

# Alternativní využití hematologického analyzátoru Advia 2120i® při studiu lymfocytů

J. Šebek

Kvantitativní i kvalitativní sledování parametrů krevních buněk již náleží ke standardům hematologického vyšetření. Reálnou morfologii krvinek nejvíce odrážejí grafy v našem případě označované jako cytogramy, které jsou součástí výsledkového protokolu z hematologických analyzátorů. Při grafické projekci sehrává roli několik faktorů. Náleží k nim jak morfologické, tak i v případě hematologických analyzátorů Siemens® biochemické vlastnosti např. myeloperoxidázová reakce neutrofilních granulocytů. Samotný cytogram lze rozdělit na několik oblastí tzv. gatů. Do jednoho gatů pak náleží buňky se vzájemnou podobností, přičemž grafické znázornění dostatečně reflektuje jejich morfologii. Umístění v cytogramu závisí na rozptylu světla vznikajícího odrazem od buněk v průtokové kyvetě. Kyveta zajistí, aby buňky protínaly laser nebo jiný druh monochromatického světelného toku jedna po druhé a rozptýlené světlo bylo detekováno ve dvou osách, můžeme říci v úhlech. Osa X odpovídá rozptylu světla pod velkým úhlem a naopak osa Y rozptylu světla pod malým úhlem. Výsledkem jsou údaje o velikosti i vnitřní struktuře buněk. V cytogramu vytvářejí body znázorňující jednotlivé buňky.

V našem případě potřebujeme sledovat dynamickou kulturu lymfocytů. Proto jsem použil hematologický systém Advia 2120i®. Mód pro vyšetření cerebrospinálního moku umožňoval získat data o čistotě buněčného izolátu i jeho změnách s dostačující analytickou citlivostí i dobře interpretovatelným grafem označovaný jako CSF scatter. Na základě naměřených údajů jsem vytýčil dvě základní kritéria pro sledování populace lymfocytů:

- schopnost jejich proliferace (dělení) během 48 hodin
- morfologické posuny během 48 hodin v cytogramu

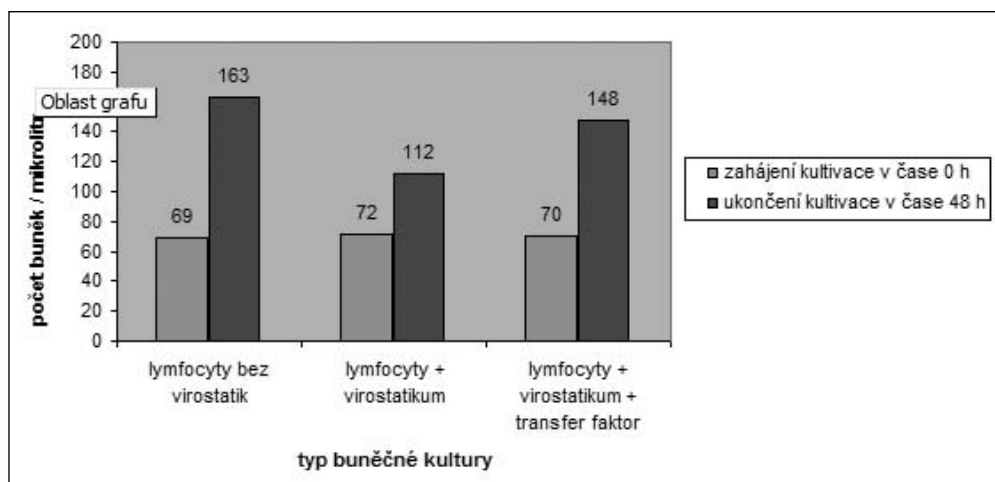
Praktické provedení se opíralo o tzv. test blastické transformace za použití phytohemaglutininu (PHA), který zde sehrál roli nespecifického mitogenu. Tedy inicioval buněčné dělení. V průběhu kultivace vznikaly změny v počtu a posuny morfologického

charakteru nasazených buněk, přičemž posuny dostatečně reflektoval cytogram CSF scatter, a to v oblasti gatů pro lymfocyty. Mononukleární buňky potřebné k výše uvedené kultivaci jsem izoloval z krve pacientů jednak před, a také po nasazení virostatické terapie. Přesněji řečeno se jednalo o nukleosidová analoga ribavirin (Copegus®), lamivudin (Epivir®), acyklovir (Zovirax®) indikovaných v léčbě HBV (virové hepatitidy typu B), HCV (virové hepatitidy typu C) nebo VZV (pásového oparu). Mechanismus účinku uvedených antivirotik spočívá v kompetitivním či soutěživém přerušování replikace nukleových kyselin, protože jako antimetabolity taktéž falešné prekurzory vstoupí do elongace nukleových kyselin a následně inhibují polymerázy důležité k tvorbě virových nukleových kyselin. Díky molekulární struktuře léčiva větší mírou inklinují k virem kódovaným polymerázám, což farmakodynamiku posouvá ve prospěch buněk transformovaných virovou infekcí. Bohužel selektivita není úplná. Virostatiky navozená cytotoxicita postihuje i ostatní buňky. Zvláště ty rychle proliferující, mezi něž náleží právě lymfocyty. V rámci imunitního systému eliminují virovou nákazu, tudíž jejich pokles můžeme považovat za nežádoucí. Jedno z mála léčiv schopných kompenzovat buněčnou imunitu představuje transfer faktor. Jedná se o leukocytární dialyzát (extrakt) z vepřových nebo lidských leukocytů obsahující nízkomolekulární peptidy respektive ribonukleopeptidy s molekulovou velikostí do 10 kDa s imunooptimalizačním efektem. Můžeme se tedy domnívat, že kombinované podání transfer faktoru společně s nukleosidovými analogy bude efekt virostatik posilovat, tím že posílí buněčné dělení bílých krvinek včetně jejich protivirového efektu. K potvrzení hypotézy jsem použil několik testů aplikovaných na kulturu mononukleárních buněk v rozdílných podmínkách. Leukocyty pocházely z náběru pacientů před léčbou a následně druhého náběru během léčby. Zatímco první kultura poukázala na bazální vlastnosti lymfocytů nezatížených virostatiky, druhá kultura korespondovala se stavem vyvolaným aplikací nukleosidových analogů. In vitro tedy bylo možné sledovat lymfocyty nativní i pod vlivem virostatik. Ovšem abychom získali údaje o lymfocytech nejen pozměněných léčivem, ale i pod současným vlivem transfer faktoru, byla z druhé buněčné kultury odvozena ještě třetí s přídavkem zmiňovaného transfer faktoru. Díky tomu můžeme výsledky vzájemně porovnat. Funkci standardu zde plnila první kultura, ke které zbylé dvě byly vztaženy. Mohl jsem tak sledovat pokles proliferace lymfocytů navozenou virostatiky a následně schopnost transfer faktoru navozenou odchylku normalizovat.

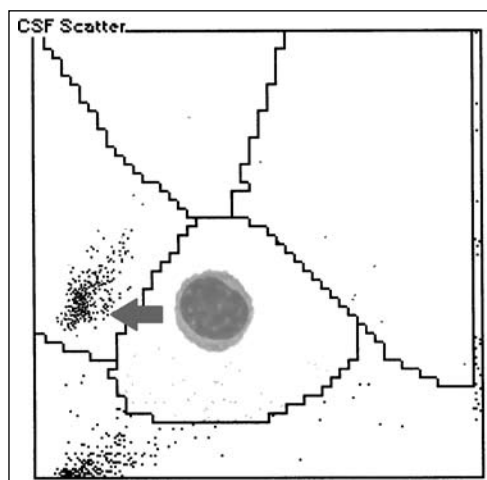
Statisticky zpracovaná data hypotézu potvrdila. Zatímco mitotická aktivita lymfocytů z krve pacientů s virostatickou léčbou v průměru o 42,56 % klesla, s přidávkou transfer faktoru v podmínkách in vitro se zlepšila jejich proliferační schopnost v průměru o 82,98 % vůči standardní kultuře (graf 1). Se zjištěnými hodnotami korespondovaly i posuny v CSF scatter cytogramu, kdy projekce buněk s probíhající mitózou (dělením) zaujímá přednostně pravý dolní kvadrant gatu pro lymfocyty (obr. 1, 2). Při podrobnějším pohledu na graf si můžeme všimnout dvou pacientů respektive naměřených dat, aniž by u nich docházelo k signifikantním změnám sledovaných parametrů během léčby (graf 2). Důvodem bylo

podávání acykloviru. Oproti ostatním virostaticům totiž vykazuje nejnižší toxicitu, protože výrazně inklinuje k virem kódované thymidin-kináze (fosforyluje nukleosid na nukleotid) a nezasahuje tak do metabolismu fyziologických buněk.

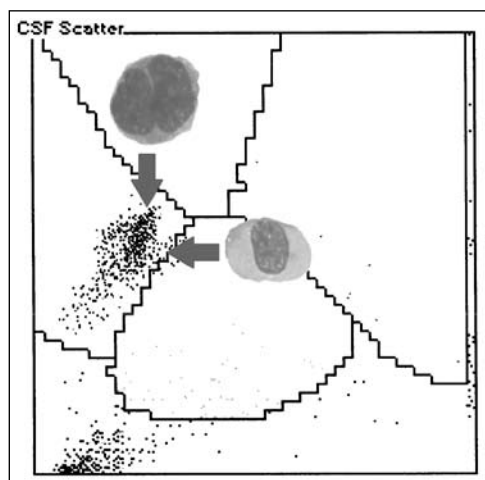
Laboratorní studie měla za úkol potvrdit hypotézu, zda aplikace transfer faktoru během systémové léčby virostatiky zlepši parametry buněčné imunity. Výsledky domněnku potvrdily. Závěrem tedy můžeme konstatovat, že podávání leukocytárního dialyzátu a nukleosidových antivirotik v kombinovaném režimu lze považovat za legitimní.



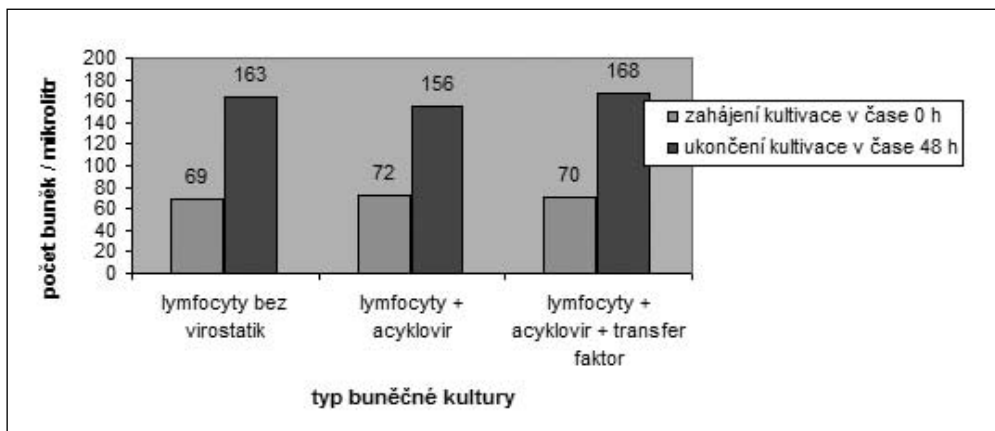
Graf č.1 Průměrné hodnoty schopnosti lymfocytů proliferovat za přítomnosti ribavirinu, lamivudinu.



Obr. 1



Obr. 2



Graf č. 2 Průměrné hodnoty schopnosti lymfocytů proliferovat za přítomnosti acykloviru.