaną pierwotnie przez Mosmanna (11).

Ocena parametrów nieswoistej odporności humoralnej. Aktywność lizozymu (muramidazy) (mg/l) metodą turbidymetryczną (12) w modyfikacji Siwickiego i Andersona (16), poziom białka całkowitego (g/l) oznaczono metodą spektrofotometryczną (9), poziom gammaglobulin (g/l) metodą precypitacji wg Siwickiego i Andersona (16), aktywność ceruloplazminy – Cp (mg%) metodą spektrofotometryczną (13).

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (One-way ANOVA) testem Bonferroni z wykorzystaniem programu komputerowego GraphPad Prism.

Wyniki i omówienie

Jak wiadomo, w wyniku procesu zapalnego w miejscu ogniska dochodzi do nagromadzenia licznych komórek i rozpuszczalnych czynników (frakcje układu

Tab. 1. Wpływ meloksykamu na aktywność lizozymu, poziom białka całkowitego, gammaglobulin oraz ceruloplazminy surowicy krwi krów

	Aktywność lizozymu w surowicy krwi krów (mg/l)	Poziom ceruloplazminy w surowicy krwi krów (IU)	Poziom białka ogólnego w surowicy krwi krów (g/l)	Poziom gammaglobulin w surowicy krwi krów (g/l)
Przed aplikacją meloksykamu	1,37 ± 0,29	42,52 ± 6,00	37,89 ± 3,36	5,49 ± 1,96
5 dni po aplikacji	0,94 ± 0,19	45,54 ± 2,70	45,45 ± 10,4	2,39 ± 1,55**
10 dni po aplikacji	0,81 ± 0,09**	56,36 ± 5,01**	51,35 ± 7,90	1,70 ± 0,87**
15 dni po aplikacji	0,89 ± 0,13*	49,24 ± 1,60	36,92 ± 13,8	1,65 ± 0,23**

Tab. 2. Wpływ meloksykamu na aktywność metaboliczną fagocytów (RBA), zdolność wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) przez komórki żerne (PMN i MN) oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów (MTT) stymulowanych mitogenami (ConA, LPS, PHA) krwi obwodowej krów

	Respiratory Burst Activity (RBA)	Potential Killing Activity (PKA)	(ConA-50 µg/ml)	MTT (LPS-25 µg/ml)	MTT (Fito-10 µg/ml)
Przed aplikacją meloksykamu	0,59 ± 0,10	0,32 ± 0,14	0,25 ± 0,050	0,36 ± 0,130	0,34 ± 0,140
5 dni po aplikacji	0,34 ± 0,08**	0,14 ± 0,02*	0,10 ± 0,009***	0,08 ± 0,005***	0,09 ± 0,007***
11 dni po aplikacji	0,16 ± 0,04***	0,12 ± 0,01**	0,14 ± 0,020***	0,10 ± 0,020***	0,13 ± 0,030**
14 dni po aplikacji	0,20 ± 0,10***	0,16 ± 0,07*	0,12 ± 0,030***	0,13 ± 0,060**	0,12 ± 0,040**

Objaśnienia: * – statystycznie istotne różnice $p \leq 0,05$, ** – statystycznie istotne różnice $p \leq 0,01$, *** – statystycznie istotne różnice $p \leq 0,001$

dopełniacza, immunoglobuliny, granulocyty, makrofagi, limfocyty itp.) zwalczających zarazek. Jednymi z mediatorów zapalnych są prostanoidy, które powstają z kwasu arachidonowego pod wpływem enzymu cyklooksygenazy (COX). Ten ostatni z kolei blokowany jest przez niesterydowe leki przeciwpalne, w tym również przez badany meloksykam. Prostanoidy wykazują m.in. właściwości pobudzające mechanizmy obronne organizmu bezpośrednio bądź pośrednio (np. wytwarzanie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, wolnych rodników przez leukocyty, mieloperoksydazy, kwasu podchlorowego (10).

Oceniane parametry nieswoistej odporności, zarówno humoralnej, jak i komórkowej warunkują zdolność eliminacji czynników zakaźnych, w wyniku czego decydują o zasiedleniu, namnożeniu i rozprzestrzenieniu się zarazka w organizmie. Gammaglobuliny stanowią podstawę do efektywnego wytworzenia odporności humoralnej, lizozym niszczy komórki bakteryjne, zaś białka ostrej fazy, będące pierwszą barierą w zwalczaniu patogenów, współpracują z innymi nieswoistymi czynnikami odporności, np.: dopełniaczem, fagocytami. Te ostatnie zasługują na szczególną uwagę, gdyż odgrywają zasadniczą rolę w zakażeniach drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi, zwłaszcza wirusami. Obok zabijania zarazków mogą one po ich degradacji prezentować antygen limfocytom T, które ulegają wówczas swoistej aktywacji i na drodze bezpośredniej lub pośredniej wchodzi w cykl procesów obronnych. Poza tym obniżona bądź podwyższona zdolność limfocytów do transformowania w formy blastyczne pod wpływem czynnika mitogenowego, wy-

daje się równie istotna w przypadku ewentualnego zadziałania mitogenu swoistego, jakim mogą być pasożyty wewnątrzkomórkowe w zakażonym organizmie.

Uzyskane w trakcie doświadczenia wyniki badań u krów wskazują na istotny wpływ meloksykamu na wybrane parametry nieswoistej odporności humoralnej: poziom gammaglobulin, ceruloplazminy, aktywność lizozymu (tab. 1) oraz nieswoistej odporności komórkowej: RBA i PKA (tab. 2).

Podkreślić należy statystycznie istotny spadek poziomu gammaglobulin, który obserwowano już od 5. dnia po aplikacji leku (2-krotne zmniejszenie w 5. dniu i 3-krotne w 15. dniu w porównaniu do grupy kontrolnej). Stwierdzono również statystycznie istotny spadek aktywności lizozymu, która przed podaniem meloksykamu kształtowała się na poziomie 1,37 mg/l, natomiast po 10 i 15 dniach od iniekcji preparatu wynosiła 0,81 mg/l oraz 0,89 mg/l. Zaskakujący efekt działania meloksykamu obserwowano w odniesieniu do ceruloplazminy – jednego z białek ostrej fazy, której poziom statystycznie istotnie wzrósł 10 dnia *post injectione* (p.i.). Natomiast wzrost poziomu białka całkowitego, obserwowany w pierwszych dziesięciu dniach po podaniu leku, był statystycznie nieistotny i 15. dnia p.i. parametr ten wrócił do poziomu wyjściowego (jak przed iniekcją meloksykamu) tzn. 36,92 g/l (tab. 1).

Jeszcze bardziej interesujący wpływ meloksykamu u krów obserwowano w obrębie ocenianych wskaźników nieswoistej odporności komórkowej (tab. 2). Zarówno aktywność metaboliczna (RBA), jak i fagocytarna (PKA) leukocytów krwi oraz zdolność proliferowania limfocytów (MTT) stymulowanych mitogenami (konkawalina, lipopolisacharydami, fitohemaglutynina) od 5. dnia p.i. do końca trwania doświadczenia (15. dnia) wykazywały statystycznie istotny spadek wartości.

Prezentowane wyniki badań wskazują, że meloksykam u krów działa silnie immunosupresyjnie, zarówno na parametry nieswoistej odporności komórkowej, jak i humoralnej, i – co ważne – bezpośrednio po jego podaniu. Przyczyn tego zjawiska dopatrywać się można w wielu mechanizmach działania NLPZ. W badaniach *in vitro* (4, 19) wykazano, że NLPZ posiadają właściwości przeciwutleniające i zmniejszające wytwarzanie wolnych rodników przez aktywowane granulocyty oraz ograniczające agregację granulocytów i ich adhezję do śródbłonek. Berg J. i wsp. (3) stwierdzili, że hamują one tworzenie IL-6 i NO przez stymulowane komórki. Natomiast inni autorzy (2) obserwowali, po podaniu NLPZ, u krów spadek poziomu IFN (Interferonu) i TNF- α (Tumor Necrosis Factor) oraz u człowieka IL-1 (1, 17).

W praktyce obserwowane u krów zjawisko immunosupresji objawiać się może zwiększoną wrażliwością organizmu na zakażenia, słabszą odpornością poszczepienną i ujawnieniem zakażeń bezobjawowych.

Piśmiennictwo

1. Amberger A., Hala M., Saurwein-Teissl M., Metzler B., Grubeck-Loebenstein B., Xu Q., Wick G.: Suppressive effects of anti-inflammatory agents on human endothelial cell activation and induction of heat shock proteins. *Mol. Med.* 1999, 5, 117-128.
2. Bednarek D., Zdzisińska B., Kondracki M., Kandefer-Szerszeń M.: Effect of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs in combination with long-acting oxytetracycline on non-specific immunity of calves suffering from enzootic bronchopneumonia. *Vet. Microbiol.* 2003, 96, 53-67.
3. Berg J., Fellier H., Chritoph T., Grarup J., Stimmender D.: The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX) -1/-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL) -6 *in vitro*. *Inflamm. Res.* 1999, 48, 369-379.
4. Bevilacqua M., Magni E.: Recent contributions to knowledge of the mechanism of action of nimesulide. *Drugs.* 1993, 46, 40-47.
5. Chung S., Secombes S. J.: Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comp. Biochem. Physiol.* 1988, 89B, 539-544.
6. Emery P.: Clinical aspects of COX-2 inhibitors. *Drugs Today (Barc.)* 1999, 35, 267-274.
7. Hayes E. C., Rock J. A.: COX-2 inhibitors and their role in gynecology. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2002, 57, 768-780.
8. Kurumbail R. G., Stevens A. M., Gierse J. K., McDonald J. J., Stegeman R. A., Park J. Y., Gildehaus D., Miyashiro J. M., Penning T. D., Seibert K., Isakson P. C., Stallings W. C.: Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996, 384, 644-648.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.: Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
10. Międzybrodzki R.: Kierunki poszukiwań i zastosowanie niesteroidowych leków przeciwpalniczych. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2004, 58, 438-448.
11. Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983, 65, 55-63.
12. Parry R. M., Chandau R. C., Shahani R. M.: A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965, 119, 384-386.
13. Rice E. W., Wagman E., Takenaka Y.: Ceruloplasmin assay in serum: standardization of ceruloplasmin activity in terms of international enzyme units. *Diag. Lab.* 1986, 12, 39-53.
14. Rook G. A., Steele W., Umar J., Dockrell H. M.: A simple method for the solubilization of reduced NBT and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma interferon. *J. Immunol. Meth.* 1995, 82, 161-167.
15. Sano H., Kawahito Y., Wilder R. L., Hashimoto A., Mukai S., Asai K., Kimura S., Kato H., Kondo M., Hla T.: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. 1995, 17, 3785-3789.
16. Siwicki A. K., Anderson D. P.: Immunostimulation in fish: Measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. *U.S. Fish Wildl. Service-IFI, Olsztyn* 1993, 1, 17.
17. Wu K. K., Sanduja R., Tsai A. L., Ferhanoglu B., Loose-Mitchell D. S.: Aspirin inhibits interleukin 1 – induced prostaglandin H synthase expression in cultured endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88, 2384-2387.
18. Vane J. R.: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 1971, 231, 232-235.
19. Verhoeven A. J., Tool A. T. J., Kuijpers T. W., Roos D.: Nimesulide inhibits platelet-activating factor synthesis in activated human neutrophils. *Drugs.* 1993, 46, 52-58.

Adres autora: dr Roman Wójcik, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn;
e-mail: brandy@uwm.edu.pl