DIAGN. LAB., 1975, XI, Nr 5-6

ZBIGNIEW SAGAN, ALICJA KENDZIOREK, BOŻENA UŚCINOWICZ

PROSTA METODA IZOLACJI LIMFOCYTÓW

Z Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie
Kierownik: prof. dr med. *J. Krawczyński*

Opisano własną modyfikację procedury izolowania limfocytów z krwi obwodowej przy użyciu dostępnych w kraju odczynników: uropoliny i dekstranu 200 000 lub gumy arabskiej. Zastosowana procedura pozwoliła nie tylko na uzskanie zawiesiny limfocytów o dużym stopniu czystości lecz także na praktycznie 100% odzysk.

W nowoczesnej diagnostyce laboratoryjnej coraz częściej przedmiotem badań są zawiesiny komórek. W szczególności dotyczy to limfocytów. Poznanie roli tych komórek w procesach odpornościowych sprawiło, że istnieje obecnie coraz większe zapotrzebowanie na proste, łatwe, lecz jednocześnie niezawodne metody izolowania limfocytów z krwi obwodowej.

Jedna z pierwszych wprowadzonych do praktyki metod izolowania limfocytów polegała na wymieszaniu badanej krwi z odczynnikiem, zawierającym substancję zdolną do agregowania krwinek czerwonych. Wskutek agregacji tworzyły się z krwinek czerwonych duże i ciężkie zlepy, które z łatwością opadały na dno naczynia. W płynie znajdującym się nad osadem pozostawały leukocyty (3). Ażeby wyizolować z nich limfocyty wykorzystywano zjawisko adhezji granulocytów i monocytów na różnego rodzaju powierzchniach: szkle (6), nylonie (10), piasku (2). Przejście zawiesiny leukocytów przez kolumnę wypełnioną watą lub perełkami szklanymi, watą nylonową lub piaskiem powodowało, że w eluacie z kolumny znajdowano przede wszystkim limfocyty, nie ulegające adhezji. Metoda ta wykazuje jednakże pewną niedogodność. Cała procedura izolacji trwa stosunkowo długo, a uzyskana zawiesina limfocytów zawiera dość znaczną domieszkę krwinek czerwonych. Metoda ta daje poza tym niewielki odsetek limfocytów oraz, jak się okazało, powoduje wybiórczą utratę znacznego odsetka limfocytów B, które w odróżnieniu od limfocytów T posiadają jednak własności adhezji (1).

Punktem zwrotnym w metodyce izolowania limfocytów stało się wprowadzenie przez *Bøyuma* (4) techniki wirowania w gradiencie gęstości i w obecności substancji, agregującej krwinki czerwone. Wspomniana technika opiera się na różnicy ciężarów właściwych różnych rodzajów leukocytów, z których cięższe (granulocyty) podczas wirowania w gradiencie gęstości szybciej opadają na dno probówki, lżejsze zaś (limfocyty) gromadzą się w tych warunkach na granicy fazy o wysokim ciężarze właściwym, skąd można je łatwo wyizolować. Krwinki czerwone, które należą także do lekkich komórek po zetknięciu się z substancją powodującą ich agregację zlepiają się i jako ciężkie cząstki opadają przy wirowaniu na dno probówki.

W celu uzyskania odpowiednio wysokiego ciężaru właściwego powszechne zastosowanie znalazły preparaty jodowe, używane jako środki cieniujące w radiodiagnostyce (Isopaque lub Sodium Metrizoate — Nyeco, Oslo, Urographin — Schering lub krajowy preparat Uropolinum — Polfa) (3, 4, 7—9). Jako środków agregujących krwinki czerwone używa się najczęściej dekstranu, metylocelulozy i fikolu (3).

Do niedawna użytkownik musiał sam przygotowywać roztwór o odpowiednim ciężarze właściwym. Ostatnio ukazał się na rynku gotowy preparat w ampułkach, który pod nazwą „Lymphoprep" (firma Nyegaard, Oslo) stanowi mieszaninę Sodium Metrizoate i fikolu.

Celem naszej pracy było ustalenie optymalnych warunków dla techniki izolowania limfocytów, przy użyciu preparatu, sporządzonego ze składników pochodzenia krajowego i tym samym powszechnie dostępnych.

MATERIAŁ I METODYKA

Krew, z której zamierzano izolować limfocyty pobierano na suchy wersenian sodowy (5 ml krwi na 62,5 mg werseniana sodowego). Jako środka do wytworzenia gradientu gęstości używano dostępnego preparatu „Uropolinum" 75% — Polfa (Natrium amido-trizoat: N-methylglucaminum amidotriozoat, a jako środka agregującego krwinki czerwone — preparatu Dextran 200 000 — Polfa lub gumy arabskiej (wg FP III) w postaci 6% wodnych roztworów.

W zależności od ciężaru właściwego roztworu używanego do izolowania limfocytów mieszano uropolinę z roztworem dekstranu lub gumy arabskiej w różnych proporcjach. W ten sposób przygotowywano roztwory o następujących ciężarach właściwych: 1,077, 1,080 i 1,090. Pierwszy z nich odpowiadał dokładnie ciężarowi właściwemu preparatu „Lymphoprep" a pozostałe stanowiły punkt wyjścia do ustalenia optymalnego ciężaru właściwego roztworu izolującego, przy którym odzysk imfocytów byłby największy.

Zastosowano następującą procedurę postępowania. Krew obwodową po pobraniu i wymieszaniu jej z suchym wersenianem sodowym rozcieńczano 0,9% roztworem NaCl w stosunku 1 : 1. Tak przygotowaną krew w ilości 4 ml nawarstwiano na 2 ml roztworu izolującego w probówkach wirówkowych o pojemności 10 ml i średnicy ok. 13 mm, a następnie wirowano przy 400 x g przez 40 minut. Po odwirowaniu odciągano przy pomocy pipetki Pasteura warstwę komórek z granicy faz, starając się zebrać wszystkie komórki, a to w celu możliwie dokładnej oceny stopnia odzysku. Otrzymaną zawiesinę komórek płukano dwukrotnie zbuforowanym roztworem soli — Tris — BSS wg przepisu Favoura (5) wirując za każdym razem przy 400 x g przez 15 minut. Ostatecznie komórki zawieszano w 0,25 ml roztworu Tris — BSS i liczono w komorze Fuchsa — Rosenthala, rozcieńczając zawiesinę płynem Türka w stosunku 1 : 10.

Czystość uzyskanych zawiesin oceniano na podstawie oglądania pod mikroskopem preparatów przygotowanych z tych zawiesin, barwionych metodą Pappenheima oraz na obecność peroksydazy wg techniki Grahama. Oceny żywotności komórek dokonywano barwiąc preparaty 1% wodnym roztworem błękitu trypanu. Próbę odzysku wykonywano, porównując liczbę limfocytów, znalezionych przy zastosowaniu opisanej procedury izolowania w przeliczeniu na 1 μl krwi pełnej z liczbą limfocytów, wyliczoną na podstawie leukocytozy i odsetka limfocytów w barwionym preparacie pełnej krwi (wzór krwinek białych) i w przeliczeniu na tę samą objętość pełnej krwi.

WYNIKI

Jak wspomniano uprzednio, do izolowania limfocytów używano początkowo roztworu uropoliny i dekstranu lub gumy arabskiej o ciężarze właściwym 1,077 t. zn. takim, jaki posiada preparat „Lymphoprep". Stosując jednakże roztwór o takim ciężarze właściwym uzyskano wprawdzie zawiesinę limfocytów, której czystość oceniana na podstawie barwionego preparatu wyniosła ok. 98%, ale nie uzyskano zadowalającego odzysku. W związku z tym przeprowadzono izolowanie limfocytów przy wyższych ciężarach właściwych (1,080 i 1,090) wychodząc z założenia, że mały odzysk limfocytów przy ciężarze właściwym 1,077 jest spowodowany utratą pewnego ich odsetka w wyniku działania zastosowanej przy wirowaniu siły odśrodkowej, wynoszącej 400 x g. Wyniki uzyskane przy izolowniu limfocytów z zastosowaniem preparatu „Lymphoprep", jak również przy zastosowaniu własnych mieszanin o ciężarach właściwych 1,077, 1,080 i 1,090 przedstawiono w tabeli I. Należy zaznaczyć, że uzyskane we wszystkich wypadkach zawiesiny zawierały zawsze około 98% limfocytów, na podstawie preparatu barwionego met. Pappenheima lub około 90% — na podstawie określenia własności peroksydatywnych komórek, znajdujących się w zawiesinie.

Tabela I

Wyniki próby odzyskania limfocytów w odsetkach dla preparatu „Lymphoprep" i własnych roztworów izolujących o różnych ciężarach właściwych. Za 100% przyjęto limfocytozę obliczoną na podstawie oznaczonej leukocytozy i odsetka limfocytów w preparacie barwionym pełnej krwi

Liczba próbek n	„Lymphoprep"	Własne roztwory izolujące o c. wł.		
		1,077	1,080	1,090
8	82,3±9,0	75,0±2,6	78,9±5,8	100,2±4,4

Jak wynika z tabeli, najlepsze wyniki, odpowiadające odzyskowi w granicach 100% uzyskano, gdy ciężar właściwy roztworu izolującego wyniósł 1,090. Taki ciężar właściwy otrzymywano uzupełniając 18 ml 75% uropoliny do 100 ml za pomocą 6% wodnego roztworu dekstranu lub 6% wodnego roztworu gumy arabskiej.

Dane z tabeli I wykazują, że stosując własny roztwór izolujący o ciężarze właściwym 1,090 można było uzyskać największy stopień odzysku limfocytów, przy czym stopień ten był wyższy od otrzymanego przy użyciu preparatu „Lymphoprep".

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przy badaniach prowadzonych na limfocytach badający powinien mieć pewność, że stosowana przez niego zawiesina jest możliwie najczystsza, t. zn., że zawiera możliwie najmniejszą domieszkę innych komórek, i że w skład jej wchodzą praktycznie wszystkie limfocyty, jakie znajdowały się w próbce pełnej krwi użytej do badania (100% odzysku). Sprawa ta jest szczególnie istotna, gdy izoluje się limfocyty w celu określenia odsetka komórek obydwu głównych subpopulacji T i B, albo gdy celem badania są własności wykazywane przez poszczególne subpopulacje (testy

rozetowe spontaniczne lub swoiste, test hamowania migracji makrofagów (MIF), test mieszanej hodowli (MCL) i inne). Okazało się bowiem, że różne warunki izolowania limfocytów powodują w konsekwencji uzyskanie zawiesin o różnych proporcjach limfocytów T i B co uniemożliwia właściwe interpretowanie wyników testów. Dlatego też metoda izolacji, dająca 100% odzysku limfocytów ma duże znaczenie praktyczne. Dotychczas jednakże w pracach omawiających metody izolowania limfocytów ograniczano się z reguły tylko do oceny czystości zawiesiny limfocytów (7, 8, 9). Prawdopodobnie jest to powodem, że specjalnie przygotowany do izolowania limfocytów preparat „Lymphoprep" nie daje 100% odzysku, co z pewnością stanowi jego istotną wadę. Podana przez *Hołowieckiego* i wsp. (8) metoda izolowania limfocytów z użyciem czystej uropoliny daje tylko ok. 70% odzysku, przy czym odzysk ten wykazuje bardzo duże wahania (odchylenie standardowe ± 22,8%). Przy użyciu innego środka jodowego — Urographin — Schering otrzymano odzysk wynoszący zaledwie ok. 52% (7).

Wydaje się więc, że opisana wyżej własna procedura izolowania limfocytów może mieć duże znaczenie.

Należy zaznaczyć, że własny roztwór izolujący można także zastosować do zagęszczania leukocytów przy określaniu odsetkowego wzoru krwinek białych, u osób z leukopenią. Nawarstwiając badaną krew na roztwór izolujący i pozostawiając probówkę bez wirowania, otrzymuje się zwykle po 0,5 h na granicy faz pierścień złożony z leukocytów, reprezentujący wszystkie ich rodzaje w prawidłowych proporcjach. Po odciągnięciu komórek, przepłukaniu i zawieszeniu ich w środowisku koloidowym można wykonać rozmaz barwiony, w którym duża gęstość krwinek białych umożliwi szybkie obliczenie wzoru odsetkowego leukocytów.

З. Саган, А. Кэндзиорэк, Б. Усьцинович

ПРОСТОЙ МЕТОД ИЗОЛИРОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ

Содержание

Описывается собственная модификация процедуры изолирования лимфоцитов из периферической крови и использованием доступных в стране реактивов: уропролина и декстрина 200 000 либо гуммирабика. Применяемая процедура позволила не только получить взвесь лимфоцитов с высокой степенью чистоты, но также практически 100% ретура.

Z. Sagan, A. Kendziorek, B. Uścinowicz

SIMPLE METHOD OF LYMPHOCYTES ISOLATION

Summary

Modified procedure for isolation of periperal lymphocytes using available reagents: uroproline and dextrane 200.000 or Arabic gumm is described. This method results not only in receiving lymphocyte suspension of high purity but also in practically 100 per cent recovery.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bianco C., Patrick R., Nussenzweig V.*: J. Exp. Med., 1970, 132, 702. — 2. *Błaszczyszyn M.*: Badania nad izolowaniem limfocytów, granulocytów i monocytów oraz nad oznaczaniem cholesterolu całkowitego w poszczególnych rodzajach leukocytów i w surowicy krwi. Praca doktorska. — 3. *Boyum A.*: Nature, 1964, 204, 794. — 4. *Boyum A.*: Scand. J. Clin.Lab. Invest., 1968, 21, suppl. 97. — 5. *Favour C. B.*: Antigen-antibody reactions in tissue culture. Immunological Methods ed. J. R. Ackroyd, Oxford. — 6. *Garvin J. E.*: J. Exp. Med., 1961, 114, 51. — 7. *Hołowiecki J., Illiger H. J., A. van Felten*: Arch. Immun. Ther. Exp., 1972, 22, 177. — 8. *Hołowiecki J., Stella B., Krawczyk M., Huzarski J., Kubica L.*: Acta Haemat. Polon., 1974, 3, 195. — 9. *Mączyńska-Rusiniak B., Żupańska B.*: Acta Haemat. Polon., 1974, 2, 111. — 10. *Rabinowitz Y.*: Blood, 1964, 33, 811.

Wpłynęło dnia 20. XII. 1974 r.

Adres autorów: Dr med. Z. Sagan, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej SMKP, ul. Banacha 1 A, 02-097 Warszawa.