

W. BICZ, A. KOJ, J. M. ZGLICZYŃSKI

METODYKA WYOSABNIANIA LEUKOCYTÓW Z KRWI LUDZKIEJ

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie
Kierownik: prof. dr B. Skarżyński

Jakkolwiek od dawna podejmowano wysiłki mające na celu oddzielenie leukocytów od czerwonych ciałek krwi w celu otrzymania materiału nadającego się do badań biochemicznych, zagadnienie to nie zostało dotychczas rozwiązane zadowalająco pod względem technicznym. Świadczy o tym wiele publikacji metodycznych, z których żadna dotychczas nie podaje sposobu oczyszczania leukocytów dostarczającego badaczowi komórki te w stanie zupełnie nieuszkodzonym i całkowicie wolnym od domieszki erytrocytów. Trudności techniczne wynikają z konieczności ograniczania się do małych objętości krwi będącej źródłem leukocytów, z wybitnej wrażliwości leukocytów na działanie różnorodnych czynników zewnętrznych, z podobnych właściwości fizycznych (ciężar właściwy, wielkość) leukocytów i erytrocytów oraz z bardzo niekorzystnego ilościowego stosunku ciałek białych do innych komórek krwi. Zazwyczaj materiałem wyjściowym jest krew pełna z dodatkiem środków hamujących krzepnięcie, które mogą wpływać szkodliwie zarówno na same leukocyty, jak i na właściwości fizykochemiczne krwi, na których opiera się rozdział elementów morfotycznych. Stosowanie wymienników jonowych (3, 13) dla zapobiegania krzepnięciu otwiera nowe, w tej chwili jeszcze nie wykorzystane, możliwości badań nad krwią.

W tych przypadkach, gdy chodzi o uzyskanie leukocytów z krwi dla analizy ich składu chemicznego, najdogodniejszym jest usunięcie erytrocytów przez hemolizę. Stosowanie do tego celu jako czynników hemolizujących hipotonicznych roztworów soli, kwasu octowego (14) lub saponin istotnie pozwala na otrzymanie leukocytów wolnych od domieszki ciałek czerwonych i to nawet z małych objętości krwi. Czynniki hemolityczne z reguły jednak zabijają lub co najmniej uszkadzają leukocyty (9), a tym samym uniemożliwiają stosowanie uzyskanych w ten sposób komórek do badań metabolicznych.

W ostatnich latach opisano liczne sposoby izolowania leukocytów na zasadzie flotacji (8, 11, 12, 16). Metody te wykorzystują różnice w ciężarze właściwym i lepkości erytrocytów i ciałek białych, a rozdział elementów morfotycznych następuje dzięki użyciu płynów o odpowiedniej gęstości, będących roztworami gumy arabskiej, albumin surowicy, gramicydyny itd. Przy zastosowaniu tych zabiegów zachodzi jednak obawa poważnego naruszenia funkcji życiowych leukocytów.

Szeroko rozpowszechnione są metody sedymentacyjne. Ponieważ erytrocyty sedymentują szybciej niż inne elementy morfotyczne, w krwi nie krzepnącej zachodzi po pewnym czasie rozdział na warstwę erytrocytów

i zawiesinę leukocytów w osoczu. Sedymentacja pełnej krwi przebiega jednak bardzo powoli, szczególnie u ludzi zdrowych i dlatego jest zabiegiem mało wydajnym. Próbowano więc przyspieszyć opadanie erytrocytów przez dodatek składników zmieniających właściwości fizykochemiczne krwi, o których wiadomo na podstawie doświadczeń, że przyspieszają sedymentację. Używano w tym celu włóknika zwierzęcego (2, 8, 15), poliwinylpirolidonu (10) lub odpowiednio przygotowanej żelatyny (6).

Zachęcające rezultaty uzyskać można przyspieszając sedymentację za pomocą swoistej aglutynacji krwinek czerwonych. W tym celu używano hemoaglutyninów roślinnych izolowanych z *Phaseolus vulgaris* (5), a w naszej pracowni robiono próby z grupowymi aglutyninami ludzkimi.

Wadą sedymentacyjnych metod otrzymywania leukocytów jest mała wydajność i długi czas trwania zabiegów utrudniający otrzymanie leukocytów świeżych. Niedogodność tę można usunąć przez dodanie substancji przyspieszających sedymentację, ale powstają w ten sposób nowe możliwości uszkodzenia struktury i czynności komórek.

Najszybciej można otrzymać leukocyty przez odwirowanie krwi w wyniku czego następuje rozdział słupa krwi na osocze i kilka warstw osadu o różnym składzie komórkowym. Na tej zasadzie opiera się wirowanie frakcjonowane (1), często przy użyciu specjalnych przyrządów. Nigdy jednak nie udaje się uzyskać po jednorazowym wirowaniu większej ilości dostatecznie czystych leukocytów. Dlatego najczęściej stosowanym zabiegiem jest wirowanie wielokrotne lub odpowiednia kombinacja sedymentacji i wirowania (4, 6, 7, 15).

Jakkolwiek za pomocą niektórych wyżej opisanych metod udaje się otrzymać praktycznie czystą zawiesinę leukocytów, to jednak bardzo skomplikowany sposób postępowania połączony z wielokrotnym wirowaniem czy wprowadzeniem substancji nieobojętnych dla komórek krwi stawia pod znakiem zapytania przydatność otrzymanego materiału do badań biologicznych. Wszelkie próby uproszczonego postępowania, które stwarzałyby mniej możliwości naruszenia funkcji życiowych leukocytów, prowadzą do otrzymania zawiesiny znacznie zanieczyszczonej krwinkami czerwonymi (4—6 erytrocytów na 1 leukocyt (6)). Wielu autorów pomija sprawę zawartości erytrocytów w otrzymanej zawieszynie, mimo że według naszych spostrzeżeń nie jest to obojętne. Staraliśmy się zatem opracować metodę otrzymywania leukocytów możliwie w najmniejszym stopniu zmieniającą ich pierwotne środowisko przy jednoczesnej redukcji do minimum zanieczyszczenia krwinkami czerwonymi. Cel ten osiągnęliśmy poniżej opisaną metodą.

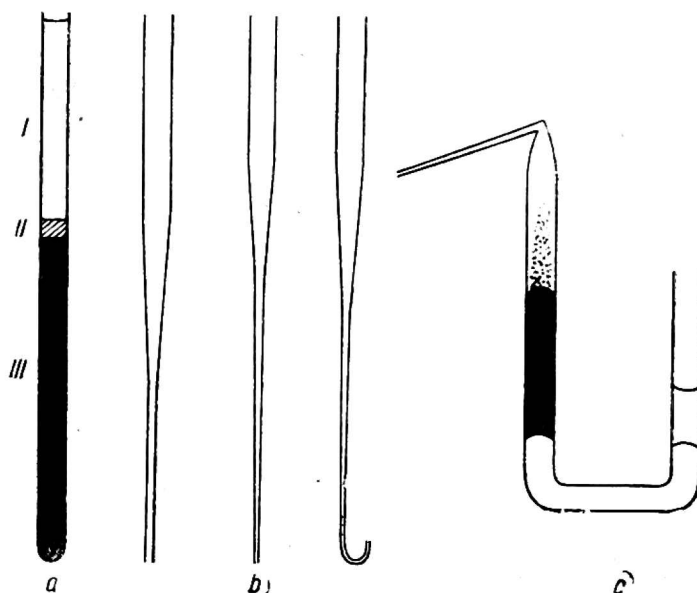
MIKROMETODA IZOLOWANIA LEUKOCYTÓW LUDZKICH

1. Zasada metody

Wyosabnianie leukocytów oparliśmy na stosowaniu wirowania i frakcjonowanej sedymentacji. Przez ostrożne zebranie pewnych warstw osadu komórkowego po odwirowaniu krwi można uzyskać dość duże zagęszczenie leukocytów, jednakże jeszcze znacznie zanieczyszczonych krwinkami czerwonymi. Sedymentacja tak uzyskanej zawiesiny komórek w specjalnym naczynku pozwala na usunięcie większości erytrocytów przy dalszej możliwości zagęszczenia krwinek białych i rozdziału ich na dowolne frakcje.

2. Aparatura

Zestaw przyrządów używanych przez nas jest bardzo prosty i daje się bez trudu sporządzić w każdej pracowni. Probówki wirówkowe o objętości około 1 ml sporządzone były z rurek ze szkła jenajskiego o średnicy wewn. 4 mm. Zestaw pipet był przygotowany przez wyciągnięcie nad płomieniem w kapilarne zakończenie rurek jenajskich odpowiedniej średnicy.



Ryc. 1. a — Probówka z krwią po wirowaniu (I — warstwa osocza, II — warstwa pośrednia, III — warstwa erytrocytów); b — pipetki: pipetka do zbierania osocza i 2 rodzaje wąskich pipet do zbierania kożucha; c — kogut wypełniony sedymentującą zawiesiną.

Fig. 1. a — test-tube with blood after centrifugation (I — the layer of plasma, II — the intermediary layer, III — the layer of erythrocytes); b — pipettes: pipette for plasma collection and 2 types of narrow pipettes for collection of cellslayer; c — the double arms vessel „cock“ — filled with the sedimentating suspension.

Pipety o szerszym ujściu (ϕ około 1 mm, ryc. 1b) służą do odciągnięcia osocza z probówki wirówkowej (I na rys. 1a). Do zebrania pośredniej warstwy komórkowej (II na rys. 1a) używaliśmy pipety z włosowatym zakończeniem o wewnętrznej średnicy 0,2—0,3 mm. Może ona mieć zakończenie proste lub kolankowato wygięte (ryc. 1b). Naczynie sedymentacyjne nazwane przez nas „kogutem“ jest rurką w kształcie litery U z włosowatym wygiętym zakończeniem (ryc. 1c). Średnica rurki ze szkła jenajskiego wynosi około 4 mm, a kapilary końcowej około 0,2—0,3 mm. Zawiesina mająca ulec sedymentacji zostaje wprowadzona przez szerokie ujście koguta do jego światła (w objętości 0,5 do 1,0 ml), po czym przez wywarcie odpowiedniego ciśnienia na szerokie ujście zostaje wepchnięta do włosowatego dzioba. Słup zawiesiny utrzymuje się dzięki działaniu siły włosowatości i napięcia powierzchniowego.

3. P o s t ę p o w a n i e

Z żyły łokciowej pobiera się 8 ml krwi do 2 ml roztworu cytrynianu (0,7% NaCl + 1,1% cytrynianu sodu) umieszczonego w jałowej strzykawce. Pobraną krew natychmiast poddaje się wirowaniu w opisanych wyżej probówkach przy 2 500 obr./min. przez 2 min., licząc czas od chwili osiągnięcia maksymalnych obrotów do rozpoczęcia hamowania. Przy przestrzeganiu tych warunków jednolity słup krwi w probówkach ulega rozdzieleniu na kilka warstw (ryc. 1a). Górną część probówki zajmuje osocze pozbawione elementów morfotycznych, w dolnej znajdują się zagęszczone erytrocyty. Ponad erytrocytami zawarta jest warstwa pośrednia bogata w leukocyty, w której wyróżnić można, postępując od góry, następujące frakcje:

1. Warstwa silnie opalizująca zawierająca zagęszczone płytki i limfocyty. Drobne odchylenia od podanego powyżej czasu i szybkości wirowania powodują jej rozproszenie w surowicy lub zmieszanie z frakcją następną.

2. Białozółty „kozuch“ zawierający wszystkie postacie krwinek białych z przewagą limfocytów.

3. Warstwa czerwonoszara składająca się z mieszaniny krwinek czerwonych i granulocytów.

Następnym etapem izolowania leukocytów jest zebranie wyżej opisanej warstwy pośredniej z probówek wirówkowych i przeniesienie jej do naczynka sedymentacyjnego. Kapilarną pipetką (ryc. 1b) odciąga się osocze aż do dolnej granicy warstwy opalizującej. Następnie pod kontrolą wzroku przy odpowiednim oświetleniu probówki wprowadza się węższą pipetkę (ryc. 1b) i ostrożnie zbiera wszystkie frakcje bogate w leukocyty. Wskazane jest, aby pipetka posiadała cechę pozwalającą na zbieranie zbliżonych do siebie objętości zawiesiny z każdej probówki. Ogólna objętość zebranego w ten sposób materiału (przy 10 ml krwi) nie powinna przekraczać 1 ml. Po dokładnym wymieszaniu zawiesiny umieszcza się ją w dwu kogutach jak opisano poprzednio. W celu uniknięcia parowania szersze ujście zamyka się plombą osocza.

Sedymentację można przeprowadzać w rozmaitych temperaturach, ale najszybciej zachodzi ona w 37°. Przy tej temperaturze najlepsze wyniki w oczyszczeniu i zagęszczeniu leukocytów otrzymuje się przez sedymentację trwającą 45—60 min. Po upływie tego czasu zawiesina krwinek w kogucie rozdziela się na dwie warstwy, z których górna jest pożądanym materiałem (ryc. 1c). Opróżnienie koguta przeprowadza się przez wywarcie ciśnienia na jego szerokie ujście, wskutek czego zawiesina komórek wydostaje się powoli przez włosowate zakończenie. Pierwszą kroplę spływającą z dzioba należy odrzucić, ze względu na uwięźle we włosowatym ujściu krwinki czerwone. Następne krople zawierają już prawie czyste leukocyty o rosnącym w miarę opróżniania koguta stężeniu. Należy dodać, że wstępne porcje zawierają prawie czyste limfocyty, a dopiero dalsze są stopniowo bogatsze w inne postacie ciałek białych.

OCENA METODY

Przedstawiona wyżej mikrometoda pozwala na uzyskanie z 8 ml krwi żyłnej ludzi zdrowych zawiesiny leukocytów w ilości około 0,1 ml przy stężeniu 30 000—100 000 leukocytów/mm³. Dłuższa sedymentacja i ograniczenie ilości otrzymanego materiału pozwala na uzyskanie wyższych

stężeń. Uzyskane w ten sposób maksymalne stężenie leukocytów wynosiło 368 000/mm³. Przeciętna wydajność metody wynosi około 10⁰%. Cyfry te wskazują na szczególną przydatność metody do badań na materiale ludzkim, ze względu na małą ilość krwi wyjściowej i znaczną wydajność.

Badanie składu uzyskanej zawiesiny wykazuje, że leukocyty stanowią w niej 70—85% ogólnej ilości komórek, a reszta przypada na erythrocyty, podczas gdy w pełnej krwi zawartość leukocytów wyraża się cyfrą zaledwie 0,1%. Miarą wysokiego oczyszczenia leukocytów uzyskanego w otrzymanej zawieszynie jest ich stosunek do krwinek czerwonych, który wynosi około 4 leukocyty na 1 erythrocyt, wobec proporcji 1 leukocyt na 1000 erythrocytów w pełnej krwi. Próby usunięcia pozostałego niewielkiego zanieczyszczenia erythrocytami napotyka się na trudności wynikłe z podobnego współczynnika sedymentacji tych krwinek czerwonych i leukocytów. Można wprawdzie pokusić się o uzyskanie leukocytów o jeszcze wyższym oczyszczeniu, ale związane to jest z dodatkowymi zabiegami, o których wspomniano na wstępie, a które zmieniają naturalne środowisko leukocyta, jakim jest osocze, i wobec tego wywoływać mogą zmiany w metabolizmie i morfologii. Zresztą zanieczyszczenie erythrocytami rzędu 0,2—0,4 erythrocyta na 1 leukocyt nie stanowi zasadniczej przeszkody w badaniach metabolizmu leukocytów wobec bardzo małej aktywności oddechowej krwinek czerwonych.

Badanie obrazu *Schillinga* leukocytów z otrzymanej zawiesiny pozwala stwierdzić, że z reguły następuje przesunięcie w kierunku limfocytozy, głównie kosztem granulocytów obojętno-chłonnych. Ilość limfocytów wyrażona w odsetkach waha się od 40 do 60%. Odpowiednie postępowanie pozwala na uzyskanie prawie czystych limfocytów (80—90%). Osiągnąć to można przez zebranie po wirowaniu warstwy opalizującej i powierzchni kozucha oraz pominięcie niższych warstw surowicy przy opróżnianiu koguta. Otrzymanym leukocytom towarzyszą płytki, jest ich więcej we frakcji limfocytowej.

Po przeprowadzeniu pewnych modyfikacji w metodyce można otrzymać prawie czyste granulocyty (80—90%). Cytrynianową krew rozcieńcza się w stosunku 5 : 1 własnym osoczem, otrzymanym z wirowania i umieszcza w kogutach. Po 60—90 min. sedymentacji zbiera się warstwę osocza graniczącą bezpośrednio z krwinkami czerwonymi. Ilość zebranego materiału jest tu jednak mała i zagęszczenie jest mniejsze (10 000—30 000 leukocytów/mm³).

Opisana metoda otrzymywania leukocytów nie ogranicza się tylko do krwi cytrynianowej, ale znajduje zastosowanie także przy innych sposobach zapobiegania krzepnięciu krwi. Na przykład postępowanie z krwią heparynową jest takie samo, jak w przypadku krwi cytrynianowej, a wyniki zagęszczenia i oczyszczenia leukocytów są nawet nieco lepsze.

W celu pozbycia się płytek towarzyszących leukocytom, a których zawartość może przekraczać stężenie płytek w krwi pełnej, należy przed typowymi zabiegami krew bezpośrednio z żyły przepuścić przez kolumnę z wymiennikiem jonowym. Najlepiej płytki są absorbowane przez Dowex-50 Na⁺ (3), słabiej przez inne rodzaje żywic.

Przy odpowiednim postępowaniu można łatwo zachować jałowość uzyskanej zawiesiny leukocytów, co w niektórych badaniach jest bardzo istotne. W takim przypadku przed przystąpieniem do zabiegów aparatura szklana musi być wyjałowiona w temp. 180°, a przy wszystkich manipulacjach trzeba stosować się do zasad aseptyki.

Wobec dużej wrażliwości krwinek białych i ułatwionego ich rozpadu przy zetknięciu się z powierzchniami szklanymi, wielu autorów poleca stosowanie naczyń plastikowych lub powlekanie naczyń szklanych substancjami hydrofobowymi. Użyta przez nas aparatura szklana nadaje się wprost do zastosowania tej modyfikacji. Wszystkie probówki, pipety i koguty muszą wówczas zostać powleczone od wewnątrz cienką warstwą parafiny lub silikonu.

Prostota postępowania, znaczna wydajność, mała ilość krwi wyjściowej, stosunkowo duże oczyszczenie leukocytów zawieszonych w ich własnym osoczu, możliwość wyboru składu morfologicznego krwinek białych, jak i użycia rozmaitych antykoagulantów, oraz krótki czas wszystkich zabiegów stanowi o użyteczności tej mikrometody. Otrzymana w ten sposób zawiesina leukocytów nadaje się zarówno do badań metabolizmu i innych przejawów życiowych krwinek białych, jak i do rozmaitych badań cytochemicznych, biologicznych, a nawet morfologicznych.

*

*

*

Autorzy pragną wyrazić podziękowanie prof. dr *B. Skarżyńskiemu* za cenne wskazówki udzielane w czasie pracy i pomoc przy jej ukończeniu.

В. Бич, А. Кой, И. М. Зглищински

МЕТОДИКА ИЗОЛИРОВАНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ ИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ

W. Bicz, A. Koj, J. M. Zgliczyński

THE TECHNIQUE OF ISOLATION OF LEUKOCYTES FROM HUMAN BLOOD

PIŚMIENNICTWO

1. Bessis M.: Cytologie sanguine norm. et path., Masson, Paris 1948, cyt. wg Schapira G.: Patologie chimique, Paris 1952, 1079. — 2. Buckley E. S., Powell M., Gibson J. G.: J. Lab. Clin. Med., 1950, 36, 29. — 3. Denkwalter R. G., Kazal L. A.: Ion exchange technology, New York 1957. — 4. Kieler J.: The leukemias: etiology, patophysiology and treatment, New York 1957, 215. — 5. Li J., Osgood E. A.: Blood, 1949, 4, 670. — 6. Malec J., Zakrzewski K.: Nature, 1957, 180, 551. — 7. McLeod J., Rhoads C. P.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1939, 41, 210, cyt. wg Schapira G.: Patologie chimique Paris 1952, 1079. — 8. Minor A. H., Burnett L.: Blood, 1948, 3, 799. — 9. Ponder E., MacLeod J.: J. Gen. Physiol., 1936, 20, 267. — 10. Robineaux R., Lebrun J., Kourilsky R., Delaunay A.: Ann. de l'Inst. Pasteur, 1949, 77, 710.
11. Singer T., Silberbach L., Schwartz A.: Blood, 1947, 11, 88. — 12. Spear F.: Blood, 1948, 11, 1055. — 13. Steinberg R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1944, 56, 124. — 14. Szilard P.: Arch. Ges. Physiol., 1926, 211, 597. — 15. Valentine W. N., Beck W. S.: J. Lab. Clin. Med., 1951, 38, 39. — 16. Vallee B. L., Hughes W. L., Gibson J. G.: Blood Special Issue, 1947, 1, 82, cyt. wg Beck W. S., Valentine W. N.: Cancer Res., 1952, 12, 818.

Otrzymano: dnia 20.XII.1957 r.