

FLUORESzcENS JELZÉSI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA MAKROFÁGOK FELÜLETI RECEPTORAINAK VIZSGÁLATÁRA

HRABÁK András és VRAY Bernard

SOTE I. Kémiai-Biokémiai Intézete és Brüsszeli Szabad Egyetem — U. L. B. —
Immunológiai Laboratóriuma

Bevezetés

A fagocitózis az élő szervezetek egyik legfontosabb védekező mechanizmusát képviseli. Lehetővé teszi mind a patogén baktériumok, mind az immunreakciók során képződő immunkomplexek eltávolítását. Fagocitózisra többféle sejttípus specializálódott, legnagyobb jelentőségük azonban a makrofágoknak van. Ezek a sejtek a mononukleáris fagocitáló rendszer alkotórészei (9) és fagocitáló tulajdonságaikon kívül más fontos szerepet is betöltenek az immunrendszer működésében. Limfocitákkal létesített kölcsönhatásaik során egyrészt az antigének immunogenitását növelik meg, ezzel fokozzák az immunválasz intenzitását, másrészt a limfociták által termelt egyes oldható mediátorok — MIF, illetve az ezzel azonosnak tartott MAF (1, 14, 19) révén a makrofágok aktiválódnak. A makrofágok számos enzimet is termelnek, különösen jelentős a lizozim-szintézisük. Szerepük van tumorelleses folyamatokban is, ezt egyesek az argináz-szekréció nyomán létrejövő arginin-koncentráció csökkenéssel magyarázzák, amelyre a daganatos sejtek érzékenyebbek (7).

A fagocitózis mechanizmusának vizsgálatában egyrészt a felületi receptorokra, másrészt az intracelluláris kontraktilis fehérjékre fordítanak nagy figyelmet. Ezzel párhuzamosan a fagocitózist kísérő oxidációs változásokról is egyre több adat válik ismertté biokémiai vizsgálatokból (6, 22, 33). A felületi receptorok közül eddig a makrofágok Fc és komplement kötőhelyeiről sikerült egyértelműen igazolni, hogy szerepük van a részecskék internalizációjában. A makrofág fagocitotikus képessége jelentősen nagyobb, ha opsonizált — immunglobulinnal vagy komplementtel bevont — részecskékkel kerül kapcsolatba. Az opsonizált részecskék ugyanis megkötődnek a specifikus felületi receptorokon, majd a sejt fagocitálja őket.

Patkány peritoneális makrofágok stimuláció nélkül nem képesek fagocitálni, csupán megkötni a komplementtel opsonizált partikulumokat, ugyanekkor az IgG-vel bevont részecskéket internalizálják. Ezzel szemben, tioglikoláttal stimulált makrofágok már képesek a C3b-mediált fagocitózisra is. Számos kísérlet utalt arra, hogy a kétféle fagocitotikus folyamatban különböző és egymással össze nem függő struktúrák vesznek részt (11, 23).

Az Fc-receptorok vizsgálatában nem csupán IgG-vel opsonizált baktériumok, hanem IgG-aggregátumok is jól alkalmazhatók. Ezen aggregátumok

alkalmazásával információk nyerhetők a kötőhelyek számáról és affinitásáról. A hőaggregált FITC-jelzett immunglobulinok alkalmazása sok tekintetben előnyösebb a radioaktívan jelölt készítményekhez képest. Ezeket a vizsgálatokat jelentősen megkönnyíti a VRAY és mtsai (1980) által kidolgozott módszer (30), amely lehetővé teszi, hogy a fagocitózist és az IgG-aggregátumok kötését párhuzamos kísérletekben fluoreszcens mikroszkóppal és kvantitatív spektrofluorimetriás mérésekkel is vizsgálhassuk.

A továbbiakban azon kísérleteinkről számolunk be, amelyek során FITC-jelzett IgG-aggregátumok kötődését és a fagocitózisa gyakorolt hatásukat vizsgáltuk patkány peritoneális makrofágokon. Megvizsgáltuk néhány tényező módosító hatását a fagocitózisa, úgy kvantitatív, mind kvalitatív vonatkozásban.

Anyagok és módszerek

Sejtek preparálása: Hím Wistar patkányokat 5 ml steril tioglikolát-tartalmú médiummal peritoneálisan injektáltunk, majd 4 nap elteltével az állatokat levágtuk és a peritoneális üreget Ca—Mg mentes Hanks oldattal átmostuk. Az így kinyert makrofágokat Dulbecco MEM médiumban reszuszpendáltuk, és Linbro petricsészékben ($2-4 \times 10^6$ sejt), illetve Leighton-csövekben elhelyezett fedőlemezekben ($1-2 \times 10^6$ sejt) 30 percig hagytuk őket kitapadni. A nem adherens sejteket PBS oldattal eltávolítottuk, és a további kísérleteket a mosott sejtekkel indítottuk, általában 10% autológ, dekomplementált szérumot tartalmazó Dulbecco MEM médiumban. A kísérletek egy részében a sejteket ebben a közegben hagytuk állni 2 óráig 37 °C-on, hogy ezzel az Fc-receptorok expresszióját elősegítsük.

Baktérium-szuszenzió jelölése: *Micrococcus lysodeikticus* (Worthington) baktériumokból 5 mg/ml-es szuszenziót 0,5 mg FITC-vel vagy RITC-vel (Sigma) inkubáltunk 0,1 M NaHCO₃-ban (pH = 9) 4 °C-on, sötétben 24 órán át. A fölös festéket PBS-sel mosva távolítottuk el, majd a jelzett baktériumokat 5×10^9 bakt/ml koncentrációjú alikvotokban lefagyasztottuk.

Opszonizáció: A baktériumokat patkányban termelt anti-micrococcus szérummal opszonizáltuk, szubagglutináló dózis alkalmazásával, előzetes dekomplementálás (56 °C, 30 perc) után. Ez általában 1/20-os hígítást jelent. Az opszonizálást 15 percig, 37 °C-on történő inkubálással végeztük. Az opszonizált baktériumokat 3-szor mostuk PBS-sel és végül PBS-ben is vettük fel. A komplementes opszonizálást hasonlóan végeztük, de ebben az esetben friss patkány szérumot használtunk — nem immunizált állatból — és 1/5-ös hígítást alkalmaztunk.

Médiumok: A vizsgálatokhoz Dulbecco MEM médiumot használtunk, amelyhez 10% végkoncentrációban dekomplementált autológ szérumot adtunk.

FITC-jelzett, hőaggregált IgG készítése: Patkány szérumból ammónium-szulfátos fracionálással immunglobulint preparáltunk. A dializált fehérjét a baktériumok jelzéséhez hasonló módon inkubáltuk FITC-vel, a festéket centrifugálással és dialízissel távolítottuk el. Az IgG-t jelzés után 63 °C-on, 90 percig aggregálódni hagytuk, az oldhatatlan aggregátumot kicentrifugáltuk és az 5–20 IgG egységet tartalmazó frakciót Sepharose 4 B oszlopon tisztítottuk. A betöményített aggregátumot –20 °C-on tároltuk felhasználás előtt, maximum 4 hétig.

IgG-aggregátumok kötésének fluorimetriás mérése: Ezeket a méréseket SCHREIBER és mtsai (1978) nyomán (21) végeztük, kisebb módosításokkal. A különböző mennyiségű aggregátumot a Linbro petricsészékbe, ill. Leighton-csővekbe 1 ml médiumban levő makrofághoz adtuk és 4 °C-on hagytuk állni 60 percig. Utána eltávolítottuk az aggregátumot tartalmazó Dulbecco MEM-et és kétszer átmostuk a sejteket 2–2 ml PBS-sel. Végül a Linbro petricsészékben található sejteket 1%-os NP-40 detergenssel lizáltuk és a fluoreszcenciát Jobin-Yvon JY 3 spektrofluoriméterrel mértük, gerjesztési hullámhosszként 493 nm-t, emissziós hullámhosszként 520 nm-t használtunk. A Leighton-csővekből mosás után kiemeltük a 9×35 mm-es fedőlemezeket és mikroszkóp alatt vizsgáltuk a fluoreszcens IgG-aggregátum kötődését (Universal Zeiss Microscope).

A kötés specificitásának ellenőrzésére 1/8 és 8/1 koncentrációhatárok között FITC-jelzett és nem jelzett aggregátumot adtunk a sejtekhez. A FITC-jelzett aggregátum koncentrációját minden esetben úgy választottuk meg, hogy az telítse a felületi kötőhelyeket (ez a telítési görbéből 4×10^{-6} M végkoncentrációnál biztosan elérhető). A leszorítási kísérletet — a specificitás további kontrollálása érdekében — szérumalbuminnal is elvégeztük.

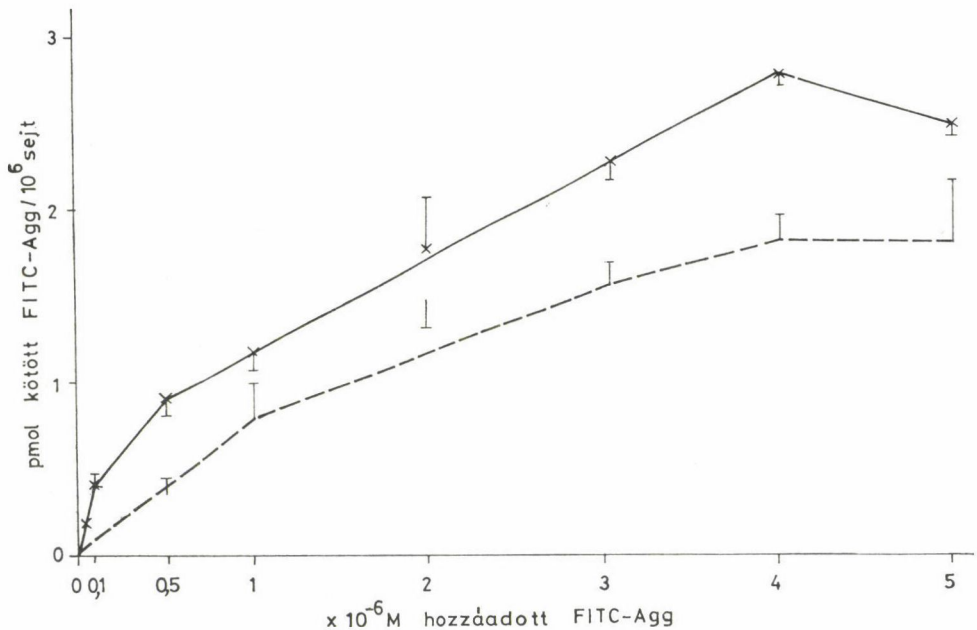
Fagocitózis vizsgálata: A *Micrococcus lysodeikticus* internalizációját VRAY és mtsai (30) szerint vizsgáltuk. A baktériumokat 100–500-szoros feleslegben adtuk a makrofágokhoz, általában 60 perces méréseket végeztünk (kivéve az időfüggés megállapításakor). A fagocitózist befolyásoló anyagokat — IgG-aggregátum, immunkomplex, kemotaktikus peptid — a baktériumok hozzáadása előtt hosszabb-rövidebb ideig együtt tartottuk a makrofágokkal (részletesen az egyes vizsgálatok eredményeinél). A fagocitózist a Linbro petricsészékben 10^{-3} M koncentrációjú N-etil-maleinimiddel állítottuk le, a Leighton-csővekben pedig a médium eltávolítása után 5%-os paraformaldehiddel kezeltük a sejteket 1 percig. A leállítást után PBS-sel kétszer mostuk a sejteket, majd 0,01%-os lizozimmal 30 percig 37 °C-on tartva eltávolítottuk a nem fagocitált baktériumokat. Újabb PBS mosások után a Leighton-csőből kivett fedőlemezeket immerziós objektívvel vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkóp alatt. A Linbro petricsészékben levő sejteket mosás után 1%-os NP-40 detergenssel szolubilizáltuk és ilyen formában mértük a fluoreszcenciát. A kvantitatív mérések esetében csak egyféle jelzés (FITC) volt alkalmazható, a kvalitatív mikrosz-

kópos vizsgálatok viszont lehetővé tették FITC és RITC jelzés párhuzamos alkalmazását.

Eredmények

Az FITC-jelzett IgG-aggregátum kötődése

A hőaggregált immunglobulin preparátum molekulaméret szempontjából heterogén: 5–20 IgG egységet tartalmazó molekulákból áll. SCHREIBER és mtsai kimutatták, hogy az FITC-Agg ennek ellenére homogén módon viselke-



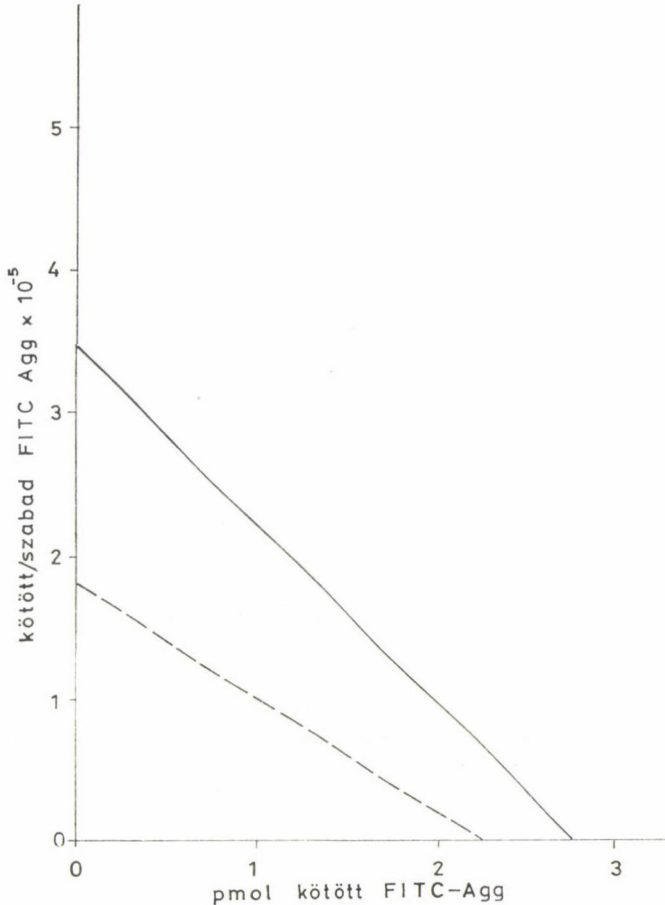
1. ábra. A makrofágok telíthetősége FITC-jelzett IgG-aggregátummal. \times = 2 óras, 37 °C-os Fc-receptor expresszió után \bullet = Fc-receptor expresszió nélkül; az S. E. M. értékeket 4 kísérlet értékeiből számoltuk

dik kötődési vizsgálatokban (21). A telítési koncentráció meghatározásakor az aggregátumot 10 nM és 5 μ M-os koncentrációk között használtuk, 1 ml-es térfogatban levő 10^6 makrofághoz adva az aggregátumot. Az FITC-Agg molaritását átlagosan 13 egységet tartalmazó aggregátumra számoltuk, amelynek molekulásúlya 2×10^6 dalton.

Az FITC-jelzett aggregátum kötődésének koncentrációfüggését az 1. ábra mutatja. Az Fc-receptorok 2 óras expressziója során a hozzáférhető receptorok száma nő ugyan, de számítógépes analízissel a Scatchard-görbékéből (2. ábra) az a következtetés vonható le, hogy a 37 °C-os inkubálás során első-

sorban a receptorok affinitása változik. 10^6 makrofágra 2,23, illetve (expresszió után) 2,76 pmol aggregátum kötődött.

Mikroszkópos megfigyelések szerint a sejteknek csak kis része kötött ténylegesen IgG-aggregátumot. 3–3 látótérnyi sejt leszámolása alapján a kötő

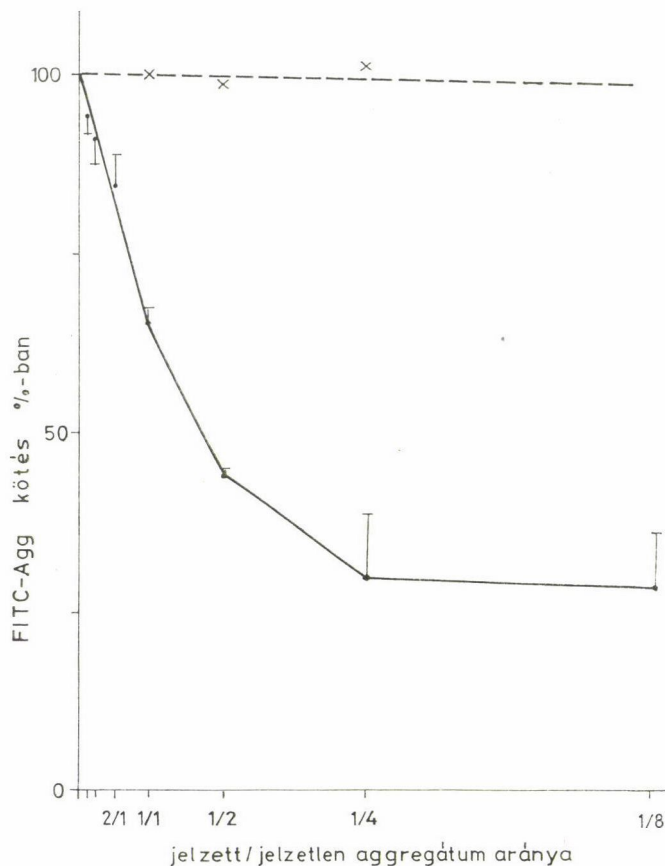


2. ábra. Scatchard-görbék az Fc-receptorok számának és affinitásának meghatározásához, regressziós analízis alapján. — 2 órás, 37 °C-os Fc-receptor expresszió után, $r^2 = 0,844$
 - - - - Fc-receptor expresszió nélkül, $r^2 = 0,729$

sejtek számaránya 4 °C-on $13,5 \pm 4,9\%$ -nak adódott. A sejteken a megkötött aggregátum kis zöld pontok formájában látható, az előzetes 37 °C-os expresszió során tehát sapkaképződés nem történt, legfeljebb kisebb „patch”-ek megjelenéséről beszélhetünk.

A fentiek alapján kiszámítható, hogy egy sejt felületén mennyi IgG-kötőhely (Fc-receptor) található. Előzetes 37 °C-os inkubálás nélkül, figyelembe véve, hogy csak a sejtek alig több, mint egytizede köt valójában aggregátu-

mot, számítógéppel $12,3 \times 10^6$ kötőhelyet kalkuláltunk, melyeknek asszociációs konstansa $0,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Mivel az aggregátum heterogén, a 13 IgG-egységre számított átlag valójában $4,7 - 18,9 \times 10^6$ receptort jelent (egy molekula aggregátum 5–20 egységből áll). Expresszió után az egy makrofágra számított Fc-receptor mennyisége $12,7 \times 10^6$ volt, asszociációs konstansa pedig $1,42 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, tehát valóban az affinitás emelkedett számottevően.



3. ábra. A kötés specificitásának vizsgálata leszorítási kísérlettel. A kontroll (100%-os kötés) értéke $2,02 \pm 0,06 \text{ pmol FITC-Agg}/10^6$ makrofág. ● Jelzetlen IgG-aggregátum × = szérumbalbumin (nincs leszorítás); Az S. E. M. értékek 3 kísérlet értékeiből származnak

A kötés specificitását telítési koncentráción ($4 \times 10^{-6} \text{ M}$ FITC-Agg) alkalmazott jelzett aggregátummal együtt 1/8–8/1 arányban adott nem jelzett aggregátum segítségével bizonyítottuk. Ezen kísérlet eredményeit a 3. ábra mutatja, ezen látható, hogy a növekvő arányban adott nem jelzett aggregátum csökkentette a FITC-jelzett aggregátum kötődését. Mindamellett bizonyos nem specifikus kötődéssel is számolni kell, ez abból látható, hogy 1/1 arány esetén a

kötődés nem a kiindulási érték 50%-a, hanem eléri a 65%-ot is. A görbe alapján a nem specifikus kötődés 25–30%-ot érhet el. Amennyiben ezt is figyelembe vesszük, úgy a kötőhelyek száma sejtenként átlagosan $8-9 \times 10^6$ -ra tehető (13 IgG-ből álló „átlagos” aggregátumra számolva). A 3. ábra azt is mutatja, hogy szérumbalbumin nagy feleslegben sem csökkenti az FITC-jelzett IgG-aggregátum kötődését. A jelzetlen aggregátum csökkentő hatása viszont mikroszkóppal is látható volt: 1/1 jelzett/jelzetlen aggregátum arány mellett a kötőképes sejtek aránya 7%-ra csökken és a fluoreszcencia diffúzabb.

Kötött aggregátum hatása a fagocitózisra

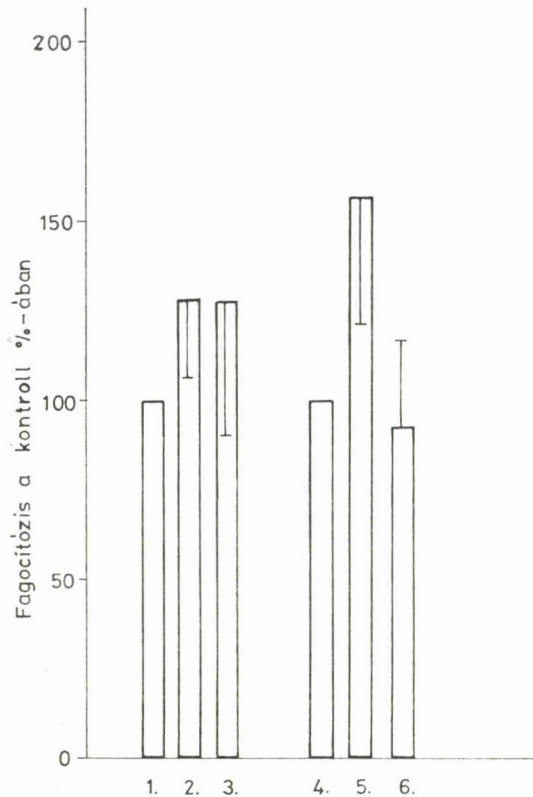
Ezekben a kísérletekben telítési koncentrációban alkalmaztuk az aggregátumot, amelyet egyes kísérletekben a 4 °C-os inkubálás után kimostunk és friss Dulbecco-10% szérumos médiumban végeztük a fagocitózist, más esetekben azonban egyszerűen 37 °C-ra helyeztük az edényeket. Az FITC-jelzett baktériumokat mindkét esetben az aggregátummal egyidejűleg adtuk a sejtekhez, így azok a 4 °C-os kötődés során is jelen voltak a rendszerben. A vizsgált esetekben kapott eredményeket mutatja be a 4. ábra. Ezen látható, hogy a fagocitózist kvantitatíve nem befolyásolta az aggregátum hozzáadása, legalábbis csökkenést nem okozott. Ugyanekkor a párhuzamosan végzett kísérletekben a mikroszkópos vizsgálatok arra mutattak, hogy a makrofágok nem képesek egyidejűleg aggregátumot kötni és fagocitálni. Ezekben a kísérletekben azok a sejtek, amelyek FITC-jelzettek voltak (aggregátum-kötő makrofágok, kb. 10–20%) egyidejűleg sohasem internalizáltak RITC-jelzett baktériumokat, akár antitestekkel, akár komplementtel opsonizáltuk azokat. A komplement-mediált fagocitózis mértéke meghaladta az IgG-mediált mértékét (40–45, illetve 30–35% fagocitáló sejt), míg a sejtek jelentős része sem aggregátumot nem kötött, sem fagocitózisra nem volt képes (1. táblázat).

1. táblázat

Kötött FITC-aggregátum hatása RITC-jelzett baktériumok fagocitózisára

	MI-RITC-C3b	MI-RITC-IgG
FITC-Agg kötő sejt	10–20%	10–20%
Fagocitáló sejt	40–45%	30–35%
Nem kötő és nem is fagocitáló sejt	40–45%	55–60%

A megadott értékek 3–3 látótérben levő sejtekre, mint 100%-ra vonatkoznak, 3 kísérletben.



4. ábra. Az aggregátum kötődésének hatása a fagocitózisra. 1 = kontroll, ha a sejteket a 4 °C-os inkubálás után PBS-sel mostuk; 2 = C3b-mediált fagocitózis az 1 kontroll szerint kezelve; 3 = IgG-mediált fagocitózis az 1 kontroll szerint kezelve; 4 = kontroll, ha a sejteket a 4 °C-os inkubálás után mosás nélkül helyeztük 37 °C-ra; 5 = C3b-mediált fagocitózis a 4 kontroll szerint kezelve; 6 = IgG-mediált fagocitózis a 4 kontroll szerint kezelve. A kontrollok (100%) értékei: 1. kontroll C3b-mediált fagocitózis $P_i = 1,319 \pm 0,419$; IgG-mediált $P_i = 0,974 \pm 0,309$; 2. kontroll C3b-mediált fagocitózis $P_i = 6,510 \pm 2,498$; IgG-mediált $P_i = 1,686 \pm 0,831$ Az S. E. M. értékeket 3 kísérletről számoltuk

A fagocitózis függése az időtartamtól és a baktérium/makrofóg aránytól

Ezekben a kísérletekben a kvantitatív vizsgálatokhoz FITC-vel, a mikroszkópos megfigyelésekhez RITC-vel jelzett baktériumokat használtunk. Az időtartam növelése 0, 5, 15, 30 és 60 perces vizsgálatokban a fagocitózis mértékének emelkedését eredményezte, akár C3b akár Fc-közvetített fagocitózisról van szó. Mikroszkópos megfigyelések alapján a fagocitózis növekedése elsősorban az egy makrofágra eső internalizált baktériumszám emelkedéséből és nem a fagocitáló sejtek arányának növekedéséből adódott. A baktérium/makrofóg arány 250 volt.

A baktérium/makrofág arány növelése hasonló módon a fagocitotikus index emelkedéséhez vezet (az arányt 15—450 között változtattuk). Az emelkedés — a mikroszkópos megfigyelések szerint — itt is az egy makrofágra jutó *Micrococcus*ok számának növekedéséből és nem a fagocitáló sejtek arányának emelkedéséből ered. A kísérletekben 60 perces fagocitózist mértünk. Ezekben a kísérletekben is látszott, hogy a C3b-mediált fagocitózis többszöröse az anti-testtel opsonizált baktériumokénak.

Immunkomplex hatása a fagocitózisra

A kísérletek során a sejtekhez az Fc-receptor expresszió ideje alatt 620 µg fehérjének megfelelő immunkomplexet adtunk, amelyet nyúlban marha szérumalbumin ellen termelt IgG-ből és marha szérumalbuminból készítettünk (BSA-nyúl anti-BSA-IgG). Az immunkomplexet a korábbiaktól eltérően nemcsak tioglikolát-stimulált, hanem rezidens makrofágokon is kipróbáltuk. Az immunkomplex az Fc-mediált fagocitózisra semmiféle hatást nem gyakorolt. A 2. táblázatban az is látható, hogy a C3b-mediált fagocitózist kis mértékben emelte az immunkomplex jelenléte, elsősorban a stimulált sejtek esetén. Rezidens makrofágokon ez a hatás nem volt jól értékelhető.

2. táblázat

Immunkomplex hatása peritoneális makrofágok fagocitózisára

	Fagocitotikus index %	Fagocitáló sejtek %
Nem stimulált makrofág		
C3b-mediált	138,3 ± 52,5	25 (25)
IgG-mediált	105,5 ± 21,7	10 alatt (10)
Stimulált makrofág		
C3b-mediált	158,8 ± 24,1	70 (70)
IgG-mediált	107,8 ± 29,5	30 (25)

A fagocitotikus indexeket a megfelelő kontroll (immunkomplex nélkül vizsgált) értékekre, mint 100%-ra vonatkoztattuk

Ezek az értékek nem stimulált sejtekre:

C3b-mediált, átlag: 0,355; IgG-mediált, átlag: 0,061

Stimulált sejtek kontroll fagocitotikus indexei:

C3b-mediált, átlag: 3,91; IgG-mediált, átlag: 1,13

A fagocitáló sejtek %-ánál zárójelben a kontroll minták értékeit adtuk meg. Az adatok 2—2 látótérben levő sejtekre mint 100%-ra vonatkoznak.

Kemotaktikus peptid hatása a fagocitózisra

A kísérletek során az N-formilmethionil-leucil-fenilalanin tripeptidet (FMLF) 2×10^{-9} és 2×10^{-5} M végkoncentrációk között alkalmaztuk, mivel ebben a tartományban mutat kemotaktikus hatást is. Mind stimulált, mind

rezidens makrofágok vizsgálatát elvégeztük. A tripeptidet az immunkomplex-hez hasonlóan a 2 órás inkubáció elején hozzáadtuk a rendszerhez és az jelen volt a fagocitózis alatt is. Stimulált sejteken a tripeptid nem mutatott jelentősebb hatást, koncentrációtól független 20–30%-os emelkedést mutatott csupán. Ezzel szemben, nem stimulált sejtek esetében 10^{-8} – 10^{-7} M koncentrációs maximummal jelentősen emelte a C3b-mediált internalizációt, míg az Fc-mediált fagocitózis mértéke nem változott és szinte mérhetetlenül alacsony maradt. A tripeptid hatása többszöri fagyasztás-felolvasztás során csökkent, mivel ez elősegíti a lebomlást, ezzel egyébként a kemotaktikus hatás is károsodik. A kemotaktikus peptid hatását az 5. táblázatban mutatjuk be. A mikroszkópos vizsgálatok során kvalitatíve hasonló képet kaptunk: a maximális hatású koncentrációt alkalmazva a sejtek között megnőtt a fagocitáló sejtek aránya és az egy makrofágra jutó internalizált *Micrococcus*ok száma is.

3. táblázat

Kemotaktikus peptid (fMet-Leu-Phe) hatása a fagocitózisra

Peptid koncentráció nmol/l	Friss peptid P_i		Tárolt peptid	
	C3b-med.	IgG-med.	C3b-med.	IgG-med.
Nem stimulált sejtek				
kontroll	0,25		0,81	
2	2,16		2,83	
20	2,41		3,65	
200	2,77		3,65	
2000	1,12		3,40	
20 000	1,27		3,29	
Stimulált sejtek				
kontroll	8,36	0,75	8,93	0,715
2	12,83	0,84	8,83	0,683
20	11,74	1,00	9,39	0,916
200	11,80	0,89	10,56	0,797
2000	11,50	0,71	9,86	0,619
20 000	11,40	0,75	nincs adat	0,642

A fenti fagocitotikus indexek (P_i) 2–2 kísérlet átlagaiból adódnak. Az IgG-mediált fagocitózis rezidens sejtek esetében elhanyagolhatóan alacsony volt, így nem is tüntettük fel. A peptidet valamennyi esetben azonos térfogatban (20 μ l) adtuk az 1 ml-es mintákhoz.

Megbeszélés

A fagocitózisban a makrofágok különféle receptorai vesznek részt. Az Fc és C3b receptorok szerepe egyértelműen bizonyított, de leírtak ún. nem specifikus receptorokat is, amelyek a latex, zimozán és egyéb szemcsék felvételében játszanak szerepet, így elkülöníthetők az előbbi két felületi strukturától (10, 17, 23). A felületi receptoroknak mindenekelőtt a partikulumok meg-

kötésében van szerepük; az internalizációs folyamatban már az intracelluláris kontraktilis elemek is részt vesznek (23, 26).

Fc-receptorok nem csupán makrofágokon fordulnak elő. Jól ismert a limfociták és limfoid eredetű tumorsejtek felületi Ig-receptora (21), amelyeket ugyancsak FITC-jelzett IgG-vel vizsgáltak. Ezek a vizsgálatok igazolták, hogy a fluoreszcens jelölés kiküszöböli a rádióaktív anyaggal való munka számos hátrányát, anélkül, hogy a módszer érzékenysége és megbízhatósága romlana. Az aggregált IgG használata több előnnyel jár: egy hónapig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on stabil, affinitása az Fc-receptorok iránt 2–3 nagyságrenddel nagyobb, így kiküszöbölődik a 10% autológ szérumban jelenlevő monomer IgG esetleges zavaró hatása. A makrofágok Fc-receptorai kétfélék: tripszin-rezisztens és tripszin-érzékeny Fc receptorokat ismerünk. A rezisztens receptorok, amelyek kb. 90%-át teszik ki az ilyen receptoroknak, az immunkomplexek, IgG-aggregátumok és antitesttel bevont partikulumok kötődéséért felelősek (23, 27). Egereken kívül nyulakon is hasonló vizsgálatokat végeztek (3), ennek alapján a tripszinre érzékeny receptorok szerepét inkább a monomer, citofil antitestek kötésében látják (27). Ezen kívül, az Fc-receptorok bizonyos faj- és alosztály-specifitást is mutatnak (8, 13, 15).

Az Fc-receptorok számát illetően az egyes vizsgálatok némileg eltérő eredményeket adnak. Kísérleteinkben, ahol stimulált patkány makrofágokat vizsgáltunk, a kötőhelyek száma sejtenként 10^6 – 10^7 nagyságrendben volt. A 2 órás expresszió ezt a számot nem növelte meg, az asszociációs konstans azonban több, mint háromszorosára emelkedett (1. és 2. ábra). Ha figyelembe vesszük, hogy a mikroszkópos vizsgálatok szerint a sejtek kb. 10%-a köt FITC-aggregátumot, a kötésnek pedig 25–30%-a nem specifikus, a tényleges kötőhelyszám sejtenként 10^7 körül lehet. UNKELESS és mtsai (28) kb. 10^6 tripszin-rezisztens és 1 – $1,5 \times 10^5$ tripszin-érzékeny receptort írtak le egér makrofágokon. Stimulált nyúl alveoláris makrofágokon több mint 10^6 kötőhelyet mutattak ki (3). Limfoma sejteken végzett vizsgálatok során (21) 10^5 körüli számban találtak kötőhelyet, az asszociációs konstans nagyságrendje azonos volt az általunk tapasztalttal. Az a tény, hogy a makrofágoknak csak egy része köt ténylegesen FITC-jelzett aggregátumot, arra vall, hogy a morfológiailag homogénnek látszó sejtpopuláció valójában funkcionálisan heterogén, tényleges kötőképességgel csak a sejtciklus megfelelő fázisában levő sejtek rendelkeznek. Az Fc-receptor által mediált fagocitózis időbeli változásának ciklikus jellege ugyancsak emellett szól (VRAY, személyes közlés).

A kötés specifitását a jelzetlen aggregátum leszorító hatása igazolja. Ugyanekkor a szérumalbumin nagy feleslegben sem gátolja az FITC-Agg kötődését. Hasonló specifitást írtak le limfoid sejteken (21), azonban ott nem észlelték azt a nem specifikus kötést, ami a 3. ábrán jól látható. Ezt elsősorban az FITC-jelzés sikerességével lehet magyarázni: a mikroszkópos képek jelentős részén halványzöld háttér utal arra, hogy a fluoreszcens jelzés egy része levál-

hat a fehérjéről és közvetlenül a sejt felületi fehérjeihez kötődve a szolubilizálás után megnöveli a fluoreszcenciát a kvantitatív mérés során. Ez a hátrány azonban nem csupán az FITC-jelzésre jellemző: ^{125}I -dal jelzett IgG alkalmazásakor ugyancsak kimutatták a nem specifikus jelölődést (2). Az említett kísérletekben humán makrofágok Fc-receptorait vizsgálták, kb. 2×10^4 kötőhelyet találtak és kb. 1/3 rész nem specifikus kötődést. A nem specifikus jelölődés mértéke azonban a talált kötőhelyszámot nagyságrendileg semmiképpen sem befolyásolta.

Az aggregátum kötődése kvantitatív csökkenést nem okozott a fagocitózisban (4. ábra). Ez arra utal, hogy — amint a mikroszkópos megfigyelések is mutatták — adott sejtek nem vetélkednek az aggregátumért, illetve az opsonizált baktériumokért, hanem szelektálnak közöttük: vagy FITC-aggregátumot kötöttek, vagy FITC-jelzett baktériumokat fagocitáltak. Ez a megfigyelés felveti az Fc-receptorok funkcionális heterogenitásának kérdését, még a nem citofil antitesteket kötő helyek esetében is. A C3b-mediált fagocitózis és az FITC-aggregátum kötés egymást kizáró jellege korábbi vizsgálatok alapján is érthető: ha egy baktérium vagy egyéb partikulum a C3b-receptorhoz kötődik, nem képes fagocitálódni, ha egyidejűleg ugyanazon sejt már az Fc-receptoron keresztül fagocitál (szegmentális válasz, 11, 23). Így, bár a két receptort egymástól függetlennek tartják, az egész sejt működésében nem lehet őket teljesen egymagukban vizsgálni.

A fagocitózis mértéke függ az inkubációs időtől, valamint a baktérium/makrofág arányától. Ennek vizsgálatára ugyancsak igen jó lehetőséget nyújt a spektrofluoriméter és a mikroszkóp párhuzamos alkalmazása. Az időbeli függés esetében jól látszik, hogy 60 percig a fagocitózis kvantitatíve állandóan emelkedik; ugyanekkor a fagocitáló sejtek száma a 30. perc után jelentős változást már nem mutat. Így a további emelkedés döntően az egy makrofágra jutó internalizált baktériumok számának növekedéséből adódik. Hasonló a helyzet a baktérium/fagocita arány vizsgálatánál is. Míg pl. a C3b-mediált fagocitózis esetében a 15-szörös arány és a 300-szoros arány között közel 10-szeres a kvantitatív eltérés, a fagocitáló sejtek száma alig 1/3-dal növekszik (4. és 5. táblázat).

A fenti megfigyelések alapján arra következtethetünk, hogy a fagocitózis során az arra képes sejtek közül a lehető legtöbb megkezdí az internalizációt, amennyiben erre alkalma van, a fagocitózis mértékének további növekedését pedig a rendelkezésre álló baktériumok száma határozza meg. Mikroszkópos vizsgálatok alapján egyébként jól látszik, hogy a makrofágok fokozatosan telítődnek a baktériumokkal, megfelelő baktérium-szám esetén jól látható sapkaképződés is megindul. A capping és a fagocitózis során kialakuló szerkezeti analógiákat már korábban is leírták (4).

A komplement-dependens és az antitest-dependens fagocitózis igen eltérő mértékű volt. Bár ismert, hogy a C3b-mediált folyamat jelentősen meghaladja a másikat stimulált sejtekben, mégis meg kell említeni ebben az opsonizáció

4. táblázat

Az inkubációs idő hatása Micrococcusok fagocitózisára

Fagocitózis ideje (perc)	Fagocitotikus index felvett bakt./sejt		Fagocitáló sejtek %-os aránya	
	C3b-mediált	Fc-mediált	C3b-mediált	Fc-mediált
0	0	0	—	—
5	0,055 ± 0,003	0	38	5% alatt
15	0,444 ± 0,053	0,026 ± 0,01	46	40
30	1,486 ± 0,494	0,130 ± 0,088	55	43
45	2,027 ± 0,468	0,175 ± 0,071	52	45
60	3,783 ± 0,797	0,544 ± 0,135	57	50

A baktérium/makrofág arány 250 volt mindegyik kísérletben. A megadott értékek 3 párhuzamos kísérlet 2—2 paralel értékéből adódnak. A fagocitáló sejtek arányát 2—2 látótérben levő — kb. 120 — sejt leszámolása után kalkuláltuk.

szerepét, az anti-micrococcus antitestek jelen esetben nem optimális tulajdonságait is.

Az immunkomplex vizsgálatához az alapot az adta, hogy az irodalomban számos adat ismert az ilyen anyagok fagocitózist befolyásoló hatásáról. Elsősorban a C3b-mediált fagocitózis aktiválása emelkedik ki: ezzel párhuzamosan azonban azt is felvetik, hogy a komplement maszkírozná a komplex Fc-részét és így gátolná az Fc-mediált fagocitózist (18). Humán limfocitákon az immunkomplex Fc-receptor aktivitást csökkentő hatását a cAMP-vel is kapcsolatba hozták (20). Egér peritoneális makrofágban viszont azt írták le, hogy a komplement stimulálta az oldott immunkomplex felvételét. Az IgM-aggregátum komplement által történő opszonizációja az immunkomplex C3b-receptoron át folyó felvételét eredményezheti (23). Saját kísérleteinkben az alkalmazott immunkomplex csak igen mérsékelt hatást fejtett ki a fagocitózisra és csupán stimulált makrofágok esetén (ez összhangban áll az immobilizált komplexekre

5. táblázat

A baktérium/makrofág arány hatása Micrococcusok fagocitózisára

Baktérium/makrofág arány	Fagocitotikus index felvett bakt./sejt		Fagocitáló sejtek %-os aránya	
	C3b-mediált	Fc-mediált	C3b-mediált	Fc-mediált
15	1,234 ± 0,448	0,635 ± 0,073	44	18
75	6,408 ± 1,230	0,696 ± 0,087	45	24
150	7,478 ± 1,067	0,777 ± 0,120	52	28
300	10,230 ± 3,310	1,001 ± 0,271	61	28
450	10,880 ± 3,400	1,099 ± 0,233	63	29

A fagocitózis ideje minden kísérletben 60 perc volt. A megadott értékeket 3 kísérlet 2—2 paraleljéből számoltuk. A fagocitáló sejtek arányát 2—2 látótérben levő — kb. 120 — sejtire vonatkoztattuk.

leírt hatás körülményeivel (18). Valószínűleg az immunkomplexek szerkezeti sajátosságai dönthetik el, hogy végül is milyen jellegű és mértékű hatása van a fagocitózisra, mint ahogy a komplementrendszer aktiválásában is fontos az immunkomplexek szerkezete (16).

A kemotaktikus peptidek és más kemotaktikus anyagok vizsgálata igen fontos és egyik aktuális kérdése a kutatásoknak. Az általunk vizsgált N-formilált tripeptid a granulocitákra fejt ki hatását elsősorban, de receptorát kimutatták makrofágokon is (25). Immunkomplexek, immunglobulinok és komplementfaktorok ugyancsak rendelkeznek kemotaktikus hatással (24, 31–32). A kísérleteinkben vizsgált N-formilált tripeptid koncentrációtól függően jelentősen emelte a rezidens makrofágok fagocitózisát, míg stimulált sejtekre alig hatott. Mindez a komplement-dependens fagocitózisra volt érvényes: az Fc-mediált folyamatot egyáltalán nem érintette, még rezidens makrofágok esetében sem. A hatás 10^{-8} – 10^{-7} M koncentrációban volt a maximális; ez a koncentráció tartomány közel áll a kemotaxisban optimális hatást eredményező dózishoz. Az aktiválás mechanizmusáról jelenleg nem tudunk részleteket. Mindamellett nem tűnik elképzelhetetlennek, hogy a tioglikolátos és más *in vivo* stimulálási módszerek tulajdonképpen olyan anyagok képződését váltják ki a stimulált állatokban, amelyek egyszerre kemotaktikus és fagocitózist stimuláló hatásúak. Ezek lehetnének felelősek a makrofágoknak a peritoneális üregbe vándorlásáért, valamint azokért a változásokért, amelyek a stimuláció kísérik. Különösen valószínűsíti ezt, hogy a peptid a komplement-dependens fagocitózist stimulálja, márpedig a stimuláció során elsősorban a C3b-mediált folyamat intenzitása változik jelentősen (5, 23). További érdekes megfigyelés, hogy fagocitáló sejteken az említett tripeptid (FMLF) — kemolumineszcenciás vizsgálatok alapján — hasonló változásokat okoz a sejtek oxidációs folyamataiban, mint a fagocitotikus stimulus pl. zimozán esetén (12). Mindezek az adatok a kemotaxis és fagocitózis kapcsolatát igazolják és felvetik azt a kérdést, hogy a stimuláció mechanizmusában a kemotaktikus anyagoknak van-e és milyen szerepük. Ezt a kérdést részben ismert kemotaktikus hatású anyagoknak a stimulációra jellemző hatások kiváltására való alkalmasságával, a továbbiakban pedig a peritoneális sejtek izolálásakor talált folyadék vizsgálatával, esetleges kemotaktikus komponenseinek izolálásával lehet megközelíteni. A kérdés fontossága nem kis mértékben a humán makrofágok stimulációjával kapcsolatos: mivel ezeket *in vivo* stimulálni nem lehet, megfelelő *in vitro* lehetőség kidolgozása mint metodikai eredmény is jelentős lenne.

RÖVIDÍTÉSEK

BSA	= marha(bovin) szérumalbumin
C3b	= a komplement rendszer 3b jelzésű komponense
FITC	= fluoreszcein-izotiocianát
FITC-Agg	= FITC-jelzett IgG-aggregátum
FMLF	= N-formilmetionil-leucil-fenilalanin
IgG, IgM	= immunglobulin G, ill. M
MAF	= makrofág-aktiváló faktor(limfokin)
MEM	= minimál tápoldat, esszenciális aminosavakkal, vitaminokkal
MIF	= migrációt gátló faktor(limfokin)
MI-RITC-C3b	= komplement-opszonizált, RITC-jelzett <i>Micrococcus lysodeikticus</i>
MI-RITC-IgG	= IgG-opszonizált, RITC-jelzett <i>Micrococcus lysodeikticus</i>
PBS	= foszfát-pufferolt izotóniás NaCl oldat
P _i	= fagocitotikus index; fagocitált baktérium/makrofág
RITC	= béta-rodamin-izotiocianát

IRODALOM

1. ADELMAN, N., HAMMOND, M. E., COHEN, S. és DVORAK, H. F.: *Biology of the Lymphokines*, 21—27. old., szerkesztette Cohen, S., Pick, E. és Oppenheim, J. J.; Acad. Press, N. Y., London
2. ANDERSON, C. L. és ABRAHAM, G. N.: *J. Immunol.* **125**, 2735—2741 (1980).
3. AREND, W. P. és MANNIK, M.: *J. Immunol.* **110**, 1455—1463 (1973).
4. BERLIN, R. D. és OLIVER, J. M.: *J. Cell. Biol.* **77**, 789—804 (1978).
5. BIANCO, C., GRIFFIN, F. M. és SILVERSTEIN, S. C.: *J. Exp. Med.* **141**, 1278—1290 (1975).
6. BOXER, L. A., ISMAIL, G., ALLEN, J. M. és BAEHNER, R. L.: *Blood* **53**, 486—491 (1979).
7. CURRIE, G. A.: *Nature* **273**, 758—759 (1978).
8. FROLAND, S. S., MICHAELSEN, T. E., WISLOFF, F. és NATVIG, J. B.: *Scand. J. Immunol.* **3**, 509—517 (1974).
9. GERGELY, J.: *Immunbiológia*, 153—157. és 174—178. old. Medicina, Budapest (1979).
10. GRIFFIN, F. M., GRIFFIN, J. A., LEIDER, J. E. és SILVERSTEIN, S. C.: *J. Exp. Med.* **142**, 1263—1282 (1975).
11. GRIFFIN, F. M., GRIFFIN, J. A. és SILVERSTEIN, S. C.: *J. Exp. Med.* **144**, 788—809 (1976).
12. HATCH, G., GARDNER, D. E. és MENZEL, D. B.: *J. Exp. Med.* **147**, 182—195 (1978).
13. HEUSSER, C. H., ANDERSON, C. L. és GREY, H. M.: *J. Exp. Med.* **145**, 1316—1327 (1977).
14. KOLB, W. P. és GRANGER, G. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 1250—1255 (1968).
15. LESLIE, R. C. Q. és NIEMETZ, A. H.: *Immunology* **37**, 835—840 (1979).
16. MEDGYESI, G. A.: Structure of immune complexes and triggering the complement system. Triggering of phagocytic cells, 39—46. old. Szerk.: Dierich, M. P., Füst, G. és Turner, M. W., Medicina, Budapest (1980).
17. MICHL, J., OHLBAUM, D. J. és SILVERSTEIN, S. C.: *J. Exp. Med.* **144**, 1484—1493 (1976).
18. MICHL, J., PIECZONKA, M. M., UNKELESS, J. C. és SILVERSTEIN, S. C.: *J. Exp. Med.* **150**, 607—621 (1979).
19. PIESSENS, W. F., REMOLD, W. G. és DAVID, J. R.: *J. Immunol.* **118**, 2078—2082 (1977).
20. RAGSDALE, C. G. és AREND, W. P.: *J. Exp. Med.* **151**, 32—44 (1980).
21. SCHREIBER, A. B., HOEBEKE, J., BERGMAN, Y., HAIMOVICH, J. és STROSBURG, A. D.: *J. Immunol.* **121**, 19—23 (1978).
22. SEGAL, A. W., GEISOW, M., GARCIA, R., HARPER, A. és MILLER, R.: *Nature* **290**, 406—409 (1981).
23. SILVERSTEIN, S. C., STEINMAN, R. M. és COHN, Z. A.: *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 669—722 (1977).
24. SNYDERMAN, R. és MergenHAGEN, S. E.: *Chemotaxis of Macrophages in „Chemotaxis and Inflammation”, Churchill-Livingstone, Edinburgh—London* 323—348. old. (1974).
25. SNYDERMAN, R. és FUDMAN, E. J.: *J. Immunol.* **124**, 2754—2757 (1980).
26. STOSSEL, T. P.: Endocytosis, in „Receptors and Recognition” A4 105—141 old., szerk.: Cuatrecasas, P. és Greaves, M. F., Chapman and Hall, London (1977).
27. UNKELESS, J. C. és EISEN, H. N.: *J. Exp. Med.* **142**, 1520—1533 (1975).
28. UNKELESS, J. C.: *J. Exp. Med.* **145**, 931—947 (1977).

29. VAN SNICK, J. L. és MASSON, P. L.: *J. Exp. Med.* **148**, 903—914 (1978).
30. VRAY, B., HOEBEKE, J., SAINT-GUILLAIN, M., LELOUP, R. és STROBERG, A. D.: *Scand. J. Immunol.* **11**, 147—153 (1980).
31. WILKINSON, P. C.: Cellular and Molecular Aspects of Chemotaxis of Macrophages and Monocytes, in „Chemotaxis and Inflammation”, Churchill-Livingstone, Edinburgh, London 349—365. old. (1974).
32. WILKINSON, P. C.: Chemotactic factors and their reaction with cell surfaces. Triggering of phagocytic cells, 83—94. old. Szerk.: Dierich, M. P., Füst, G. és Turner, M. W., Medicina, Budapest (1980).
33. ZUCKERMAN, S. H. és DOUGLAS, S. D.: *Ann. Rev. Microbiol.* **33**, 267—307 (1979).