

WPŁYW CYKLOFOSFAMIDU I STREPTOMYCYNY NA POZIOM WITAMINY A W WĄTROBIE MYSZY ZARAŻONYCH *TRICHINELLA SPIRALIS*

LECH WARTENBERG, BARBARA TRĘBUSIEWICZ i KRYSTYNA KARMAŃSKA

Instytut Higieny Produktów Zwierzęcych AR, Wrocław
Zakład Parazytologii PAN, Wrocław

Znany jest związek między inwazjami pasożytniczymi a poziomem witaminy A w organizmie żywiciela (por. np. artykuł przeglądowy Markiewicza, 1963). Obecność pasożytów w przewodzie pokarmowym ogranicza możliwość odzyskiwania witaminy A przez ustrój, gdyż zmiany zapalne w błonie śluzowej jelit utrudniają hydrolizę estrów witaminy oraz jej resorpcję (Piusiński, 1975). Spadek aktywności enzymów trawiennych w jelitach owiec zarażonych *Trichostrongylus colubriformis* został stwierdzony przez Coopa i Angusa (1975), którzy wykazali znaczne zmniejszenie aktywności peptydazy leucynowej, maltazy i fosfatazy zasadowej w tych odcinkach jelit, w których znajdowały się pasożyty. Po 10 tygodniach inwazji w wątrobach zarażonych owiec następowało wyraźne obniżenie poziomu witaminy A.

Jakkolwiek rola witaminy A w rozwoju procesów immunologicznych została udowodniona (Rzedzicki i Chmielewski, 1976), to jednak dotychczas nie ustalono, czy pobudzenie lub stłumienie reakcji odpornościowych wywiera wpływ na odzyskiwanie witaminy A z przewodu pokarmowego żywicieli zarażanych pasożytami per os. We wcześniej wykonanych badaniach Karmańska i Michalska (1975) stwierdziły, że immunosupresja wywołana podawaniem cyklofosfamidu w przebiegu włósnicy u myszy wyrażała się m. in. także niemal całkowitym brakiem nacieków zapalnych w blaszce właściwej błony śluzowej jelit. To spostrzeżenie uzasadnia celowość tych badań nad wykorzystaniem witaminy A przez organizm myszy zarażonych *T. spiralis*, u których procesy immunologiczne stłumiono przez podawanie cyklofosfamidu lub pobudzono, stosując streptomycynę przed zarażeniem.

Material i metody

Materiał do badań stanowiło 320 myszy (samce) szczepu CFW o wadze 20 g ($\pm 0,9$), w wieku ca 3 miesiące. Zwierzęta na 3 tygodnie przed zarażeniem przenoszono wyłącznie na żywienie przemysłową paszą granulowaną „Murigran” produkcji Biowet, którą otrzymywały przez okres całego doświadczenia.

Sposób uzyskiwania larw mięśniowych, liczenia pasożytów i zarażania zwierząt został opisany wcześniej (Karmańska i wsp. 1977).

Komórki tworzące rozetki z krwinkami opłaszczonymi antygenem włóśniowym wykrywano metodą opisaną przez Płonkę (1974), i zmodyfikowaną przez Machnicką (1976).

Zawartość witaminy A w wątrobie zabijanych myszy oznaczono metodą Ames a i wsp. (1954) w reakcji Carr Price'a.

Podstawowe składniki pokarmowe diety: sucha masa — 91,33%, popiół — 4,3%, białko — 16,94%, tłuszcz — 4,78%, włókno surowe — 1,63%, substancje organiczne — 87,03%, związki bezazotowe wyciągowe — 63,68% oznaczano według powszechnie przyjętych metod.

Na początku doświadczenia w paszach oznaczano: witaminę A według Carr Price'a, beta - karoten — metodą podaną w normie branżowej (BN - 67/9163 - 01, 1967) oraz sumę karotenoidów według Zielińskiej i Czerniewicza (1971). Postępowanie przy oznaczaniu karotenoidów było następujące: odważoną ilość paszy ekstrahowano około 20 godz. mieszaniną acetonu i eteru naftowego (30 ml, 3 : 7). Następnie dodawano 50 ml 10 - procentowego alkoholowego roztworu KOH i 3 ml 10 - procentowego roztworu askorbinianu sodu. Mieszaninę zmydlano około 30 min. chłodzono, sączono przez lejek Buchnera, przemywano eterem etylowym, przenoszono do rozdzielacza, po czym przemywano 8 - 10 - krotnie wodą destylowaną. Frakcję eterową zagęszczano do objętości 30 - 40 ml, przenoszono ilościowo do kolby miarowej 100 ml, uzupełniano rozpuszczalnikiem (aceton, eter naftowy, 1 : 20) i mierzono ekstynkcję przy długości fali 450 nm. Sumę karotenoidów obliczano według wzoru

$$A = \frac{E \times \text{rozcieńczenie} \times 100}{0,25 \times a} \quad [\text{mg/kg}],$$

gdzie E oznacza ekstynkcję, a — nawagę [g].

Zawartość witaminy A wynosiła 2100 $\mu\text{m/kg}$, betakarotenu — 5,3 mg/kg , suma karotenoidów — 19 mg/kg .

W okresie doświadczenia mieszanka była przechowywana w szczelnym opakowaniu w pomieszczeniu zaciemnionym o wyrównanej temperaturze i wilgotności. W połowie doświadczenia oraz w ostatnim tygodniu oznaczano kontrolnie w paszach poziom witaminy A i karotenu.

Przeprowadzone badania składały się z dwóch doświadczeń. W doświadczeniu I użyto 150 myszy, które podzielono na trzy grupy: Ts + C, Ts₁ i C.

Zwierzęta z grupy Ts + C zarażono *T. spiralis* dawką 50 larw/mysz, a następnie między 2 a 30 dniem inwazji podawano dootrzewnowo cyklofosfamid w ilości 10 mg/kg/dobę. Myszy z grupy Ts₁ zostały zarażone tą samą dawką i stanowiły kontrolę przebiegu inwazji. Zwierzęta z grupy C otrzymywały jedynie cyklofosfamid i traktowano je jako kontrolę działania leku.

W doświadczeniu II użyto także 150 myszy, które analogicznie jak w doświadczeniu I podzielono na trzy grupy: Ts + S, Ts₂ i S. Zwierzęta z grupy Ts + S otrzymały cztery dootrzewnowe iniekcje streptomycyny w dawce 33 mg/kg z przerwami 48 godz. W 24 godz. po ostatniej iniekcji myszy zarażano *T. spiralis* w ilości 200 larw/mysz. Myszy z grupy Ts₂ zarażano podobnie jak zwierzęta z grupy Ts + S i uważano za kontrolę inwazji. Mysiom z grupy S podawano jedynie streptomycynę i traktowano je jako kontrolę działania leku.

Po 10 zwierząt z każdej grupy zabijano w 10, 20, 30, 40 i 60 dniu zarażenia, po czym w wątrobach oznaczano poziom witaminy A. U zwierząt z grup: Ts + C, Ts₁, Ts + S i Ts₂ liczono włośnię w jelitach, a z komórkami węzłów limfatycznych krezkowych nastawiano odczyn immuno-cytoadherencyjny.

Bezpośrednio przed rozpoczęciem doświadczenia i tuż po jego zakończeniu sekcjonowano po 10 zdrowych zwierząt w celu ustalenia poziomu witaminy A w wątrobie.

Wyniki

DOŚWIADCZENIE I

1. Witamina A w wątrobie

U myszy zarażonych włośniami (grupa Ts₁) zawartość witaminy A różniła się istotnie między 10 i 20 dniem inwazji oraz między 30 i 40. W pozostałych terminach różnice te były statystycznie nieistotne. Porównanie poszczególnych terminów w grupie C wykazało istotność różnic między 30 i 40 oraz 40 i 60 dniem doświadczenia. W grupie Ts + C wykazano istotność różnic tylko między 40 a 60 dniem po zarażeniu.

W 10, 20, 30 i 40 dniu doświadczenia zawartość witaminy w wątrobie myszy z grupy Ts + C i Ts₁ wykazała istotne różnice. W 60 dniu różnice okazały się nieistotne. Porównanie poziomu witaminy A u myszy w grupach Ts₁ i C wykazało statystyczną istotność tylko w 10 oraz w 40 dniu po zarażeniu (tabl. 1).

TABELA I

Zawartość witaminy A w wątrobach badanych myszy (jm/1g)

TABLE I

Vitamin A content in the livers of the examined mice (iu/1g)

Grupa* Group	Dzień po zarażeniu — Days after infection									
	10		20		30		40		60	
	$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S
Doświadczenie I — Experiment I										
C	1242,8	± 812,4	1385,2	± 572,2	1224,9	± 605,5	1161,6	± 540,3	1609,9	± 1228,2
Ts+C	1511,7	± 917,7	1353,4	± 1046,6	1230,5	± 518,9	1432,1	± 678,8	1818,1	± 723,8
Ts	1144,2	± 971,3	865,4	± 335,4	818,9	± 263,7	1805,6	± 1016,4	1822,1	± 509,1
Doświadczenie II — Experiment II										
S	1542,4	± 307,2	1855,0	± 290,7	1977,0	± 427,4	2177,1	± 589,2	2482,0	± 421,4
Ts+S	1624,1	± 590,7	1218,1	± 270,9	1473,0	± 385,1	1609,0	± 584,2	2129,0	± 489,9
Ts	1259,6	± 631,8	1016,0	± 841,1	1018,2	± 659,0	1627,8	± 649,1	1617,7	± 726,1

Poziom wit. A u myszy bezpośrednio przed rozpoczęciem doświadczenia wynosił 1225,5 jm/1g ± 654,3

Vit. A level in mice immediately before the experiment was 1225.5 iu/1g ± 654.3

Poziom wit. A u myszy bezpośrednio po zakończeniu doświadczenia (60 dnia) wyniósł 1877,1 jm/1g ± 879,6

Vit. A level in mice immediately after the experiment (on 60 day) was 1877.1 iu/1g ± 879.6

* C — zwierzęta, którym podawano cyklofosfamid

C — animals treated with cyclophosphamide

S — zwierzęta, którym podawano streptomycynę

S — animals treated with streptomycin

Ts — zwierzęta tylko zarażone

Ts — animals only infected

Ts+C — zwierzęta zarażone, którym podawano cyklofosfamid

Ts+C — infected animals, treated with cyclophosphamide

Ts+S — zwierzęta zarażone, którym podawano streptomycynę

Ts+S — infected animals, treated with streptomycin

2. Odczyn immunocytoadherencyjny

Średnią ilość komórek tworzących rozetki z krwinkami opłaszczonymi antygenem *T. spiralis* w kolejnych badaniach przedstawiono w tabeli 2.

TABELA 2

Procent komórek tworzących rozetki

TABLE 2

Percentage of rosette-forming cells

Grupa Group	Dzień po zarażeniu — Days after infection									
	10		20		30		40		60	
	$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S
Doświadczenie I — Experiment I										
Ts+C Ts	1,8	1,0	3,5	1,0	1,5	0,9	1,2	0,9	1,2	0,3
	5,0	1,1	9,8	0,9	8,8	1,1	3,1	0,7	0,7	0,1
Doświadczenie II — Experiment II										
Ts+C Ts	6,0	1,2	13,5	1,5	12,1	1,4	9,0	1,5	1,1	0,7
	5,0	1,2	8,0	1,1	8,2	1,3	4,3	1,0	1,2	0,7

Oznaczenie jak w tab. 1

Explanations as in tab. 1

3. Pasożyty w jelicie

U zwierząt stanowiących kontrolę zarażenia (Ts_1) średnia ilość pasożytów dorosłych w 10 dniu inwazji wynosiła 17,4, w 20 dniu natomiast 5,3. Od 30 dnia obserwacji włośni w jelitach nie stwierdzano.

U myszy traktowanych cyklofosfamidem ($Ts + C$) średnia liczba pasożytów w 10 dniu inwazji wynosiła 38,4, w 20 dniu — 17,4, w 30 dniu — 1,3 a w 40 dniu — 0,3. W 60 dniu po zarażeniu włośni dorosłych nie znaleziono.

DOŚWIADCZENIE II

1. Witamina A w wątrobie

Jak wynika z tabeli 1 średnie poziomu witaminy A w wątrobie myszy z grupy S i $Ts + S$ różniły się statystycznie istotnie tylko w 20 dniu doświadczenia.

2. Odczyn immunocytoadherencyjny

Tabela 2 przedstawia średnią ilość komórek tworzących rozetki w odczynie immunocytoadherencyjnym w kolejnych dniach po zarażeniu.

3. Pasożyty w jelicie

U zwierząt zarażonych lecz nie traktowanych streptomycyną (Ts_2) średnia ilość pasożytów w jelitach w 10 dniu po zarażeniu dochodziła do 97,3 zaś w 20 dniu — 24,4. W dalszych badaniach włośni dorosłych nie znaleziono.

U myszy, którym przed zarażeniem podano streptomycynę ($Ts + S$) średnia liczba pasożytów w 10 dniu inwazji wynosiła 89,9, w 20 dniu — 4,2; następnie, aż do końca obserwacji pasożytów nie stwierdzano.

Dyskusja

Z przeprowadzonych badań wynika, że w przebiegu zarażenia myszy *T. spiralis* występuje obniżenie poziomu witaminy A w wątrobie (tab. 1). Podobny obraz poziomu witaminy A w przebiegu inwazji *Ascaris lumbricoides* u dzieci obserwowali Sivakumer i Reddy (1975) stwierdzając, że absorpcja witaminy spadała o około 19% w porównaniu do dzieci zdrowych.

W naszych badaniach gorsze magazynowanie witaminy A u myszy zarażonych *T. spiralis* (grupy: Ts_1 i Ts_2) utrzymywało się aż do 30 dnia po zarażeniu, mimo że w obu doświadczeniach po 20 dniu inwazji nie stwierdzono już pasożytów w jelitach. Wydaje się, że utrudnioną absorpcję witaminy A w 30 dniu zarażenia należy łączyć ze zmianami histopatologicznymi w błaszcze właściwej błony śluzowej jelit, bowiem, jak wiadomo, nacieki zapalne, spowodowane obecnością włośni, cofają się stopniowo, a więc obserwuje się je jeszcze przez pewien okres po usunięciu pasożytów. Natomiast w grupie zwierząt traktowanych cyklofosfamidem obserwowano mniejszy niż w kontroli spadek zawartości witaminy A w wątrobie. Można przypuszczać, że ten słabszy spadek poziomu witaminy A u zwierząt, u których procesy immunologiczne stłumiono cyklofosfamidem, jest następstwem bardzo małych zmian w błonie śluzowej jelit. Z wcześniejszej pracy Karmańskiej i Michalskiej (1975) wynika, że cyklofosfamid w dawce 10 mg/kg, stosowany u myszy między 2 - 25 dniem po zarażeniu *T. spiralis*, hamuje niemal całkowicie (z wyjątkiem komórek tucznych) powstawanie nacieku zapalnego, występującego zwykle w jelitowej fazie włośnicy. Dłuższe przeżywanie włośni w jelitach zwierząt traktowanych cyklofosfamidem autorki łączą ze znacznie słabszą mobilizacją komórek tucznych w tym narządzie.

W przeciwieństwie do cyklofosfamidu, podawanie myszom streptomycyny przed wprowadzeniem antygeny wpływa na przyspieszenie i wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej, wyrażającej się wyższym poziomem komórek wytwarzających przeciwciała (Zimecki i Wieczorek, 1974). Długiewicz - Bulla (1978) obserwowała znacznie więcej komórek tworzących rozetki w teście immunocytoadherencyjnym oraz szybsze usuwanie włosni dorosłych u myszy, którym przed zarażeniem podawała streptomycynę. W tej pracy również uzyskaliśmy wzmocnienie odporności humoralnej, o czym świadczy wyższy niż w kontroli poziom komórek rozetkujących z krwinkami opłaszczonymi antygenem *T. spiralis*. Ilość komórek tworzących rozetki przez cały okres obserwacji była wyższa niż w kontroli. Równocześnie u zwierząt tych stwierdzano najlepsze magazynowanie witaminy A. Wydaje się zatem, że silniejsza obrona organizmu łączy się z lepszym odzyskiwaniem witaminy. Jednak biorąc pod uwagę wyniki otrzymane w grupie S, można również przypuszczać, że sama streptomycyna ma właściwości ułatwiające wchłanianie witaminy A. Aby wyjaśnić to zagadnienie, potrzebne są dalsze badania.

Otrzymano: 25 I 1977

Adres autorów:

50 - 375 Wrocław, C. Norwida 29

LITERATURA

1. Ames, S., Risley, H., Harris, P.: Simplified procedure of extraction and determination of vitamin A in liver. — *Analyt. Chem.*, 26, 1378 - 1382, 1954.
2. Coop, R., Angus, K.: The effect of continuous doses of *Trichostrongylus colubriformis* larvae on the intestinal mucosa of sheep and on liver vitamin A concentration. — *Parasitol.*, 70, 1 - 9, 1975.
3. Długiewicz - Bulla, M.: The influence of small doses of streptomycin on the course of experimental trichinellosis in mice. — *Wiad. Parazytol.*, 24, 5: 519 - 537, 1978.
4. Karmańska, K., Grabiński, J., Piotrowski, R., Michalska, Z.: The influence of X-irradiation on immune phenomena in the course of experimental trichinellosis in mice. — *Wiad. Parazytol.*, 23, 699 - 710, 1977.
5. Karmańska, K., Michalska, Z.: Influence of immunosuppressors (cyclophosphamide and azatioprine) on mast cells in experimental trichinellosis of mice. — *Wiad. Parazytol.*, 21, 649 - 662, 1975.
6. Machnicka, B.: The dynamics of antigen binding lymphocytes tested by the rosetts — forming cell (RFC) technique in mice infected with *Trichinella spiralis*. — *Acta parasitol. pol.*, 24, 335 - 343, 1976.

7. Markiewicz, K.: Witaminy w układzie żywiciel-pasożyt w przebiegu inwazji robaków pasożytniczych u zwierząt. — *Wiad. Parazytol.*, 9, 193 - 200, 1963.
8. Piusiński, W.: Zmiany histochemiczne z uwzględnieniem patoformologii w wątrobie królików zakażonych doświadczalnie kokcydiozą (*E. stiedae*). — *Zesz. Nauk. AR w Warszawie*, 48, 1 - 123, 1975.
9. Płonka, W.: Immunocytoadherence test for the detection of cellular immune response against *Trichinella spiralis* antigen, in „Trichinellosis”: — Ed. Ch. Kim. 1974, T. Y. Crowell Company, Inc. New York, pp. 255 - 258, 1974.
10. Rzedzicki, J., Chmielewski, W.: Rola witaminy A w kształtowaniu odporności u zwierząt. *Medycyna Wet.*, 32, 594 - 597, 1976.
11. Sivakumar, B., Reddy, V.: Absorption of vitamin A in children with Ascariasis. — *J. Trop. Med. Hyg.*, 78, 114 - 115, 1975.
12. Zielińska, K., Czerniewicz, J.: Central. Lab. Przemysłu Roln. Warszawa 1971 (materiały nie publikowane).
13. Zimecki, M., Wieczorek, Z.: Modification of the immunologic response. I. The effect of streptomycin on the humoral immunologic response in guinea pigs and mice. — *Arch. Immun. Ther.*, 22, 277 - 287, 1974.

THE EFFECT OF CYCLOPHOSPHAMIDE AND STREPTOMYCIN ON THE LEVEL OF VITAMIN A IN THE LIVERS OF MICE INFECTED WITH *TRICHINELLA SPIRALIS*

by

L. WARTENBERG, B. TRĘBUSIEWICZ and K. KARMAŃSKA

The authors studied the effect of the inhibition or stimulation of immunological reactions on vitamin A storage in the livers of mice infected with *T. spiralis*. It was found in the animals whose immunity processes were suppressed by cyclophosphamide that the carotins of the diet were almost totally used. The authors associate better conditions for vitamin A recorption from the alimentary canal to blood circulation and the increase in the quantity of the accumulated vitamin with the lack of inflammatory reaction in the mucosa of intestines. On the contrary, in the organisms of the infected animals yet not treated with cyclophosphamide, the level of vitamin A distinctly dropped, most probably because of inflammatory transformations taking place in the intestine as the result of parasite invasion.

In the livers of mice that were given streptomycin, a higher level of vitamin A was found than in the control animals. The interpretation of this observation is difficult and needs further investigations.