

Praca oryginalna

Original paper

Cytometryczna ocena aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów krwi obwodowej królików z przewlekłą trichofitozą

KRZYSZTOF KOSTRO, KATARZYNA WOJCICKA-LORENOWICZ, KINGA LEŚNIEWSKA***, JACEK MADANY*, BARBARA MAJER-DZIEDZIC**

Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych,

*Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

**Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

***Katedra Biologii i Ochrony Środowiska Wydziału Lekarskiego AM, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań

Kostro K., Wojcicka-Lorenowicz K., Leśniewska K., Madany J., Majer-Dziedzic B.

Flow cytometry evaluation of phagocyte activity and oxygen metabolism in granulocytes of peripheral blood in rabbits with chronic trichophytosis

Summary

The aim of the study was to evaluate the activity of peripheral blood granulocytes in rabbits with chronic trichophytosis by using commercial sets of Phagotest and Burstest adopted to flow cytometry. A strong suppression of unspecific cellular immune responses was found in rabbits with chronic trichophytosis. Once fungal infection is established it can only be destroyed by T cell-mediated mechanisms. T cells primarily function by activating macrophages and by promoting epidermal growth and keratinization. The destroyed unspecific immune mechanisms are manifested by decreased phagocyte activity and oxygen metabolism of granulocytes. Therefore, it is reasonable to assume that when vaccine therapy is used to treat chronic trichophytosis in rabbits with unspecific immunity it should be modulated in order to restore the destroyed mechanisms of unspecific immunity. The latter's normal functioning is a prerequisite for the development of specific antifungal immunity.

Keywords: rabbits, flow cytometry, trichophytosis

Główną przyczyną występowania trychofitozy królików jest supresja swoistej odporności typu komórkowego, która odgrywa główną rolę w likwidacji infekcji wywołanych przez dermatofity (11, 12). U człowieka i zwierząt z przewlekłą postacią dermatofitozy reakcja na antygeny grzybicze nie występuje lub jest osłabiona, na co wskazują wyniki uzyskiwane w teście śródskórnym i teście transformacji blastycznej limfocytów (1, 6, 7, 9, 10). Istotny wpływ na rozwój przewlekłej trichofitozy wywiera też sprawność komórkowych mechanizmów odporności nieswoistej, odpowiedzialnych za fagocytozę i wewnątrzkomórkowe zabijanie. Te mechanizmy odgrywają ważną rolę w rozwoju swoistej odporności przeciwgrzybiczej (8). Zdolność fagocytarna oraz aktywność metabolizmu tlenowego granulocytów krwi obwodowej u królików z przewlekłą trychofitożą nie są opisane. Wiele cennych informacji odnośnie do stanu czynnościowego tych komórek uzyskuje się w oparciu o analizę cytometryczną z wykorzystaniem gotowych zestawów „Phagotest” i „Bursttest”.

Celem badań była ocena stanu komórkowej odporności nieswoistej na podstawie cytometrycznej analizy aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów krwi obwodowej królików z przewlekłą trychofitożą.

Materiał i metody

Zwierzęta doświadczalne. Badania przeprowadzono w fermie królików rasy nowozelandzkiej, liczącej 190 samców i 950 samic w ciągłym cyklu produkcyjnym, w której od kilku lat stacjonarnie występuje grzybica skórna wywołana przez *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosum*. Króliki trzymane były w systemie chowu klatkowego z automatycznymi poidłami w halach z wentylacją grawitacyjną i mechanicznym nawiewem świeżego powietrza, oświetlone w sposób naturalny w okresie wiosenno-letnim i sztuczny w okresie jesienno-zimowym. Hale w okresie zimowym ogrzewane były nadmuchem ciepłego powietrza. Zwierzęta tworzące stado podstawowe wraz z przychowkiem trzymane były w oddzielnych halach. Warunki zoohigieniczne i sanitarne w fermie były zadowalające. Króliki żywiono pełnoporcjową paszą granulowaną z dodatkiem kokcydiostatyków przy stałym dostępie do wody.

Badania wykonano na 15 królikach rasy nowozelandzkiej (grupa I) w wieku 16 tygodni, u których badaniem klinicznym stwierdzono uogólnioną postać trychofitozy. Od tych królików izolowano *T. mentagrophytes* var. *granulosum*. W trakcie wywiadu z właścicielem ustalono, że zmiany grzybicze u wytypowanych do badań królików utrzymują się około 12 tygodni. Ze względu na długotrwałe utrzymywanie się zmian chorobowych rozpoznano grzybicę skórą zakwalifikowaną jako przewlekłą postać trychofitozy. Grupę kontrolną (grupa II) stanowiło 8 zdrowych królików rasy nowozelandzkiej będących w tym samym wieku i pochodzących z hodowli, w której ta choroba dotychczas nie występowała.

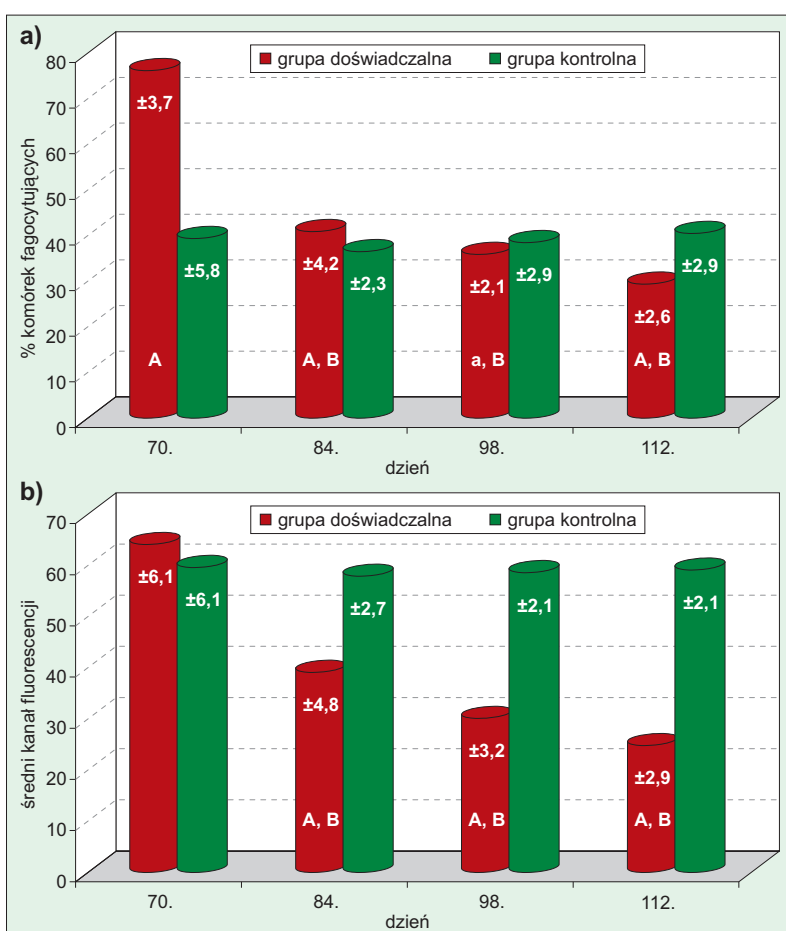
Oznaczanie aktywności fagocytarnej granulocytów. Aktywność fagocytarną granulocytów określono metodą cytometrii przepływowej, używając komercyjnego zestawu Phagotest (Orpegon Pharma, Heidelberg, F.R.G.), zaadaptowanego do metody cytometrii przepływowej. Zestaw ten zawiera bakterie *E. coli* znakowane FITC, opsonizowane przeciwciałami i składowymi dopełniaczami. Pozwala on na określenie odsetka granulocytów fagocytykujących oraz ich aktywności fagocytarnej (średnia intensywność fluorescencji pozwala wnioskować o ilości wchłoniętych bakterii przez granulocyt).

Oznaczenia wykonano według załączonej procedury. Do jałowych próbek wlewano po 20 μ l pełnej heparynizowanej krwi, schłodzonej przez 10 min. w temperaturze 0°C i mieszano z równą objętością (20 μ l) zawiesiny *E. coli*. Testowane hodowle inkubowano przez 20 min. w temp. 37°C, natomiast próbki kontrolne w łaźni lodowej (20 min. w 0°C), a następnie badane próbki umieszczono w łaźni lodowej i po dodaniu do każdej 100 μ l zimnego płynu Quenching dokładnie mieszano przez 2 min. w temp. 25°C. Po tym czasie do każdej próbki dodano po 3 ml zimnego płynu płuczącego (Washing) i wirowano przy 250 g przez 5 minut w temp. 4°C. Następnie do wszystkich próbek dodano 700 μ l płynu lizującego i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji próbki poddano analizie cytometrycznej.

Określenie metabolizmu tlenowego granulocytów. Metabolizm tlenowy granulocytów określono przy użyciu komercyjnego zestawu Bursttest (Orpegon Pharma, Heidelberg, F.R.G.) zaadaptowanego do metody cytometrii przepływowej. Do aktywacji komórek stosowano opsonizowane bakterie *E. coli*. Oznaczenia wykonano według wskazań producenta. Odsetek pobudzonych komórek zdolnych do produkcji metabolitów tlenowych określono przy pomocy przekształconego modelu DHR (dihydrorhodamine) 123 w R 123. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, obliczając średnią i odchylenie standardowe oraz istotność różnic pomiędzy grupami oraz kolejnymi oznaczeniami, stosując test t-Studenta.

Wyniki i omówienie

U królików występowała uogólniona głęboka strupia trichofitoza o przewlekłym charakterze. Typowe ogniska grzybicze w postaci owalnych wyłysień, pokrytych azbestowymi, silnie zespolonymi ze skórą strupami umiejscowione były na głowie i małżowinach usznych, tułowiu oraz na przednich i tylnych kończy-

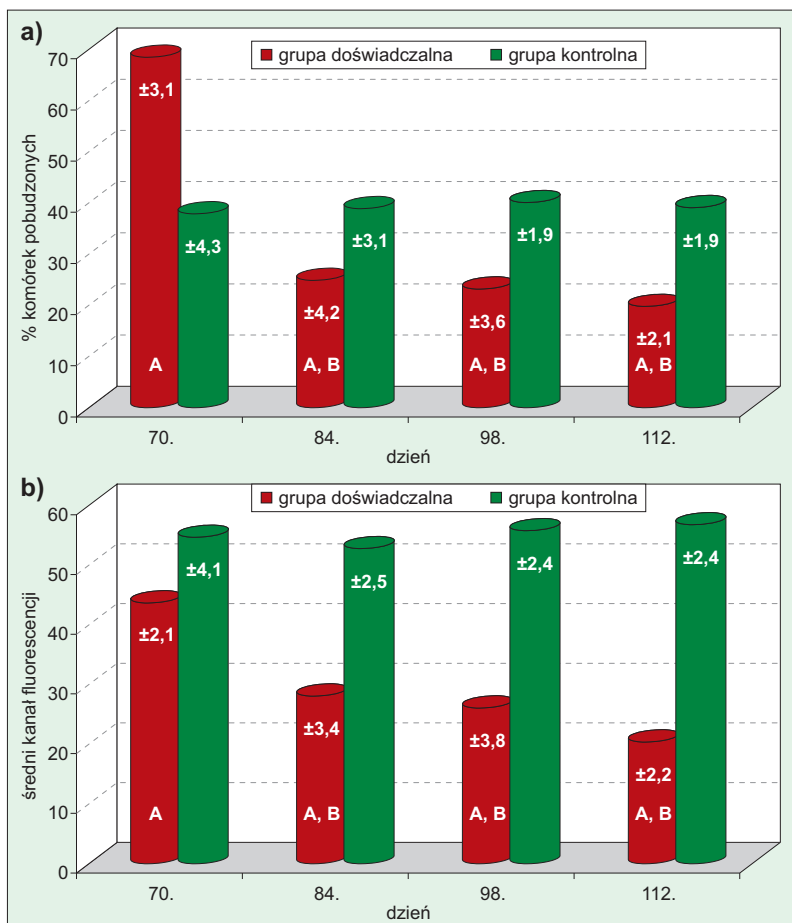


Ryc. 1. Cytometryczna analiza aktywności fagocytarnej granulocytów [a) % komórek fagocytykujących, b) średni kanał fluorescencji] we krwi obwodowej u królików z naturalną przewlekłą trichofitozą ($\bar{x} \pm SD$)

Objaśnienia: a – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą doświadczalną a kontrolną ($p \leq 0,05$), A – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą doświadczalną a kontrolną ($p \leq 0,01$), B – różnice statystycznie istotne pomiędzy poszczególnymi pobraniami a dniem 70. ($p \leq 0,01$)

nach. Ogniska grzybicze utrzymywały się u wszystkich badanych królików przez cały okres prowadzonej obserwacji. Równocześnie obserwowano zahamowanie wzrostu i postępujące charłactwo. Z zeszkobin pobranych od chorych królików izolowano przed rozpoczęciem badań oraz w ich toku czystą hodowlę *T. mentagrophytes*. U zwierząt grupy kontrolnej nie obserwowano żadnych objawów chorobowych, a wyniki badań hodowlanych wypadły negatywnie.

W 70. dniu (dzień rozpoczęcia badań) w grupie zwierząt doświadczalnych notowano statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$) wyższe średnie wartości odsetka komórek fagocytykujących w porównaniu z kontrolą (ryc. 1a i 1b). Następnie wystąpił stopniowy, ale statystycznie istotny spadek tych wartości w stosunku do jego średnich wartości wyjściowych ($p \leq 0,01$), jak i grupy kontrolnej ($p \leq 0,01$ lub $p \leq 0,05$). Najniższe średnie wartości procentu komórek fagocytykujących w grupie zwierząt doświadczalnych notowano w ostatnim terminie badań. Podobnie w ciągu całego okresu utrzymywały się na niższym ($p \leq 0,01$) od wyjściowego poziomie wartości średniego kanału fluorescencji i były one najniższe w tym samym terminie, co procent komórek



Ryc. 2. Ocena metabolizmu tlenowego granulocytów [a) % komórek pobudzonych, b) średni kanał fluorescencji] we krwi obwodowej po aktywacji *E. coli* u królików z naturalną przewlekłą trichofitozą ($\bar{x} \pm SD$)
 Objasnienia: A – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą doświadczalną a kontrolną ($p \leq 0,01$), B – różnice statystycznie istotne pomiędzy poszczególnymi pobraniami a dniem 70. ($p \leq 0,01$)

fagocytujących. U królików w grupie kontrolnej odsetek komórek fagocytujących i średni kanał fluorescencji utrzymywały się na poziomie zbliżonym do wyjściowego przez cały okres obserwacji. Średnie wartości procentu komórek fagocytujących, z wyjątkiem dwóch pierwszych terminów oznaczeń, były istotnie wyższe w toku dalszej obserwacji w stosunku do królików z przewlekłą trichofitozą. Z kolei średnie wartości kanału fluorescencji, z wyjątkiem wartości początkowej, w pozostałych terminach oznaczeń były istotnie wyższe w stosunku do zwierząt doświadczalnych.

Z danych ryc. 2a i 2b wynika, że istotny spadek ($p \leq 0,01$) aktywności metabolizmu tlenowego granulocytów u królików z przewlekłą trichofitozą nastąpił już w drugim terminie oznaczeń w porównaniu z wartościami wyjściowymi oraz grupą kontrolną. Różnice te dotyczyły zarówno średnich wartości odsetka komórek pobudzonych, jak i kanału fluorescencji. Po tym czasie obserwowano dalszy stopniowy i statystycznie istotny ($p \leq 0,01$) spadek procentu komórek pobudzonych i średniego kanału fluorescencji tak w stosunku do wartości początkowych, jak i grupy kontrol-

nej. W ostatnim dniu badań stwierdzono najniższe średnie wartości odsetka komórek pobudzonych i kanału fluorescencji w toku całej obserwacji. U zwierząt grupy kontrolnej odsetek komórek pobudzonych, z wyjątkiem wartości wyjściowych, był istotnie wyższy od zwierząt doświadczalnych w pozostałych terminach oznaczeń. Natomiast średni kanał fluorescencji był istotnie wyższy we wszystkich terminach badań.

Obraz kliniczny trychofitozy u królików, podobnie jak u innych gatunków zwierząt, zależy przede wszystkim od wieku zwierząt, rezystencji i warunków bytowania. Wśród tych czynników ważną rolę w rozwoju procesu chorobowego odgrywa sprawność komórkowych mechanizmów odporności nieswoistej oraz swoistej. Zaburzenie ich funkcji jest warunkiem wystąpienia jawnej postaci trychofitozy z tendencją do rozwoju formy przewlekłej (11-13). W badaniach własnych przewlekła postać trychofitozy występowała u 16-tygodniowych królików zakażonych w warunkach naturalnych. Z zeszkobin pobranych od królików chorych izolowano czystą kulturę *T. mentagrophytes* var. *granulosum*, który odgrywa dominującą rolę w etiologii grzybicy skórnej królików. Typowe ogniska grzybicze utrzymywały się przez okres 6-tygodniowej obserwacji, powodując w tym czasie u królików z uogólnioną postacią trychofitozy przewlekłej zahamowanie rozwoju i postępujące charłactwo. Jest to zgodne z danymi piśmiennictwa oraz wynikami własnych obserwacji, że ostra postać trychofitozy u królików nie poddanych we właściwym czasie terapii przyczynowej ma tendencję do wybitnie przewlekłego przebiegu (11, 12).

Rozwój odporności przeciwgrzybiczej wiąże się z aktywacją fagocytów, uczuleniem klonów swoistych limfocytów T oraz produkcją przeciwciał skierowanych przeciwko dermatofitom (13). W czasie wzrostu grzybów uwalniane są substancje chemotaktyczne dla neutrofilów, które infiltrując miejsce infekcji, likwidują zakażenie (3, 4, 13). W nieswoistej odporności komórkowej uczestniczą również makrofagi, które posiadają receptory lektynowe wiążące bezpośrednio określone cukry ściany komórkowej grzybów lub niszczą je przy udziale obecnego na ich powierzchni receptora FcIgG i C3b (13). Jednakże główną rolę w odporności przeciwgrzybiczej odgrywa swoista odporność komórkowa związana z limfocytami pomocniczymi Th (2, 7, 13, 14). Smith i Griffin (15) wyrażają pogląd, że zjawisko wzajemnego wykluczania się limfocytów Th1 i Th2 oznacza, że dla rozwoju protekcyjnej odporności przeciwgrzybiczej konieczna jest aktywacja subpopulacji limfocytów Th1. Natomiast aktywacja limfocytów Th2 przyczynia się do rozwoju przewlekłej postaci grzybicy skórnej oraz jest przy-

czyną hamowania protekcyjnej odporności przeciwgrzybiczej.

Dokonując cytometrycznej oceny stanu czynnościowego granulocytów krwi obwodowej u królików z przewlekłą postacią trychofitozy stwierdzono statystycznie istotny spadek aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów krwi obwodowej u królików chorych we wszystkich terminach oznaczeń w stosunku do zwierząt grupy kontrolnej. Statystycznie istotnie zmniejszył się także średni kanał fluorescencji będący wykładnikiem nasilenia procesu fagocytozy. Wskazuje to na supresję komórkowych mechanizmów odporności nieswoistej u królików z przewlekłą trychofitozą. Silnie zaznaczona supresja aktywności fagocytarnej granulocytów mogła być efektem inhibicyjnego oddziaływania grzyba polegającego prawdopodobnie na blokowaniu powierzchniowych receptorów komórek fagocytyzujących (2). Dermatofity wytwarzają też substancje hamujące odczyny odpornościowe. Wśród nich główną rolę odgrywają mannany zawarte w ścianie komórkowej grzyba, które uwalniane są w czasie jego wzrostu. Prawdopodobnie mannany, po związaniu się z powierzchniowym receptorem polisacharydowym komórek prezentujących antygen limfocytom T, wnikają do wnętrza komórki, powodując zaburzenia syntezy lub funkcji RNA (3, 5, 13). Granulocyty, zwłaszcza neutrofile, które odgrywają najważniejszą rolę w procesie fagocytozy nie były w pełni zdolne do podjęcia funkcji obronnych prowadzących do eliminacji infekcji grzybiczej z powierzchni skóry u królików z przewlekłą trychofitozą. Zatem utrzymująca się supresja aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego jest ważnym czynnikiem predysponującym do rozwoju przewlekłej formy grzybicy u królików.

Aktywowane neutrofile i makrofagi uczestniczą również w swoistej odpowiedzi immunologicznej, pełniąc rolę komórek prezentujących antygen. Antygeny dermatofitów są rozpoznawane, przetwarzane i umieszczane w połączeniu z cząsteczkami MHC II klasy na powierzchni błon komórek prezentujących antygen (aktywowane neutrofile, makrofagi i komórki Langerhansa) limfocytom T. Ponadto komórki te po uprzedniej stymulacji antygenowej uwalniają szereg cytokin, które modulują zarówno miejscową, jak i systemową reakcję zapalną oraz odpowiedź immunologiczną organizmu w przebiegu infekcji grzybiczej. Fagocyty uprzednio aktywowane przez limfocyty T są również jednym z głównych mechanizmów efektorowych swoistej odpowiedzi immunologicznej, biorącym udział w eliminacji infekcji grzybiczych (2, 6, 13). W tym procesie ważną rolę spełnia czynnik zahamowania migracji makrofagów MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor). Źródłem jego syntezy są limfocyty TCD4⁺ oraz monocyty i makrofagi. Produkowany w ognisku zapalnym przez komórki TCD4⁺ czynnik MIF hamuje migrację pobudzonych makrofagów, które pełnią zasadniczą rolę w likwidacji infekcji grzy-

bicznej. Z kolei uwalniany przez makrofagi czynnik MIF wzmacnia aktywność limfocytów T. Cytokina ta wzmacnia też syntezę TNF α oraz wykazuje synergizm z IFN γ w stymulacji produkcji tlenku azotu (NO) przez makrofagi. W ognisku zapalnym produkowany przez makrofagi i limfocyty TCD4⁺ czynnik MIF neutralizując immunosupresyjne właściwości glikokortykoidów, utrzymuje wzajemną równowagę pomiędzy aktywnością cytokin pro- i przeciwzapalnych. Stwierdzony w badaniach własnych istotny spadek aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów u królików z przewlekłą trychofitozą miał prawdopodobnie zasadniczy wpływ na wielkość uzyskanej komórkowej odporności swoistej. Według Calderona (2), dermatofitoza przewlekła rozwija się w wyniku hiporeaktywności komórek immunokompetentnych lub w wyniku modulacji odpowiedzi immunologicznej przez limfocyty T supresyjne.

Wnioski

1. W przewlekłej trichofitozie królików dochodzi do supresji komórkowych mechanizmów odporności nieswoistej, na co wskazuje spadek aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów krwi obwodowej.
2. W terapii przewlekłej trichofitozy królików, celem przywrócenia zaburzonych mechanizmów odporności nieswoistej wskazane jest ich pobudzenie poprzez stosowanie nieswoistych immunostymulatorów.

Piśmiennictwo

1. Brahmi Z., Liautaud B., Marill F.: Depressed cell – mediated immunity in chronic dermatophytic infectious. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 1980, 131C, 143-153.
2. Calderon R. A.: Immunoregulation of dermatophytosis. Critical Rev. Microbiol. 1989, 16, 339-368.
3. Dahl M. V.: Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. J. Am. Acad. Dermatol. 1993, 28, 19-23.
4. Davies R. R., Zaini F.: Trichophyton rubrum and the chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes. J. Med. Vet. Mycology 1984, 22, 65-71.
5. Grandi S. A., Hostager B. S., Herron M. J.: Binding of Trichophyton rubrum mannan to human monocytes in vitro. J. Invest. Dermatol. 1992, 98, 876-880.
6. Grappel S. F., Bishop C. T., Blank F.: Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. Bacteriol. Rev. 1974, 38, 222-250.
7. Green F., Lee K. W., Balish E.: Chronic T. mentagrophytes dermatophytosis of guinea pigs skin grafts on nude mice. J. Invest. Dermatol. 1982, 79, 125-129.
8. Gregurek-Novak T., Rabatić S., Silobrić V.: Defective phagocytosis in chronic trichophytosis. J. Med. Vet. Mycol. 1993, 31, 115-120.
9. Hay R. J., Shennan G.: Chronic dermatophyte infections II. Antibody and cell-mediated immune responses. Br. J. Dermatol. 1982, 106, 191-198.
10. Honbo S., Jones H. J., Artis W. M.: Chronic dermatophyte infection: evaluation of the Ig class-specific antibody response reactive with polysaccharide and peptide antigens derived from Trichophyton mentagrophytes. J. Invest. Dermatol. 1984, 82, 287-290.
11. Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K., Gacek L., Krakowski M.: Szczepionka Alopecac w profilaktyce i terapii trychofitozy królików. Medycyna Wet. 2000, 56, 816-821.
12. Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K., Gacek L., Krakowski M.: Wpływ wczesnego uodporniania osesków królików na występowanie trychofitozy w fermie zapowietrzanej. Medycyna Wet. 2001, 57, 819-823.
13. Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K.: Odczyny immunologiczne w grzybicach skórnych zwierząt. Medycyna Wet. 2001, 57, 709-714.
14. Romagnani S.: Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. Int. J. Clin. Lab. Res. 1991, 21, 152-159.
15. Smith J. M. B., Griffin J. F. T.: Strategies for the development of a vaccine against ringworm. J. Med. Vet. Mycology 1995, 33, 87-91.

Adres autora: dr hab. Krzysztof Kostro, prof. nadzw. AR, ul. Sikorskiego 3/81, 20-814 Lublin