



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.
Hudcova 70
621 00 Brno

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

Imunostimulační efekt ether-fosfolipidu PNAE na imunitní systém králíka

Zadavatel: Areko Praha, s.r.o.

Vykonavatel: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

za vykonavatele: MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.

2008

Závěrečná zpráva

Imunostimulační efekt ether-fosfolipidu PNAE na imunitní systém králíka

Zadavatel: Areko Praha, s.r.o.

Vykonavatel: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

za vykonavatele:


MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.

VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.
odd. imunologie
621 00 BRNO, Hudcova 70

1. CÍL STUDIE

Cílem práce bylo ověřit předpokládaný imunostimulační efekt ether-fosfolipidu PNAE (plasmanyl-(N-acyl)-ethanolamin) na imunitní systém králíka.

2. MATERIÁL A METODY

2.1. Zvířata a experimentální uspořádání

V experimentu bylo použito celkem 18 kusů králíků plemene novozélandský bílý (CRL:KLB) produkovaných firmou Charles River Laboratories, Inc. a doručených firmou AnLab s.r.o., spolu s potvrzením deklarujícím SPF status dodaných zvířat.

Zvířata byla ustájena v prostorách akreditovaných stáji Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i. v Brně (akreditace č. 5834/2007-10001). Celý experiment proběhl ve stáji s ochrannou bariérou, s monitorovaným světelným i teplotním režimem. Králíci byli ustájeni individuálně v nerezových klecích pro králíky odpovídajících vyhlášce č. 207/2004 Sb. O ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Identifikace králíků byla zajištěna štítkem umístěným na kleci a označením barvou na vnitřní části ušního boltce každého jedince. Zvířata byla pod každodenním dohledem ošetřujícího personálu a veterinárního lékaře. Projekt pokusu byl povolen Ministerstvem zemědělství České republiky (MZe č. 973, VÚVeL č. 05/2008).

Pro účely experimentu byli králíci náhodně rozděleni do tří skupin po šesti kusech, vždy 3 samice a 3 samci v každé skupině:

1. skupina (P-KLH-P):

Králíkům v první skupině byl podáván ether fosfolipid PNAE 14 dní před a 7 dní po vakcinaci keyhole limpet hemocyaninem (KLH), testovaný preparát byl podáván také 7 dní před a 7 dní po revakcinaci KLH.

2. skupina (KLH-P):

Králíkům ve druhé skupině byl 14 dní před vakcinací KLH podáván fyziologický roztok, ether fosfolipid PNAE byl podáván 7 dní po vakcinaci KLH, testovaný preparát byl podáván také 7 dní po revakcinaci KLH.

3. skupina (KLH):

Králíkům ve třetí skupině byl podáván pouze fyziologický roztok a to 14 dní před a 7 dní po vakcinaci KLH a také 7 dní před a 7 dní po revakcinaci KLH.

Ether fosfolipid PNAE (APLC-L-080812, 15% emulze ve fyziologickém roztoku, Areko Praha, s.r.o.) byl aplikován per orálně injekční stříkačkou v dávce 1 ml / kus 3x denně.

Čtrnáctý den po zahájení experimentu byl všem králíkům subkutánně aplikován KLH (Imject® Mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin, Thermo Scientific, Rockford, USA) v dávce 5 µg / kus v objemu 0,5 ml. Tři týdny po vakcinaci byli všichni králíci stejným způsobem revakcinováni.

2.2. Odběr a zpracování vzorků:

Všem králíkům zařazeným do experimentu bylo za aseptických podmínek odebráno 1,5 ml periferní krve z *vena auricularis lateralis* do heparinizovaných (Heparin forte, Léčiva, ČR, 10 m.j./1ml krve) zkumavek typu Eppendorf. Takto získané vzorky krve byly určeny pro test specifické blastické transformace lymfocytů (den -14, 0, 14 a 35) a detekci tvorby specifických protilátek IgM a IgG izotypu pomocí ELISA (den -14, 0, 7, 14, 21, 28, 35 a 42).

Odběry krve probíhaly dle následujícího schématu:

- den -14:** odběr před zahájením perorální aplikace (13.8.2008)
- den 0:** odběr před vakcinací KLH (27.8.2008)
- den 7:** odběr 7 dní po vakcinaci KLH (3.9.2008)
- den 14:** odběr 14 dní po vakcinaci KLH (10.9.2008)
- den 21:** odběr 21 dní po vakcinaci KLH, revakcinace (17.9.2008)
- den 28:** odběr 28 dní po vakcinaci KLH, 7 dní po revakcinaci (24.9.2008)
- den 35:** odběr 35 dní po vakcinaci KLH, 14 dní po revakcinaci (1.10.2008)
- den 42:** odběr 42 dní po vakcinaci KLH, 28 dní po revakcinaci (8.10.2008)

2.3. Test specifické blastické transformace lymfocytů:

Přidá-li se do testované kultury specifický antigen, lymfocyty, které ho rozpoznají, jsou převedeny z klidové fáze do fáze množení, čímž dochází ke zvýšení jejich mitotické i metabolické aktivity. V tomto testu se zvýšená intenzita mitózy a metabolismu zjišťuje na základě inkorporace nukleové báze thymidinu značeného radioaktivním vodíkem.

V mikrotitrační destičce (Gama, ČR) bylo smícháno 20 μ l specifického antigenu (KLH v koncentraci 20 mg) s 200 μ l periferní krve. Mitogeny stimulované i kontrolní (bez KLH) kultury byly nanášeny v triplicátech. Kultivace probíhala 3 dny při 37 °C a 5 % CO₂, 20 hodin před sklizením buněk (FilterMate Harvestor, Packard Bioscience Instrument Company, USA) bylo přidáno ³H-thymidinem značené médium (5 μ Ci/ml) v množství 50 μ l na jamku. Inkorporace ³H-thymidinu byla měřena scintilačním spektrofotometrem (TopCount NXT™, Packard Bioscience Instrument Company, USA).

Stupeň stimulace lymfocytů je vyjádřen stimulačním indexem (SI). SI je poměr průměrů CPM (counts per minute) stimulovaných a nestimulovaných kultur, (SI = průměr CPM stimulovaných kultur / průměr CPM nestimulovaných kultur).

2.4. Kvantifikace KLH-specifických protilátek:

Specifické protilátky byly detekovány pomocí ELISA testu. Koncentrace všech reagensů použitých v tomto testu byla zjištěna boxovou titrací. Antigen (lyofilizovaný KLH) byl rozpuštěn v uhličitan-hydrogenuhličitanovém pufru (pH 8,6) a navázán na 96 jamkové mikrotitrační desky (Gama Dalečín, ČR) v koncentraci 0,2 μ g na jamku. Desky byly inkubovány v chladu 18 hodin a následně byly 3x promyty fyziologickým roztokem (pH 7,2) obsahujícím 0,05 % tweenu 20. Poté bylo do každé jamky

napipetováno 100 μ l ředícího roztoku (fyziologický roztok s 0,05 % tweenu 20 a 0,5 % kaseinu). Do jamek v prvním řádku bylo přidáno 50 μ l vzorků krevní plazmy ředěných 1:33 a následně bylo připraveno trojnásobné ředění vzorku.

Po 1 hodinové inkubaci ve vlhké komůrce při 37°C byly desky třikrát promyty a poté bylo do všech jamek napipetováno 100 μ l příslušného konjugátu (kozí anti-králičí IgM nebo kuřecí anti-králičí IgG konjugované s křenovou peroxidázou, Rockland, Gibbstville, PA). Po 1 hodinové inkubaci byly desky opět promyty a do jamek byl napipetován substrát (TMB, Test-line, ČR). Reakce byla zastavena po 10 minutách pomocí 50 μ l 2M kyseliny sírové. Absorbance byla měřena při 450 nm pomocí multikanálového spektrometru iEMS Reader (Labsystems iEMS). Měřeními byly získány titrační křivky pro každý vzorek. Výsledný titr, ve kterém byly odečítány výsledky byl definovaný jako ředění, při kterém optická denzita klesla na konečnou hodnotu ($OD_{450} = 0,1$). Jeden vzorek séra byl titrován na každé desce jako pozitivní kontrola.

2.5. Statistická analýza dat:

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny (srovnání hodnot mezi všemi skupinami v každém termínu) neparametrickým Mann-Whitney testem pomocí programu Prism[®]. Rozdíl s $P < 0,05$ byl považován za statisticky významný.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1. Test specifické blastické transformace lymfocytů:

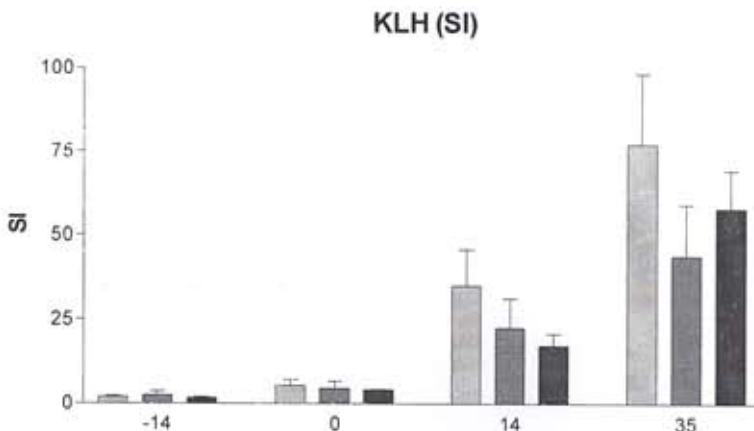
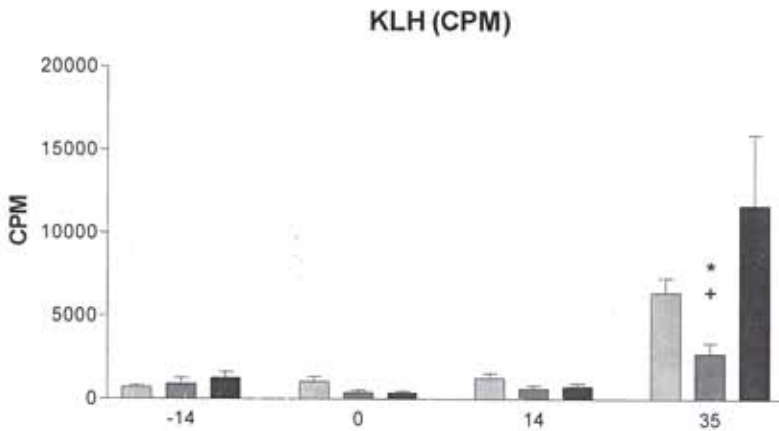
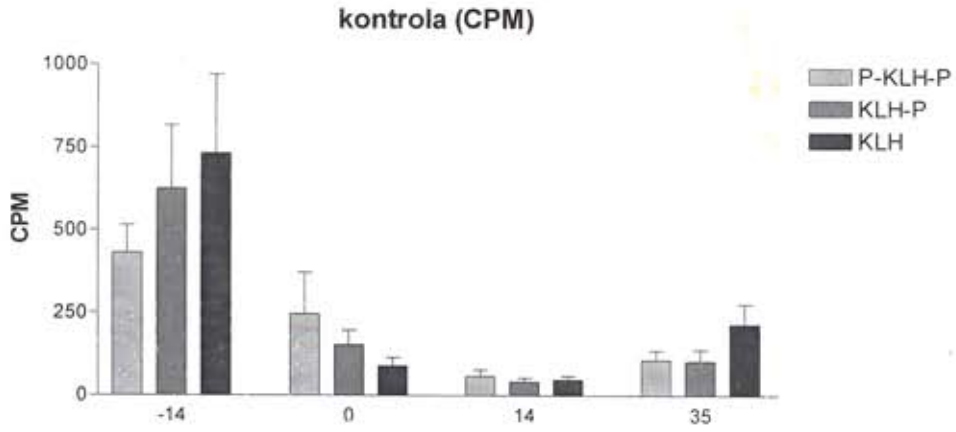
Vakcinace a následná revakcinace králíků KLH antigenem vedla k očekávanému zvýšení proliferační schopnosti lymfocytů po specifické stimulaci vzorků krve antigenem KLH u všech tří skupin králíků (Graf 1). Nicméně při statistickém porovnání dosažených hodnot nebyl prokázán žádný signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami a to ani u kontrolních nestimulovaných kultur ani u kultur stimulovaných specifickým KLH antigenem. Při porovnání parametru CPM, který vyjadřuje proliferační schopnosti lymfocytů, u králíků ve skupině KLH-P v den 35 byla prokázána signifikantně nižší proliferační schopnost u lymfocytů po specifické stimulaci v porovnání jak s králíky ve skupině KLH ($P < 0,01$), tak ve skupině P-KLH-P ($P < 0,05$) v tomto termínu. **Z výše uvedených výsledků vyplývá, že aplikace ether fosfolipidu PNAE nevedla ke zvýšení proliferační schopnosti lymfocytů po vakcinaci KLH antigenem.**

3.2. Tvorba specifických protilátek:

Králičí ve všech skupinách odpověděli na podaný antigen tvorbou specifických IgM a IgG protilátek (Graf 2). Tvorba specifických protilátek byla klasicky dvoufázová, to znamená mírný nárůst specifických protilátek po vakcinaci s razantní tvorbou zejména IgG protilátek po revakcinaci. Při statistickém vyhodnocení hladin jednotlivých izotypů protilátek v jednotlivých termínech po vakcinaci a revakcinaci nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami králíků. **To znamená, že aplikace ether fosfolipidu PNAE nevedla ke zvýšení specifické protilátkové odpovědi po vakcinaci KLH antigenem.**

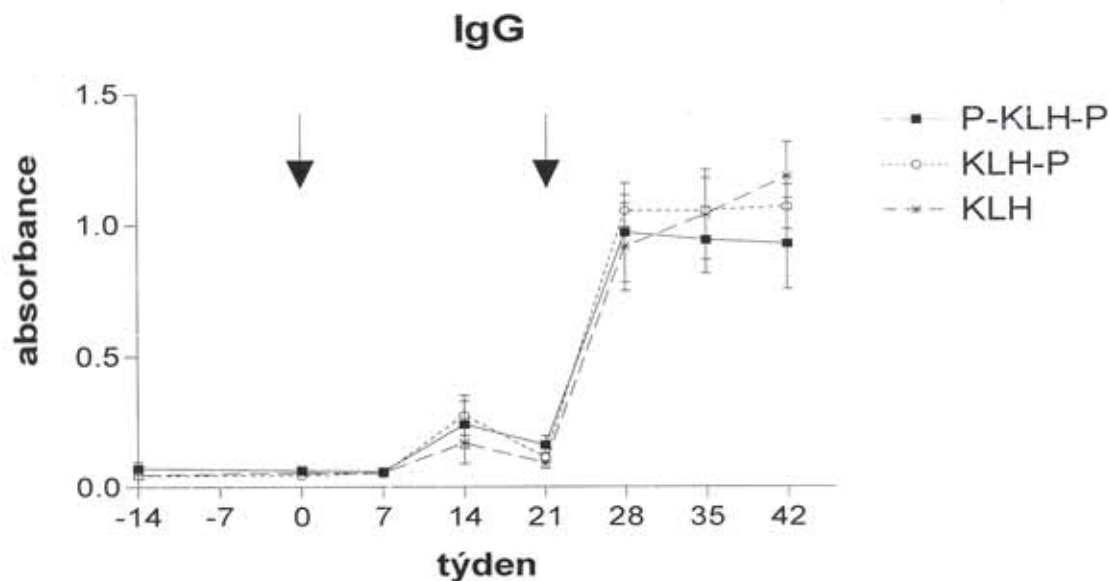
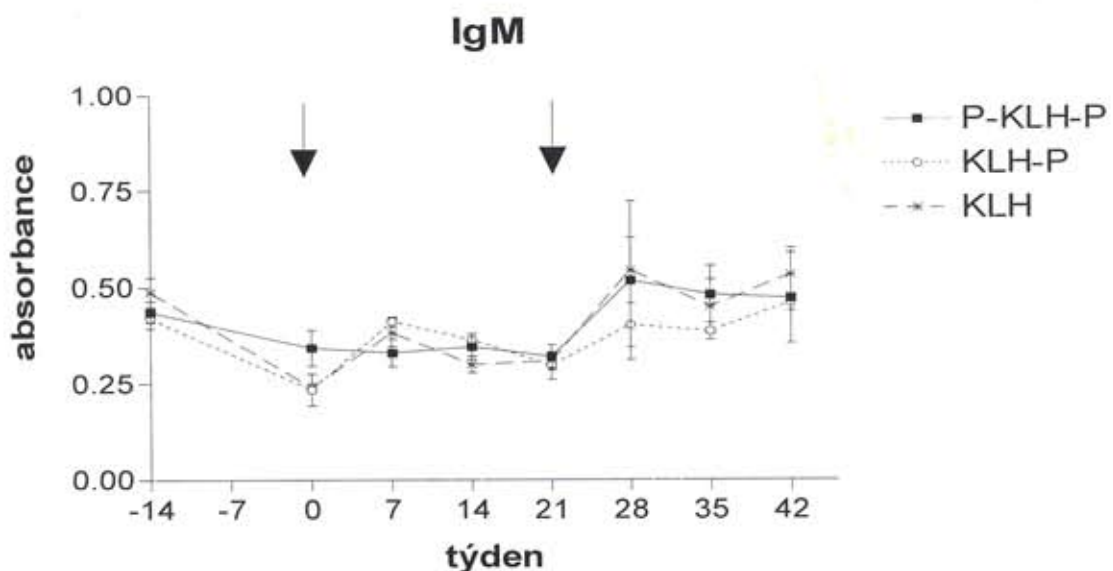
Graf 1.

Test specifické blastické transformace lymfocytů: kontrola (CPM) udává proliferační schopnost nestimulovaných lymfocytů, KLH (CPM) udává proliferační schopnost lymfocytů po *in vitro* stimulaci KLH 20 mg, KLH (SI) vyjadřuje poměr hodnot stimulovaných / nestimulovaných lymfocytů. Signifikantní rozdíly mezi skupinou P-KLH-P a KLH-P v porovnání se skupinou KLH jsou označeny * ($P < 0,01$), signifikantní rozdíly mezi skupinou P-KLH-P a KLH-P jsou označeny + ($P < 0,05$).



Graf 2.

Tvorba specifických IgM a IgG protilátek po subkutánní aplikaci KLH v dávce 5 μg / kus. Data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka absorbance IgM nebo IgG v různých termínech po vakcinaci a revakcinaci (označeno šipkou).





Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 70, 621 00 Brno

tel.: 533 331 111
fax: 541 211 229
e-mail: vri@vri.cz
www: <http://www.vri.cz>