

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

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

IMUNOSTIMULAČNÍ AKTIVITA VAKCÍNY PRO LÉČBU RECIDIVUJÍCÍCH UROINFEKČÍ. II.

Abstract

Koukalova D, Krocova Z, Vitek P, Macela A, Hajek V:
Immunostimulatory Activity of the Vaccine Used in the Treatment of Recurrent Urinary Infections. II.
 Bratisl Lek Listy 1999; 100 (4): 215–217

The authors describe on the immunostimulatory properties of the vaccine URVAKOL aimed for the treatment of recurrent urinary infections. Detection of immunostimulatory activity of the preparation and its effects on the humoral and cellular immunity were performed after oral administration of the preparation. Important was the evidence of nonspecific immunity of mice against intracellular pathogen *Francisella tularensis* induced with URVAKOL strain 15L. (Tab. 4, Fig. 1, Ref. 8.)

Key words: recurrent urinary infection, vaccine URVAKOL, oral administration, immunomodulatory effect.

V práci jsou předloženy výsledky testování vakcíny URVAKOL po jejím perorálním podání myším. Při hodnocení imunomodulačních vlastností preparátu bylo použito stejných metod jako při popisu testování vakcíny po její intraperitoneální aplikaci (Macela a spol., 1990; Hofstaetter a spol., 1981; Procházková a spol., 1986).

Ve druhé variantě pokusů — podání per os — byly hodnoceny vlivy preparátu na cytotoxickou aktivitu adhezujících peritoneálních buněk a lymfoproliferativní reakce slezinných buněk na polyklonální mitogeny (ConA, LPS). Rovněž byl hodnocen vliv preparátu na přežívání myši při jejich inhalační infekci francisellami a na tvorbu specifických protilátek.

Materiál a metody

Experimentální zvířata, infekční agens i chemikálie byly shodné s údaji popisujícími testování vakcíny podané intraperitoneální cestou (Koukalová a spol., 1999). Pro perorální podání byl lyofilizovaný preparát naředěn do koncentrace 3 mg/0,5 ml sterilní

Abstrakt

Koukalová D., Kročová Z., Vitek P., Macela A., Hájek V.:
 Imunostimulační aktivita vakcíny pro léčbu recidivujících uroinfekcí. II.
 Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 4, s. 215–217

Autoři popisují imunomodulační vlastnosti vakcíny URVAKOL určené k léčbě recidivujících uroinfekcí. Vyšetření imunostimulační aktivity přípravku a ovlivnění humorální i buněčné složky imunitního systému myši bylo provedeno po jeho perorálním podání. Významný byl průkaz nespecifické ochrany myši preparátem URVAKOL proti intracelulárnímu patogenu *Francisella tularensis* (kmen 15L). (Tab. 4, obr. 1, lit. 8.)

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

pitné vody (Koukalová, 1996). Podáván byl žaludeční sondou po dobu 7 dní, vždy v dávce 3 mg na myš a 24 h.

Pokusy se zvířaty probíhaly v podmínkách, které odpovídaly zákonu 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a byly schváleny etickou komisí LF UP.

Cytotoxická aktivita adhezujících peritoneálních buněk

Preparát byl aplikován šesti skupinám myši. Kontrolním 6 skupinám byla ve stejných intervalech a objemech (0,5 ml) podána sterilní pitná voda. V každé skupině byly tři inbrední myši linie C3H/DiSn.

U první skupiny bylo stanovení cytotoxické aktivity makrofágů (Procházková a spol., 1986; Koukalová a spol., 1999) provedeno 14. den, u druhé skupiny 10. den, u třetí 7. den, u čtvrté 5. den, u páté 3. den a u šesté skupiny za 24 h po ukončení podávání preparátu.

Stejným způsobem bylo nakládáno s kontrolními skupinami pro každý časový interval.

Podávání preparátu i kontrolní pitné vody bylo provedeno tak, že stanovení cytotoxické aktivity makrofágů bylo realizováno v jeden den u všech 12 skupin.

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, ČR.
 Phone: +420.68.5632409, Internet: koukal@risc.upol.cz

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.

Aktivita NK-buněk

Z utracených myší, kterým byl proveden výplach peritonea na stanovení cytotoxické aktivity makrofágů, byly sterilně odebrány sleziny. S připravenými suspenzemi slezinných buněk byla testována aktivita NK-buněk pomocí neadherujících cílů (Brunner a spol., 1968; Koukalová a spol., 1999).

Blastická transformace

Použito bylo dalších částí slezinných suspenzí získaných z myší po perorálním podání preparátu i kontrolní pitné vody a proveden s nimi test blastické transformace (Ling a spol., 1975; Koukalová a spol., 1999).

Procento přežití a střední den úhynu

Třem skupinám myší byla perorálně podána opět po dobu sedmi dnů vakcína o koncentraci 3 mg/0,5 ml sterilní pitné vody na jednu myš a den. V každé skupině bylo 8 myší C3H/DiSn. Kontrolním myším byla podávána ve stejném objemu a ve stejných časových intervalech sterilní pitná voda.

První skupina zvířat byla čtvrtý den podávání preparátu inhalována inhalační cestou druhem *Francisella tularensis* (kmen 15 L). Myši byly vystaveny působení infekčního aerosolu ve speciální komoře. Průměrný počet mikrobů podaných po 18 minutách expozice byl 59 zárodků na jednu myš. U druhé skupiny byla stejná infekční dávka podána 24 h po ukončení aplikace preparátu a u třetí skupiny 4 dny po jejím ukončení.

Sledování myší a hodnocení jejich přežití bylo obdobné jako při intraperitoneálním podání preparátu, tj. celkem 21 dní po aplikaci infekčního agens (Koukalová a spol., 1999).

Stanovení specifických protilátek

Vyšetření protilátek proti *Francisella tularensis* bylo provedeno u myší použitých v pokusu při sledování procenta přežití po jejich infekci franciselami inhalační cestou. Specifické protilátky byly vyšetřovány metodou přímé aglutinace a souběžně metodou ELISA (Koukalová a spol., 1999).

Výsledky

Cytotoxická aktivita makrofágů

Závislost cytotoxické aktivity makrofágů na době podání vakcíny je uvedena v tabulce 1. Míra nespecifické cytotoxické aktivity makrofágů je vyjádřena procentem kontrolních hodnot.

Tab. 1. Cytotoxic activity of macrophages.
Tab. 1. Cytotoxická aktivita makrofágů.

Termination of preparation administration before the experiment (days)	% controls
Ukončení podávání preparátu před pokusem (dny)	% kontroly
14	-4.4
10	-1.9
7	-1.5
5	-0.4
3	+1.3
1	+0.7

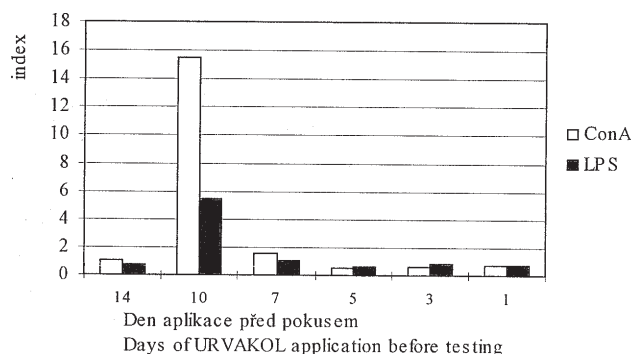


Fig. 1. Blast transformation test after polyclonal mitogen LPS and ConA stimulation.

Obr. 1. Test blastické transformace po stimulaci polyklonálními mitogeny LPS a ConA. Výsledky jsou vyjádřeny indexem jako poměr ovlivněných zvířat ke kontrolám.

Z výsledků vyplývá, že v dané dávce a způsobu podávání nedošlo u žádné pokusné skupiny k výraznému zvýšení cytotoxické aktivity makrofágů.

Aktivita NK-buněk

Výsledky přepočtené na procenta kontroly jsou uvedeny v tabulce 2.

Z tabulky je zřejmé, že aktivita NK buněk nebyla ovlivněna žádným schématem podání v dané dávce.

Blastická transformace

Na obrázku 1 je uvedena míra ovlivnění myších slezinných buněk preparátem. Je vyjádřena poměrem mezi transformačními indexy myší, kterým byl podán preparát a myší, které dostaly pouze sterilní pitnou vodu.

Perorální podání vakcíny velmi mírně tlumilo lymfoproliferativní odpověď slezinných buněk na polyklonální mitogeny ConA a LPS v prvních pěti dnech po ukončení aplikace. Avšak 10. den byla prokázána jejich vysoká aktivita, která se velmi rychle vrátila k hodnotě srovnatelné s kontrolními zvířaty.

Procento přežití a střední den úhynu

Výsledky přepočtené na procenta přežívajících myší a střední den úhynu jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 2. NK-cells activity.
Tab. 2. Aktivita NK-buněk.

Termination of preparation administration before the experiment (days)	% controls
Ukončení podávání preparátu před pokusem (dny)	% kontroly
14	0.0
10	+0.8
7	-0.3
5	-0.4
3	+0.6
1	+0.2

Tab. 3. Survival percentage and mean time of death.
Tab. 3. Procento přežití a střední den úhynu.

Last vaccine administration Poslední podání vakcíny	Survival (%) Přežití (v %)	Mean time of death Střední den úhynu
4 days before infection control		
4 dny před infekcí kontrola	75.0 37.5	12 10
1 day after infection control		
1 den po infekci kontrola	75.0 12.5	15 11
4 days after infection control		
4 dny po infekci kontrola	62.5 62.5	12 11

Tab. 4. Effects of the preparation on antibodies against *Francisella tularensis* formation.

Tab. 4. Vliv preparátu na tvorbu protilátek proti *Francisella tularensis*.

Last vaccine administration Poslední podání vakcíny	Microagglutination titre Mikroaglutinace titr	ELISA titre ELISA titr
4 days before the infection control		
4 dny před infekcí kontrola	32 32	5120 2560
1 day after the infection control		
1 den po infekci kontrola	32 32	1280 1280
4 days after infection control		
4 dny po infekci kontrola	16 32	1280 1280

Signifikantní rozdíl 95 % (Dunn, 1964) mezi vakcinovanými a kontrolními skupinami byl zjištěn u 2. skupiny, ve které byly myši vystaveny infekci 24 h po ukončení podávání preparátu. Dlouhodobější působení preparátu hodnocené podle aplikace francisel 4 dny po ukončení jeho podávání nebylo zjištěno.

Stanovení specifických protilátek

Výsledky obou použitých metod jsou uvedeny v tabulce 4. Rozdělení zvířat do skupin bylo shodné jako u stanovení středního dne úhynu.

Perorální podání preparátu neovlivnilo tvorbu protilátek proti aplikované infekci kmenem *Francisella tularensis* 15 L.

Diskuse a závěry

Preklinické výsledky získané na modelu opakovaného perorálního podání ukázaly, že preparát aplikovaný touto cestou (v dáv-

ce 3 mg na den a myš) již neovlivňoval aktivitu NK-buněk a cytotoxickou aktivitu makrofágů. Mírně tlumil lymfoproliferativní odpověď na polyklonální mitogeny LPS a ConA v prvních pěti dnech po ukončení aplikace preparátu. Desátý den byla prokázána vysoká stimulace proliferace slezinných buněk proti myším kontrolám, 14. den byla hodnota proliferace již blízká kontrole.

Stejně jako u parenterální vakcinace byl po perorálním podání preparátu zaznamenán efekt nespecifické ochrany proti infekci druhem *Francisella tularensis* (kmen 15L) aplikovaným inhalační cestou. Odolnost stimulovaná vakcínou byla nejvýraznější 24 h po ukončení jejího podávání. Tento příznivý stav trval ještě 4 dny po ukončení aplikace preparátu. Získaná ochrana organismu se však nepromítala do specifické protilátkové odpovědi.

Je tedy možné konstatovat, že testovaná vakcína URVAKOL má velmi dobrý modulační účinek na imunitní systém.*

Literatura

Brunner K.T., Mael J., Cerottiny J.C., Chapis B.: Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cell on ⁵¹Cr-labelled allogenic 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. Olomouc, LFUP 1996.

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

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

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.

Do redakcie došlo 13.3.1998.

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