



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

## ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

# **VLIV ETHER - FOSFOLIPIDU PNAE NA IMUNITNÍ SYSTÉM KRÁLÍKA PŘI DEXAMETAZONEM INDUKOVANÉ IMUNOSUPRESI**

Zadavatel: Areko Praha, s. r. o.

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

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

**2008**

Závěrečná zpráva

## Vliv ether-fosfolipidu PNAE na imunitní systém králíka při dexametazonem indukované imunopresi

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. MATERIÁL A METODY

## 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 (MZe č. 974, VÚVeL, v. v. i. č. 06/2008).

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

### **1. skupina (P-DX-P):**

Králíkům v první skupině byl podáván ether fosfolipid PNAE 7 dní před aplikací dexamethazonu (DXP), v aplikaci testovaného preparátu bylo pokračováno až do 10. dne po zahájení aplikace DXP.

### **2. skupina (DX-P):**

Králíkům ve druhé skupině byl 7 dní před aplikací DXP podáván fyziologický roztok, ether fosfolipid PNAE byl podáván až zároveň s aplikací DXP, v aplikaci testovaného preparátu bylo pokračováno až do 10. dne po zahájení aplikace DXP.

### **3. skupina (DX):**

Králíkům ve třetí skupině byl od zahájení experimentu až do 10. dne po zahájení aplikace DXP podáván pouze fyziologický roztok, králíci byli suprimováni aplikací DXP stejným způsobem jako králíci ve skupině 1 a 2.

Ether fosfolipid PNAE (APLC-L-080520, 15% emulze ve fyziologickém roztoku, Areko Praha, s.r.o.) byl aplikován per orálně injekční stříkačkou v dávce 1 ml / kus 3x denně.

Osmý den po zahájení experimentu byl všem králíkům intramuskulárně aplikován dexamethazon (Dexamed, Medochemie s.r.o., Kypr) v dávce 2 mg/kg dle následujícího schématu:

- den 0:** 1. aplikace a následně 6 a 12 hodin po první aplikaci
- den 1:** 24 hodin po první aplikaci
- den 2:** 48 hodin po první aplikaci

## 1.2. Odběr a zpracování vzorků:

Všem králíkům zařazeným do experimentu bylo za aseptických podmínek odebíráno 1,5 ml periferní krve z *arteria auricularis centralis* do heparinizovaných (Heparin forte, Léčiva, ČR, 10 m.j./1ml krve) zkumavek typu Eppendorf. Takto získané vzorky krve byly určeny pro hematologické vyšetření, test blastické

transformace lymfocytů a analýzu subpopulací lymfocytů pomocí průtokové cytometrie.

Odběry krve probíhaly dle následujícího schématu:

<b>den -7:</b>	odběr před zahájením perorální aplikace (9.6.2008)
<b>den 0:</b>	odběr před první aplikací DXP (16.6.2008)
<b>den 1:</b>	odběr 1 den po první aplikaci DXP (17.6.2008)
<b>den 4:</b>	odběr 4 dny po první aplikaci DXP (20.6.2008)
<b>den 7:</b>	odběr 7 dní po první aplikaci DXP (23.6.2008)
<b>den 10:</b>	odběr 10 dní po první aplikaci DXP (26.6.2008)
<b>den 23:</b>	odběr 23 dní po první aplikaci DXP (9.7.2008)

### 1.3. Hematologické vyšetření:

Stanovení celkového počtu leukocytů a erytrocytů bylo provedeno za pomoci automatického analyzátoru buněk Coulter Counter CBC 5 (Coulter Electronics Ltd, UK).

Z kapky krve byl zhotoven nátěr na podložní sklíčko a nabarven metodou dle Pappenheima. Za pomoci světelného mikroskopu bylo odečteno 200 leukocytů, ze kterých byl stanoven relativní diferenciální rozpočet v procentech, a následně byl z celkového počtu leukocytů vypočítán absolutní diferenciální rozpočet v celých číslech na litr.

### 1.4. Test blastické transformace lymfocytů:

Některé rostlinné lektiny, označované jako mitogeny, jsou schopny nespecificky aktivovat lymfocyty. Aktivované lymfocyty 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  $\mu$ l mitogenu (concanavalin A – ConA, v koncentraci 10  $\mu$ g/ml) s 200  $\mu$ l periferní krve. Mitogeny stimulované i kontrolní (bez ConA) kultury byly nanášeny v triplikátech. Kultivace probíhala 3 dny při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>, 20 hodin před sklizením buněk (FilterMate Harvester, Packard Bioscience Instrument Company, USA) bylo přidáno <sup>3</sup>H-thymidinem značené médium (5  $\mu$ Ci/ml) v množství 50  $\mu$ l na jamku. Inkorporace <sup>3</sup>H-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).

### 1.5. Průtoková cytometrie:

Procentuální hodnoty jednotlivých lymfocytárních subpopulací periferní krve byly získány metodou průtokové cytometrie za použití komerčně dostupných myších anti-králičích monoklonálních protilátek: anti-CD4 (RTH1A, IgG1), anti-CD8 (ISC27A, IgG2a), anti-pantT2 (RTH21A, IgG1), anti-CD45 (ISC18A, IgG2a) (VMRD Inc., USA) a křížově reagující anti-lidské CD14 monoklonální protilátky (TÜK4, IgG2a, DakoCytomation). Erytrocyty v 50  $\mu$ l plné krve byly lyzovány 4 ml hemolytického

roztoku (8,26 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 g  $\text{KHCO}_3$  a 0,037 g  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  v 1 litru destilované vody). Získané leukocyty byly inkubovány s monoklonálními protilátkami v ředění 1:50 při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Následovalo promytí suspenze 3 ml proplachovacího roztoku (1 g  $\text{NaN}_3$  a 1,84 g  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  v 1 litru PBS) a centrifugace (5 minut, 1200 rpm/min.) K sedimentovaným leukocytům bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  sekundárních isotypově specifických protilátek (kozy anti-myší IgG1-FITC ředěno 1:100 a kozí anti-myší IgG2a-RPE ředěno 1:500, Southern Biotechnology, USA), suspenze byla inkubována při 4°C po dobu 20 minut. Pro detekci B lymfocytů byla použita křížově reagující myší anti-lidská CD79 $\alpha$  monoklonální protilátka (klon HM57, DakoCytomation, DE). Buňky periferní krve byly fixovány a permeabilizovány pomocí IntraStain kitu (DakoCytomation, DE) a následně označeny dle protokolu doporučeného výrobcem.

Po závěrečném promytí byly značené leukocyty analyzovány pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) s operačním programem CELLQuest™. K označení DNA poškozených nebo mrtvých buněk a jejich následnému vyloučení z analýzy byl použit propidium jodid. Expres antigenů CD45 a CD14 sloužila k nastavení a ověření čistoty "lymfogatu". Získané procentuální hodnoty zastoupení ostatních povrchových znaků byly přepočítány na 100 % CD45<sup>+</sup> a CD14<sup>-</sup> buněk "lymfogatu".

#### 1.6. 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.

## 2. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 2.1. Hematologické vyšetření:

Aplikace DXP měla za následek snížení procentuálního zastoupení lymfocytů, a naopak zvýšení procentuálního zastoupení neutrofilů periferní krve u všech sledovaných skupin (graf 1). V celkových počtech došlo k signifikantnímu snížení počtů lymfocytů, eosinofilů a monocytů a zvýšení počtů neutrofilů. V průběhu experimentu nebyly zaznamenány žádné změny v celkovém počtu erytrocytů a leukocytů. Tyto výsledky se shodují s výsledky získané v naší předešlé studii týkající se vlivu DXP na imunitní systém králíka (Jeklova a kol., Vet. Immunol. Immunopathol., 2008; 122:231-40).

Při srovnání intenzity těchto změn u skupiny P-DX-P v porovnání se skupinou DX, bylo zjištěno, že přestože celkově nebyl prokázán statisticky významný pokles celkového počtu leukocytů, králíci ve skupině P-DX-P měli v den 1 signifikantně více leukocytů ( $P < 0,05$ ) než králíci ve skupině DX. Vyšší počet leukocytů u zvířat ze skupiny P-DX-P byl způsoben signifikantně nižším úbytkem lymfocytů ( $P < 0,01$ ) v tomto termínu než u králíků ve skupině DX. U skupiny P-DX-P byl prokázán také signifikantně vyšší celkový počet lymfocytů ( $P < 0,05$ ) v den 7 než u skupiny DX v tomto termínu. **Tyto výsledky indikují nižší pokles a rychlejší návrat lymfocytů periferní krve u králíků, kterým byl aplikován ether fosfolipid PNAE 7 dní před aplikací DXP než u králíků, kterým ether fosfolipid PNAE podáván nebyl.**

U králíků ve skupině DX-P byl zjištěn signifikantně nižší procentuální zastoupení neutrofilů ( $P < 0,05$ ) v den 7 v porovnání se skupinou DX a signifikantně vyšší procentuální ( $P < 0,05$ ) i celkový počet eosinofilů ( $P < 0,05$ ) v den 7 oproti skupině DX. **Uvedené výsledky naznačují rychlejší pokles neutrofilů, které se v důsledku aplikace DXP nakumulovali v periferní krvi a naopak rychlejší návrat eosinofilů do oběhu u skupiny zvířat, kterým byl ether fosfolipid PNAE podáván zároveň s aplikací DXP v porovnání se skupinou, které ether fosfolipid PNAE podáván nebyl.**

### 2.2. Test blastické transformace lymfocytů:

Aplikace imunosupresiva vedla k očekávanému poklesu proliferační schopnosti lymfocytů po nespecifické stimulaci concanavalinem A. Útlum aktivity lymfocytů byl nejmarkantnější v den 1 (graf 2).

Při porovnání proliferační schopnosti lymfocytů u králíků ve skupině P-DX-P v den 0 byla prokázána signifikantně vyšší proliferační schopnost u lymfocytů v kontrolních vzorcích (vzorek krve bez stimulace ConA) v porovnání jak s králíky ve skupině DX ( $P < 0,05$ ), tak ve skupině DX-P ( $P < 0,05$ ) v tomto termínu. V den 1 byla zjištěna signifikantně nižší proliferační schopnost lymfocytů v kontrolních vzorcích u skupin P-DX-P ( $P < 0,01$ ) a P-DX ( $P < 0,01$ ) v porovnání se skupinou DX. **Z uvedeného vyplývá, že králíci, kterým byl ether fosfolipid PNAE podáván 7 dní před aplikací DXP měli vyšší spontánní aktivitu lymfocytů v porovnání s králíky, kterým ether fosfolipid PNAE podáván nebyl. Nicméně aplikace ether fosfolipidu PNAE nezabrání poklesu aktivity lymfocytů, který je navozen imunosupresí. Naopak pokles proliferační schopnosti je méně markantní u zvířat, kterým ether fosfolipid PNAE podáván nebyl.**

U králíků ve skupině P-DX-P byla zjištěna vyšší proliferační schopnost lymfocytů ( $P < 0,05$ ) v den 0 také ve vzorcích stimulovaných ConA v porovnání s králíky ve

skupině DX, což potvrzuje výše uvedenou možnost stimulace proliferační schopnosti podáváním ether fosfolipidu PNAE. U skupiny DX-P byla prokázána vyšší schopnost proliferace u lymfocytů stimulovaných ConA ( $P < 0,05$ ) v den 7 než u skupiny DX, to může indikovat rychlejší návrat proliferační schopnosti lymfocytů u králíků, kterým byl ether fosfolipid PNAE podáván zároveň s aplikací DXP.

Žádný z výše uvedených signifikantních rozdílů nebyl prokázán při výpočtu stimulačního indexu (SI).

### 2.3. Průtoková cytometrie:

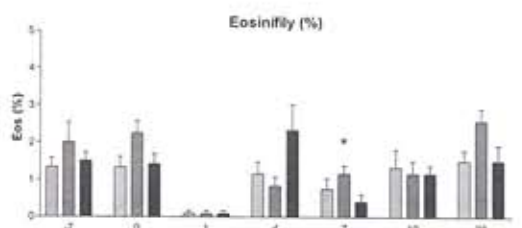
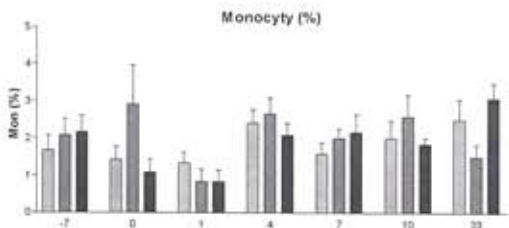
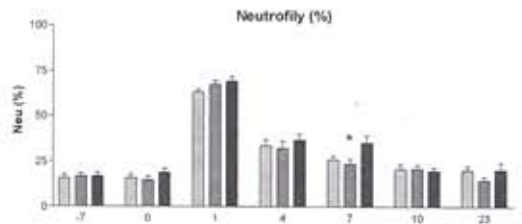
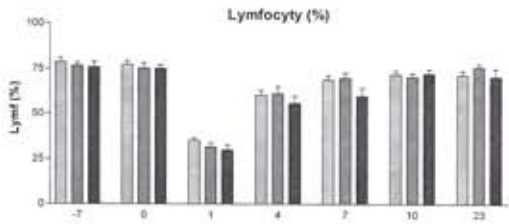
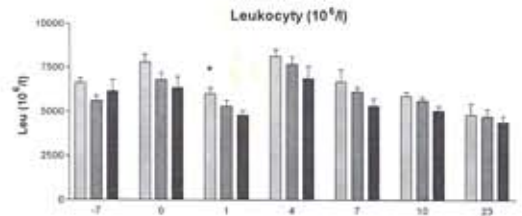
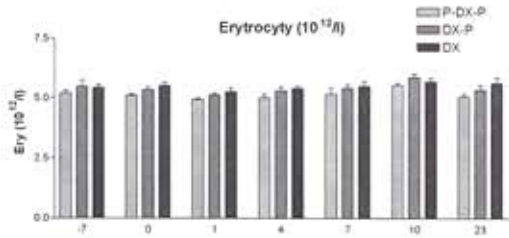
Subpopulace lymfocytů byly aplikací DXP výrazně ovlivněny (graf 3). Po DXP indukované imunosupresi došlo k zvýšení procentuálního zastoupení  $CD4^+$  a  $panT^+$  lymfocytů a naopak ke snížení  $CD8^+$ ,  $CD4^+8^+$  a  $CD79\alpha^+$  lymfocytů. V absolutních hodnotách pak došlo v důsledku poklesu celkového počtu lymfocytů k poklesu všech námi sledovaných lymfocytárních subpopulací. Uvedené změny byly nejvýraznější v den 1.

Při srovnání skupiny P-DX-P v den 0 bylo zjištěno vyšší počet  $CD4^+$  lymfocytů a v důsledku toho i zvýšení celkového počtu  $panT^+$  lymfocytů v porovnání se skupinami DX-P a DX. V den 1 byl u skupiny P-DX-P zjištěn vyšší celkový počet  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  (vyšší celkový i procentuální počet),  $CD4^+8^+$  a  $panT^+$  lymfocytů ( $P < 0,01$ ) v porovnání se skupinou DX v tomto termínu. U skupiny DX-P byl v den 1 zjištěn vyšší celkový počet  $CD8^+$  a  $CD4^+8^+$  lymfocytů spolu s vyšším procentuálním počtem  $CD4^+8^+$  lymfocytů ( $P < 0,05$ ) v porovnání se skupinou DX. To znamená, že u králíků, kterým byl aplikován ether fosfolipid PNAE 7 dní před začátkem imunosuprese a u králíků, kterým byl ether fosfolipid PNAE podáván zároveň s imunosupresivem nedošlo k tak výraznému poklesu jednotlivých lymfocytárních subpopulací jako u králíků, kterým ether fosfolipid PNAE podáván nebyl.

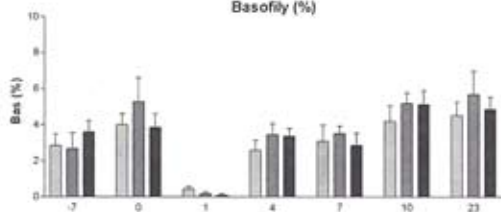
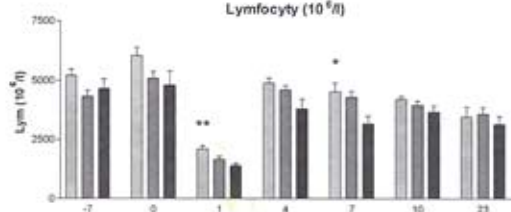
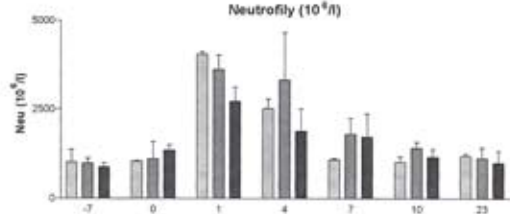
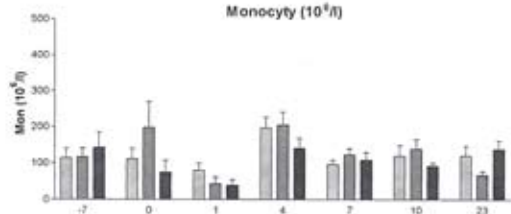
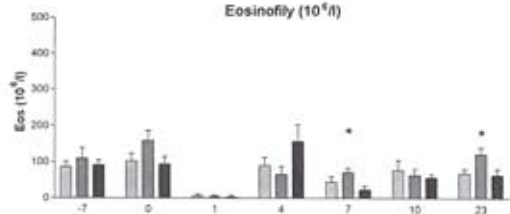
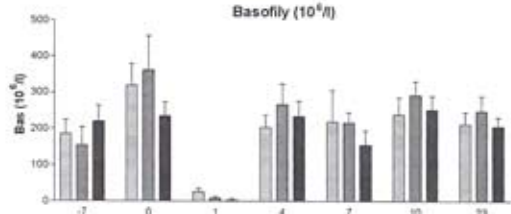
V den 7 byl u skupiny P-DX-P prokázán vyšší celkový počet  $CD4^+$ ,  $CD4^+8^+$ ,  $panT$  a  $CD79\alpha^+$  lymfocytů ( $P < 0,05$ ) v porovnání se skupinou DX. U skupiny DX-P byl zjištěn vyšší celkový počet  $CD8^+$ ,  $CD4^+8^+$  a vyšší procentuální i celkový počet  $CD79\alpha^+$  lymfocytů ( $P < 0,05$ ) oproti skupině DX ve stejném termínu. To indikuje rychlejší návrat těchto subpopulací u skupin králíků, kterým byl podáván ether fosfolipid PNAE ve srovnání se skupinou, které tento preparát podáván nebyl.

**Graf 1.**

Srovnání celkového počtu erytrocytů a leukocytů a procentuálního a celkového zastoupení lymfocytů, neutrofilů, monocyty, eosinofilů a basofilů. Signifikantní rozdíly mezi skupinou P-DX-P a DX-P v porovnání se skupinou DX jsou označeny \* ( $P < 0,05$ ) nebo \*\* ( $P < 0,01$ ).

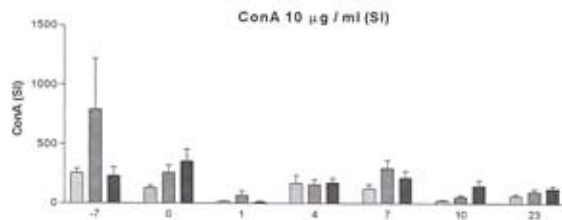
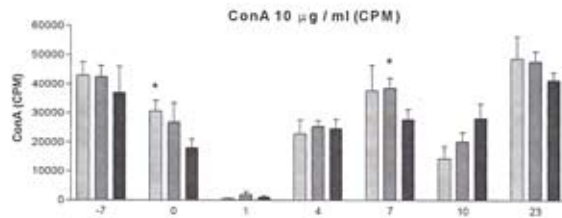
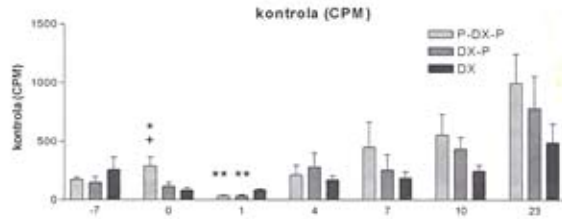




**Basofily (%)****Lymfocyty ( $10^9/l$ )****Neutrofilij ( $10^9/l$ )****Monocyty ( $10^9/l$ )****Eosinofily ( $10^9/l$ )****Basofily ( $10^9/l$ )**

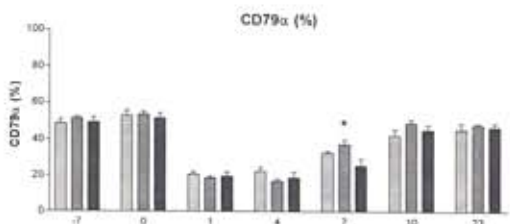
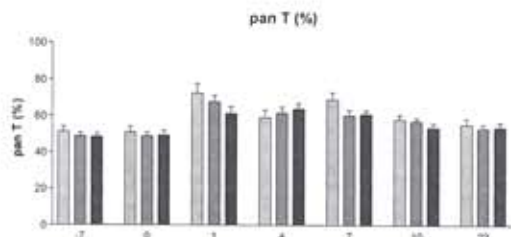
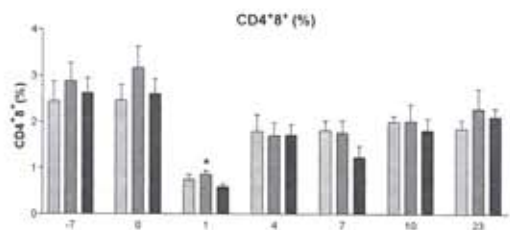
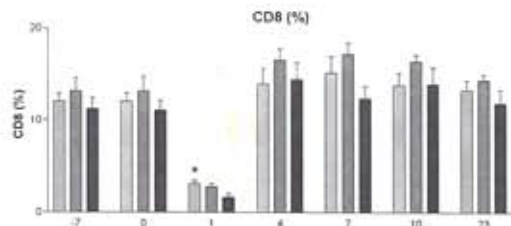
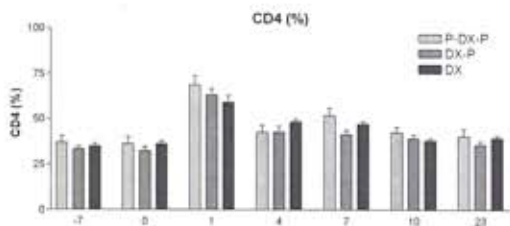
**Graf 2.**

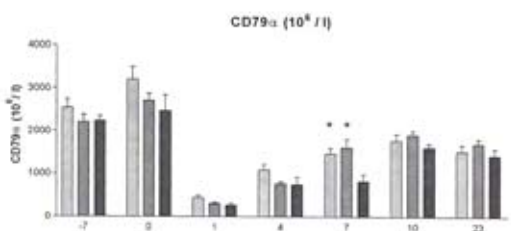
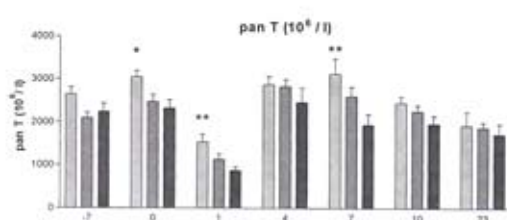
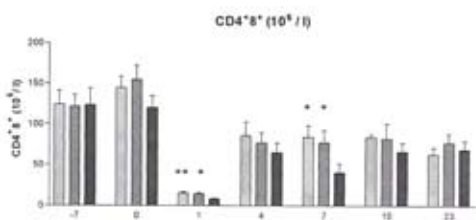
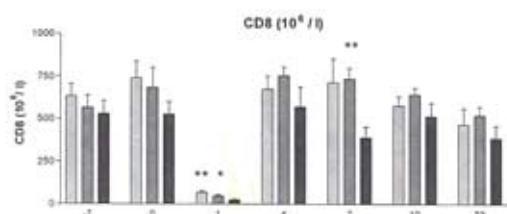
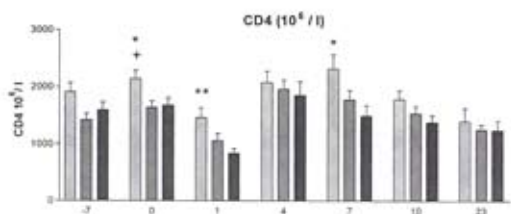
Test blastické transformace lymfocytů: kontrola (CPM) udává proliferační schopnost nestimulovaných lymfocytů, ConA 10  $\mu\text{g/ml}$  (CPM) udává proliferační schopnost lymfocytů po stimulaci concavalinem A, ConA 10  $\mu\text{g/ml}$  (SI) vyjadřuje poměr hodnot stimulovaných / nestimulovaných lymfocytů. Signifikantní rozdíly mezi skupinou P-DX-P a DX-P v porovnání se skupinou DX jsou označeny \* ( $P < 0,05$ ) nebo \*\* ( $P < 0,01$ ), signifikantní rozdíly mezi skupinou P-DX-P a DX-P jsou označeny + ( $P < 0,05$ ).



**Graf 3.**

Srovnání procentuálního a celkového počtu  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+8^+$ , panT<sup>+</sup> a  $CD79\alpha^+$  lymfocytů. Signifikantní rozdíly mezi skupinou P-DX-P a DX-P v porovnání se skupinou DX jsou označeny \* ( $P < 0,05$ ) nebo \*\* ( $P < 0,01$ ), signifikantní rozdíly mezi skupinou P-DX-P a DX-P jsou označeny + ( $P < 0,05$ ).







**Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.**

**Hudcova 70, 621 00 Brno**

**tel.: +420 5 3333 1111**

**fax: +420 5 4121 1229**

**e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)**

**URL: <http://www.vri.cz>**