

# Ocena subpopulacji limfocytów oraz aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów u królików zakażonych *Trichophyton mentagrophytes* i poddanych wakcynoterapii

KRZYSZTOF KOSTRO, KATARZYNA WOJCICKA-LORENOWICZ,  
BARBARA MAJER-DZIEDZIC\*, ZBIGNIEW GRĄDZKI, ŁUKASZ JAROSZ

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin  
\*Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Kostro K., Wojcicka-Lorenowicz K., Majer-Dziedzic B., Grądzi Z., Jarosz Ł.

## Evaluation of lymphocyte subpopulations, phagocytic activity and oxygen metabolism of granulocytes of rabbits infected with *Trichophyton mentagrophytes* and immunized against trichophytosis

### Summary

The aim of the study was to evaluate the CD3, CD4, CD8, CD19, CD25 T lymphocyte subpopulations and the state of granulocytes activity in the peripheral blood of rabbits infected with *Trichophyton mentagrophytes* and immunized against trichophytosis by using the flow cytometry method. Our study revealed significant suppression of non-specific cellular antimycotic immunity in rabbits during the development of fungal lesions, which manifested a significant decrease in the phagocytic activity and oxygen metabolism of granulocytes and the decrease of CD3, CD4 subpopulations and CD25 T lymphocytes. Simultaneously, the increase of suppressor CD8 T cells and CD4/CD8 T-cells ratio were observed. The vaccine Alopevac can be used as an effective vaccine against rabbit trichophytosis. Alopevac restored non-specific cellular antimycotic immunity and proper CD4/CD8 T-cells ratio, which contributed to the effective elimination of fungal lesions.

**Keywords:** *T. mentagrophytes*

Leczenie i zwalczanie grzybicy skórnej królików w systemie chowu halowego przy użyciu chemioterapeutyków jest trudne, pracochłonne i nie zawsze skuteczne. Brak efektów jest związany z dużą opornością spor grzyba na czynniki środowiska i środki odkażające oraz utrudnionym wnikaniem leków przeciwgrzybiczych w miejsce procesu chorobowego. Niektóre z tych leków są przy tym wysoce toksyczne i wywierają działanie immunosupresyjne i teratogenne (16). Najbardziej efektywną metodą zwalczania grzybicy skórnej królików w fermach, w których choroba ta występuje stacjonarnie, jest swoista profilaktyka i terapia przy użyciu szczepionek (6, 7, 18). Racjonalne stosowanie immunoprofilaktyki i immunoterapii wymaga znajomości mechanizmów, które warunkują odporność przeciwgrzybiczą królików (16).

Celem badań była ocena cytometryczna subpopulacji limfocytów zawierających cząsteczki CD3, CD4, CD8, CD19 i CD25 oraz aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów krwi obwodowej królików zakażonych doświadczalnie *Tricho-*

*phyton mentagrophytes*, u których zastosowano wakcynoterapię.

### Materiał i metody

**Zwierzęta doświadczalne.** Badania wykonano na 24 królikach rasy nowozelandzkiej w wieku 10 tygodni, pochodzących z hodowli wolnej od grzybicy skórnej. Zwierzęta podzielono na dwie grupy doświadczalne (Grupa I, II) i grupę kontrolną (Grupa III) po 8 królików w każdej. Przed przystąpieniem do doświadczenia od królików pobrano próbki włosów z różnych okolic ciała do mikologicznych badań hodowlanych. W żadnej z próbek nie stwierdzono wzrostu dermatofitów. Dodatkowo u zwierząt tych wykonano testy skórne, do których używano oczyszczonej frakcji glikoproteinowej (Tm-GP) otrzymanej ze szczepu *T. mentagrophytes* według metody Wołoszyna i Umińskiego (17). U wszystkich królików testy skórne wypadły ujemnie.

Do zakażenia eksperymentalnego użyto zjadliwego szczepu *T. mentagrophytes* var. *granulosum* (Tm-K), wyizolowanego uprzednio od królików z naturalną trychofi-

tozą (6). Króliki zakażano, wcierając uprzednio przygotowaną zawiesinę o gęstości  $10^4$  cfu/ml w wystrzyżoną i lekko skaryfikowaną skórę przez 2 kolejne dni w okolicy łopatki i uda po obu stronach ciała oraz na grzbiecie (łącznie 5 pól). Dzienną dawkę wynoszącą 5 ml zawiesiny grzyba podzielono na 5 części i wcierano w skórę każdemu królikowi.

W okresie nasilonych zmian klinicznych (14. dzień po zakażeniu) 8 królikom (grupa I) podano leczniczo handlową szczepionkę Alopecac domięśniowo dwukrotnie w odstępach 10 dni w dawce 1 ml. Pozostałe 8 królików zakażonych eksperymentalnie, nie poddanych szczepieniu stanowiło pozytywną grupę kontrolną (grupa II). Negatywną grupę kontrolną (grupa III) stanowiło 8 królików zdrowych, nie zakażonych i nie immunizowanych.

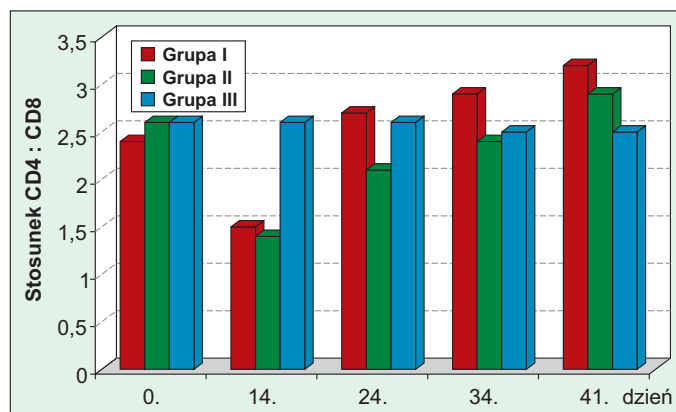
Zwierzęta grup doświadczalnych i grupy kontrolnej poddano obserwacji, w czasie której prześledzono dynamikę procesu chorobowego i określono profil odpowiedzi immunologicznej w przebiegu eksperymentalnego zakażenia *T. mentagrophytes* oraz u zwierząt zakażonych i poddanych wakcynoterapii. Odpowiedź immunologiczną określono za pomocą wymienionych poniżej testów, które wykonywano w 0., 14., 24., 34. i 41. dniu po zakażeniu. Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej stosując test t-Studenta.

**Szczepionka.** W badaniach użyto handlowej szczepionki inaktywowanej Alopecac produkcji Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego, zawierającej wysoce immunogenny szczep *T. mentagrophytes* i *T. verrucosum*, stosowanej w leczeniu i zapobieganiu trychofiziozie lisów. Biopreparat ten posiada również dobre właściwości terapeutyczne oraz ochronne przeciwko trychofiziozie królików (6, 7).

**Określenie cząsteczek powierzchniowych CD3, CD4, CD8, CD19 i CD25 na limfocytach.** Badania wykonano metodą cytometrii przepływowej, stosując dwustopniowe znakowanie komórek. W pierwszym etapie użyto mysich przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko cząsteczkom powierzchniowym CD3, CD4, CD8, CD19 i CD25 obecnym na limfocytach człowieka, zaś w drugim przeciwciał króliczych znakowanych FITC skierowanych przeciwko mysiej IgG (Serotec Immunological Excellence Oxford, England). Oznaczenia wykonano zgodnie z załączoną do zestawów przeciwciał procedurą.

**Określenie 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. Oznaczenia wykonano według załączonej instrukcji producenta testu.

**Określenie aktywności metabolizmu tlenowego granulocytów.** Metabolizm tlenowy granulocytów określono przy użyciu komercyjnego zestawu Bursttest (Orpegon Pharma, Heidelberg, F.R.G.) zaadaptowanego do metody cytometrii przepływowej. Oznaczenia wykonano według załączonej instrukcji producenta testu. Odsetek pobudzonych komórek zdolnych do produkcji metabolitów tlenowych określono przy pomocy przekształconego modelu DHR (dihydroorhodamine) 123 w R 123.

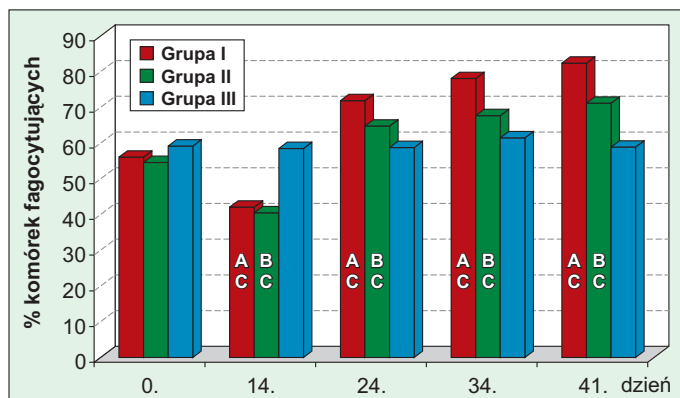


Ryc. 1. Stosunek limfocytów CD4 : CD8 we krwi obwodowej u królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* i poddanych wakcynoterapii ( $\bar{x} \pm SD$ )

## Wyniki i omówienie

**Wyniki obserwacji klinicznych i badań mikologicznych.** Objawy kliniczne u królików zakażonych doświadczalnie w postaci przekrwienia, obrzęku skóry oraz łuszczenia się naskórka w miejscu inokulacji *T. mentagrophytes* pojawiały się pomiędzy 6.-8. dniem po zakażeniu. Dopiero w 12.-14. dniu tworzyły się pęcherzyki i różnej grubości strupy koloru szarozółtego, później azbestowego, które pokrywały całe ogniska i były zawsze ograniczone do strefy zakażenia. Strupy te po kilku dniach samoistnie odklejały się i odpadały, odsłaniając zdrowy naskórek. U królików zakażonych *T. mentagrophytes* i poddanych wakcynoterapii zmiany chorobowe zanikały między 24. a 34. dniem, natomiast u zwierząt tylko zakażonych zanikały one później, tj. pomiędzy 34. a 41. dniem po infekcji, co manifestowało się łuszczeniem i odpadaniem strupów. U królików grupy I dodatkowo wyniki mikologicznych badań hodowlanych uzyskano do 24. dnia włącznie. W 34. i 41. dniu obserwacji wyniki posiewów od wszystkich królików były negatywne. Natomiast u królików grupy II badaniem hodowlanym obecność *T. mentagrophytes* w ogniskach chorobowych wykazano pomiędzy 8. a 34. dniem od zakażenia i dopiero w ostatnim terminie badań wyniki posiewów od wszystkich królików były negatywne. U zwierząt grupy kontrolnej nie obserwowano żadnych objawów chorobowych, a wyniki badań hodowlanych wypadły negatywnie we wszystkich terminach.

**Wyniki badań immunologicznych.** Przed zakażeniem (dzień 0.) aktywność fagocytarna granulocytów we wszystkich grupach zwierząt była zbliżona (ryc. 2). W 14. dniu w grupach zwierząt zakażonych eksperymentalnie *T. mentagrophytes* (grupa I i II) odsetek komórek fagocytujących ulegał statystycznie istotnemu spadkowi tak w odniesieniu do wartości wyjściowych, jak i grupy kontrolnej i były to najniższe jego średnie wartości w toku całego doświadczenia. Po tym czasie odsetek komórek fagocytujących u królików grupy I i II ulegał stopniowemu i statystycznie istotnemu wzrostowi i w 41. dniu obserwacji stwierdzono najwyższe

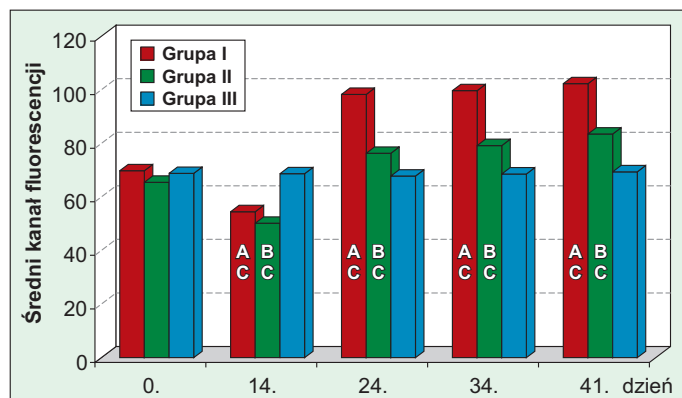


Ryc. 2. Cytometryczna analiza aktywności fagocytarnej granulocytów (% komórek fagocytujących) w krwi obwodowej u królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* i poddanych wakcynoterapii ( $\bar{x} \pm SD$ )

Objaśnienia: A – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą doświadczalną (I) a kontrolą (III) ( $\alpha \leq 0,01$ ); a – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą doświadczalną (I) a kontrolą (III) ( $\alpha \leq 0,05$ ); B – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą doświadczalną (II) a kontrolą (III) ( $\alpha \leq 0,01$ ); b – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą doświadczalną (II) a kontrolą (III) ( $\alpha \leq 0,05$ ); C – różnice statystycznie istotne pomiędzy kolejnymi pobraniami a dniem „0” ( $\alpha \leq 0,01$ ); c – różnice statystycznie istotne pomiędzy kolejnymi pobraniami a dniem „0” ( $\alpha \leq 0,05$ )

jego średnie wartości. W tym czasie ustąpiły już objawy kliniczne trichofityzy, a wyniki badań mikologicznych były ujemne.

Podobnie w dniu rozpoczęcia badań średnie wartości kanału fluorescencji w grupie doświadczalnej były zbliżone do kontroli (ryc. 3). Średnie wartości kanału fluorescencji w grupie I i II oznaczone w 14. dniu po zakażeniu doświadczalnym *T. mentagrophytes* były najniższe ( $p \leq 0,01$ ) w toku całego doświadczenia tak w stosunku do wartości wyjściowych, jak i grupy kontrolnej. W kolejnych terminach oznaczeń średni kanał fluorescencji w grupach zwierząt doświadczalnych ulegał stopniowemu i istotnemu wzrostowi i w ostatnim terminie oznaczeń stwierdzono najwyższe jego średnie wartości. U królików w grupie kon-

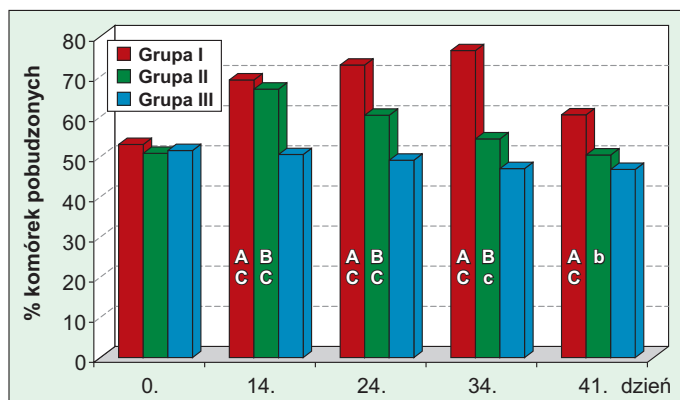


Ryc. 3. Cytometryczna analiza aktywności fagocytarnej granulocytów (średni kanał fluorescencji) w krwi obwodowej u królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* i poddanych wakcynoterapii ( $\bar{x} \pm SD$ )

Objaśnienia: jak na ryc. 2.

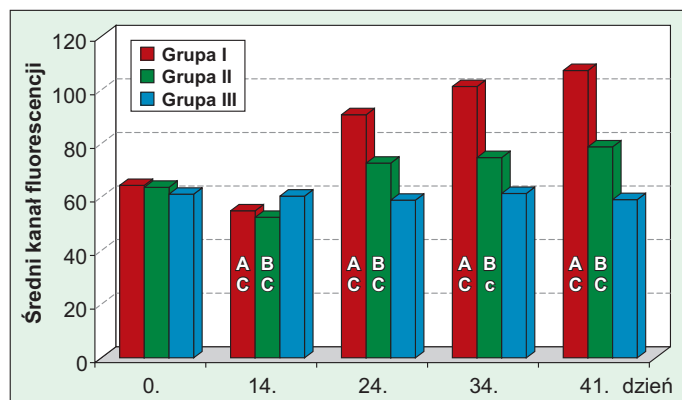
trojnej średnie wartości odsetka komórek fagocytujących oraz średni kanał fluorescencji utrzymywały się na poziomie zbliżonym do wyjściowego przez cały okres obserwacji.

Z danych na ryc. 4 wynika, że w dniu rozpoczęcia badań odsetek komórek pobudzonych po aktywacji *E. coli* był zbliżony we wszystkich trzech grupach królików. U królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* (grupa I i II) istotny ( $p \leq 0,01$ ) wzrost odsetka komórek pobudzonych nastąpił w 14. dniu, tj. w okresie w pełni rozwiniętych objawów klinicznych trichofityzy. W przypadku królików grupy II były to maksymalne wskaźniki komórek pobudzonych w toku całego doświadczenia. Po tym czasie w grupie królików tylko zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* (grupa II) następował stopniowy spadek odsetka komórek pobudzonych, lecz do końca badań jego średnie wartości były istotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną ( $p \leq 0,05$ ). Natomiast u królików zakażonych *T. mentagrophytes* i poddanych wakcynoterapii (grupa I) w 24. dniu stwierdzono dalszy wzrost odsetka komórek pobudzonych i w kolejnym terminie



Ryc. 4. Ocena metabolizmu tlenowego granulocytów (% komórek pobudzonych) w krwi obwodowej po aktywacji *E. coli* u królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* i poddanych wakcynoterapii ( $\bar{x} \pm SD$ )

Objaśnienia: jak na ryc. 2.



Ryc. 5. Ocena metabolizmu tlenowego granulocytów (średni kanał fluorescencji) we krwi obwodowej po aktywacji *E. coli* u królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* i poddanych wakcynoterapii ( $\bar{x} \pm SD$ )

Objaśnienia: jak na ryc. 2.

oznaczeń obserwowano jego najwyższe wartości w toku całego doświadczenia. W ostatnim dniu badań odsetek komórek pobudzonych uległ wyraźnemu spadkowi, lecz jego średnie wartości były istotnie wyższe w porównaniu do wartości początkowej ( $p \leq 0,01$ ) oraz grupy kontrolnej ( $p \leq 0,01$ ).

Przed zakażeniem również średni kanał fluorescencji we wszystkich badanych grupach zwierząt był zbliżony (ryc. 5). W grupach królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* (grupa I i II) najniższe i statystycznie istotne średnie wartości kanału fluorescencji w ciągu całego doświadczenia stwierdzono w 14. dniu. Od 24. dnia w grupach doświadczalnych (grupa I i II) notowano stopniowy i statystycznie istotny wzrost średniego kanału fluorescencji i w 41. dniu stwierdzono najwyższe jego wartości tak w odniesieniu do wartości wyjściowej, jak i grupy kontrolnej. Jednakże średnie wartości kanału fluorescencji u królików zakażonych i poddanych wakcynoterapii były wyraźnie wyższe w porównaniu do zwierząt tylko zakażonych *T. mentagrophytes*. U królików w grupie kontrolnej zarówno odsetek komórek pobudzonych, jak i średnie wartości kanału fluorescencji utrzymywały się na poziomie zbliżonym do wyjściowego przez cały okres obserwacji.

Cytometryczną analizę subpopulacji limfocytów CD3, CD4, CD8, CD19 i CD25 oraz stosunek limfocytów CD4 do CD8 ilustruje tab. 1 oraz ryc. 1. U królików grupy I i II w 14. dniu po doświadczalnym zakażeniu *T. mentagrophytes* nastąpił istotny spadek odsetka limfocytów CD3 w porównaniu do wartości wyjściowej oraz grupy kontrolnej, a jego średnie wartości były najniższe w toku całego doświadczenia. W kolejnym dniu badań w obu grupach doświadczalnych następował wzrost odsetka limfocytów CD3, a jego średnie wartości były zbliżone do wartości wyjściowych oraz grupy kontrolnej. U królików tylko zakażonych *T. mentagrophytes* (grupa II) odsetek limfocytów CD3 na zbliżonym do poprzedniego poziomie utrzymywał się do 34. dnia obserwacji i dopiero w ostatnim terminie oznaczeń osiągał najwyższe wartości w toku całego doświadczenia. Natomiast u królików zakażonych i poddanych wakcynoterapii (grupa I) maksymalne średnie wartości odsetka limfocytów CD3 notowano w 34. dniu badań (10. dzień po II dawce szczepionki) i mniej więcej na tym poziomie utrzymywały się one do końca obserwacji. W grupie kontrolnej odsetek limfocytów CD3 utrzymywał się z niewielkimi odchyleniami na tym samym poziomie przez cały okres obserwacji.

W dniu rozpoczęcia badań odsetek limfocytów CD4 we wszystkich badanych grupach zwierząt był podobny (tab. 1). W kolejnym terminie oznaczeń u królików zakażonych *T. mentagrophytes* (grupa I i II) notowano najwyższy i statystycznie istotny ( $p \leq 0,01$ ) spadek odsetka limfocytów CD4 tak w odniesieniu do wartości wyjściowych, jak i grupy kontrolnej. W kolejnych terminach oznaczeń w obu grupach doświadczalnych

Tab. 1. Odsetek limfocytów CD3, CD4, CD8, CD19 i CD25 w krwi obwodowej u królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* i poddanych wakcynoterapii ( $\bar{x} \pm SD$ )

Dzień	Grupa	CD3	CD4	CD8	CD19	CD25
0	Grupa I	59,6 ( $\pm 2,5$ )	38,2 ( $\pm 2,1$ )	15,7 ( $\pm 1,5$ )	4,7 ( $\pm 2,5$ )	48,7 ( $\pm 3,3$ )
	Grupa II	58,9 ( $\pm 3,5$ )	37,4 ( $\pm 2,1$ )	14,3 ( $\pm 1,3$ )	5,2 ( $\pm 2,6$ )	47,8 ( $\pm 2,9$ )
	Grupa III	57,4 ( $\pm 4,1$ )	38,4 ( $\pm 1,8$ )	14,9 ( $\pm 1,7$ )	5,9 ( $\pm 2,8$ )	49,4 ( $\pm 1,9$ )
14	Grupa I	47,6 <sup>A,C</sup> ( $\pm 1,5$ )	30,9 <sup>A,C</sup> ( $\pm 1,1$ )	19,9 <sup>A,C</sup> ( $\pm 1,5$ )	1,1 <sup>A,C</sup> ( $\pm 0,7$ )	24,3 <sup>A,C</sup> ( $\pm 1,2$ )
	Grupa II	46,9 <sup>B,C</sup> ( $\pm 2,1$ )	29,1 <sup>B,C</sup> ( $\pm 1,9$ )	20,7 <sup>B,C</sup> ( $\pm 1,3$ )	1,5 <sup>B,C</sup> ( $\pm 0,2$ )	16,8 <sup>B,C</sup> ( $\pm 1,8$ )
	Grupa III	59,1 ( $\pm 2,2$ )	39,1 ( $\pm 3,4$ )	14,2 ( $\pm 1,2$ )	5,3 ( $\pm 1,3$ )	48,1 ( $\pm 2,4$ )
24	Grupa I	58,9 ( $\pm 3,2$ )	39,3 ( $\pm 1,9$ )	14,5 ( $\pm 1,5$ )	8,8 <sup>A,C</sup> ( $\pm 1,4$ )	58,3 <sup>A,C</sup> ( $\pm 4,4$ )
	Grupa II	57,4 ( $\pm 2,2$ )	35,3 ( $\pm 2,1$ )	16,8 <sup>b,C</sup> ( $\pm 1,3$ )	2,9 <sup>B,C</sup> ( $\pm 1,1$ )	50,1 ( $\pm 1,8$ )
	Grupa III	58,4 ( $\pm 2,5$ )	38,1 ( $\pm 3,9$ )	14,3 ( $\pm 2,4$ )	4,9 ( $\pm 1,2$ )	47,8 ( $\pm 2,4$ )
34	Grupa I	64,5 <sup>A,C</sup> ( $\pm 2,5$ )	40,8 ( $\pm 3,9$ )	14,1 ( $\pm 1,5$ )	6,7 <sup>a,C</sup> ( $\pm 0,9$ )	68,8 <sup>A,C</sup> ( $\pm 2,6$ )
	Grupa II	59,1 ( $\pm 2,2$ )	37,9 ( $\pm 2,9$ )	15,8 ( $\pm 1,3$ )	2,5 <sup>B,C</sup> ( $\pm 1,1$ )	58,1 <sup>B</sup> ( $\pm 2,7$ )
	Grupa III	57,9 ( $\pm 3,4$ )	37,9 ( $\pm 2,6$ )	15,4 ( $\pm 2,7$ )	5,6 ( $\pm 0,9$ )	49,3 ( $\pm 3,2$ )
41	Grupa I	63,5 <sup>A,C</sup> ( $\pm 2,5$ )	43,8 <sup>a,C</sup> ( $\pm 3,9$ )	13,9 <sup>c</sup> ( $\pm 1,5$ )	6,7 <sup>A,C</sup> ( $\pm 0,9$ )	68,8 <sup>A,C</sup> ( $\pm 2,6$ )
	Grupa II	62,1 <sup>b</sup> ( $\pm 2,2$ )	40,2 ( $\pm 2,9$ )	14,3 ( $\pm 1,3$ )	4,5 ( $\pm 1,1$ )	62,1 <sup>B,C</sup> ( $\pm 2,7$ )
	Grupa III	58,2 ( $\pm 2,9$ )	38,8 ( $\pm 2,5$ )	15,5 ( $\pm 3,2$ )	4,9 ( $\pm 0,6$ )	48,5 ( $\pm 2,5$ )

Objaśnienia: jak na ryc. 2.

nych odsetek limfocytów CD4 ulegał stopniowemu wzrostowi i w ostatnim dniu badań obserwowano jego najwyższe średnie wartości w toku całej obserwacji. W grupie królików zakażonych i poddanych wakcynoterapii różnice te były istotne tak w odniesieniu do wartości początkowej ( $p \leq 0,01$ ), jak i grupy kontrolnej ( $p \leq 0,05$ ). Natomiast średnie wartości limfocytów CD8 u królików doświadczalnych grupa I i II) w 14. dniu po zakażeniu były najwyższe w toku całej obserwacji i istotnie ( $p \leq 0,01$ ) wyższe w porównaniu do wartości wyjściowych oraz grupy kontrolnej. Od 24. dnia odsetek limfocytów CD8 u zwierząt grup doświadczalnych ulegał stopniowemu spadkowi i w ostatnim dniu oznaczeń jego średnie wartości u królików grupy I były istotnie ( $p \leq 0,05$ ) niższe od wyjściowych, natomiast u królików grupy II zbliżone do wyjściowych i grupy kontrolnej.

Stosunek limfocytów CD4 do CD8 u królików grup doświadczalnych był najniższy w toku całego doświadczenia w 14. dniu po zakażeniu *T. mentagrophytes* i wynosił kolejno 1,5 i 1,4. Natomiast w grupie kontrolnej w tym samym terminie oznaczeń stosunek ten

wynosił 2,7 (ryc. 1). Po tym czasie w grupach zwierząt doświadczalnych stosunek limfocytów CD4 do CD8 stopniowo wzrastał, osiągając najwyższe wartości (3,2 grupa I i 2,8 grupa II) w ostatnim dniu badań. U królików grupy kontrolnej zarówno odsetek limfocytów CD4 i CD8, jak i stosunek CD4 do CD8 utrzymywał się w toku całego doświadczenia na zbliżonym do wyjściowego poziomie.

Wyniki odsetka limfocytów CD19 ilustruje tab. 1. Stwierdzono, że najniższy odsetek limfocytów CD19 u królików doświadczalnych występował w 14. dniu po zakażeniu tak w odniesieniu do wartości początkowych, jak i grupy kontrolnej. Po tym czasie obserwowano istotny wzrost odsetka limfocytów CD19 w obu grupach doświadczalnych, z tym, że w grupie I jego średnie wartości były do końca obserwacji istotnie wyższe od wartości początkowej oraz grupy kontrolnej. Natomiast w grupie kontrolnej odsetek limfocytów CD19 utrzymywał się z niewielkimi odchyleniami na tym samym poziomie przez cały okres obserwacji.

Z danych tab. 1 wynika, że odsetek limfocytów CD25 u zwierząt doświadczalnych osiągał najniższe średnie wartości w okresie w pełni rozwiniętych zmian grzybiczych (14. dzień po zakażeniu) i różnice te były istotne w porównaniu do wartości wyjściowej i grupy kontrolnej. Po tym czasie w obu grupach doświadczalnych następował istotny wzrost odsetka limfocytów CD25 i w 41. dniu osiągał on wartości maksymalne, z tym, że w grupie I wartości te były wyraźnie wyższe w porównaniu do grupy II. Natomiast w grupie kontrolnej odsetek limfocytów CD25 utrzymywał się na zbliżonym poziomie w ciągu całego doświadczenia.

W profilaktyce i terapii grzybic skórnych najlepsze efekty uzyskuje się po zastosowaniu swoistych biopreparatów, co potwierdzają prezentowane wyniki badań własnych, które dotyczą leczenia trychofitozy u młodych królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* przy użyciu szczepionki Alopecvac (6, 7, 12, 13, 15, 18). Do oceny stanu czynnościowego granulocytów oraz zachowania się subpopulacji limfocytów T i B u królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* i poddanych wakcytacji została użyta metoda cytometrii przepływowej (3, 16). Stwierdzono, że kinetyka kształtowania się odpowiedzi immunologicznej u królików zakażonych *T. mentagrophytes* była związana z obecnością klinicznych objawów choroby. Statystycznie istotny spadek aktywności fagocytarnej i bójczej granulocytów oraz odsetka limfocytów o fenotypie CD3, CD4 i CD25 u królików w okresie w pełni rozwiniętych objawów klinicznych świadczy o supresji odporności komórkowej wywołanej wzrostem odsetka limfocytów supresorowych TCD8<sup>+</sup>, przesunięciem profilu immunologicznego na korzyść komórek Th2 oraz niewłaściwym stosunkiem limfocytów CD4 : CD8, a także obecnością grzyba w zmienionej chorobowo skórze i jego bezpośrednim hamującym wpływem na limfocyty pomocnicze Th1

wytwarzające cytokiny biorące udział we wspomaganiu swoistej odporności komórkowej (1, 2, 5, 8).

W okresie samoistnego ustępowania zmian grzybiczych w grupie królików tylko zakażonych *T. mentagrophytes* występowała dość ścisła korelacja pomiędzy wielkością odsetka i wzajemnej proporcji limfocytów TCD4<sup>+</sup> i CD8 oraz odsetka limfocytów TCD4<sup>+</sup> posiadających cząsteczkę powierzchniową CD25<sup>+</sup>. Można sądzić, że aktywacja limfocytów przez swoisty antygen jest bezpośrednim dowodem, że samoistne ustępowanie zmian grzybiczych u królików związane jest z nasileniem się swoistej odpowiedzi komórkowej, która jest stymulowana przez immunologiczne mechanizmy systemowe. Stymulowane przez *T. mentagrophytes* mechanizmy obronne typu komórkowego przyczyniają się do eliminacji zdolnych do namnażania elementów grzybiczych ze skóry i w efekcie do wygaśnięcia czynnego procesu chorobowego (5, 10, 19).

U królików zakażonych doświadczalnie *T. mentagrophytes* zastosowanie wakcytacji w okresie najbardziej nasilonych zmian grzybiczych spowodowało szybsze zanikanie klinicznych objawów i wygasanie trychofitozy w porównaniu do zwierząt tylko zakażonych *T. mentagrophytes* (grupa II). Aplikacja szczepionki Alopecvac królikom grupy I spowodowała istotny wzrost wskaźników aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów w porównaniu do zwierząt grupy II oraz kontroli, co świadczy o silnej stymulacji komórkowych mechanizmów odporności nieswoistej. Procent komórek fagocytujących lub pobudzonych oraz wartości średniego kanału fluorescencji u królików zakażonych i poddanych wakcytacji utrzymywały się na wyższym w porównaniu do królików tylko zakażonych *T. mentagrophytes* poziomie w każdym terminie badań, co wskazuje na indukcję odpowiedzi układowej. W ostatnim dniu badań stwierdzono najwyższe wskaźniki aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego w toku całego doświadczenia. W tym samym terminie oznaczeń zanotowano natomiast najniższy i istotny spadek odsetka limfocytów TCD8<sup>+</sup>. Można przypuszczać, że okres wygasania procesu chorobowego jest związany z rozwojem swoistej odporności komórkowej uwarunkowanej dominacją limfocytów typu CD4<sup>+</sup> (Th1) i zwiększonego stosunku limfocytów CD4 : CD8 (9, 11, 14, 16).

Użyta w badaniach własnych inaktywowana szczepionka Alopecvac uruchamiała głównie komórkową odpowiedź immunologiczną typu Th1, o czym świadczy istotny wzrost w grupie królików zakażonych i poddanych wakcytacji odsetka limfocytów T posiadających cząsteczkę CD3, CD4 i CD25 oraz stosunku limfocytów TCD4<sup>+</sup> do TCD8<sup>+</sup> w porównaniu do królików tylko zakażonych *T. mentagrophytes*. Dane te stanowią potwierdzenie opinii wielu autorów, iż pożądaną cechą szczepionki przeciwgrzybiczej po jej zastosowaniu jest uruchomienie głównie odporności

komórkowej związanej z rozwojem profilu Th1, w słabym natomiast stopniu indukowanie odpowiedzi humoralnej (4, 14, 16).

Wzrost wskaźników odporności komórkowej u królików grupy I następował już w trakcie stosowania wakcynoterapii, z tym że uzyskane w tym czasie wartości były istotnie niższe niż w okresie zdrowienia i w pierwszych dniach po wyleczeniu trychofitozy. Można sądzić, że aplikacja szczepionki Alopecac zawierającej wysoce immunogenne szczepy *T. mentagrophytes* i *T. verucosum* spowodowała zniesienie stanu immunosupresji u królików z doświadczalną trychofitozą w wyniku aktywacji limfocytów Th1 warunkujących rozwój protekcyjnej odporności przeciwgrzybiczej. W momencie zanikania klinicznych objawów choroby oraz całkowitego wyleczenia średnie wartości limfocytów CD4 i CD25 osiągały najwyższe wartości przez cały okres prowadzonej obserwacji. Fakt ten można tłumaczyć eliminacją z ognisk chorobowych grzyba wywierającego hamujący wpływ na swoistą komórkową odpowiedź immunologiczną oraz dominacją w tym czasie profilu immunologicznego typu Th1 (najwyższy odsetek limfocytów CD4<sup>+</sup>).

Reasumując należy stwierdzić, że w przebiegu doświadczalnej trychofitozy królików dochodzi do supresji komórkowych mechanizmów odporności nieswoistej i swoistej, na co wskazuje spadek aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów, limfocytów CD3, CD4 i CD25 przy jednoczesnym wzroście odsetka limfocytów supresorowych CD8 w okresie w pełni rozwiniętych objawów klinicznych. W terapii trychofitozy królików celem przywrócenia zaburzonych mechanizmów odporności przeciwgrzybiczej i przyspieszenia ustępowania zmian grzybiczych z powodzeniem może być stosowana szczepionka Alopecac.

## Piśmiennictwo

1. Calderon R. A., Hay R. J.: Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis. II. Adoptive transfer of immunity to dermatophyte infection by lymphoid cells from donors with acute or chronic infections. *Immunology* 1984, 53, 465.
2. Dahl M. V.: Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1993, 28, 19-23.
3. Deptuła W., Kostrzewa A., Stosik M., Tokarz-Deptuła B., Wiktorowicz K.: Subpopulacje limfocytów krwi obwodowej u królików. *Nowiny Lekarskie* 1998, 67, 377-382.
4. Grappel S. F., Bishop C. T., Blank F.: Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. *Bacteriol. Rev.* 1974, 38, 222-250.
5. Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K.: Odczyn immunologiczny w grzybicach skórnych zwierząt. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 709-714.
6. Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K., Gacek L., Krakowski M.: Szczepionka Alopecac w profilaktyce i terapii trychofitozy królików. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 816-820.
7. 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.
8. Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K., Nozdryn-Plotnicki Z.: Odporność przeciwwakalna skóry. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 655-660.
9. Kostro K., Wojcicka-Lorenowicz K., Leśniewska K., Madany J., Majer-Dziedzic B.: Cytometryczna ocena aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów krwi obwodowej królików z przewlekłą trychofitozą. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 423-426.
10. Pier A. C., Ellis J. A., Mills K. W.: Development of immune response to experimental bovine *Trichophyton verrucosum* infection. *Vet. Dermatol.* 1993, 3, 131-136.
11. 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.
12. Rybnikar A., Chumela J., Vrzal V., Nepereny J.: Vaccination of rabbits against trichophytosis – An experimental study. *Acta Vet. Brno* 1998, 67, 121-125.
13. Sarkisow A. H., Nikiforow L. I.: Specyficzekskaja profilaktika trichofitii pusznych zwierz. *Veterinarija* 1981, 7, 37-38.
14. 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.
15. Wawrzkiwicz J., Wawrzkiwicz K., Sadzikowski Z.: Monowalentna i skojarzona szczepionka inaktywowana w profilaktyce trychofitozy lisów hodowlanych. *Medycyna Wet.* 1991, 47, 317-322.
16. Wojcicka-Lorenowicz K.: Profil odpowiedzi immunologicznej królików zakażonych *Trichophyton mentagrophytes* i u królików szczepionych. *Praca doktorska.* Lublin 2006.
17. Wołoszyn S., Umiński M.: Aktywność serologiczna i alergiczna trychofityn natywnych oraz oczyszczonych. *Medycyna Wet.* 1985, 41, 394-398.
18. Wołoszyn S., Andrychiewicz J., Kostro K., Winiarczyk S., Grądziński Z.: Skuteczność szczepionek w zwalczaniu grzybic skórnych królików. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 518-524.
19. Woodfolk J. A., Platts-Mills T. A. E.: The immune response to dermatophytes. *Res. Immunol.* 1998, 149, 436-445.

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