

## Aktiviti Bakterisidal *in vitro* Fagosit daripada Pesakit Lupus Eritematosus Sistemik (SLE)

M. MUSA, J. MAT ASAN dan Y.M. PANG  
Jabatan Imunologi, Pusat Pengajian Sains Perubatan,  
Universiti Sains Malaysia,  
11800 Minden, Pulau Pinang, Malaysia.

**Kata Punca:** Neutrofil, monosit, *in vitro*, pesakit Lupus Eritematosus Sistemik.

### ABSTRAK

*Di dalam kajian ini, neutrofil dan monosit daripada darah periferi pesakit SLE telah diasingkan dan diuji aktiviti bakterisidalnya terhadap Staphylococcus aureus berbanding dengan sel daripada kontrol normal. Keputusan ujian ini menunjukkan bahawa neutrofil dan monosit daripada pesakit SLE masih mempunyai aktiviti bakterisidal yang normal, walaupun sebelum ini pernah dilaporkan terdapat kecacatan pada fungsi fagositosis dan kemotaksis. Fagosit daripada pesakit ini dapat membunuh bakteria dengan berkesan. Fungsi serumnya sebagai opsonin di dalam aktiviti bakterisidal juga didapati normal.*

### ABSTRACT

*Neutrophils and monocytes of the peripheral blood of patients with SLE were isolated and tested for their bactericidal activity against Staphylococcus aureus, compared to cells obtained from normal controls. Despite having abnormalities in phagocytic and chemotactic functions as previously reported, the results of this study showed that neutrophils and monocytes from patients with SLE exhibited normal bactericidal activity. Phagocytes of these patients were able to kill the bacteria very effectively. Their serum function as opsonin in the bactericidal activity was also normal.*

### PENGENALAN

Lupus Eritematosus Sistemik (SLE), sejenis penyakit inflamatori sistemik wujud dengan adanya manifestasi autoimun. Gangguan autoimun ini umumnya berkaitan dengan kehadiran antibodi antinukleus (ANA) dan antibodi anti-ds DNA di dalam serum pesakit. Oleh itu, patogenesis penyakit SLE dikatakan hasil daripada kesan buruk yang disebabkan oleh pembentukan kompleks imun berkenaan (Chia *et al.* 1979; Zvaifler 1981). Punca pembentukan antibodi tersebut masih tidak jelas diketahui. Selain daripada kecacatan tersebut, fungsi imuniti sel pesakit juga dilaporkan terganggu berdasarkan gerak balas imuniti sel. Seterusnya setengah-setengah fungsi sel leukosit daripada pesakit SLE seperti kemotaksis dan fagositosis dilaporkan juga merosot (Ward 1974; Svensson 1980). Kecacatan aktiviti fagositosis mungkin ada kaitan dengan kekurangan aviditi penerima Fc (Katayama *et al.* 1983) dan

juga kecacatan fungsi penerima komplemen sel berkenaan (Hurst, Nuki dan Wallington 1984). Seterusnya Salmon dan rakannya (1984) mendapati bahawa kecacatan pada fungsi fagositosis adalah disebabkan oleh proses penelanan bukan pada perlekatan melalui penerima Fc. Walau bagaimanapun, semua kajian berkenaan hanya mengukur proses fagositosis atau penelanan partikel, oleh itu aktiviti bakterisidal atau pembunuhan bakteria yang merupakan fungsi utama fagosit di dalam pertahanan perumah menentang jangkitan masih perlu dikaji. Di samping itu, selain daripada aktiviti sel, fungsi serum sebagai opsonin yang mempunyai peranan penting di dalam aktiviti bakterisidal harus juga diperhatikan. Kajian ini dijalankan untuk menentukan sama ada terdapat kecacatan aktiviti bakterisidal pada fagosit (kecacatan intrinsik) daripada SLE dan seterusnya meneliti jika ada kecacatan pada faktor serum pesakit SLE itu juga.

## BAHAN DAN KAEDAH

### *Serum Pesakit SLE dan Kontrol Normal*

Darah periferi daripada 6 orang pesakit SLE diperolehi daripada Hospital Besar, Pulau Pinang iaitu berdasarkan kriteria diagnosis untuk SLE meliputi ciri klinikal dan laporan makmal. Keenam-enam pesakit menunjukkan ciri klinikal meliputi anemia, ruam dan lesi kulit, Empat daripadanya mengalami gangguan sistem renal. Kesemuanya memberikan ujian ANA yang positif dengan titer yang tinggi. Kesemua pesakit baru saja menerima rawatan prednison dan berada di dalam wad ketika sampel darah mereka diambil. Drug ini dipercayai merencat gerak balas imun menerusi tindakannya ke atas limfosit. Empat daripada pesakit juga merupakan kes berulang dan telah mempunyai riwayat SLE sebelumnya. Darah daripada penderma Tabung Darah digunakan sebagai kontrol normal. Setiap eksperimen, darah kontrol diambil daripada penderma yang padan umur dengan pesakit. Serum daripada darah yang dibiarkan beku diasingkan dan terus digunakan untuk tujuan eksperimen.

### *Bakteria*

Bakteria *Staphylococcus aureus* diperolehi daripada stok Jabatan Mikrobiologi Perubatan, Universiti Sains Malaysia. Ampaian bakteria (fasa log) disediakan di dalam medium kultur RPMI (Sigma) pada kepekatan  $2 \times 10^5$  sel/ml. Serum daripada pesakit SLE atau kontrol normal (kepekatan akhir 10%) ditambah kepada ampaian bakteria.

### *Fagosit Pesakit SLE dan Kontrol Normal*

Darah periferi berantikoagulan daripada pesakit SLE dan kontrol normal diperolehi seperti di atas. Neutrofil dan monosit diasingkan dengan kaedah Histopaque 1.119/1.077 (Sigma). Neutrofil dipungut daripada lapisan interfasa 1.119 dan 1.077, manakala sel mononukleus yang mengandungi monosit dipungut daripada lapisan interfasa 1.077 dan plasma. Sel tersebut dibasuh dengan larutan garam seimbang Hanks (HBSS) (Sigma). Ampaian neutrofil yang mempunyai viabiliti lebih daripada 95% dibuat di dalam medium kultur RPMI pada kepekatan  $2 \times 10^6$  sel/ml. Ampaian sel mononukleus pula disediakan pada kepekatan  $4 \times 10^6$  sel/ml.

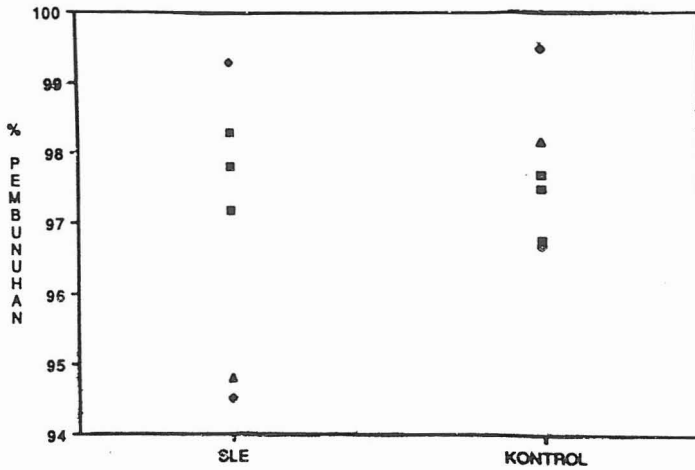
### *Penentuan Aktiviti Bakterisidal Neutrofil dan Monosit*

Penentuan aktiviti bakterisidal neutrofil dan monosit dilakukan di dalam kolam-96 plat mikrotiter (Linbro). Di dalam kolam plat tersebut, neutrofil (0.1 ml) atau ampaian sel mononukleus (0.1 ml) yang telah disediakan daripada pesakit SLE atau kontrol normal dieramkan selama 1 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}/5\%$   $\text{CO}_2$ , udara. Selepas eraman, supernatan dibuang dan sel dibasuh dengan medium kultur RPMI. Monosit yang melekat kepada plat selepas eraman dan basuhan seterusnya digunakan untuk tujuan eksperimen. Cerakinan bakterisidal dilakukan secara bersilang dan setiap satu secara triplikat. Sel pesakit SLE atau kontrol normal ditambahkan dengan ampaian bakteria (50 ul/kolam) yang sebelumnya telah disediakan sama ada dengan serum kontrol normal atau serum pesakit SLE. Plat mikrotiter kemudiannya diemparkan selaju 800 g pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 5 minit. Kawalan untuk pertumbuhan bakteria disertakan juga iaitu tanpa kehadiran sel. Plat kemudiannya dieramkan pada suhu  $37^\circ\text{C}/5\%$   $\text{CO}_2$ , udara. Bilangan hidup bakteria dilakukan pada 0 dan 60 minit masa eraman. Ini dilakukan dengan menambah larutan 1% Triton  $\times 100$  (200 ui/kolam) untuk memecahkan fagosit dan selepas dibaurkan, sampel (10 ul) diambil lalu disebar di atas piring agar nutrien, dan dieramkan semalaman. Peratus pembunuhan bakteria ditentukan dengan membandingkan bilangan hidup bakteria yang dieramkan bersama sel dengan bilangan hidup bakteria kawalan (tanpa sel) selepas eraman.

## KEPUTUSAN

### *Aktiviti Bakterisidal Neutrofil SLE Berbanding dengan Kontrol Normal*

Untuk meneliti adanya kecacatan intrinsik pada fungsi bakterisidal neutrofil daripada pesakit SLE, aktiviti bakterisidal neutrofil daripada pesakit SLE dan neutrofil kontrol normal dengan kehadiran serum kontrol normal sebagai oponin dibandingkan. Hasil ujian ini ditunjukkan di dalam *Gambarajah 1*. Neutrofil SLE mempunyai aktiviti bakterisidal yang berkesan (membunuh lebih daripada 50%) setanding dengan neutrofil daripada



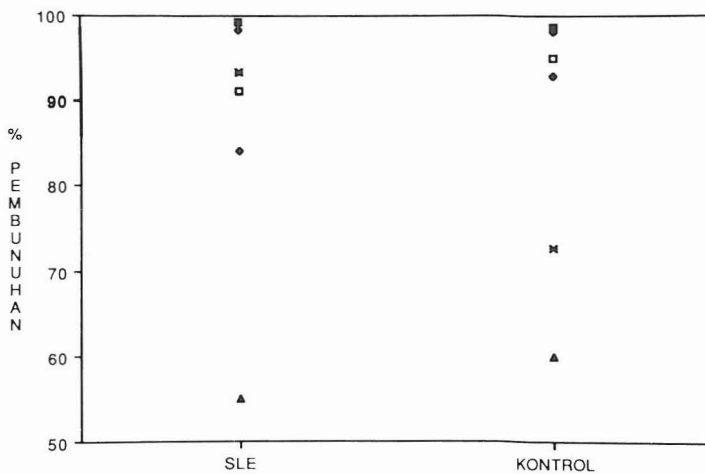
Gambarajah 1. Peratus pembunuhan bakteria oleh neutrofil daripada pesakit SLE atau kontrol normal dengan kehadiran serum opsonin kontrol normal. Setiap corak pada histogram mewakili seorang pesakit dan kontrol normal dalam setiap eksperimen.

kontrol normal. Keputusan ini menunjukkan tiada kecacatan pada fungsi bakterisidal neutrofil daripada pesakit SLE.

*Aktiviti Bakterisidal Monosit Berbanding dengan Kontrol Normal*

Penelitian yang serupa juga dilakukan terhadap fungsi bakterisidal monosit. Walaupun

peratus pembunuhan bakteria oleh monosit berbeza dengan yang ditunjukkan oleh neutrofil, monosit daripada pesakit SLE tidak menunjukkan kecacatan (lebih 50% pembunuhan) pada fungsi bakterisidal jika dibandingkan dengan kontrol normal masing-masing di dalam setiap eksperimen yang dijalankan (Gambarajah 2). Setiap eksperimen



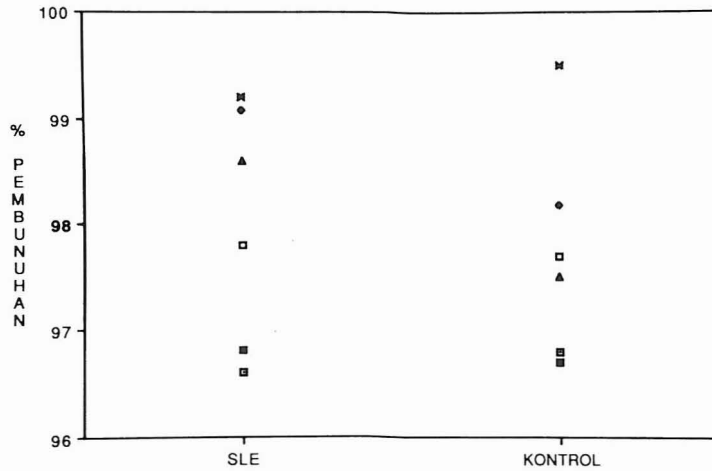
Gambarajah 2. Peratus pembunuhan bakteria oleh monosit daripada pesakit SLE atau kontrol normal dengan kehadiran serum opsonin kontrol normal. Setiap corak pada histogram mewakili seorang pesakit dan kontrol normal dalam setiap eksperimen.

mewakili seorang pesakit SLE berserta kontrol normal masing-masing.

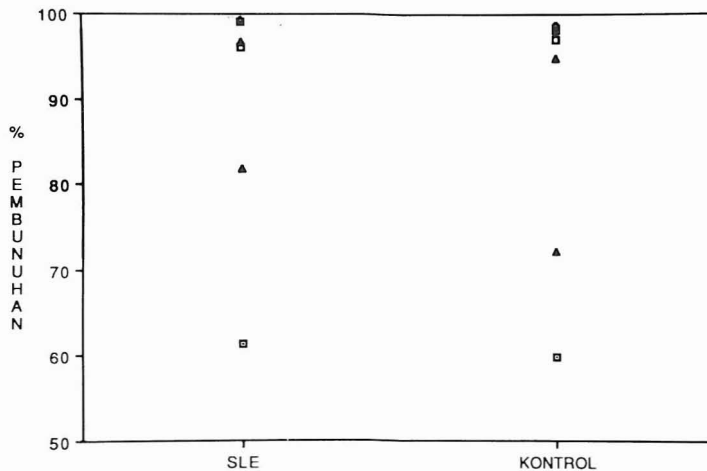
*Fungsi Serum SLE Berbanding dengan Serum Kontrol Normal untuk Aktiviti Bakterisidal*

Untuk menentukan sama ada serum pesakit SLE mempengaruhi atau mengganggu aktiviti bakterisidal fagosit daripada kontrol normal,

aktiviti bakterisidal neutrofil dan monosit daripada kontrol normal dengan kehadiran sama ada serum pesakit SLE atau serum kontrol normal sebagai opsonin dibandingkan. *Gambarajah 3* menunjukkan aktiviti bakterisidal neutrofil yang berkesan sama ada dengan kehadiran serum daripada pesakit SLE atau serum kontrol normal. Keputusan yang serupa



*Gambarajah 3. Peratus pembunuhan bakteria oleh neutrofil daripada kontrol normal dengan kehadiran serum opsonin sama ada daripada pesakit SLE atau kontrol normal. Setiap corak pada histogram mewakili seorang pesakit dan kontrol normal dalam setiap eksperimen.*



*Gambarajah 4. Peratus pembunuhan bakteria oleh monosit daripada kontrol normal dengan kehadiran serum opsonin sama ada daripada pesakit SLE atau kontrol normal. Setiap corak pada histogram mewakili seorang pesakit dan kontrol normal dalam setiap eksperimen.*

juga diperolehi untuk aktiviti bakterisidal monosit pada eksperimen masing-masing (*Gambarajah 4*).

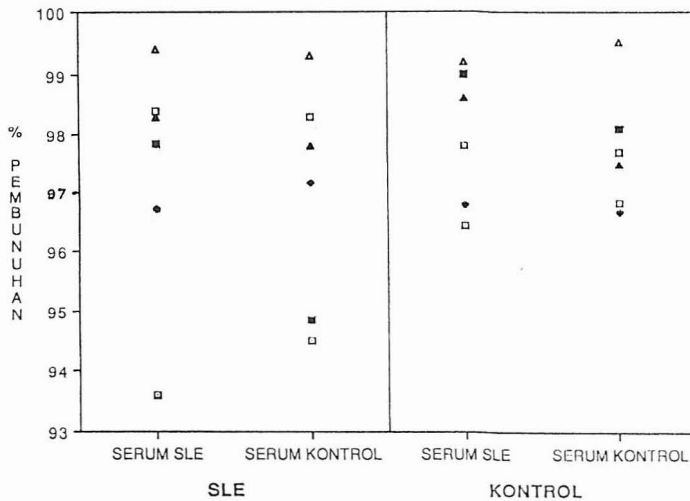
*Penentuan Aktiviti Bakterisidal Neutrofil SLE dengan Kehadiran Serumnya*

Untuk memastikan perjumpaan sebelum ini iaitu tiada kecacatan aktiviti bakterisidal sama ada pada sel, fungsi serum atau kedua-duanya untuk fagosit SLE, aktiviti bakterisidal neutrofil SLE dengan kehadiran serumnya sendiri dilakukan. Jika ada kecacatan pada kedua-dua faktor tersebut kesan gandaan akan dapat diperhatikan. Sebagai kontrol, aktiviti bakterisidal neutrofil kontrol normal dengan kehadiran serum SLE atau serum kontrol normal dan neutrofil SLE dengan kehadiran serum kontrol normal juga dilakukan. *Gambarajah 5* menunjukkan neutrofil daripada pesakit SLE yang dieramkan dengan kehadiran serumnya mempunyai aktiviti bakterisidal yang berkesan berbanding dengan semua kontrol yang disertakan. Keputusan ini mengesahkan lagi bahawa tiada kecacatan pada aktiviti bakterisidal sama ada pada sel atau serum daripada pesakit SLE.

**PERBINCANGAN**

Beberapa kecacatan imun telah dilaporkan untuk penyakit SLE termasuk pembentukan

autoantibodi (Zvaifler 1981), kehadiran kompleks imun beredar di dalam serum (Koffler *et al.* 1971) dan kerentanan terhadap jangkitan (Staples *et al.* 1974). Kerentanan terhadap jangkitan kemungkinan ada kaitannya dengan kecacatan fungsi fagosit. Landry (1977) telah menunjukkan kaitan di antara kecacatan fagositosis imun *in vitro* dengan kekurangan gerak balas keimunan sel. Kecacatan pada gerak balas metabolisme oksidatif fagosit SLE juga dilaporkan (Wenger dan Bole 1972). Kecacatan pada sel telah dikaitkan dengan kecacatan pada fungsi penerima Fc dan komponen komplemen (Hurst, Nuki dan Wallington, 1984). Kecacatan fagositosis menerusi penerima komplemen dikaitkan dengan bilangan dan fungsi penerima tersebut, sedangkan kecacatan fagositosis menerusi penerima Fc dikaitkan dengan fungsi penerima itu sendiri kerana pertambahan penerima Fc pada monosit daripada SLE pernah dilaporkan (Hurst *et al.* 1984; Fries *et al.* 1984). Kecacatan pada fungsi penerima dikatakan berlaku pada proses penelanan tetapi tidak pada perlekatan (Salmon *et al.* 1984). Meski pun banyak kajian telah dibuat terhadap aktiviti fagositosis atau lebih jelas lagi penelanan oleh sel daripada pesakit SLE, proses pembunuhan selepas penelanan berlaku masih tidak diketahui.



*Gambarajah 5. Peratus pembunuhan bakteria oleh neutrofil daripada pesakit SLE dan kontrol normal dengan kehadiran serum opsonin sama ada daripada pesakit SLE atau kontrol normal. Setiap corak pada histogram mewakili seorang pesakit dan kontrol normal dalam setiap eksperimen.*

Aktiviti pembunuhan bakteria oleh fagosit merangkumi beberapa peringkat termasuk kemotaksis, perlekatan dan penelanan, degranulasi dan pembunuhan intrasel. Kajian kami cuba mengukur hasil akhir daripada proses keseluruhan pembunuhan iaitu aktiviti bakterisidal. Data kami menunjukkan neutrofil dan monosit daripada pesakit SLE mempunyai aktiviti bakterisidal *in vitro* yang berkesan (peratus pembunuhan bakteria sentiasa melebihi 50%). Walaupun sampel darah untuk kajian terpaksa diperolehi daripada pesakit SLE yang baru menerima rawatan drug immunosupresif, data kajian menunjukkan ia tidak mempunyai kesan langsung ke atas fungsi fagosit. Fagosit telah diketahui penting untuk pertahanan tidak spesifik perumah. Kesan drug immunosupresif mungkin bertindak ke atas pengeluaran autoantibodi oleh limfosit di dalam pesakit autoimun termasuk SLE.

Seterusnya serum daripada pesakit SLE juga tidak mengganggu aktiviti bakterisidal oleh fagosit kontrol normal dan mempunyai fungsi opsonin yang normal. Sebelum ini Hurst dan rakannya (1984) juga menunjukkan bahawa serum daripada pesakit SLE yang mempunyai kecacatan fagositosis tidak merencat fagositosis oleh monosit normal. Kajian kami hanya mengukur 'hasil akhir' daripada aktiviti keseluruhan bakterisidal. Oleh itu adalah menarik jika pengukuran pembunuhan intrasel selepas proses fagositosis tamat dapat ditentukan. Meskipun proses fagositosis atau penelanan fagosit SLE mempunyai kecacatan seperti yang dilaporkan, ini tidak bermakna tiada langsung bakteria dapat ditelan. Proses pembunuhan bakteria oleh fagosit umumnya berlaku di dalam fagosom iaitu selepas penelanan, tetapi agen pembunuhan dapat juga dikeluarkan ke ekstrasel dan pembunuhan boleh terjadi di permukaan membran sel (Okamura, Ishibashi dan Takano 1979). Kesimpulan daripada kajian ini mencadangkan fagosit daripada pesakit SLE masih mempunyai aktiviti bakterisidal yang berkesan meskipun terdapat kecacatan pada sesetengah peringkat pada proses pembunuhan bakteria. Kaitan di antara aktiviti bakterisidal fagosit pesakit SLE dengan kerentanan terhadap infeksi masih perlu diselidik.

## PENGHARGAAN

Kerja penyelidikan ini telah dibiayai oleh geran Penyelidikan Jangka Pendek, Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang. Kami juga melahirkan rasa terima kasih kepada pihak Hospital Besar Pulau Pinang di atas kerjasama mereka.

## RUJUKAN

- CHIA, D., E.V. BERETT, J. YAMAGATA, D. KNUTSON, C. RESTIVO & D. FURST. 1979. Quantitative and Characterization of Soluble Immune Complexes Precipitated from Sera by Polyethylen Glycol (PEG). *Clin. Exp. Immunol.* **37**: 299.
- FRIES, L.F., W.W. MULLINS, K.R. CHO, P.H. PLOTZ & M.M. FRANK. 1984. Monocyte Receptors for the Fc Portion of IgG are Increased in Systemic Lupus erythematosus. *J. Immunol.* **132**: 695.
- HURST, N.P., G. NUKI & T. WALLINGTON. 1984. Evidence for Intrinsic Cellular Defects of 'Complement' Receptor-mediated Monocytes Phagocytosis in Patients with Systemic Lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.* **55**: 303.
- KATAYAMA, S., D. CHIA, D.W. KHUTSON & E.V. BARNETT. 1983. Decreased Fc Receptor Avidity and Degradative Function of Monocytes from Patients with Systemic Lupus erythematosus. *J. Immunol.* **131**: 1217.
- KAVAI, M., K. LUKACS, I. SONKONLY, K. PALOCZI & G.Y. SZEGEDI. 1979. Circulating Immune Complexes and Monocyte Fc Function in Autoimmune Disease. *Ann. Rheum. (Dis).* **38**: 79.
- KOFFLER, D., V. AGNELLO, R. THOBURN & H.G. KUNKEL. 1971. Systemic Lupus erythematosus: Prototype of Immune Complex Nephritis in Man. *J. Exp. Med. (suppl).* **134**: 1695.
- LANDRY, M. 1977. Phagocyte Function and Cell Mediated Immunity in Systemic Lupus erythematosus. *Arch. Dermatol.* **113**: 147.
- OKAMURA N., S. ISHIBASHI & T. TAKANO. 1979. Evidence for Bactericidal Activity of Polymorphonuclear Leukocytes without Phagocytosis. *J. Biochem.* **86**: 469.
- SALMON, J.E., R.P. KIMBERLY, A. GIBOFKY, & M. FOTINO. 1984. Defective Mononuclear Phagocyte Function in Systemic Lupus erythematosus: Dissociation of Fc Receptor-Ligand Binding and Internalization. *J. Immunol.* **133**: 2525.
- STAPLES, P.J., D.N. GERDING, J.I. DECKER & R.S. GORDAN. 1974. Incidence of Infection in Systemic Lupus erythematosus. *Arthrit. Rheum.* **17**: 1.

- SVENSSON, B. 1980. Monocyte *in vitro* Function in Systemic Lupus erythematosus. I. A Clinical and Immunological Study. *Scand. J. Rheum. (Suppl)*. **31**: 29.
- TEMPLE, A. & G. LOEWI. 1977. The Effect of Sera from Patients with Connective Tissue Diseases on Red Cell Binding and Phagocytosis by Monocytes. *Immunology* **33**: 109.
- WARD, P.A. 1974. Leukotaxis and Leukotactic Disorders. *Am. J. Pathol.* **77**: 520.
- WENGER, M.E. & G.G. BOLE. 1972. Nitroblue Tetrazolium Test in Systemic Lupus. *N. Engl. J. Med.* **287**: 1150.
- ZVAIFLER, N.J. 1981. Aetiology and Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In *Textbook of Rheumatology*, ed W.N. Kelly, E.D. Harris, S. Ruddy, & C.B. Sledge, pp. 1079-1079. Philadelphia: W. B. Saunders.

(Diterima 10 Oktober, 1989)