Magyar Reumatológia 27. 15—21. 1986.

A Debreceni Orvostudományi Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika (igazgató: Szegedi Gyula dr.) közleménye

Rheumatoid arthritises betegek monocita-makrofág funkciójának alakulása in vitro tenyésztés során

ZEHER MARGIT dr., KÁVAI MÁRIA dr., LUKÁCS KATALIN dr., TAMÁSI LÁSZLÓ dr. és SZEGEDI GYULA dr.

ÖSSZEFOGLALÁS: Rheumatoid arthritises (RA) betegek monocitáit tenyésztették a szerzők in vitro körülmények között. Vizsgálták a kultúra indításakor a monociták élesztő fagocitózisát, C3b receptor funkcióját (opszonizált élesztő fagocitózis) és kemotaxisát. Ismételt vizsgálat a tenyésztés ötödik napján történt. Megállapítják, hogy a frissen szeparált sejteknél észlelhető szignifikáns fagocitózis és kemotaxis csökkenés a tenyésztés előrehaladtával javul. A sejtek aktív migrációja az ötödik napra a kontroll értékét eléri. Az élesztő fagocitózis a kontrollértéktől szignifikánsan alacsonyabb marad. A monociták irányított motilitásának javulása az in vivo érvényesülő gátló faktorok (immunkomplexek, monocita ellenes antitestek) hatásának megszünésére utalhat. A kontrollértéktől szignifikánsan alacsonyabb élesztő fagocitózis azonban a sejt funkciójának olyan irányú károsodására utalhat, melynek esetleg in vivo következményeivel feltétlenül számolni lehet.

Зехер М., Каваи М., Лукач, К., Тамаши Л., Сегеди Дь.: *Образование моноцито-макрофагоцитарной функции у больных РА при выращивании* in vitro

Авторы выращивали моноциты больных РА in vitro. В начале выращивания культуры исследовали фагоцитоз моноцитами дрожжей, функцию рецептора C_3B (фагоцитоз опсонированных дрожжей) и хемотаксис. Повторное исследование проводили на пятый день выращивания. Установили, что в процессе выращивания улучшается обнаруженное сигнификантное уменьшение фагоцитоза и хемотаксиса свежеепарированных клеток. На пятый день активная миграция клеток достигает контрольного уровня. Фагоцитоз дрожжей остался значительно ниже контрольного уровня. Улучшение управляемой мотиляции моноцитов указывает на прекращение, действующих in vivo тормозящих факторов (иммунокомплексы, антимоноцитарные антитела). Тем не менее, значительно замедленный по сравнению с контрольной группой фагоцитоз дрожжей указывает на такого рода повреждение функции клеток, на последствие которого может быть нужно расчитывать in vivo.

Margit Zeher, Kávai Mária, Katalin Lukács, Tamási, L., Szegedi, Gy.: *Changes in Monocyte and Macrophage Functions in Rheumatoid Arthritis during In Vitro Culturing*

The authors have cultured monocytes of rheumatoid arthritis (RA) patients in vitro. At the beginning they measured yeast phagocytosis, C3b receptor function (opsonized yeast phagocytosis) and chemotaxis of the monocytes. Measurements were repeated on the fifth day of culturing. They found that the significant decrease of phagocytosis and chemotaxis observed in the freshly separated cells has decreased as culturing advanced. Active migration of the cells have reached the normal value by the fifth day. Yeast phagocytosis stayed significantly decreased compared to the control value. Improvement in the controlled motility of the monocytes may suggest cessation of inhibition by inhibiting factors acting in vivo (immuncomplexes, antibodies against monocytes). However, the significantly decreased yeast phagocytosis may indicate an alteration in the cell function, the possible in vivo consequences of which have to be considered by all means.

Dr. László Tamási, Dr. Maria Kávai, Dr. Katalin Lukác
Dr. Gyula Szegedi: *Die Gestaltung der Monozyt*
Makrophagen Funktion von Rheumatoid Arthritis Patienten bei in vitro Züchtung

Die Verfasser züchteten die Monozyten von Rheumatoid Arthritis (RA) Patient
unter in vitro Verhältnissen. Zu Beginn der Kultur untersuchten sie die Hefephagoz
tose der Monozyten, C3b Rezeptorfunktion (opsonisierte Hefephagozytose) und Chem
taxe. Die wiederholten Untersuchungen erfolgten am fünften Tag der Züchtung. S
stellten fest, dass eine signifikante Abnahme der Phagozytose und Chemotaxe bei d
frisch separierten Zellen zu bemerken ist, die sich mit dem Fortschreiten der Kult
bessern. Die aktive Migration der Zellen erreicht am fünften Tag die Kontrollwert
Die Hefephagozytose bleibt signifikant erniedrigt im Vergleich zum Kontrollwert. D
Besserung der gezielten Motilität der Monozyten kann auf die Einstellung der Wirkun
der in vivo zur Geltung kommenden hemmenden Faktoren (Immunkomplex, Antikö
per gegen Monozyten) hinweisen. Die zum Kontrollwert signifikant erniederigte Hef
phagazytose dagegen, kann auf eine so gerichtete Schädigung der Zellfunktion hin
weisen, mit deren eventuellen in vivo Folgen unbedingt zu rechnen ist.

Rheumatoid arthritises (RA) betegek hajlamosabbak fertőzésekre, elsősorban a bronchopulmonalis megbetegedések gyakoribbak. A szervezet védekezésében jelentős szerepet játszanak a mononukleáris fagociták.

A testidegen anyagok antigénné alakítását, valamint az antigének megfelelő formában történő prezentálását végzik, de mint effektor sejteknek is alapvető jelentőségük van az immunreakciók kialakításában, az immunkomplexek, fertőző ágensek és a károsodott sejtek eltávolításában [26, 27].

A rheumatoid arthritises betegek fokozott infekciós hajlamára választ keresve több szerző is végzett funkcionális vizsgálatokat vénás vérből szeparált monocitákkal. *Hodinka* [12] vizsgálataival a monocita Fc receptor, Eritrocita (E)-antitest (A)—EA-rozetta képzésben, élesztő fagocitózisban és az opszonizált élesztő partikulumok fagocitózisában közel élettani értékeket talált. *Carter* [3] RA-s betegek monocitáinak Fc receptor expresszió növekedését észlelte. Hasonló eredményekről számol be *Katayama* [16]. *Möller—Rasmussen* [23] vizsgálataihoz egér IgG-t mint ligandot alkalmazva előbbi szerzőkkel megegyező eredményhez jutott. *Hurst* [14] RA-s betegek monocitáinak C3 függő fagocitózisát vizsgálva a vasculitisben is szenvedő betegek esetében a fagocita funkció jelentős csökkenését észlelte. Ismertek RA-ban végzett polimorfonukleáris leukocita (PMNL) funkció vizsgálatok is. *Mowat* [22] és *Turner* [30] PMNL sejtek csökkent kemotaxisát és élesztő fagocitózisát észlelte.

Felty-szindrómás és RA-s betegek PMNL sejtjeinek kóros kemotaxisáról és élesztő fagocitózisáról több szerző is beszámol [2, 10, 11, 13].

Fearon [7] RA-s betegek PMNL sejtjeinek csökkent C3b receptor működését észlelte közvetlenül a sejtek izolálása után. *Breedveld* [1] csökkent granulocita Fc receptor aktivitást tapasztalt RA-s és Felty-szindrómás betegekből nyert PMNL sejtek szobahőn és 4 °C-on történő vizsgálata során.

A perifériás vérben megtalálható monociták a szöveti makrofágok elődjét jelentik, így felmerül a kérdés, hogy a monocitákra vonatkozó adatok mennyiben vihetők át a makrofágokra?

Jelen vizsgálatainkkal egyrészt a vénás vérből nyert perifériás monociták funkcióit vizsgáltuk in vitro, másrészt a tenyésztés adta lehetőségeket kihasználva a monocitákból kiérett makrofágok tulajdonságait is követtük ugyanazon módszerekkel. A tenyésztés körülményei között tartott monociták-makrofágok nem érintkeznek azokkal a szérum faktorokkal (autoantitestek, immunkomplexek), melyek másodlagosan hatást gyakorolnak működésükre, így jó részt az adott sejtek intrinsic funkciójára tudunk következtetni.

Monociták opszonizált élesztő fagocitózisa (C3b receptor vizsgálata)

Az egy sejtréteget képező, kitapadt monocitákat 25 μl 10^8 részecske/ml töménységű élesztő szuszpenzióval a fenti módon inkubáltuk azzal a különbséggel, hogy az élesztőt előzetesen 0,1 ml AB savóval mint opszoninnal inkubáltuk és mostuk. Az értékelés a fagocitózisnál leírtak szerint történt [17].

Monocita kemotaxis

A *Boyden* által leírt eredeti módszert módosított formában használtuk [19]. $0{,}5\times10^6$/0,5 ml monocitát helyeztünk el a kemotaktikus kamra felső részében. Kemotaktikus faktorként zimozán aktivált kevert normál szérumot alkalmaztunk, melyet a kamra alsó részébe töltöttünk be. A kiértékelés a vezérsejtek által megtett út mérésével történt. Méréseinket mindig 5 látótérben végeztük el.

A frissen szeparált és tenyésztett sejtek C3b receptor funkcióját, élesztő fagocitózisát és kemotaxis változását vizsgáltuk a tenyésztés indításakor és az 5. napon.

Eredmények

A tenyésztés indításakor vizsgáltuk a monocita szuszpenzió élesztő fagocitózisát. A vizsgálat során az RA-s betegek monocitáinak fagocita aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollcsoporthoz képest a frissen szeparált sejteknél. Fagocitózis indexben kifejezve a betegeknél $0{,}76\pm0{,}01$, kontrollcsoportban $0{,}95\pm0{,}03$.

A sejtek érése során a fagocita aktivitás is nő, makrofágok esetén magasabb index érték tapasztalható. A betegekből származó monociták, illetve makrofágok értékei azonban a kontroll eredményeket nem érik el. Az 5. napon a fagocitózis index betegek esetén $1{,}22\pm0{,}01$, a kontrollcsoportban $1{,}77\pm0{,}02$. A betegek értékei szignifikánsan alacsonyabbak a kontrollértékhez viszonyítva *(1. ábra)*.

Az opszonizált élesztő fagocitózist vizsgálva a 0. napon nem volt szignifikáns differencia a vizsgált két csoport között (beteg: $3{,}81\pm0{,}04$; kontroll: $3{,}65\pm0{,}07$). A tenyésztett sejtekkel az 5. napon ismét elvégzett opszonizáció vizsgálat során mindkét esetben a sejtek funkciójának fokozódását igazoló eredményeket kaptuk. A kontroll- és a betegcsoport eredményei szignifikáns eltérést nem mutattak (beteg: $5{,}45\pm0{,}17$; kontroll: $5{,}73\pm0{,}03$) *(2. ábra)*.

A sejtek irányított motilitásának vizsgálatakor szembetűnő volt a rheumatoid arthritises betegek monocitáinak csökkent mozgásképessége. A vezérsejtek által megtett út mérésével jellemezve ez 49 μm$\pm0{,}97$. Ez erősen szignifikánsan alacsonyabb a kontroll vezérsejt által megtett út mértékétől: 66 μm$\pm0{,}41$. A tenyésztett sejtek mozgásképessége javul a kontroll- és betegcsoportban egyaránt az ötödik napon kapott eredményeket tekintve. A rheumatoid arthritises betegekből származó sejtek mozgásképessége megközelíti a normális sejtek által megtett út mértékét (beteg: 72 μm$\pm0{,}59$; kontroll: 71,2 μm$\pm0{,}31$). A két csoport között szignifikáns eltérés nincs, de figyelembe véve a betegek monocitáinak szignifikáns motilitás csökkenését a tenyésztés előtt a beteg monociták kemotaxis „javulása" jelentősebb mértékűnek tekinthető *(3. ábra)*.

ségét károsan befolyásolják, illetve funkcióikra kihatással legyenek. *Chi* [4] hasonló módszerrel végzett tenyésztés során megtartott funkciókról (fag citózis, adherencia, C3 receptor aktivitás) számol be. A minél kisebb sejtve teség, illetve atraumatikus sejt visszanyerés miatt a tenyésztő kamrák alj kis kerek fedőlemezt helyeztünk el (2 cm^2 alapterületű), ezen képeztünk m nolayert. A későbbiekben a fedőlemezre tapadt sejt monolayert kiemelve tenyésztő kamrából ezen végeztük el vizsgálatainkat. Munkánk során tis sejtszuszpenziónak tekinthető anyagot a 4—5. napon kaptunk, a polimor nukleáris sejtek rövid élettartamuk miatt elpusztultak. Hasonló tapasztalat ról számol be *van der Meer* [21], egér csontvelői makrofágok tenyésztése rán a granulociták korai pusztulását tapasztalta. A tenyésztés 3. napján t folyadékcsere is történt, ezzel a tenyészet tápanyagban gazdag közeget kapc másrészt az elpusztult PMNL sejteket és ezek termékeit eltávolítottuk.

A sejtek érésük során méretükben növekedtek, nem specifikus eszteráz t talmuk megsokszorozódott. Egér makrofágokkal történő vizsgálat során ez jelenségről beszámoltak [5].

A monocita-makrofág érés bekövetkeztével a sejt funkcionálisan aktiválód a vizsgált receptorok tekintetében aktívabb sejtet kapunk [5, 6, 20]. Részb ezért is tapasztaljuk a kontrollokból és RA-s betegekből származó monocit funkcionális jellemzőinek emelkedését a tenyésztés indításakor vizsgált al értékhez viszonyítva.

A tenyésztés indításakor a beteg csoportban észlelt szignifikánsan alac nyabb élesztő fagocitózis és kemotaxis csökkenés a betegek szérumában lenlévő gátló faktorokra utalhat. Hasonló eredményekről *Mowat* [22] és *Ti ner* [30] is beszámol rheumatoid arthritises betegek PMNL sejtjein végz vizsgálataikban. A sejt izolálásával, illetve azzal, hogy a tenyésztő közegb autológ szérumot nem helyezünk el, ezen lehetséges faktorok hatását igy szünk kizárni. A monocita-makrofág átalakulás bekövetkezésével ezek a fur ciók jelentős javulást mutatnak, megközelítik a kontrollértékeket, de a ken taxis kivételével nem érik el a kontrollszintjét. Ez az eredmény azonban a utalhat, hogy rheumatoid arthritisesekben észlelt monocita funkció csökkenés érett makrofág funkciójában is kifejeződhet, tehát esetleg a sejt eleve káro dott voltára utalhat. Ellentmondani látszik ennek, hogy a csökkent aktív m rációs képesség javul a tenyésztés előrehaladtával, a kiindulási értékhez l pest szignifikánsan, és eléri a kontroll szintjét. A kemotaxis javulás a gá faktorok eliminációja utáni korrekciónak felelhet meg. A klinikailag aktív inaktív csoport eredményei között különbséget nem észleltünk. Ezen funkci változásának követésével heterogén jelenségcsoport leírására vállalkoztu így az észlelt eltéréseket nehéz egységesen magyarázni, hiszen a vizsgált p raméterek a sejt más-más funkcióira utalnak, ezért azonos tendenciájú v tozásuk nem tűnik törvényszerűnek.

IRODALOM: 1. *Breedveld, F. C., Lafeber, J. M., Geertruida, I., De Vries, E., Le P. C. J., Daha, M. R. Cats, A.:* Clin. Exp. Immunol. *55*, 677 (1984). — 2. *Bültm B., Geitner, R., Seibold, H., Kratsch, G., Haferkamp, O.:* Klin. Wochenschr. *58*, (1980). — 3. *Carter, S. D., Bourne, J. T., Elson, C. J., Hutton, C. W., Czudek, Dieppe, A.:* Ann. Rheum. Dis. *43*, 424 (1984). — 4. *Chien, P., Rose, L. J., Schreil A. D.:* Immunol. Communic. *12*, 407 (1983). — 5. *Diesselhoff den Dulk, M. M. van Furth, R.:* Characteristics of mononuclear phagocytes from different tissu In: Methods for studying mononuclear phagocytes. Adams, D. O., Edelsonand, O. Karen, H., eds., Acad. Press, New York (1983). — 6. *Dimitru—Bona, A., Burmes G. R. Waters, S. J. Winchester, R. J.:* J. Immunol. *130*, 145 (1983). — 7. *Fear D. T., Collins, L. A.: I.* Immunol. *130*, 370 (1983). — 8. *van Furth, R., Raebu J. A., van Zwet, T. L.:* Blood, *54* 485 (1979). — 9. *Gonwa, T. A., Picker, L.*