

Testsystem zur Erfassung der Leukozytenfunktion

Anwendung an tierexperimentellen Untersuchungen zur Beeinflussung der Immunantwort durch ungesättigte Fettsäuren

A. Bauer, G. Wüsten, M. Born, A. Weber

Aus der Kinderklinik B der Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. E. Schmidt)

Zusammenfassung:

Das Prinzip und die methodische Durchführung von vier Mikromethoden, die innerhalb eines Testsystems kombiniert werden, werden beschrieben. Gemessen werden die Chemotaxis, die Migrationshemmung, die Latex-Partikel-Phagozytose und die NBT-Reduktionskapazität an in vitro stimulierten Leukozyten.

Vergleichbare Methoden zur Erfassung der Leukozytenfunktion setzen in der Regel zu ihrer Durchführung relativ große Blutvolumina voraus. Das vorgestellte Testsystem ist dagegen mit einem Minimum an Blut ausführbar und daher auch für die Anwendung in der Pädiatrie geeignet.

Es handelt sich bei dem Testsystem um ein für ein immunologisches Routinelabor praktikables Spektrum an Untersuchungen.

Der detaillierten Darstellung der Methoden schließt sich ein angewandter Teil am Beispiel tierexperimenteller Untersuchungen an. Im Rahmen von Fütterungsversuchen an Kaninchen wird der Einfluß unterschiedlich hoher Zufuhr essentieller Fettsäuren auf die Immunantwort unter einer Listerien-Infektion gemessen.

Schlüsselwörter:

Leukozytenfunktion – Kombiniertes Testsystem – Chemotaxis – Migrationshemmung – Latex-Partikel-Phagozytose – NBT-Reduktionskapazität – Leukozytenstimulation – Diagnostische Anwendbarkeit

Summary:

Principles and methods of four micro-tests are described. Four tests, Chemotaxis, Migration inhibition, Latex-particles-phagocytosis and NBT-reduction-capacity of in vitro stimulated leucocytes are combined in one testsystem.

The system reported has the advantage of working with relatively small blood volumes and thus can also be applied in the pediatric group.

The testsystem can well be used in an routine immunological laboratory.

A detailed presentation of the test in an animal experiment concerning the immune response to Listeria infection under the influence of various levels of dietary essential fatty acids is given.

Keywords:

Leucocyte function – combined testsystem – chemotaxis – migration inhibition – Latex-particles-phagocytosis – NBT-reduction capacity – diagnostic application – leucocyte-stimulation – animal experiments

Einleitung

Die Entwicklung und Modifikation geeigneter Labormethoden zur Erfassung der Leukozytenfunktion stieß speziell in der Pädiatrie auf eine Reihe praktischer Probleme. Limitierend erwies sich die Notwendigkeit größerer Blutvolumina für die Durchführung eines aussagekräftigen Spektrums von immunologischen Methoden zur Erfassung der zellulären Abwehrsituation des Kleinkindes.

Ein Überblick über die konventionellen Techniken ergibt ein widersprüchliches Bild, das einen Vergleich der Ergebnisse in der Literatur, z. B. zur Messung der Leukozytenfunktion stark erschwert. Für die verschiedenen Tests zur Erfassung der chemotaktischen Aktivität der Leukozyten existieren derzeit kaum vergleichbare Referenzdaten.

Die altersabhängige Ausprägung der zellulären Immunantwort wurde nur von wenigen Untersuchern in ihre Beobachtungen eingeschlossen (1, 2).

Die bei der in vitro-Messung der Leukozytenfunktion möglichen Störfaktoren können bezüglich der Reproduzierbarkeit der Tests erhebliche Probleme aufwerfen. Keller (3) ermittelte bei einem Patienten eine Variationsbreite der Messung von 180 ± 23 , bzw. 132 ± 65 migrierten Leukozyten in der Boyden-Kammer je nach dem Grad der Aktivierung der Zellen. Es erweist sich als problematisch, ein Meßsystem zu standardisieren, das von einer enorm großen Zahl von Faktoren beeinflusst werden kann.

Eine Reihe technischer Faktoren, wie z. B. der Zusatz von Antikoagulantien, die Verwendung von Zellseparationsmitteln usw. beeinflussen das Testsystem.

Die Aussagekraft eines Tests zur Funktion immunkompetenter Zellen hängt davon ab, wie weit man sich bei der Übertragung auf ein geeignetes Testmodell von der *in-vivo*-Situation entfernt.

Im folgenden soll ein Testsystem in Form einer Kombination von vier Funktionstests zur Ermittlung der Leukozytenfunktion vorgestellt werden, für dessen Durchführung eine Gesamtblutmenge von 13 ml erforderlich ist. Damit ist die Erstellung des zellulären Immunstatus z. B. auch für die Pädiatrie in einem immunologischen Routinelabor praktikabel. Voraussetzung für die Anwendung an Säuglingen ist selbstverständlich die vorangegangene Immunisierung mit dem auch im Testansatz verwendeten Antigen. Wegen der obligatorischen Tetanus-Impfung im Alter von ca. 3 Monaten bietet sich dieses Antigen an.

Material und Methoden

Prinzip der Methoden

Chemotaxis

Zur Erfassung der chemotaktischen Aktivität der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten werden die in

einem Gewebekulturmedium angereicherten Zellen in einem gelartigen Medium veranlaßt, auf einen chemotaktischen Faktor (z. B. Lipopolysaccharid aus *E. coli* bzw. Zymosan aus der Zellwand von *S. cerevisiae*) gerichtet zu wandern (4, 5). Die Wanderungstrecke wird mikroskopisch mittels eines graduierten Meßokulars quantifiziert.

Leukozytenmigrations-Hemmtest

Einer in einem Gewebekulturmedium angereicherten Leukozytensuspension wird ein T-Zell-Antigen (Tuberkulin oder hochgereinigtes Tetanus-Toxoid) zugesetzt (5, 6).

Unter der Antigenstimulation kommt es zur Ausschüttung eines Migrations-Hemm-Faktors (MIF), der eine Auswanderung in das umgebende agarosehaltige Gewebekulturmedium verhindert. Die mikroskopische Auswertung erfolgt analog der in der Chemotaxis beschriebenen.

Latex-Partikel-Phagozytose

Eine Leukozytensuspension wird mit Latex-Partikeln inkubiert (7). Nach Fixation und Anfärbung mit Kernechtrot wird der prozentuale Anteil an Leukozyten mikroskopisch ermittelt, die mehr als 5 Latexpartikel phagozytiert haben.

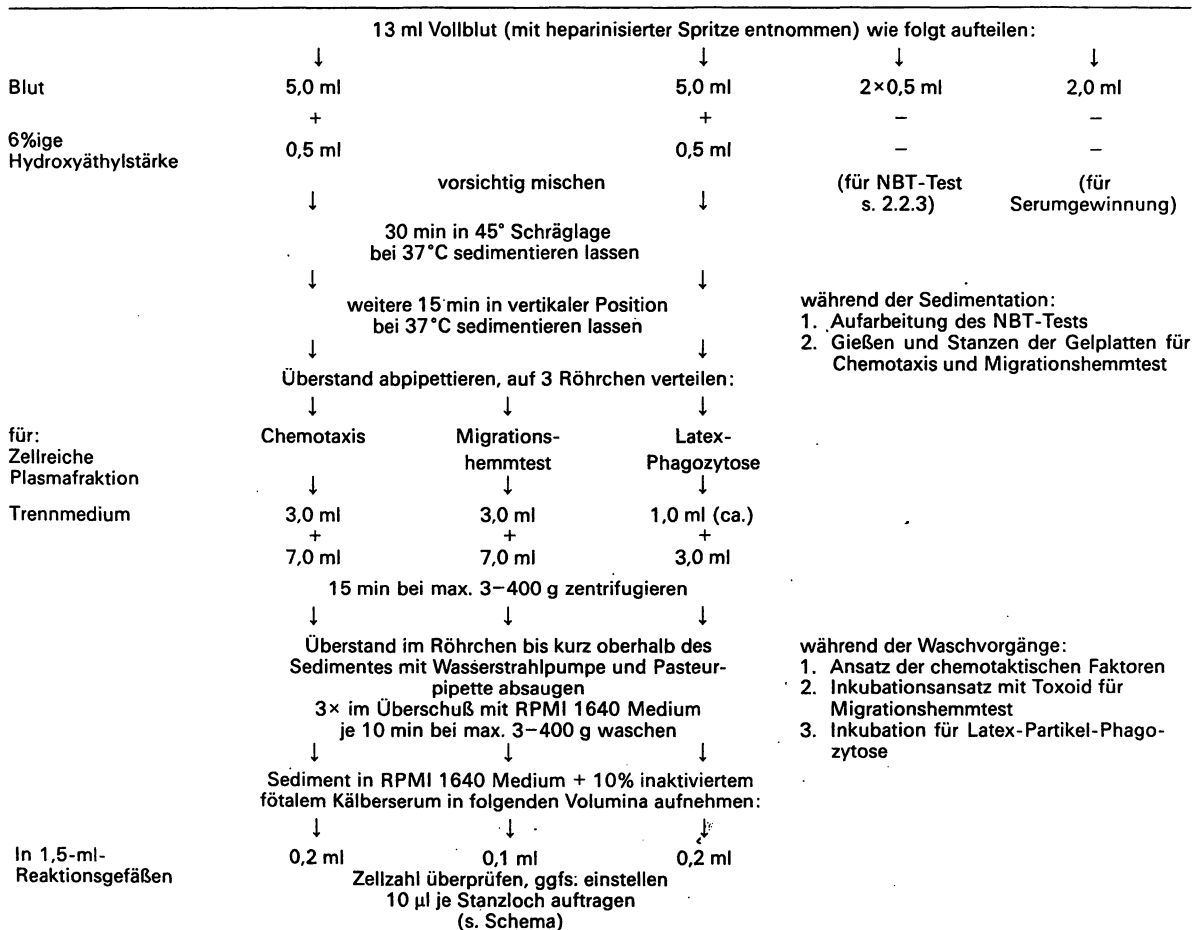


Abb. 1: Koordinationsschema zur organisatorischen Durchführung von vier kombinierten Leukozytenfunktionstests innerhalb eines Systems

Ein Defekt kann in einer Funktionsstörung der Zellen selbst oder in einer mangelnden Produktion chemotaktisch wirksamer Mediatoren liegen.

In der Beurteilung sind folgende Aussagen möglich:

Ansatz 1 erlaubt eine Bewertung eines Funktionsdefektes der Granulozyten.

Ansatz 2 läßt eine Aussage über die Ausschüttung von Mediatoren zu.

Ansatz 3 gibt Auskunft über eventuelle Infektzeichen.

Ansatz 4 wird als Kontrolle des Faktors ohne Serumzusatz geführt.

Nach dreistündiger Inkubation der Platten in einer feuchten Kammer bei 37°C unter kontrollierter CO₂-Atmosphäre (5%) wird die gesamte Gelschicht mit Methanol und 40%iger Formalinlösung fixiert, mit einem handelsüblichen Schnelfärber nach Entfernen der Gelschicht angefärbt und anschließend ausgewertet.

Leukozytenmigrations-Hemmtest (modifiziert nach 5,6)

Die Aufarbeitung der Leukozytensuspension erfolgt analog der Beschreibung für die Chemotaxis. Abweichend davon werden in Reaktionsgefäßen folgende Ansätze hergestellt:

Stimulierter Ansatz:	
Patientenserum	100 µl
hochgereinigtes Tetanus-Toxoid	25 µl
RPMI 1640 Medium	25 µl

Kontrollansatz:	
Patientenserum	100 µl
RPMI 1640 Medium	50 µl

Die Ansätze werden vor dem Einpipettieren in die Stanzlöcher der Gelplatte 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Entgegen der Chemotaxis werden die Stanzlöcher in gleichmäßigem Abstand auf der Platte verteilt, die Hälfte der Löcher wird mit einer Markierung versehen (Auftragstellen für den stimulierten Ansatz). Je Stanzloch beträgt das Auftragsvolumen wie bei der Chemotaxis 10 µl Zellsuspension.

NBT-Reduktionskapazität der Neutrophilen (modifiziert nach 8)

1000 µl heparinisiertes Vollblut werden in zwei Reaktionsgefäße überführt (jeweils 500 µl). Einem Ansatz werden 50 µl E. coli Lipopolysaccharid zugefügt, dem zweiten zur Kontrolle 50 µl RPMI 1640 Medium. Anschließend werden die Ansätze 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Jedem Ansatz werden 500 µl NBT-Lösung zugesetzt und weitere 15 min bei 37°C inkubiert, danach noch einmal 15 min bei Raumtemperatur. In Schräglage aufgestellte Objektträger werden mit dem Blut aus den jeweiligen Ansätzen beschichtet.

Nach dem Trocknen erfolgt die Anfärbung mit Leishman's Methyleneblau für 2 min.

Die Objektträger werden mit Aqua dest. gespült und können nach der Trocknung mikroskopisch ausgewertet werden. Die Bewertung erfolgt anhand der Erfassung des prozentualen Anteiles der NBT-positiven Zellen.

Latex-Partikel-Phagozytose der Neutrophilen

Der entsprechend dem Ablaufschema (Abb. 1) gewonnene zellreiche Plasmaüberstand wird auf eine Gewebe-

kulturplatte aufgetragen, durch vorsichtiges Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt und 20 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert.

Die Adhärenz der Neutrophilen bewirkt die Anheftung an die Oberfläche der Gewebekulturschale.

Danach wird die Platte vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und mit folgender Mischung überschichtet:

RPMI 1640 Medium	200 µl
Spenderserum	500 µl
Latex-Partikel (1:10 in phys. NaCl-Lösung)	20 µl

Der Ansatz wird 20 min bei 37°C inkubiert und die Platte vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Nach der Fixation mit Methanol und der Anfärbung mit Kernechtrot läßt sich der Anteil an Granulozyten ermitteln, die Latex-Partikel phagozytiert haben.

Beurteilung der kombinierten Tests zur Ermittlung der Leukozytenfunktion

Die Bewertung der chemotaktischen Aktivität der Leukozyten wurde mit einem Faktor vorgenommen, der als Index ausgedrückt wurde:

$$CI = \frac{\text{Spontanmigration}}{\text{Migration gegen C-Faktor}}$$

Säuglinge unter 4 Monaten weisen physiologisch erniedrigte Werte auf. Wanderungsweiten in den Ansätzen 1 (gegen AB-Normalserum) und 3 (gegen das eigene, nicht mit einem chemotaktischen Faktor versetzte Serum) die eine ebenso starke Wanderung zeigen wie die Leukozyten in Ansatz 2 (mit chemotaktischem Faktor versetzt) weisen auf Infektzeichen hin. Der Ansatz 4 (Abb. 2) gilt als Kontrolle und sollte in seiner Wanderungsweite der Spontanmigration gegenüber physiologischer Kochsalzlösung entsprechen.

Bei intakter Ausschüttung des Migrations-Hemm-Faktors (MIF) ist die Wanderungsweite der mit dem Antigen inkubierten Leukozyten um mehr als 30% gegenüber dem Kontrollansatz reduziert.

Als Normgrenze bei der Messung der NBT-Reduktionskapazität gilt für die beiden Ansätze:

Der prozentuale Anteil NBT-positiver Zellen beträgt im stimulierten Test 60%, im Kontrollansatz 30%.

Bei der Erfassung der Latex-Partikel-Phagozytose beträgt der Anteil Neutrophiler, die mehr als 5 Latex-Partikel phagozytiert haben, bei gesunden Spendern etwa 60%.

Anwendung der Testkombinationen

Die oben beschriebenen Testkombinationen wurden im Rahmen von Tierversuchen angewandt.

Anhand von Fütterungsversuchen sollte der Einfluß Linolsäure definierter Diäten auf die Immunreaktionen bei Kaninchen getestet werden.

In Vorversuchen konnten für die Methoden folgende Variationskoeffizienten ermittelt werden:

Chemotaxis	7,0%
Migrations-Hemmtest	11,7%
NBT-Reduktionskapazität	3,9%
Latex-Partikel-Phagozytose	13,0%

Unter Berücksichtigung der relativ aufwendigen Aufarbeitung des Probenmaterials, wie sie generell für Tests

zur Erfassung der zellulären Immunreaktion erforderlich ist, liegen die Variationskoeffizienten der Methoden in einem Bereich, der gesicherte Aussagen zuläßt.

Verwendete Tiere

60 männliche Kaninchen (weiße Neuseeländer) mit einem Versuchsausgangsgewicht von ca. 2200 g im Alter von drei bis vier Monaten wurden unter konventionellen Bedingungen in der Zentralen Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf in Einzelkäfigen gehalten.

Diät der Tiere

Der Linolsäuregehalt der vier isokalorischen Diäten ist in Tab. 1 aufgeführt. Der von Gruppe I nach IV ansteigende Gehalt an Linolsäure in den Diäten wurde durch die Herstellung von unterschiedlichen Mischungen verschiedener Ausgangsfette erreicht. Der prozentuale Energiegehalt der jeweiligen Linolsäurefraktion wurde anhand der gaschromatographisch ermittelten Fettsäurespektren rechnerisch ermittelt.

Erzeugung einer Infektion

Die Tiere wurden infiziert mit *Listeria monocytogenes*, Serotyp 4 b (Institut für Hygiene und Labormedizin, Krefeld). Die Kultur wurde durch fortlaufende Kaninchenpassagen virulent gehalten. Der Bakterienstamm wies eine LD₅₀ von ca. 6×10^6 Listerien auf. Die Tiere wurden primär mit einer subletalen Dosis von ca. 1×10^6 vermehrungsfähigen Keimen/ml physiologischer NaCl-Lösung i.v. infiziert.

Tab. 1: Linolsäuregehalt (LSG) der vier Testdiäten

Gruppe	LSG in % der Energie
I	0,4
II	2,1
III	5,5
IV	8,1

Versuchsablauf

Nach einer 8tägigen Adaptationsphase mit einer Standarddiät wurden die Tiere in 4 Fütterungsgruppen unterteilt und erhielten die Testdiäten unterschiedlichen Linolsäuregehaltes (Tab. 1). Das Futter wurde ad libitum angeboten. Nach dieser 12wöchigen Fütterungsperiode erfolgten die ersten Untersuchungen zur Ermittlung der Ausgangswerte. In der 13. Fütterungswoche wurden die Tiere mit einer subletalen Dosis vitaler Listerien infiziert. In der Folge wurden bei den infizierten Tieren während einer Woche in 2tägigem Abstand die Tests zur Leukozytenfunktion durchgeführt. Den Versuchen lag die Intention zugrunde, den Einfluß der Versorgung mit essentiellen Fettsäuren auf die Aktivität der Leukozyten zu untersuchen.

Aus klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen besteht Grund zu der Annahme, daß der essentielle Nahrungsfaktor die humorale und zelluläre Immunantwort dosisabhängig stimuliert (9).

Es wurde eine experimentelle Infektion mit vermehrungstüchtigen Listerien an Kaninchen vorgenommen, die

CHEMOTAKTISCHE AKTIVITÄT DER PMN

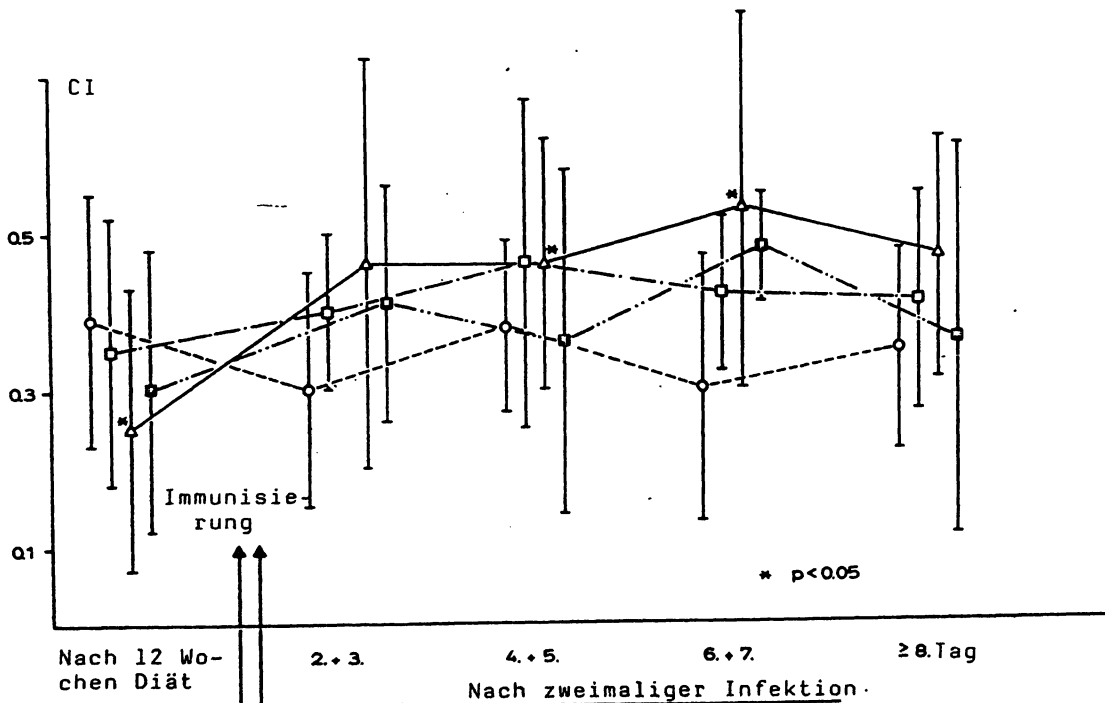


Abb. 3: Einfluß von Nahrungen unterschiedlichen Linolsäuregehaltes (LSG) auf die chemotaktische Aktivität der polymorphkernigen Leukozyten (PMN) nach experimenteller Listerieninfektion. ○—○ 0,4% LSG; □—□ 2,1% LSG; △—△ 5,5% LSG; ◆—◆ 8,1% LSG der Gesamtenergie in der Diät

zu vor, wie beschrieben, in unterschiedlicher Höhe mit essentiellen Fettsäuren versorgt worden waren.

Als Antigen im Testansatz wurde, abweichend von der vorstehenden Methodenbeschreibung eine ausgetestete, inaktivierte Listerienpräparation (Behringwerke AG, Marburg) für den Migrations-Hemmtest eingesetzt, entsprechend der mit Listerien durchgeführten Infektion.

Statistische Auswertung

Es wurden Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen berechnet und die Signifikanz in Wahrscheinlichkeitsgraden (p).

Aufgrund der z.T. kleinen Kollektive und der relativ großen Streubreiten wurde das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ angesetzt. Die statistische Berechnung wurde mit der einfachen Varianzanalyse und dem t-Test vorgenommen, um Einflüsse unterschiedlich hoher linolsäuredefinierter Diäten zu erfassen. Es wird vorausgesetzt, daß das Datenmaterial normal verteilt ist.

Ergebnisse

Chemotaktische Aktivität der neutrophilen Granulozyten

Die chemotaktischen Aktivitäten der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten unter der Verabreichung unterschiedlicher Linolsäuremengen und einer Listerieninfektion sind in Abb. 3 dargestellt. Nach 12wöchiger Versuchsdauer weist die Gruppe III (Zufuhr: 5,5% der Energie an Linolsäure) den niedrigsten CI auf, was mit einer verstärkten Mobilität der neutrophilen Granulozyten gleichzusetzen ist.

Demgegenüber ist bei dieser Gruppe nach der Immunisierung ein signifikanter Anstieg des Indexes zu verzeichnen, der sich vorwiegend, bei Betrachtung der effektiven Wanderungstrecken aus der verstärkten Spontanmigration der Zellen ergibt. Die Darstellung läßt eine linolsäureabhängige Steigerung der Spontanmigration bis zur Gruppe III erkennen. Wie die Daten der Gruppe IV zeigen, läßt sich dieser Effekt durch eine darüber hinausgehende Versorgung mit Linolsäure nicht steigern. Aus Abb. 3 wird ersichtlich, daß die Listerieninfektion auf die Spontanmigration der Granulozyten einen Einfluß besitzt. Einflußnahmen solcher Art wurden bereits beobachtet. Aktive bakterielle Infektionen beim Menschen vermögen Neutrophile stärker auf chemotaktische Stimulation reagieren zu lassen (10), wobei solche erhöhten leukotaktischen Aktivitäten vornehmlich bei bakteriellen Infektionen, die auf den Respirationstrakt beschränkt sind, nachgewiesen wurden (11).

Migrations-Hemmtest

an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten

Die Ergebnisse des Leukozytenmigrations-Hemmtests zeigen eine linolsäureabhängige Steigerung der Migrationshemmung der Zellen (Abb. 4). Der 12wöchige Verzehr der Testdiäten führte bei der Gruppe III (5,5% Linolsäurezufuhr) zu einer starken signifikanten Migrationshemmung der Granulozyten. Dieser deutliche Fütterungseinfluß setzte sich im wesentlichen während der experimentellen Listerieninfektion fort. Zwar nehmen mit dem Infektionsverlauf die effektiven Wanderungsweiten zu, jedoch läßt sich zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten meist die stärkste Migrationsinhibierung der Leukozyten bei der III. Fütterungsgruppe beobachten. Eine ausgeprägte Migrationshemmung läßt auf eine er-

MIGRATIONS-HEMMUNG DER PMN

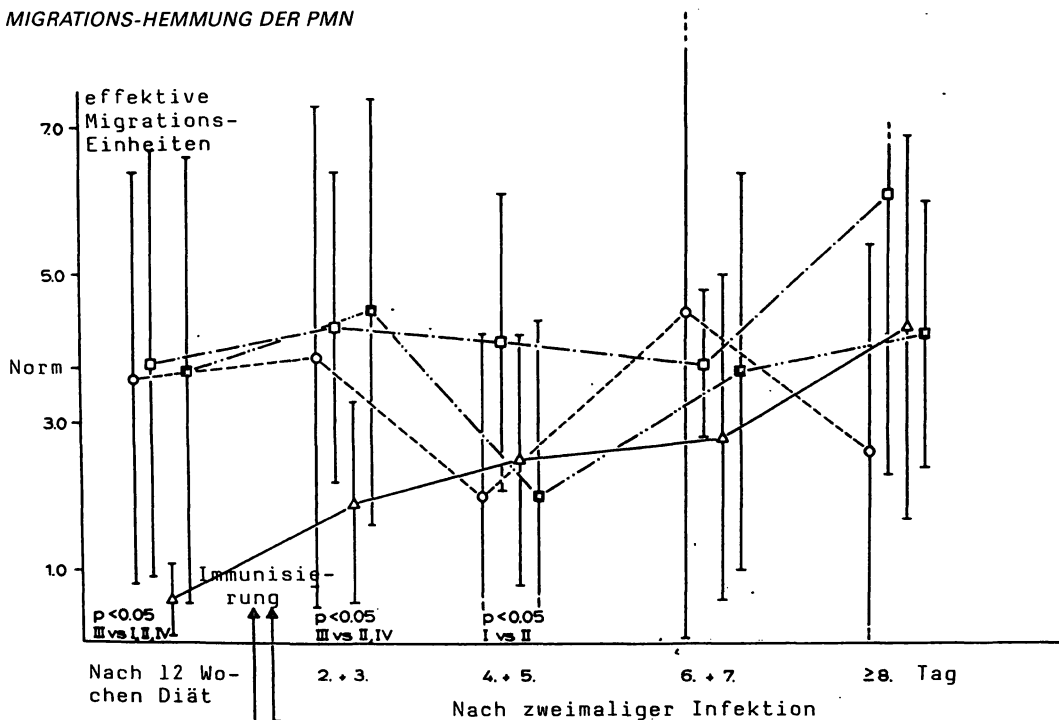


Abb. 4: Einfluß von Nahrungen unterschiedlichen Linolsäuregehaltes (LSG) auf die Migrationshemmung der polymorphkernigen Leukozyten (PMN) nach experimenteller Listerieninfektion. ○—○ 0,4% LSG; □—□ 2,1% LSG; △—△ 5,5% LSG; ◇—◇ 8,1% LSG der Gesamtenergie in der Diät

höhte Aktivität des zellulären Immunsystems schließen. In Gegenwart eines spezifischen Antigens vermögen sensibilisierte T-Lymphozyten (in vitro und in vivo) verschiedene immunologisch wirksame Mediatoren zu bilden, z. B. den Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF). Der MIF erlangt insofern eine besondere Bedeutung für das zelluläre Abwehrsystem, als durch eine Hemmung der Granulozyten- und Makrophagenbeweglichkeit die Ansammlung dieser Zellen im Bereich des Antigen-Antikörpergeschehens gewährt wird.

Die Testung des MIF stellt eines der empfindlichsten Systeme dar, die Sensibilisierung von Lymphozyten zu erfassen und kann als in vitro-Korrelation der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion dargestellt werden (5, 12).

Im vorliegenden Experiment kann die positive Migrationsinhibition – vorrangig der III. Fütterungsgruppe – nicht allein auf die T-Zell-Sensibilisierung infolge des Antigenkontaktes zurückgeführt werden. Da die unbehandelten Tiere der Gruppe III eine extreme Migrationshemmung zeigen, sollte ein fütterungsbedingter Einfluß in Betracht gezogen werden.

Latex-Partikel-Phagozytose der polymorphkernigen Granulozyten

Die Ergebnisse des Latex-Partikel-Phagozytose-Tests (Abb. 5) weisen nach 12wöchiger Versuchsdauer kaum Unterschiede zwischen den 4 Fütterungsgruppen auf. Zwar besitzt die Gruppe III die höchste Phagozytoserate, jedoch liegt diese Erhöhung noch in den Fehlergrenzen der Methode.

Nach der Immunisierung ist die Phagozytosefähigkeit bei der Gruppe III am höchsten, fällt jedoch während der Infektion bei den anderen Fütterungsgruppen z. T. erheblich ab. Signifikante Erniedrigung der Phagozytoserate weist insbesondere die Gruppe IV auf. In unseren Untersuchungen stellte sich die Phagozytoseleistung der Granulozyten bei den Tieren mit einer 5,5%igen Linolsäurezufuhr im Verlaufe der Listerieninfektion als zufriedenstellend dar. Eine Unter- bzw. Überversorgung mit Linolsäure bedingte dagegen eine zeitweilig signifikante Erniedrigung der Phagozytoserate.

Keller (3) weist auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Chemotaxis und der Phagozytose hin. Die Phagozytose von Bakterien, Latexpartikeln usw. resultiert in einer Erniedrigung der spontanen und gerichteten Zellmigration. Die relativ hoch mit Linolsäure versorgte Gruppe III weist eine hohe Phagozytosekapazität der Granulozyten auf. Sie läßt allerdings bei der Chemotaxis nur ein Mittelmaß an gerichteter Bewegung erkennen, verfügt dagegen über eine relativ hohe Spontanmigration.

NBT-Reduktionskapazität der polymorphkernigen Granulozyten

Die Effizienz der Phagozytoseleistung der Neutrophilen kann an der intrazellulären Abtötung phagozytierter Fremdkörper gemessen werden. Diese intrazelluläre Keimabtötung erfolgt durch eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme und ist als wesentlicher Parameter der zellulären Abwehr zu werten.

Für die einzelnen Gruppen sind bei den Ausgangswerten im Bereich der Norm liegende Reduktionskapazitäten zu

LATEX-PHAGOZYTOSE DER PMN

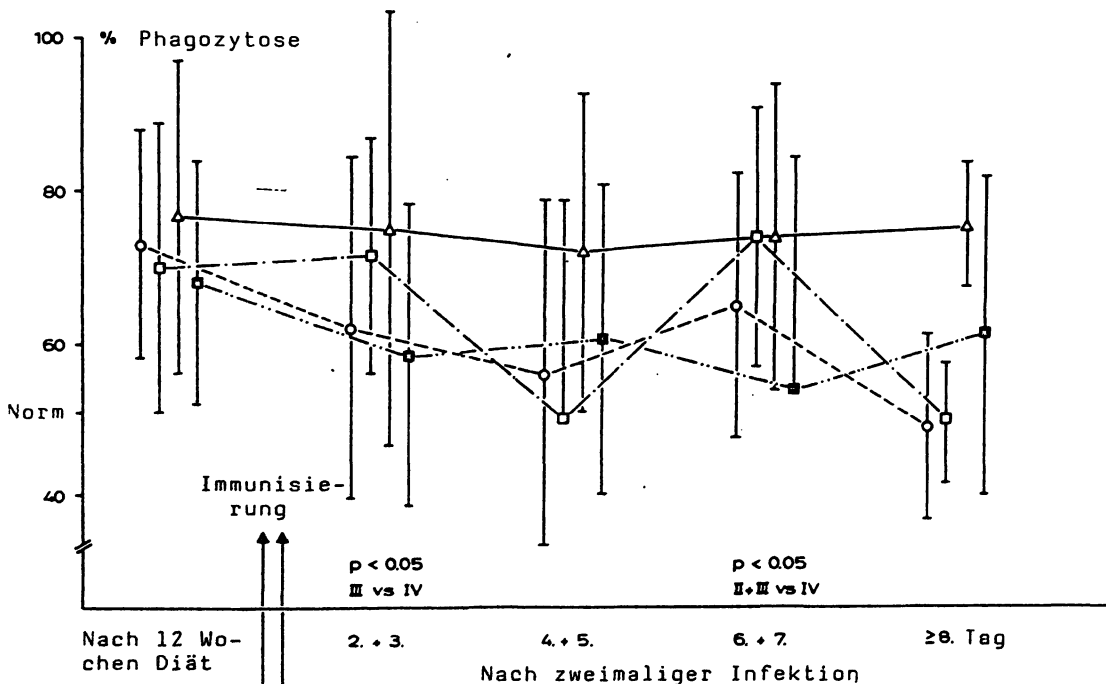


Abb. 5: Einfluß von Nahrungen unterschiedlichen Linolsäuregehaltes (LSG) auf die Latex-Partikel-Phagozytose der polymorphkernigen Leukozyten (PMN) nach experimenteller Listerieninfektion. ○ — 0,4% LSG; □ — 2,1% LSG; △ — 5,5% LSG; ◊ — 8,1% LSG der Gesamtenergie in der Diät

verzeichnen (Abb. 6). Dabei weist die Linolsäure unterversorgte Gruppe I eine signifikant erniedrigte Reduktionskapazität gegenüber den Gruppen II und III auf. Kurz nach der Immunisierung ist allgemein ein Anstieg der Reduktionsaktivität festzustellen, diese Aktivität nimmt mit der Dauer der Infektion jedoch wieder ab.

Nach 12wöchiger Fütterung der Diäten resultierte bereits in den Gruppen II und III eine signifikant erhöhte Reduktionskapazität. Im folgenden Infektionsversuch läßt sich nur eine unwesentliche Steigerung der Reduktionskapazität verzeichnen. Die Mangelgruppe I und insbesondere die mit Linolsäure überversorgte Gruppe IV reagieren auf die Immunisierung mit einem Anstieg der NBT-positiven Zellen (bei der Gruppe IV signifikant).

Der NBT-Test wird als Indikator für den Zustand des oxidativen Metabolismus der Phagozyten herangezogen (14). Offensichtlich verfügt die dem Bedarf entsprechend am günstigsten versorgte Gruppe III ebenso wie die marginal mit Linolsäure versorgte Gruppe II nach 12 Wochen Versuchsdauer über eine optimale Reduktionskapazität der PMN. Dieser Sachverhalt scheint den Tieren eine gute Ausgangsposition für den Fall einer Antigeninvasion zu gewährleisten. Daß jedoch auch die mangel- bzw. überversorgte Gruppe I bzw. IV über eine gute Immunabwehr verfügen, zeigen die hohen Kapazitätssteigerungen unmittelbar nach der Sekundärinfektion. Anstiege der Reduktionskapazität im Verlaufe bakterieller Infektionen aufgrund der Funktionsstimulation reifer Granulozyten wurden vielfach beschrieben (10, 14–16).

Diskussion

Im Verlauf der Modifikation der Einzeltests zu einer kombinierten Methode zur Erfassung der Leukozytenfunktion

wurde eine Reihe von Reagenzien auf ihre Anwendbarkeit geprüft.

Es wurde festgestellt, daß bei der Durchführung der Chemotaxis außer dem im Testansatz angewendeten Lipopolysaccharid *E. coli*, Serotyp 026:B6 auch der Serotyp 0111:B4 und Zymosan A aus Zellwandpräparationen von *Cervisiae*-Hefen vergleichbare Ergebnisse zu erzielen waren.

Im Migrations-Hemmtest führte der Einsatz von hochgereinigtem Tetanus-Toxoid zu entsprechenden Ergebnissen wie die Stimulation der Granulozyten mit hochgereinigtem Tuberkulin GT und Antigenpräparationen von *Listerien* (jeweils nach vorausgegangener Immunisierung).

Bei beiden vorangenannten Tests wurde die Beziehung zwischen der Zellzahl im Testansatz und der ermittelten Wanderungsweite untersucht. Es konnte beobachtet werden, daß sich mit zunehmender Zellzahl nicht die Wanderungsweite, sondern lediglich die Ablesegenauigkeit verbesserte.

Ein routinemäßig anwendbares Testsystem bekommt für die praktische Medizin ständig zunehmende Bedeutung. Neben den primären können erworbene Immundefizienzen mit einer Beeinträchtigung der Leukozytenfunktion eine beträchtliche Rolle im Erkrankungsverlauf des Patienten spielen. Sie treten wesentlich häufiger in der Klinik auf als die primären Immundefekte. Nach Hitzig (17) können eine Reihe exogener Einflüsse zu Immundefizienzen führen:

- Bakterielle Infekte,
- Virale Infekte,
- Pathologische Bedingungen wie z.B. Stoffwechselerkrankungen, Nierenerkrankungen, Lebererkrankungen, Neoplasien, medikamentöse Einflüsse.

NBT – REDUKTION DER PMN

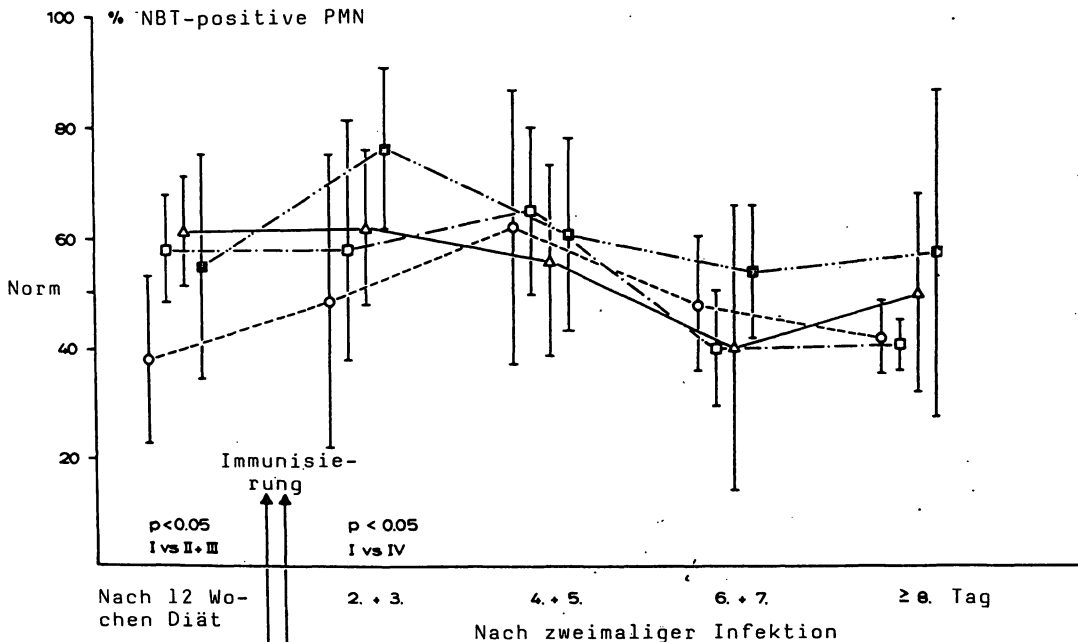


Abb. 6: Einfluß von Nahrungen unterschiedlichen Linolsäuregehaltes (LSG) auf die NBT-Reduktion der polymorphkernigen Leukozyten (PMN) nach experimenteller *Listerien*infektion. ○—○ 0,4% LSG; □—□ 2,1% LSG; △—△ 5,5% LSG; ◈—◈ 8,1% LSG der Gesamtenergie in der Diät

Das sensible Zusammenspiel von immunologisch wirkenden Plasmaproteinen, zellulären Phänomenen wie der chemotaktischen Aktivität, Phagozytose und intrazellulärem enzymatischen Abbau ist bei einer weitaus größeren Zahl von Erkrankungen gestört als es dem Spektrum primärer Immundefekte entspricht.

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt mit Unterstützung des Ministeriums für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen.

Anschrift für die Verfasser:

Dr. Annette Bauer
c/o Prof. Dr. E. Schmidt
Direktor der Kinderklinik B
Universität Düsseldorf
Moorenstraße 5
4000 Düsseldorf 1

Schrifttum:

1. KLEIN, R. B., FISHER, T. J., GARD, S. E., BIBERSTEIN, M.: Decreased mononuclear and polymorphonuclear chemotaxis in human newborns, infants and young children. *Pediatrics* 60, 467-472 (1977).
2. WRIGHT, W. C., ANK, B. J., HERBERT, J.: Decreased bactericidal activity of leucocytes of stressed newborn infants. *Pediatrics* 56 (4), 579-584 (1975).
3. KELLER, H. U., HESS, M. W., COTTIER, H.: Physiology of chemotaxis and random motility. *Seminars in Hematology* 12, 47-57 (1975).
4. NELSON, R. D., QUIE, P. G., SIMMONS, R. L.: Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *J. Immunol.* 117, 433-439 (1976).
5. AX, W., TAUTZ, C.: Assay of leucocyte migration inhibition under agarose. *Behring Inst. Mitt.* 54, 72-80 (1974).
6. CLAUSEN, J. E., RICH, K. C., STIEHM, E. R.: Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose-medium. *Acta Allergol.* 56-80 (1971).
7. WEHINGER, H., HOFACKER, M.: Latex phagocytosis by polymorphonuclear Leucocytes in vitro and in vivo studies with a simple screening test. *Eur. J. Pediatr.* 123 (2), 125-132 (1976).
8. MISHLER, J.: Pers. Mitteilung (1979).
9. MERTIN, J.: Der Einfluß essentieller Fettsäuren auf die zelluläre Immunantwort. *Med. Klinik* 72, 677-684 (1977).
10. HILL, H. R., GERRARD, J. M., HOGAN, N. A., QUIE, P. G.: Hyperactivity of neutrophil leucotactic responses during active bacterial infection. *J. Clin. Invest.* 53, 996-1002 (1974).
11. QUIE, P. G., GREENE, W. H., FAVILLE, R. C., HILL, H. R., DAVIS, A. T.: Recurrent staphylococcal infections associated with defective inflammatory response in: J. JELJASZCZAK: Staphylococci and Staphylococcal Diseases. G. Fischer Verlag, 907-910 (1976).
12. MITSUYAMA, M., NOMOTO, K., AKEDA, H., TAKEYA, K.: Enhanced elimination of List. m. at the site of delayed footpad reaction. *Infect. and Immun.* 30, 1-4 (1980).
13. DAVID, J. R.: Macrophage activation by lymphocyte mediators. *Fed. Proc.* 34, 1730-1736 (1975).
14. KÖPPLER, H., GROPP, C., HAVEMANN, K.: A modified spectrophotometric test for Nitroblue Tetrazolium reduction of granulocytes and monocytes and its application for testing inhibition of monocytes by serum components in tumor patients. *Immunobiol.* 157, 320-330 (1980).
15. PARK, B. H., FIKRIG, S. M., SMITHWICK, E. M.: Infection and Nitroblue-Tetrazolium reduction by neutrophils. *The Lancet*, Sept. 7, 532-534 (1968).
16. BJÖRNSTEIN, B.: The NBT test using venous and capillary blood. *Scand. J. Haematol.* 11, 270-274 (1973).
17. HITZIG, W.: Immundefekt-Syndrome - Hinweis auf einen WHO-Report. *Immunität und Infektion* 7, 93-96 (1979).



...da knobeln wir nicht lange...

ENZYM-IMMUNOASSAYS
zur Diagnose von:
Sharp-Syndrom
LE
LE und
Sjögren Syndrom
Mischkollagenosen



PROMA

Zwerchgasse 17, 8900 Augsburg
Telefon 08 21/31 30 62