

(92)

Wpływ opsonin na fagocytozę erytrocytów znajdujących się w ciele szklistym – badania laboratoryjne (część A)

The effect of opsonins on erythrocytes phagocytosis in the vitreous-laboratory research (part A)

Krystyna Raczyńska, Barbara Iwaszkiewicz-Bilikiewicz

Z Katedry i Kliniki Chorób Oczu Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Barbara Iwaszkiewicz-Bilikiewicz

Summary: Purpose: We performed experimental investigations in vitro into the opsonization of Rh-positive erythrocytes by IgG anti-RhD antibodies and phagocytosis of erythrocytes in the vitreous body.
Material and methods: The vitreous has been taken from the corpses of young people. Anti-RhD antibodies came from preparations 'Gamma anti-D 150'. 1% Erythrocyte suspension of ccDee phenotype has been applied. Phagocytosis assay was performed in the medium of the vitreous and in Hank's solution.
Results: Phagocytosis assay performed in the vitreous and in Hank's solution did not display statistically significant differences.
Conclusions: The investigations in vitro presented here, proved that immunological reactions are really occurring in the vitreous body. They provide a base for the explanation of activity mechanism of anti-RhD antibodies injected intraocularly in cases of hemorrhages into vitreous body.

Słowa kluczowe: IgG anti – RhD, aderenza, fagocytoza, ciało szkliste – krwotoki.
Key words: IgG anti – RhD, adherence, phagocytosis, vitreous hemorrhage.

Poprawa ostrości widzenia po krwotoku do ciała szklistego (cz.) w znacznym stopniu zależy od resorpcji erytrocytów. Ważną rolę w tym procesie odgrywa fagocytoza dokonywana między innymi przez monocyty, makrofagi i limfocyty napływające do ciała szklistego z zewnątrz (1).

Interesujący sposób nasilenia fagocytozy przedstawił Morawiecki (2,3), proponując opsonizację Rh-dodatnich erytrocytów przez przeciwciała IgG anty-RhD.

Praca niniejsza prezentuje wyniki badań doświadczalnych *in vitro*, w których oceniono interakcje pomiędzy erytrocytami związanymi z przeciwciałami IgG anty-RhD a komórkami efektorowymi o właściwościach fagocytarnych: monocytami/ makrofagami.

Materiał i metodyka

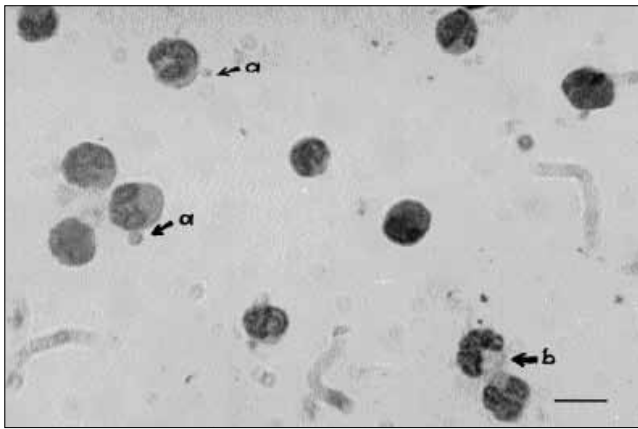
Ciało szkliste pobierano ze zwłok ludzi młodych, u których w wywiadzie nie było chorób oczu. Czas, jaki upłynął od zgonu, wyniósł od 4 do 16 godz. Pobierając cz. z gałki ocznej, przestrzegano wszystkich zasad jałowości, cz. uzyskane od kilku osób gromadzono w jednym naczyniu, a do doświadczeń używano go w czasie kolejnych 2-4 godz.

Przeciwciała anty-RhD pochodziły z gotowego preparatu o nazwie „Gamma anty-D 150”, erytrocyty – od dawców Rh-doda-

tnich. Przygotowywano 1% zawiesinę erytrocytów o fenotypie ccDee.

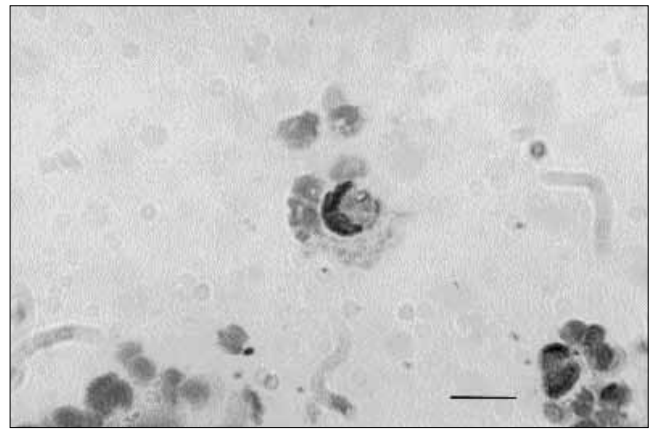
Przygotowanie i wykonanie testów aderenencji i fagocytozy: przeprowadzono je zgodnie z modyfikacją Gallaghery i wsp. (4).

Krew żylną zdrowych osób pobierano do 1 ml 5% EDTA, wirowano 8 min przy 400 g w celu pozbycia się osocza z płytkami krwi. Zawiesinę rozcieńczano w stężeniu 1: 2 w PBS i wirowano w gradientie Ficoll – Hypaque (gęstość 1,077 g/l) przez 40 min. Po odwirowaniu komórki jednojądrzaste płukano w PBS, wirowano i zawieszano w płynie Hanksa z dodatkiem 20% płodowej surowicy cielęcej (FCS). Na szkiełka nakrywkowe nanoszono 200 ml zawiesiny komórek jednojądrzastych, umieszczano w plastikowych komorach i inkubowano przez 45 min w temperaturze 37 C, aby umożliwić monocytom/ makrofagom przyłączenie się do szkiełka. Po inkubacji szkiełka sputkiwano płynem Hanksa, usuwając luźne komórki. Następnie nanoszono na szkiełka 0,5 ml 1% zawiesiny erytrocytów. W grupie porównawczej zamiast ciała szklistego dodano 0,5 ml płynu Hanksa z 20% FCS. Po 2 godzinach inkubacji w 37°C szkiełka płukano, suszono, przytwierdzano parafiną i barwiono metodą May-Grunwalda-Giemsa. Kontrolę stanowiły testy z erytrocytami nieuczulonymi.



Ryc. 1. Erytrofagocytoza w 8 monocytach, 2 erytrocyty niecałkowicie pochłonięte, resztkowy pęcherzyk na zewnątrz (A). Erytrocyt wewnątrz fagocyta (B).

Fig. 1. Erythrophagocytosis observed in 8 monocytes. Two erythrocytes not completely absorbed (A) part of erythrocyte stays on the outside in the shape of a vesicle. Erythrocytes present inside the monocyte (B) are rusty in colour, just unlike its own protoplasm visible next to the nucleus of kidney shape. Bar is 20 um.



Ryc. 2. W centrum pola monocyt adherujący i fagocytyzujący uczulone erytrocyty.

Fig. 2. In the field centre visible is the monocyte adhering and phagocytizing sensitized erythrocytes. Bar is 20 um.

Wszystkie próby wykonywano podwójnie. Preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym w powiększeniu około 400 razy.

Wyniki

Testy adherencji i fagocytozy przeprowadzone w środowisku ciała szklistego oraz w płynie Hanksa z 20% FCS nie wykazały statystycznie znamiennych różnic (tab. I).

Interakcje pomiędzy uczulonymi erytrocytami a monocytami przedstawiają fotografie (ryc. 1, ryc. 2).

W badaniach kontrolnych, w których w obu środowiskach (cz., płyn Hanksa) znajdowały się erytrocyty nieuczulone przeciwciałami, nie stwierdzono fagocytozy i/ lub adherencji.

Wyniki

Testy adherencji i fagocytozy przeprowadzone po raz pierwszy w środowisku ciała szklistego wskazują, że struktura tej tkanki, jej włókna kolagenowe, kwas hialuronowy itd. nie utrudniają procesów immunologicznych. Zarówno w środowisku płynu Hanksa z 20% FCS, jak i w cieple szklistym przeciwciała IgG anti-RhD łączyły się z antygenami Rh-dodatnich erytrocytów. Powstałe w ten sposób kompleksy immunologiczne wchodziły następnie w reakcje z komórkami efektorowymi – monocytami/ makrofagami. Pozwala to przypuszczać, że w oku ludzkim połączenia takie również się dokonują.

Obecnie wiadomo, że samo opłaszczenie erytrocytów przeciwciałami anti-RhD nie zaburza jeszcze ich funkcji (5). Badania

wykazały, że dokonuje się to po interakcji opłaszczonych erytrocytów z komórkami efektorowymi (monocyty, makrofagi, limfocyty) poprzez fragment Fc immunoglobuliny. Efekty interakcji są następujące: adherencja, zewnątrzkomórkowa liza czy też fagocytoza immunologiczna kilkakrotnie silniejsza od fagocytozy naturalnej. Erytrocyty mogą być niszczone w wyniku pozakomórkowej lizy przez uwalniane enzymy lizosomalne (6). Efekty pracy doświadczalnej pozwalają przypuszczać, że zastosowanie przeciwciał IgG anti-RhD może dać dobre efekty w leczeniu wylewów do ciała szklistego.

PIŚMIENICTWO: 1. Meek B., Speijer D., de Smet M., Peek R.: *The ocular humoral immune response in health and disease*. Prog. Ret. Eye Res., 2003, 22, 391-415. 2. Morawiecki J., Gardzilewicz A., Raczyńska K.: *Über die Wirkung inkompletter Antikörper im Glaskörper befindliche Erythrozyten*. Ber. Dtsch. Ophthal. Ges., 1979, 76, 533-535. 3. Morawiecki J.: *Behandlung mit intravirealer Injection von Anti-Rh Antikörpern*. Fortschr. Ophthal., 1984, 81, 265-266. 4. Gallagher M. T., Branch D., Mison A., Petz L.: *Evaluation of reticulo-endothelial function in autoimmune hemolytic anemia using an in vitro assay of monocyte-macrophage interaction with erythrocytes*. Exp. Hematol., 1983, 11, 82-89. 5. Loghem I., Meulen F. W., Fleer A., Hart M., Borne A. E., Engelfriet C. P.: *The importance of the Fc receptor for red cell destruction under the influence of non-compl-*

Erytrocyty opsonizowane z IgG anti-RhD inkubowane z monocytami/ makrofagami Erythrocytes opsonized by IgG anti-RhD Incubated with monocytes/ macroph.	% monocytów fagocytyzujących erytrocyty % of monocytes phagocytizing erythrocytes	Liczba wykonanych badań Numb. of performed investigations
w cieple szklistym / in vitreous	40 ± 2	18
w płynie Hanksa z 20% FCS in Hank's solution with 20% FCS	43 ± 3	20

Tab. I. Wyniki testu erytrofagocytozy z monocytami/ makrofagami.

Tab. I. Results of phagocytosis assay.

ement-binding antibodies. (ed:) Human blood Groups 5 th Int. Convoc. Immunol. Buffalo, N. Y., 1976, 75-84, Karger, Basel, 1977.
6. Engelfriet C. P., Borne A., Fleer A., Maulen T., Roos D.: *In vivo destruction of erythrocytes by complement-binding and non-compl-*

ement-binding antibodies. Immunobiology of the Erythrocyte, New York, 1980, 213-226.

Praca wpłynęła do Redakcji 16.04.2004 r. (502).

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr hab. n. med. Krystyna Raczyńska
ul. Wyczółkowskiego 63
80-147 Gdańsk

1/2

KOLOR

Centrum Mikrochirurgii Oka

z KO 3/04 str 370