

612.112.3:612.017.1

STUDIUM FAGOCYTÓZY JAKO MECHANISMU NESPECIFICKÉ PROTIINFEKČNÍ ODOLNOSTI

Plk. MUDr. Josef VANČUŘÍK, RNDr. Miroslav ŠVEC

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie Praha

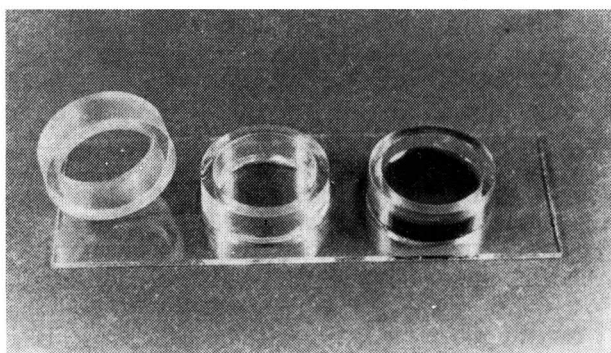
(náčelník: plk. MUDr. Vladimír Kotlář, CSc.)

Imunologie v armádních podmínkách musí být schopna vyšetřit a testovat protiinfekční imunitu, jejíž úroveň může být u různých jedinců odlišná a může i značně kolísat vlivem zevních činitelů. Výrazným mechanismem nespecifické ochrany proti infekci je fagocytóza. Práce současné doby ukazují stále názorněji velkou komplexnost fagocytózy. Jde jednak o fagocytózu granulocytů, která se uplatňuje spíše v lokálních procesech, a fagocytózu retikuloendotelovým systémem jater, sleziny a plic, jež má rozhodující podíl na očistě krevního řečiště. Oba systémy jsou však stejně vnímavé na tyto noxy, takže vyšetření fagocytární funkce granulocytů poskytuje vesměs i informaci o funkci RESu, s výjimkou speciálních případů (myelózy apod.). Fagocytóza má však velmi úzké propojení s humorálními faktory, mimo jiné s komplementem, a stává se tak multifaktórovým jevem. Pokrok v této oblasti však naráží mimo jiné i na možnosti technické a metodické. Snažíme se proto přistupovat k vyšetření fagocytární funkce komplexně, tj. vypracovat a využít vhodné nové metody, které by dávaly před-

poklady k dalšímu hlubšímu studiu podmínek a okolností, které se při fagocytóze spoluúčastní. Takovou novou metodou, kterou jsme vypracovali, je sklíčkový test.

Metodika

Na podložní sklíčko se silikonovou vazelínou fixuje kroužek z plexiskla a do takto vzniklé komůrky se nechá stéci krev vyšetřované osoby. Po její koagulaci se prstének a k němu fixované koagulum sejme, takže zůstává vrstva buněk adherovaných na skle, složená z neutrofilních granulocytů (85—95 %) a monocytů (10—15 %). Jiné buňky nejsou přítomny. Po opláchnutí se vazelínou připevní nový kroužek a do takto vzniklé komůrky se instiluje 0,2 ml zkoušeného séra a 0,2 ml suspenze kadmiumalbuminových krystalů podle Palisy (2). Krystaly vzhledem ke své tíži rychle sedimentují, a dostávají se tak do těsného kontaktu s fagocyty. S komůrkou není třeba nijak manipulovat. Po půlhodinové inkubaci při 37 °C, fixaci a obarvení se hodnotí procento fagocytujících buněk,



Obr. 1 Prstenec z plexiskla, komůrka prázdná a naplněná krví

ev. i fagocytární index. Počet adheovaných leukocytů je značně stabilní a řádově se nemění. Potřeby pro tento test jsou na obr. 1.

Metoda má dvě přednosti:

1. Umožňuje práci s čistými leukocyty, bez příměsí lymfocytů, které lze v ostatních metodách často jen nesnadně odlišit a jež mohou zkreslit výsledek.

2. Umožňuje kombinovat plně vitální fagocyty s různými typy sér, nebo naopak, a odlišit tak podíl séra a buňky na výsledné fagocytóze.

Výsledky

Při zavádění metody jsme zprvu dostávali někdy značně rozkolísané výsledky. Nešlo však o technickou vadu, a protože kadmiumalbuminové krystaly jsou neantigenní, neuplatňoval se ani vliv protilátek. Zůstává však možnost stimulace fagocytózy termolabilními nespecifickými opsoniny uvolněnými z komplementu, zejména z jeho složky C3. Abychom omezili aktivaci komplementu při venepunkci, zavedli jsme standardizovaný odběr krve pro fagocytózu — jehlou č. 10 do skleněné zkumavky a oddělení koagula vždy po půlhodině stání při laboratorní teplotě. Sérum se dále skladuje při -20°C . Kromě toho používáme u kontrolních pokusů standardní inaktivované sérum zdravého dárce. Označujeme je jako NLS.

Některé práce dokazují snížení aktivity fagocytů za určitých okolností (1), jiné naopak popisují v určitých klinických syndromech stimulaci fagocytózy (3). Provedli jsme proto pokusy, které měly objasnit podmínky obou krajních jevů.

Depresi fagocytózy jsme studovali u dvou králíků při použití jejich vlastních leukocytů a standardního inaktivovaného králíčího séra. Současně jsme použili dvou různých koncentrací kadmiových krystalů. Králíci potom dostávali denně 20 mg cyklofosfamidů, celkem 10 dávek. Potom byla opět vyšetřena fagocytóza. Výsledky jsou v tabulce 1. Z tabulky plyne, že snížení fagocytózy u pokusných zvířat lze nejspíše prokázat u těch kvant fagocytovaných objektů, která dávají vysokou počáteční fagocytózu, a při použití indiferentního séra, které činnost leukocytů nijak nemodifikuje.

Za účelem průkazu stimulace fagocytózy jsme použili séra pacientů B. V. (hairy cells leukemia) a M. E. (melanom). Při vyšetření těchto sér jsme naopak k fagocytóze použili leukocyty zdravého dárce a provedli ji opět s dvěma různými koncentracemi kadmia. V kontrolních pokusech bylo použito normální lidské sérum (NLS — viz výše). Výsledky jsou v tabulce 2.

Tab. 1

Fagocytóza u 2 králíků před a po aplikaci cyklofosfamidů (průměrné hodnoty)

Koncentrace kadmiových krystalů	Fagocytóza před pokusem (=kontrola)	Fagocytóza po cyklofosfamidů	Snížení fagocytózy oproti kontrole
2000/mikrolitr	29 %	27 %	93 %
6000/mikrolitr	74 %	43 %	58 %

Tab. 2

Stimulační účinek dvou vybraných sér na fagocytózu

Koncentrace kadmiových krystalů	Fagocytóza s NLS	Fagocytóza se sérem B. V.	Fagocytóza se sérem M. E.	Zvýšení fagocytózy oproti kontrole s NLS (=100 %)
2000/mikrolitr	24,5 %	49,5 %	50 %	200–200
6000/mikrolitr	57 %	58 %	62 %	100–108

Z obou tabulek plyne, že stimulaci fagocytózy lze nejnázat dokázat při nízkých dávkách fagocytovaného objektu, depresi fagocytózy naopak při vyšších kvantech krystalů. Je však třeba vhodně kombinovat vyšetřované buňky a sérum. Metoda s NLS a vyššími kvanty fagocytovaného objektu je velmi citlivá pro průkaz depresi fagocytózy, a lze tak snadno prokázat snížení aktivity leukocytů po řadě léků, např. i antibiotických tetracyklinové skupiny. Tyto poruchy jsou však jenom dočasné a po vysazení léků se velmi rychle reparují.

Fagocytózu u nemocných proto vyšetřujeme ve třech kombinacích: leukocyty nemocného a NLS s vyššími dávkami kadmiových krystalů — lze tak velmi dobře sledovat depresi fagocytárních funkcí. Dále sérum nemocného a dárce — leukocyty s nízkou dávkou krystalů. V této kombinaci lze velmi dobře prokázat vystupňování fagocytózy. V třetí kombinaci posuzujeme fagocytózu leukocytů nemocného v prostředí jeho vlastního séra. Tímto způsobem lze postihnout všechny základní komponenty fagocytózy.

Stimulační účinek séra pozorujeme často u nádorových a zánětlivých onemocnění. Studujeme možnost využít tohoto jevu v diagnostice a monitorování nemocných. Objasnění jeho podstaty by však přispělo i k bližšímu poznání mechanismů přirozené rezistence.

Demonstrujeme zde jeden typický příklad:

Nemocný S. F. (melanom, léčen DTIC)

1. kontrola:	vlastní leuko, norm. leuko,	Cd 6000/mikrolitr Cd 6000/mikrolitr	NLS NLS	fagocytóza 35 % 45 %
2. kontrola:	norm. leuko, norm. leuko,	Cd 2000/mikrolitr Cd 2000/mikrolitr	NLS vlastní sérum	25 % 56 %
3. kontrola:	vlastní leuko,	Cd 2000/mikrolitr	vlastní sérum	52 %

Při vyšetření by se mohlo zdát, že jde o normální fagocytózu. Ale funkce leukocytů je snížena, patrně vlivem léčby. Tento defekt je však částečně kompenzován stimulačním účinkem vlastního séra při nádorovém onemocnění.

Souhrn

Byla zavedena nová metoda testování fagocytózy na podložním sklíčku, která dává informativní obraz o obou základních komponentách fagocytózy — stavu buněk i podílu sérových faktorů. Zkušenosti z vyšetřování nemocných ukazují v některých případech rychle se

měníci dynamiku fagocytární aktivity, a vytyčují tak nutnost opakovaného vyšetřování.

Literatura

1. Kašík, J. - Kočandrl, V. - Hašková, V.: Některé možnosti objektivního hodnocení imunosuprese u pacientů po transplantaci ledvin. Prakt. Lék., 59, 1979, s. 297 až 301.
2. Palisa, V.: Metodika fagocytární aktivity in vitro. Imunologický zpravodaj, 9, 1978, č. 1, s. 42—44.
3. Palisa, V.: Přirozená odolnost u starých lidí. Čas. Lék. čes., 117, 1978, s. 118—120.

Klíčová slova: Fagocytóza; Modifikace na podložním sklíčku.