

612.112.94:612.017.1:616-071-074-078

ZÁKLADNÍ IMUNOLOGICKÁ LABORATORNÍ VYŠETŘOVÁNÍ V KLINICKÉ DIAGNOSTICE. II. BUNĚČNÁ IMUNITA

Kpt. MUDr. Tomáš VOTRUBA, CSc., MUDr. Miroslav ŠVEC,
plk. MUDr. Přemysl RÁKOSNÍK

Oddělení klinické a experimentální imunologie Vojenského ústavu hygieny,
epidemiologie a mikrobiologie, Praha
(náčelník: plk. MUDr. Vladimír KOTLÁŘ, CSc.)

V první části našeho odborného sdělení jsme se zabývali imunitou humorální. Shrnuli jsme několik základních metodik, které je možno využít pro její kvantitativní a kvalitativní posouzení. V případě imunity zprostředkované buňkami (buněčné imunity) je náš úkol obtížnější. Vzhledem k tomu, že zkoumané objekty (T- a B-lymfocyty) jsou komplexní a jsou ovlivněny celou řadou faktorů, je také posouzení jejich stavu náročnější a komplikovanější. Přestože existuje řada různých metod a nepřehrné množství modifikací jednotlivých technik pro vyšetřování počtu a funkčního stavu lymfocytů, v rámci Světové zdravotnické organizace (WHO) nejsou dosud všechny metody ujedno-

ceny. A protože jsme si vytkli za cíl informovat o mezinárodně uznávaných a standardizovaných technikách, bude náš výčet podstatně stručnější, než v případě humorální imunity.

Určování T- a B-lymfocytů

Výhodou buněk lymfoidních populací je, že mají na svém povrchu určité znaky, pomocí kterých je možno je charakterizovat. Důležitou součástí techniky charakterizace je izolace vlastních buněk. Většinou se jako zdroj používá periferní krev. Ta je podrobena diferenciální centrifugaci ve vhodném gradientu. Nejčastěji se používá Ficoll-Isopaque, případně vhod-

ná náhražka (u nás např. Verografin). Takto získané preparáty mohou obsahovat určité množství monocytů, které je třeba odlišit od lymfocytů. Důležité je, aby připravené buňky byly čerstvé, protože časová prodleva může významně ovlivnit buněčné povrchové charakteristiky.

Určování T-lymfocytů

V současné době se doporučují dvě metody pro detekci T-buněk, a to tvorba tzv. E-rozet (pomocí ovčích erytrocytů) a použití monoklonálních protilátek specifických pro povrchové markery T-lymfocytů.

Tvorba E-rozet je nejrozšířenější metodou. Přesto různé laboratoře udávají značnou variabilitu v procentu E-rozet u normální populace, i když byla technika značně zlepšena a standardizována. Důležitými faktory, které mohou výsledky značně ovlivnit, jsou zdroj ovčích erytrocytů, jejich konzervace, přítomnost malého množství séra (fetální telecí nebo lidské AB sérum), vlastní příprava rozet. Při tvorbě rozet mohou interferovat za určitých podmínek např. protilátky proti určitým povrchovým buněčným znakům, nebo lipoproteiny mechanismem kompetice s ovčími erytrocyty. Vliv těchto látek je možno potlačit krátkou dobou udržování (do 18 hodin) buněk v kultuře.

Specifická antiséra proti povrchovým znakům T-lymfocytů se stále více uplatňují pro detekci T-buněk v periferní krvi i v lymfoidních orgánech. Protilátky jsou namířeny proti E-receptorům nebo proti jiným membránovým determinantám T-lymfocytů. Nejčastěji se používají metody nepřímé fluorescence, spíše než metoda cytotoxicity, která je méně přesná. Analogicky je samozřejmě možno detekovat pomocí monoklonálních protilátek i subpopulace T-buněk.

Určování B-lymfocytů

Nejvhodnějším povrchovým znakem B-lymfocytů je povrchový membránový imunoglobulin (SmIg). Ten se dá zviditelnit protilátkou označenou vhodným fluorochromem. Nejlépe je používat protilátku vytvořenou proti F_{ab} fragmentu, anebo směs protilátek proti lehkým řetězcům kappa a lambda. Takové protilátky jsou komerčně k dispozici; je však třeba pečlivě prověřit specifitu takových protilátek. Tato metoda má i své nevýhody: možnost autologní vazby F_c receptorů (tomu se dá předejít užitím značeného $F(ab)_2$ fragmentu protilátky proti SmIg), možnost interference autologně reagujících antilymfocytárních protilátek, což vede k pozitivní povrchové reakci u jinak SmIg negativních buněk, problémem je specifita a validita používané protilátky, případná přítomnost monocytů. Vedle fluorochromového značení protilátky je možno použít i enzymy (peroxidázu), izotopy nebo erytrocyty.

Výhodnější technikou je jako u T-lymfocytů použití monoklonálních protilátek proti povrchovým znakům membrán B-lymfocytů. Stejně lze určovat i subpopulace B-buněk.

Na povrchu B-lymfocytů byla popsána celá řada znaků membrán. Většina z nich (např. receptory komplementu a receptor pro F_c fragment) však není pro B-lymfocyty specifická. Proto se také nedoporučuje tvorba EAC-rozet.

Stanovení počtu T- a B-lymfocytů je nutné při diagnóze a sledování primárních imunodeficiencí a je užitečné při diagnostice sekundárních imunodeficiencí a klasifikaci lymfoproliferativních poruch. Toto vyšetření se také provádí u řady inekčních onemocnění, u autoimunitních poruch a nelymfoidních maligních onemocnění, i když nebyla většinou v těchto případech prokázána jeho jednoznačná klinická hodnota.

Vyšetřování buňkami zprostředkované imunity

Sledování buňkami zprostředkované (buněčné) imunity je možno provádět in vivo nebo in vitro. Vyšetřuje se pozdní kožní přecitlivělost na dva anebo raději na několik běžně se vyskytujících antigenů (streptokináza, streptodornáza, tuberkulin, trichophyton, candida, toxoplasma a další). Provedení těchto tzv. kožních testů by mělo být prvním stupněm vyšetření buněčné imunity. Až v další fázi by se měla vyšetřovat odpověď lymfocytů na určité mitogeny (lymfoblastická transformace), případně odpověď na některé cizorodé antigeny nebo alloantigeny.

Opět prvou fází stanovení je izolace vhodných buněk z periferní krve. Používá se zcela analogických metod zmíněných v odstavci o určování T- a B-lymfocytů. Jako mitogeny se používají fytohemagglutinin (lektin) z Phaseolus sp., konkanavalin A (Con A) z Canavalia ensiformis nebo pokeweed mitogen (lektin) z Phytolacea americana. První dva jsou především mitogeny T-lymfocytů, zatímco pokeweed je stimulátorem T- a B-lymfocytů. Vedle těchto se používají i některé jiné materiály. Vyhodnocování proliferativní odpovědi lymfocytů na tyto mitogeny se provádí buď morfologicky optickým mikroskopem, nebo lépe sledováním nárůstu aktivity 3H -thymidinu v buňkách. První metoda je nenáročná co do vybavení, ale je pracovní velmi náročná a není možno ji provádět ve velkých sériích. Druhá metoda má však také určité nevýhody. Je nutné velmi přesně sledovat podmínky kultury buněk, standardizovat činidla, kontrolovat počet buněk v kultuře (včetně koncentrace monocytů). Vzhledem k velké variabilitě výsledků je bezpodmínečně nutné používat normální kontroly. Tyto kontroly by měly zahrnovat jak kontrolu rozptylu paralelně získaných výsledků, tak sériových měření aktivity. Výsledky se pak mohou vyjadřovat pomocí relativního indexu pro-

liiferace, který zahrnuje i již zmíněné faktory. Svůj význam mají také závislosti proliferace na množství mitogenu, protože užití nízkých koncentračních mitogenů může mít význam při sledování některých onemocnění, jako např. některých imunodeficiencí.

Při vyhodnocování proliferativní odpovědi je také třeba vyšetřovat úroveň pozadí, které může ovlivnit konečný výsledek. Proto je někdy výhodné kultivovat buňky přes noc před přidáním mitogenu; tímto způsobem se pak dá vysvětlit pokles proliferativní odpovědi vlivem inhibičních faktorů. Vyšetřování blastické transformace lymfocytů není v žádném případě indikováno jako rutinní použití. Je třeba ho užívat jen v odůvodněných případech. Důležité je také si uvědomit, že abnormální výsledek z jedné izolace buněk je klinicky bezcenný a nemusí být nutně projevem poruchy buněčné imunity. Vyšetřování buněčné imunity je nutné u podezření nebo u prokázané primární imunodeficiency. Vyšetřování je také důležité v diagnostice sekundárních imunodeficiencí, včetně deficiencí souvisejících s chronickými infekcemi, u monitorování a vyhodnocování aplikace imunostimulační terapie. Užitečné je také u chorob s možnou poruchou imunitní funkce, jako jsou autoimunitní choroby a neoplastická onemocnění, a také u sledování účinku imunosupresivních látek.

Stručný přehled naznačuje, že techniky zjiš-

ťování buněčné imunity nejsou dosud dostatečně standardní a jejich účelné použití je omezeno především na imunodeficientní stavy.

Souhrn

Práce stručně shrnuje některé technické podmínky provádění dvou základních metod vyšetřování buněčné imunity — vyšetřování počtu T- a B-lymfocytů a lymfoblastické transformace. Jsou uvedeny i klinické stavy, kdy je nutno vyšetření indikovat.

Literatura

1. BLOON, B. R. - DAVID, J. R. (eds.): In vitro methods in cells mediated and tumor immunity. 1. vyd. New York, Academic Press 1976.
2. THOMPSON, R. A.: Techniques in clinical immunology. 2. vyd. Oxford, Blackwell Scientific Publications 1981.
3. Use and abuse of eight widely used diagnostic procedures in clinical immunology: a WHO memorandum. Bull. WHO, 59, 1981, s. 717—728.
4. MACKAY, I. R. - RITTS, R. E.: WHO handbook of immunological techniques. Nepublikovaný dokument WHO, WHO (Imm. Tech.) 79. 1, Ženeva 1979.
5. ROSE, N. R. - FRIEDMAN, H.: Manual of clinical immunology. 1. vyd., Washington, American Society for Microbiology 1980.

Klíčová slova: Zjišťování počtu T- a B-lymfocytů; Lymfoblastická transformace; Indikace imunologických vyšetření.