

**NAŠE MODIFIKACE TESTU LYMFOBLASTICKÉ TRANSFORMACE A JEJÍ DIAGNOSTICKÉ VYUŽITÍ**

RNDr. Miroslav ŠVEC

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie Praha

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

Metoda blastické transformace zkoumá efektorovou část buňkami zprostředkované imunity. Malý periferní lymfocyt je možné považovat za odpovídající buňku, která má na svém povrchu receptory imunoglobulinové povahy. Jestliže je buňka aktivace schopná, naváže se antigen na příslušný receptor a v lymfocytu se začne odehrávat řada charakteristických reakcí, při kterých se aktivují metabolické procesy, především pak tvorba nukleových kyselin RNK, později DNK. Projevem je změna morfolgie malého lymfocytu na blastoidní buňku s velkými nukleoly a intenzívně basofilní cytoplasmou.

Takováto stimulace lymfocytu probíhá pomocí různých antigenů specifických, ale i nespecifických, to znamená, že aktivace probíhá nezávisle na antigenní kompetenci těchto polyclonálních aktivátorů, mezi něž se na první místo řadí fytohemaglutinin ze semen *Phaseolus vulgaris*, běžně nyní užívaný ke stimulaci lymfocytů *in vitro*. Je to povahou lektin vážící se na glykoproteiny povrchu lymfocytů a vyvolává řadu metabolických změn uvnitř buňky, především zvýšení syntézy proteinů RNK a DNK, kterou provází právě morfologická změna lymfocytu v lymfoblast. Blastická transformace lymfocytů sledovaná *in vitro* je vhodným modelem pro sledování a studium schopnosti organismu odpovídat na buněčné úrovni na antigenní podnět. Použitím nespecifické stimulace, popř. uvedeným fytohemaglutininem, což provádí naše pracoviště, se odpověď v procesu *in vitro* zvyrazňuje tak, že pod jeho účinkem reaguje blastickou transformací 70–80 % lymfocytů přítomných v kultuře.

Test blastické transformace provádíme v plné venósní, heparinizované krvi v plastické stříkačce v objemu 0,4 ml pro každou koncentraci antigenu, resp. PHA. S každou kultivací zároveň probíhá kultivace kontrolní, tj. vyšetřovaná krev bez ovlivnění antigenem.

U vzorků s PHA a kontroly, ve které je pouze médium, provádíme odečítání za 48 hodin kultivace. Po této době pořídíme nátěry na mikroskopická sklíčka a barvení i hodnocení provádíme nukleolárním testem podle Smetany. Hodnotíme nejméně 100 lymfocytů podle typu nukleolu a vyjádříme zastoupení jednotlivých typů v procentech.

Pro vlastní stanovení aktivace lymfocytů periferní krve fytohemaglutininem užíváme preparát Phytohemaglutinin M v koncentraci 30 a 15  $\mu\text{g/l}$  ml média. Během kultivace krevních buněk provádíme denní výměnu kultivačního

média samotného u kontrol a s příslušnou koncentrací PHA u vzorků.

Normální hodnoty pro koncentraci PHA 30  $\mu\text{g/l}$  ml jsou 52–70 % blasticky transformovaných lymfocytů, pro poloviční koncentraci 36–70 %. Kontrola vykazuje 0–6 % blastů. Normální hodnoty byly získány a opakováním prověřeny testem s krví 20 zdravých dárců. Předností této modifikace testu je, že pracujeme s plnou krví, takže se mohou v reakci uplatnit i sérové faktory, metoda je materiálně nenáročná, a tedy dobře proveditelná i na pracovištích s minimální laboratorní výbavou a použitím Smetanova testu při hodnocení je výsledek stanovení dokonce o jeden den dříve než při použití metody inkorporace thymidinu.

V naší laboratoři jsme provedli od března 1981 celkem 175 vyšetření aktivity T-lymfocytů testem lymfoblastické transformace ve prospěch pacientů kožního, infekčního a interních oddělení ÚVN.

Snížení aktivity lymfocytů jsme našli ve 112 případech, tj. 64 % a 63 vyšetření, tj. 36 % s hodnotami v normálu. Diagnózy, u kterých jsme našli sníženou aktivitu T-buněk, se dotýkají převážně případů provázených příznaky imunologické nedostatečnosti v oblasti kožních, infekčních a nádorových onemocnění.

Pro ilustraci a poučení zde uvádíme vlastní zkušenosti s případy, kdy vyšetření blastické transformace výrazně přispělo k diagnózám nebo průběžnému monitorování stavu pacienta a k rozhodování nebo kontrole terapie. Nejpočetnější skupina (75 vyšetření) imunodeficiencí spojených se stavy po různých infekčních chorobách byly: recidivující herpes, chronická toxoplasmóza, recidivující pneumonie a angíny, únavový syndrom doprovázený opětovnými infekcemi, recidivující infekty horních cest dýchacích, uzlinový syndrom. Do této oblasti patří naše studie prováděná pod patronací 3. vnitřního oddělení ÚVN při objasňování subfebrilních stavů nejasné etiologie u hospitalizovaných vojáků základní služby. Snížené hodnoty lymfoblastické transformace (včetně jejích známek imunodeficiency, např. protilátkových) jsou v této skupině velmi časté. Tato práce je předmětem sdělení na konferenci vojenských internistů v Brně v říjnu 1982.

U chorob dermatologických (64 případů) jsme našli, ve shodě s literaturou, snížené hodnoty transformace u rubroficií a také u difúzních alopecií. U alopecií byl tento náález indikací pro léčbu levamisolem, jež vesměs vedla

ke značnému zlepšení nemoci. V jednom případě maligní erythrodermie bylo vyšetření blastické transformace indikací k přerušení imunosupresivní léčby a k navození naopak léčby imunostimulační, jež vedlo prakticky k vyhojení choroby.

Byli jsme požádáni i o vyšetření blastické transformace u hemodialýz prováděných při léčení těžkých psoriáz. Neprokázáli jsme žádné změny v blastické transformaci.

Další skupina představuje onemocnění nádorová, neléčená i léčená chirurgicky nebo cytostatiky, především u melanomu a basaliomů (počet 24 vyšetření). Výrazně pomohlo vyšetření blastické transformace v nepřímé diagnostice Hodgkinovy choroby a několika případů lymfadenóz. U nádorových chorob nám blastická transformace pomohla při optimálním střídání cytostatické a imunostimulační léčby transferfaktorem.

Dále jsme provedli 12 vyšetření blastickou transformací u několika chorob ledvinných (glomerulonefritis, nefrotický syndrom), purpury, alergie na AMP a jiných. Zároveň jsme u vyšetřovaných pacientů sledovali krevní obraz, zejména údaj o počtu lymfocytů, a prak-

ticky ve shodě s údaji literárními jsme nacházeli poruchu buněčné imunity tam, kde absolutní počet lymfocytů klesal pod hranici 1500/ $\mu$ l krve.

Při počtu lymfocytů nad 1500 jsme našli v 10 případech ze 34 blastickou transformaci sníženou a ve 24 případech hodnotu normální.

### **Závěr**

Metoda provádění blastické transformace v plné krvi umožňuje provedení testu bez časově náročné separace lymfocytů. Nedochází ani k poškození nebo ovlivnění membránové výbavy lymfocytů, což žádná separační technika nezaručuje, a i přítomnost monocytů je pro imunitní reakci prospěšná. Vyšetření funkční schopnosti lymfocytů testem blastické transformace je vhodné jako příspěvek k diagnostice pacienta. Značného významu nabývá test prováděný u pacientů s imunologickou nedostatečností kde se jedná o zahájení léčby levamisolem, resp. dekarisem, nebo transferfaktorem a kontrolu této terapie průběžným monitorováním.

Literatura u autora.

Klíčová slova: Blastická transformace.