

IMMUNOSTIMULATORY ACTIVITY OF THE VACCINE USED IN THE TREATMENT OF RECURRENT URINARY INFECTIONS. I.

KOUKALOVA D, KROCOVA Z, VITEK P, MACELA A, HAJEK V

IMUNOSTIMULAČNÍ AKTIVITA VAKCÍNY PRO LÉČBU RECIDIVUJÍCÍCH UROINFEKČÍ. I.

Abstract

Koukalova D, Krocova Z, Vitek P, Macela A, Hajek V:
Immunostimulatory Activity of the Vaccine Used in the Treatment of Recurrent Urinary Infections. I.
 Bratisl Lek Listy 1999; 100 (3): 129–134

The authors inform about the immunomodulatory properties of the vaccine URVAKOL aimed for the treatment of recidivating urinary infections. The results of immunostimulatory activity of the preparation and its effects on cellular and humoral immunity in mice following intraperitoneal administration of the vaccine are presented. The vaccine markedly increases cytotoxic activity of adhering peritoneal cells and has protective effects in model infection induced by intracellular pathogen *Francisella tularensis* (strain 15 L). (Tab. 6, Fig. 6, Ref. 9.)
Key words: recurrent urinary infections, vaccine URVAKOL, intraperitoneal administration, immunomodulatory effect.

V práci jsou předloženy výsledky testování polybakteriální vakcíny URVAKOL připravené pracovníky Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty UP v Olomouci. Při hodnocení imunomodulačních vlastností preparátu bylo použito metody testování podle včestupňového schématu Macely a spol. (1990) a metod zveřejněných dalšími autory (Hofstaetter a spol., 1981; Procházková a spol., 1986; Šterzl a spol., 1966).

V první variantě — intraperitoneální podání — byly hodnoceny vlivy preparátu na aktivitu myších přirozených zabíječských buněk (NK), lymfoproliferativní reakce slezinných buněk na polyklonální mitogeny konkanavalin A (ConA) a lipopolysacharid (LPS), cytotoxickou aktivitu adhezujících peritoneálních buněk, vliv preparátu v kostimulačním testu in vitro a na reduktázovou aktivitu adhezujících peritoneálních buněk. Dále byl sledován jeho účinek na množství buněk produkujících IgM a IgG. Posuzován byl rovněž vliv vakcíny na přežívání myši při jejich subkutánní infekční zátěži, reakci pozdní přecitlivělosti (DTH) a tvorbu protilátek proti dané infekci.

Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc, Institute of Immunology, VLA J.E. Purkyne, Hradec Kralove
Address for correspondence: D. Koukalova, MD, PhD, Institute of Microbiology, Hnevotinska 3, CZ-775 15 Olomouc, Czech Republic
 Phone: +420.68.5632409, Internet: koukal@risc.upol.cz

Abstrakt

Koukalová D., Kročová Z., Vitek P., Macela A., Hájek V.:
Imunostimulační aktivita vakcíny pro léčbu recidivujících uroinfekcí. I.
 Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 3, s. 129–134

Autoři referují o imunomodulačních vlastnostech vakcíny URVAKOL určené k léčbě recidivujících uroinfekcí. Popisují výsledky vyšetření imunostimulační aktivity přípravku a ovlivnění humorální i buněčné složky imunitního systému myši po jeho intraperitoneálním podání. Vakcína silně zvyšuje cytotoxickou aktivitu adhezujících peritoneálních buněk a působí protektivně při modelové infekci intracelulárním patogenem *Francisella tularensis* (kmen 15 L). (Tab. 6, obr. 6, lit. 9.)

Klíčová slova: recidivující uroinfekce, vakcína URVAKOL, intraperitoneální podání, imunomodulační účinek.

Materiál a metody

K pokusům byly používány inbrední myši C3H/DiSn z chovu střediska biomodelů ČSAV Koleč. Na každý interval byly použity 3 myši — samice o hmotnosti 20–25 g. Myši byly krmeny standardní dietou DOS 2b (Velaz, Lysá nad Labem). Potrava a voda podávány ad libitum. Aklimatizace zvířat na podmínky laboratoře byla 10 dnů. Pro účely některých biologických testů byly připravovány z orgánů pokusných zvířat buněčné kultury. Pokusy se zvířaty probíhaly v podmínkách, které odpovídaly zákonu 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a byly schváleny etickou komisí LF UP.

Použité infekční agens, *Francisella tularensis* kmen 15 L (vakcinační kmen), bylo udržováno pasážemi na myších ICR. Před experimentem byla provedena jeho subpasáž na thioglykolátové agarové půdě s 5 % králičí krve. Infekční agens bylo podáváno pokusným zvířatům do levé zadní nohy subkutánně, v dávce 46 CFU (colony forming units) v 0,1 ml fosfátem pufovaného fyziologického roztoku (PBS) na myš.

Ústav mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Ústav imunologie Vojenské lékařské akademie J.E. Purkyně v Hradci Králové

Adresa: MUDr. D. Koukalová, CSc., Ústav mikrobiologie LF UP, Hnevotinská 3, 775 15 Olomouc, Česká republika.

Lyofilizovaný bakteriální preparát URVAKOL byl naředěn do koncentrace 1 mg/0,5 ml PBS (Koukalová, 1996). Myším byl podáván jednorazově v dávce 0,5 ml intraperitoneálně.

Chemikálie

Byly použity glutamin (Sevac, Praha), gentamicin (Pharmachim, Bulharsko), neesenciální aminokyseliny (Sevac, Praha), mercaptoethanol (Fluka), pyrohroznán sodný (Lachema, Brno), HEPES (Park Sci. Ltd., Northampton), fetal calf serum (FCS), RPMI-1640 (Sebak, Německo), korpuskulární antigen *Francisella tularensis* Ag2 (Sevac, Praha) na stanovení specifických protilátek ELISA testem, Muellerovy—Hintonovy pevné půdy (Difco), 0,1 % roztok želatiny v PBS (Těchonín podle SOP:ÚGN.09) obsahující 0,02 % azidu sodného (Lachema, Brno), 0,2 % Triton X-100 (Koch-Light) v PBS, SwAM/Px (Sevac, Praha) v 5 % roztoku bovinního albuminu (Ivanovice na Hané) v PBS bez azidu, roztok orthophenylendiaminu (Loba) v Mc Ilvainově pufru (Těchonín), peroxid vodíku (Lachema, Brno), veronalový pufr (Sevac, Praha), lidský albumin (Imuna, Šarišské Michalany), Agarose indubiose A37 (France), SwAM/G-RIA (Sevac, Praha), lipopolysacharid z *E. coli* 055:B5 (Sigma), Concanavalin A (Pharmacia), scintilační roztok SLT 41 (Spolana, Neratovice), ³H-thymidin (ÚVVVR Praha), izotop chromu ⁵¹Cr (Amersham CJS 4), 1 % roztok Ajatinu, 0,5 % roztok Persterilu, ether a živý kmen *Francisella tularensis* kmen 15 L.

Cytotoxická aktivita adhezujících peritoneálních buněk

Myším byl preparát aplikován intraperitoneálně v intervalech 21, 14, 11, 7, 5, 3, 2 a 1 den před pokusem. Kontrolní skupině byl podán PBS stejného objemu a ve stejných intervalech jako preparát. Za 24 h po poslední dávce byl proveden peritoneální výplach chlazeným PBS a suspenze peritoneálních buněk naředěna na koncentraci 2×10^6 buněk na 1 ml kultivačního média. Buňky (0,2 ml/jamku) byly inkubovány v panelu s 96 jamkami (Nunclon) 3 h při 37 °C, v atmosféře s 5 % CO₂. Po adhezenci makrofágů byly jamky několikanásobně promyty (promývací médium — RPMI 1640, glutamin, gentamicin) a pak přidány cílové myší mastocytární buňky (P 815) značené ⁵¹Cr (0,1 ml/jamku, koncentrace $2 \cdot 10^5$ buněk/ml média) [kultivační médium — RPMI 1640, 10 % prekolostální telecí sérum, inaktivované (PTSI), glutamin, gentamicin, neesenciální aminokyseliny (NEA), pyrohroznán sodný, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N-(-etanesulfonic acid)]. Po 20 hodinách inkubace při 37 °C, v atmosféře s 5 % CO₂, bylo odebráno médium nad adhezovanými buňkami a proměřeno na gama scintilačním automatu (Procházková a spol., 1986).

Aktivita NK buněk

Myším byl intraperitoneálně aplikován testovaný preparát v dávce 0,5 ml v intervalech 14, 11, 7, 5, 3, 2, a 1 den před pokusem. Kontrolní skupině zvířat byl stejným způsobem podán PBS.

V den pokusu byly utraceným myším vyjmuty sleziny. Suspenze slezinných buněk byly připraveny protlačeníím slezín přes sterilní sítko a trojnásobným promytím (promývací médium — M 199, glutamin, gentamicin, NaHCO₃). Po upravení koncentrace suspenzí ($1 \cdot 10^7$ buněk/ml) kultivačním médiem (kultivační médium — M 199, 10 % PTSI, glutamin, gentamicin, NEA, NaHCO₃) byly napipetovány po 0,1 ml do jamek panelu (Nunclon). Dále byly přidány cílové buňky značené ⁵¹Cr, adhezující myší lymfob-

lasty (YAC-1) i neadhezující lidské lymfoblasty (K562), v koncentraci $1 \cdot 10^4$ buněk/ml média a množství 0,1 ml/jamku. Po 5 hodinách inkubace při 37 °C, v atmosféře s 5 % CO₂, byl odebrán supernatant a změřen na gamascintilačním automatu. Ze zjištěných hodnot bylo stanoveno procento specificky uvolněného ⁵¹Cr jako míra aktivity NK buněk (Brunner a spol., 1968).

Neadhezující cílové buňky byly používány jako další kontrola metody.

Blastická transformace

Myším byl intraperitoneálně aplikován testovaný preparát v dávce 0,5 ml, kontrolním myším PBS, v intervalech 14, 11, 7, 5, 3, 2 a 1 den před pokusem. V den pokusu byla zvířata usmrce-na chloroformovými parami a sterilně odebrány sleziny.

Buňky byly promyty (promývací médium — RPMI 1640, glutamin, gentamicin, NaHCO₃) a naředěny kultivačním médiem (kultivační médium — RPMI 1640, 5 % PTSI, glutamin, gentamicin, NaHCO₃) na koncentraci $4 \cdot 10^6$ buněk/ml. K 0,2 ml této suspenze v jamkách panelu (Nunclon) bylo přidáno 50 μl mitogenů v optimální koncentraci (výsledná koncentrace v jamce — Con A 5 μg/ml, LPS 20 μg/ml). Buňky s mitogeny byly inkubovány 67 hodin při 37 °C. Poté byl přidán tritiem značený thymidin (1 μCi/jamku) a inkubace probíhala po dobu 5 hodin při 37 °C, v atmosféře s 5 % CO₂. Po jejím ukončení byly buňky harvestovány na “glass fiber” filter, usušeny a vloženy do scintilačního roztoku SLT 41. Vzorky byly proměřeny na β-počítači 1219 Rackbeta (LKB) (Ling a spol., 1975).

Transformační index byl stanoven jako poměr “count per million” (CPM) mezi jamkami s mitogeny a kontrolními jamkami s médiem.

Kostimulační test

K testu byla použita suspenze slezinných buněk z neovlivněných myší, která byla po promytí naředěna kultivačním médiem (viz test blastické transformace) na koncentraci $4 \cdot 10^6$ buněk/ml a napipetována po 0,2 ml do jamek panelu (Nunclon). Současně byly přidány mitogeny a testovaný preparát. Mitogeny byly přidány v optimální koncentraci (Con A 5 μg/ml a LPS 20 μg/ml/jamku) i v suboptimální koncentraci (Con A i LPS 0,32 μg/ml/jamku). Výchozí koncentrace preparátu byla 2,5 mg/ml (1 mg/jamku). Dále byl postup stejný jako u blastické transformace.

INT reduktázová aktivita

Myším byl podán intraperitoneálně testovaný preparát v intervalech 28, 21, 14, 10, 7, 5, 3, 2, a 1 den před pokusem. Kontrolní skupině byl aplikován PBS o stejném objemu jako preparát.

Pro stanovení INT [3-(4-jodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chlorid] reduktázové aktivity myších peritoneálních buněk byly použity výplachy břišních dutin vychlazeným PBS s heparinem. Makrofágy (MF) byly promyty, byla upravena jejich koncentrace ($1 \cdot 10^6$ /ml), napipetovány v množství 0,2 ml do jamek panelu (Nunclon) a inkubovány 2 h při 37 °C. Následovalo dvojnásobné promytí teplým médiem a přidání 0,1 ml PBS, 40 μl 0,1 % INT, 10 μl zymosan (10 mg/ml) nebo 10 μl PBS. Po 120minutové inkubaci při 37 °C, v atmosféře s 5 % CO₂, následovala centrifugace 2000 rpm po dobu 10 min při 4 °C. Po odsátí supernatantu bylo do každé jamky přidáno 150 μl koncentrovaného dimethylsulfoxidu. Inkubace probíhala za občasného třepání 30

min při 22 °C. Po další centrifugaci (2000 rpm, 10 min při 22 °C) bylo odebráno 100 µl supernatantu z každé jamky a změřena absorbance (A) na Elisa readeru při vlnové délce 460 nm. Pro myši, kterým byl podán preparát, i pro kontrolu platí:

Index metabolického vzplanutí = $A(\text{MF} + \text{zymozan}) - A(\text{MF} + \text{PBS})$.

Jerneho plaky

Vyšetřovaný preparát byl myším aplikován opět ve stejných koncentracích, množstvích a časových intervalech jako v ostatních pokusech. Kontrolním myším byl podán PBS ve shodném objemu. Za 24 h po posledním podání vakcíny byly myši imunizovány beranými erytrocyty ($5 \cdot 10^8$ buněk/ml PBS po 0,2 ml intravenózně). Po 4 a 10 dnech byly potenciálně produkční buňky izolovány ze slezin utracených myši. Suspenze slezinných buněk o koncentraci $4 \cdot 10^7$ buněk/ml PBS byla rozpipetována po 0,3 ml do zkumavek. Po přidání 0,6 ml směsi agarózy a beraních erytrocytů v poměru 3:1 byl obsah zkumavek nakapán na Petriho misky tak, aby se kapky nepřekrývaly. Po jejich ztuhnutí a dvouhodinové inkubaci při 37 °C byly překapány vysyceným morčecím komplementem, ředěným 1:10 PBS. Následovala inkubace 1 h při 37 °C a hodnocení. Byly počítány "přímé" plaky (počet IgM produkujících buněk) a proveden jejich přepočten na 10^8 slezinných buněk.

Po 10 dnech od imunizace myši beranými erytrocyty byly stejným způsobem provedeny plaky přímé. Po jejich odečtení byl odstraněn komplement veronalovým pufrem. Vyšetřované kapky byly dále překapány antiimmunoglobulinovým sérem (SWAM/GRIA ÚSOL, Praha) a inkubovány 45 min při 4 °C. Po opláchnutí veronalovým pufrem a překapání morčecím komplementem následovala inkubace 30 min při 37 °C a odečítání "nepřímých" plaků (počet IgG produkujících buněk) (Lochman a spol., 1984).

Procento přežití a střední den úhynu

V dalším pokusu bylo sledováno procento přežití a střední den úhynu v kontrolní a pokusné skupině. V každé skupině bylo 15 myši. Preparát byl myším podán intraperitoneálně 7, 3 a 1 den před subkutánní infekcí druhem *Francisella tularensis* (kmen 15 L), dále těsně před infekcí (1 h) a 1 den po infekci. Úhyn myši po aplikaci infekčního agens byl sledován 21 dní. Kontrolní skupina nebyla imunostimulačně ovlivněná.

Významnost rozdílů mezi počtem zvířat, která přežila v imunostimulované a kontrolní skupině byla hodnocena podle Dunna (1964). Tato metoda hodnotí při srovnávání skupin nejen celkový počet uhynulých zvířat, ale také postup letality.

Reakce pozdní přecitlivělosti

Vyšetřovaný preparát byl myším podán intraperitoneálně 7, 3 a 1 den před subkutánní infekcí kmenem 15 L *Francisella tularensis*, dále byl aplikován těsně před infekcí (1 h) a 1 den po infekci.

Pokusným zvířatům byl 14 dní po aplikaci infekce injikován intrakutánně korpuskulární franciselový antigen, ředěný 1:10 PBS, 50 µl do levé zadní tlapy. Do druhé zadní tlapy byl podán ve stejném množství PBS. Měřena byla výška otoku v mm po 4, 24 a 48 hodinách. Výsledkem byl rozdíl mezi otokem obou tlapek. Kontrolní skupina nebyla imunostimulačně ovlivněná. Pro každý pokusný interval bylo použito tři myši.

Stanovení specifických protilátek

Vyšetření protilátek proti *Francisella tularensis* bylo provedeno u myši použitých v pokusu stanovujícím jejich přežití a střední den úhynu.

Specifické protilátky byly stanoveny mikrometodou přímé aglutinace v 96jamkovém panelu (Nunclon). 50 µl testovaného séra bylo naředěno PBS dvojkovou řadou. Do takto naředěných jamek bylo přidáno 50 µl korpuskulárního antigenu *Francisella tularensis* v doporučeném optimálním ředění. Obsah jamek byl promíchán třepáním. Panel byl inkubován 2 h při 37 °C a potom 20 h při 22 °C. Jako aglutinační titr byla posuzována reciproká hodnota ředění séra, ve kterém ještě docházelo k aglutinaci.

Souběžně byly stanoveny protilátky metodou Elisa. Do 96jamkového panelu (Nunclon) bylo nakapáno 100 µl antigenu *Francisella tularensis*, ředěného 1:10 PBS. Po 2h inkubaci při 37 °C a promytí PBS bylo přidáno 150 µl 0,1 % želatiny, která se ponechala vyvázat 1 h při 22 °C. Následovalo promytí s PBS a nanesení 100 µl naředěných vzorků testovaných sér (1:10 až 20 480). Inkubace probíhala 1 h při 22 °C. Po dalším promytí (PBS, 0,2 % Tritonem X-100 a znovu PBS) bylo naneseo 100 µl SwAM/Px (ředěného 1:1000 v bovinním sérovém albuminu bez azidu) a následovala inkubace 30 min při 22 °C. Na další promytí stejným způsobem navázalo nakapání 100 µl substrátového roztoku — orthophenyldiaminu (1 min v temnu). Reakce byla zastavena 100 µl H_2SO_4 2 mol.l⁻¹. Extince byla hodnocena na Elisa readeru při 490 nm. Po sestrojenní titrační křivky byl stanoven titr protilátek (ředění, ve kterém byla hodnota absorbance nejbližší normálnímu myšimu séru).

Výsledky

Cytotoxická aktivita adheřujících peritoneálních buněk

Ze zjištěných hodnot bylo stanoveno procento specificky uvolněného ⁵¹Cr jako míra nespecifické cytotoxické aktivity makrofágů (v tabulkách je vyjádřena procentem kontrolních hodnot). Časová závislost je uvedena na obrázku 1. Ze získaných výsledků vyplývá, že podání preparátu zvyšuje nespecifickou aktivitu cytotoxických makrofágů, která je trvale zvýšena od pátého dne a přetrvává až do 21. dne.

Pro stanovení dávkové závislosti bylo zvoleno podání preparátu 7. den před pokusem, kdy je zvýšení cytotoxické aktivity makrofágů stabilní. Vliv koncentrace preparátu na cytotoxickou aktivitu makrofágů je znázorněn v tabulce 1. Z tabulky 1 vyplývá, že účinek preparátu až do stonásobného zředění klesá velmi zvolna. Dávka menší než 0,01 mg cytotoxickou aktivitu makrofágů již nestimuluje.

Aktivita NK-buněk

Výsledky reprezentativního pokusu jsou uvedeny na obrázku 2. Neadheřující cíle byly používány jako negativní kontrola metody, kdy aktivita NK-buněk byla minimální nebo nulová.

Z obrázku 2 je patrné, že preparát neovlivnil aktivitu NK-buněk. Pouze 24 h po podání preparátu byla opakovaně zaznamenána jejich mírně zvýšená aktivita.

Blastická transformace

Ovlivnění proliferace slezinných buněk dobou, kdy byl preparát podán myším *in vivo* před provedeným testem blastické transformace, je znázorněno na obrázku 3.

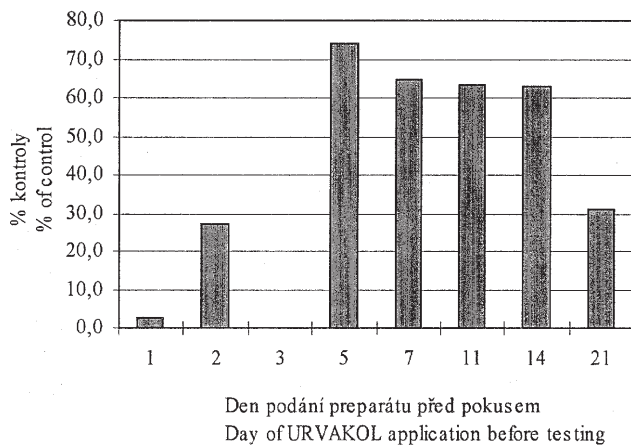


Fig. 1. Time-dependency of macrophage cytotoxicity in the preparation.
Obr. 1. Časová závislost cytotoxicity makrofágů na preparátu.

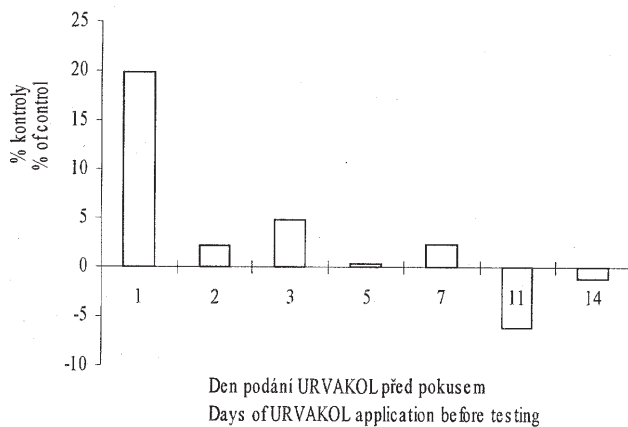


Fig. 2. Influence of the preparation URVAKOL on NK-cells activity.
Obr. 2. Vliv preparátu URVAKOL na aktivitu NK-buněk.

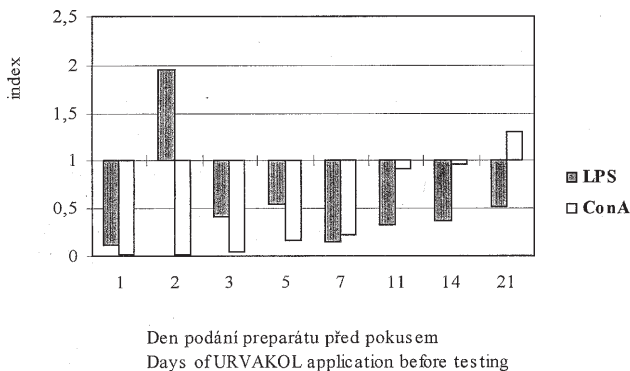


Fig. 3. Test of blast transformation after stimulation with polyclonal mitogens ConA and LPS. Results are expressed with the index of animals to controls ratio.

Obr. 3. Test blastické transformace po stimulaci polyklonálními mitogeny ConA a LPS. Výsledky jsou vyjádřeny indexem poměru vakcinovaných zvířat ke kontrolním.

Tab. 1. Influence of preparation concentration on the cytotoxicity of macrophages.

Tab. 1. Vliv koncentrace preparátu na cytotoxicitu makrofágů.

Dose of preparation mg/mouse	% of control
Dávka preparátu mg/myš	% kontroly
1	57,6
0,1	46,9
0,01	36,8
0,001	8,2

Tab. 2. Influence of preparation concentration on thymidine incorporation.

Tab. 2. Vliv koncentrace preparátu na inkorporaci thymidinu.

Dose of preparation mg/mouse	Ti LPS	Ti ConA
Dávka preparátu mg/myš	LPS	ConA
1	4,67	8,22
0,1	4,93	32,56
0,01	9,00	42,86
0,001	8,03	30,72
kontrola	11,92	50,19

Ti — transformation index

Ti — transformační index

Intraperitoneální podání tlumí lymfoproliferativní odpověď slezinných buněk na polyklonální mitogen LPS, s výjimkou podání 48 h před pokusem, kdy dochází k téměř dvojnásobné aktivitě proti kontrolním myším. U ConA dochází zpočátku k velmi silnému útlumu lymfoproliferativní odpovědi, avšak od 10. dne je tato odpověď srovnatelná s kontrolními zvířaty a 21. den je mírně zvýšená. Pro stanovení dávkové závislosti bylo zvoleno podání preparátu sedmý den před pokusem. Koncentrace preparátu ovlivnila inkorporaci ³H-thymidinu do myších slezinných buněk; tato závislost je uvedena v tabulce 2.

Preparát výrazně tlumil lymfoproliferativní odpověď v koncentraci 1 mg/myš při testu s mitogenem ConA, v nižších koncentracích vyvolával útlum o cca 40 %. Útlum kolem 60 % byl pozorován u testu s LPS v koncentracích preparátu 1 a 0,1 mg na myš.

Kostimulační test

Přepočtené výsledky na Ti udává tabulka 3. Z tabulky vyplývá, že při optimálních koncentracích mitogenů preparát potlačuje jejich aktivitu (kromě 10x ředěného). V suboptimálních dávkách mitogenu dochází při 10násobném ředění preparátu k silné stimulaci mitogenní aktivity a podobně stimuluje mitogenní aktivitu při tomto ředění samotný preparát.

INT reduktázová aktivita

Index metabolického vzplanutí (IMV) je uveden na obrázku 4. Koncentrační závislost po 7. den je uvedena v tabulce 4.

Tab. 3. Influence of preparation concentration on mitogenic activity.
Tab. 3. Vliv koncentrace preparátu na mitogenní aktivitu.

Preparation dilution Ředění preparátu	Ti of preparation without mitogen Ti preparátu bez mitogenu	optimal concentration optimální konc.		suboptimal concentration suboptimální konc.	
		Ti LPS	Ti ConA	Ti LPS	Ti ConA
1 x	0,13	0,02	0,00	0,12	0,04
10 x	8,96	2,44	1,73	11,53	7,35
100 x	1,81	0,91	1,06	2,89	1,43
1 000 x	1,00	0,85	0,93	0,97	0,97
10 000 x	0,91	0,94	0,80	1,16	1,02
100 000 x	1,03	0,96	0,83	1,12	1,23

Tab. 4. Concentration dependency for the day 7.
Tab. 4. Koncentrační závislost pro 7. den.

Preparation dose mg/mouse Dávka preparátu mg/myš	IMV
1	0,0714
0,1	0,0866
0,01	0,1038
0,001	0,1004
control kontrola	0,0864

Tab. 5. Effect of URVAKOL on DTH.
Tab. 5. Vliv preparátu na DTH.

Day Den	4 h	24 h	48 h
-7	0,42	0,40	0,32
-3	0,35	0,50	0,35
-1	0,53	0,50	0,32
0	0,47	0,52	0,42
1	0,53	0,53	0,27
control kontrola	0,63	0,58	0,33

Je zřejmé, že reduktázová aktivita peritoneálních makrofágů myši stimulovaných preparátem je vyšší než u kontrolních zvířat. Druhý den však hodnota klesá, maximum rozdílu je 3.—5. den. Po 10. dnu stimulace preparátem již není výrazná.

Index metabolického vzplanutí byl nejvyšší u stonásobně ředěné dávky — 0,01 mg/myš.

Jerneho plaky

Výsledky uvedené na obrázku 5 jsou přepočteny na 10^8 buněk. Lze konstatovat, že 3. den po intraperitoneálním podání preparátu kleslo množství buněk produkujících IgM na přibližně 50 % hodnotu proti kontrole s PBS. Sedmý den po podání preparátu poklesl počet buněk produkujících IgG, buňky produkující IgM již zůstaly neovlivněny.

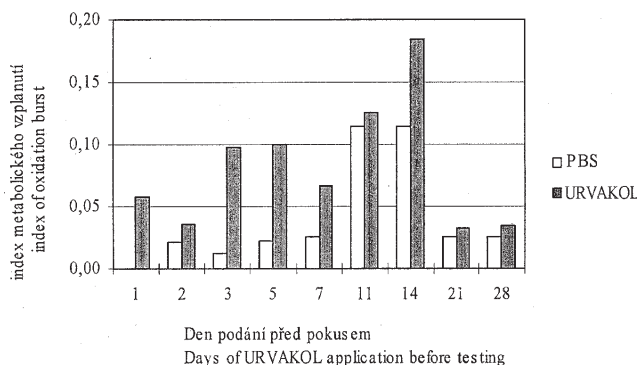


Fig. 4. INT reductive activity expressed as the index of metabolic activation.

Obr. 4. INT reduktázová aktivita vyjádřená indexem metabolického vzplanutí.

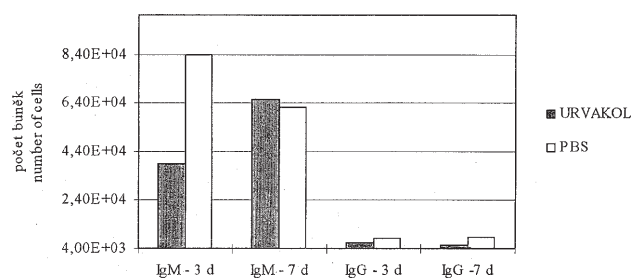


Fig. 5. Jerne plaque technique. Number of cells producing IgM and IgG 3 and 7 days following preparation application.

Obr. 5. Jerneho plaková metoda. Počet buněk produkujících IgM a IgG 3 a 7 dnů po aplikaci preparátu.

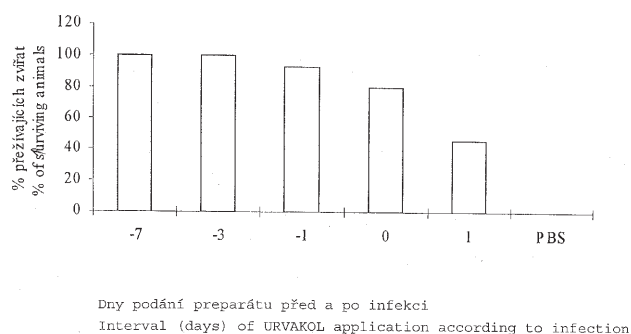


Fig. 6. Survival percentage. Preparation was administered 7, 3, 1, 0 days prior and 1 day after application of infectious agent.

Obr. 6. Procento přežití. Preparát byl podán 7, 3, 1, 0 dnů před a 1 den po aplikaci infekce.

Procento přežití a střední den úhynu

Výsledky jsou shrnuty na obrázku 6. Preparát ochránil při dané dávce a způsobu podání značnou část pokusných zvířat. Ještě jeden den po již rozvinuté intracelulární infekci přežilo 46,6 % myši. Všechny skupiny mají signifikantní rozdíl vůči kontrole 95 % (hodnoceno podle Dunna).

Tab. 6. Influence of preparation on the production of antibodies against *Francisella tularensis*.**Tab. 6. Vliv preparátu na tvorbu protilátek proti *Francisella tularensis*.**

Day of preparation administration	Microagglutination titer	ELISA titer
Den podání preparátu	Mikroaglutinace titr	ELISA titr
-7	16	5120
-3	16	5120
-1	32	5120
0	16	5120
+1	32	5120
standard control negative		
standardní kontrola negativní	0	10
standard control positive		
standardní kontrola pozitivní	16-32	5120

Reakce pozdní přecitlivělosti

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Preparát snižoval otok tlapky u všech skupin ve 4. hodině testu, po 24 h bylo snížení otoku nejmarkantnější u skupiny ošetřené preparátem 7 dní před infekcí.

Stanovení specifických protilátek

Výsledky obou použitých metod (mikroaglutinace a ELISA) jsou uvedeny v tabulce 6.

Specifické protilátky u všech skupin se pohybovaly na stejné úrovni. Došlo však k úhynu kontrolních myší, a proto nebylo možné jejich serologické vyšetření. Z mnoha dalších pokusů prováděných ve stejné laboratoři je známo, že titr protilátek u podobně infikovaných myší se pohybuje na naprosto stejné úrovni, jaká byla zjištěna u myší vakcinovaných. Je tedy možné konstatovat, že podání preparátu neovlivnilo hladinu protilátek proti *Francisella tularensis* (kmen 15 L).

Diskuse a závěry

Při hodnocení účinků vakcíny URVAKOL v pokusech *in vitro* je možné konstatovat, že preparát vykazoval zvýšenou mitogenní aktivitu v koncentraci 250 µg/ml. Z kostimulačního testu je zřejmé, že preparát v této koncentraci interferoval s působením polyklonálního T-buněčného (ConA) i B-buněčného mitogenu (LPS), zejména v suboptimální koncentraci. Z výsledků provedených

testů toxicity vyplývá, že koncentrace 2,5 mg/ml byla pro slezinné buňky, kultivované s preparátem *in vitro*, toxická.

Ovlivnění imunitního systému myší podáním vakcíny URVAKOL bylo dále testováno *ex vivo* a *in vivo*. Sledováním proliferace slezinných buněk indukované ConA a LPS byl prokázán útlum transformace lymfocytů. Pouze při stimulaci B-buněčným mitogenem došlo k mírnému zvýšení lymfoproliferace u myší, kterým byl podán URVAKOL 48 h před testem. U preparátu nebyl zjištěn signifikantní vliv na NK-buňky, ani na počet buněk produkujících protilátky IgM a IgG. Jen v případě podání 3 dny před testem došlo k signifikantnímu snížení počtu buněk produkujících IgM.

Preparát URVAKOL dále silně zvyšoval cytotoxickou aktivitu makrofágů, pokud byl podán nejméně 3 dny před pokusem. Rovněž působil stimulačně na imunitní odpověď při modelové infekci nepříbuzným intracelulárním patogenem (*Francisella tularensis* 15 L). Tato nespecifická ochrana se nepromítala do specifické protilátkové odpovědi na franciselovou infekci, pouze byla mírně modifikována hypersenzitivní reakce měřená tlakovým testem. Lze tedy usuzovat, že výrazný protektivní efekt preparátu proti infekci franciselami byl způsoben mohutnou stimulací cytotoxické aktivity adhezujících peritoneálních buněk.*

Literatura

Brunner K.T., Mauel J., Cerotiny J.C., Chapois B.: Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cell on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cell *in vitro*. Inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, 14, 1968, s. 181–185.

Dunn O.J.: Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6, 1964, s. 241–252.

Hofstaetter T., Brammsen H.: A microassay for nitroblue tetrazolium reduction by human neutrophils. *Immunobiology*, 159, 1981, s. 283–292.

Koukalová D.: Vývoj vakcíny pro léčbu zánětlivých onemocnění močových cest. Kandidátská disertační práce, LF UP Olomouc, 1996.

Ling N.R., Kay J.E.: Lymphocyte stimulation. Amsterdam, North-Holland Publishing Comp. 1975.

Lochman I., Král V., Machálek J.: Serologické mikrometody. *Acta Hyg. Epid. Microbiol.*, 14, 1984, s. 181–189.

Macela A., Kovářová H., Stulík J., Ferenčík M., Propper P., Hošková E.: Vícetupňové schéma testování imunomodulačních látek. *Bratisl. lek. Listy*, 90, 1989, s. 719–731.

Procházková J., John C.: Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie. Praha, Avicenum 1986.

Šterzl J., Říha I.: Detection of cells producing 7S antibodies by the plaque technique. *Nature*, 208, 1966, s. 858–859.

Do redakce došlo 13.3.1998.

* Tato dílčí studie byla finančně podporována grantem IGA MZ ČR č. 0716-3.