

ANNA CZERNICHOWSKA, MICHAŁ KONOPA, JACEK PRZYMUS

Zastosowanie różnych metod do identyfikacji limfocytów T i B u psów

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR,
Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Zgodnie z wynikami badań ostatnich lat w odpowiedzi immunologicznej organizmu u ptaków i ssaków zasadniczą rolę spełniają dwie podstawowe grupy komórek. Jedne odpowiedzialne są za odporność typu humoralnego i pochodzą od szpikopochodnej linii komórek B, drugie zaś warunkują istnienie odporności typu komórkowego i odpowiadają grasiczozależnym komórkom T. U zwierząt czyniono już wiele prób identyfikacji tych komórek, głównie w oparciu o ich markery powierzchniowe. Różnicowano limfocyty T i B u bydła (6, 7, 8, 14, 17, 25), koni (14, 22), świń (4, 9, 14, 21), owiec (20), kotów (23) i niejednokrotnie u zwierząt laboratoryjnych. Także i pies, jako ewentualny model w badaniach immunologicznych oraz w celu zrozumienia istoty procesów odpornościowych zachodzących u tego gatunku był obiektem zainteresowania. U psów wyróżniono dwie odmienne populacje limfocytów T i B przede wszystkim poprzez określenie ich receptorów powierzchniowych (1, 3, 5, 11, 26).

W niniejszej publikacji przedstawiono próbę zastosowania testu cytoenzymatycznego oraz testów rozetowych EA i EAC dla wykrycia na powierzchni izolowanych z krwi limfocytów psów receptorów dla erytrocytów opłaszczonych hemolizyną oraz dopełniacza.

Materiał i metody

Do badań użyto 25 psów, mieszańców, w wieku od 4 do 12 miesięcy, wagi od 5 do 20 kg, obojga płci. U wszystkich zwierząt określono ilość leukocytów, obraz białokrwinkowy wg Schillinga oraz odsetek limfocytów esterazododatnich i esterazoujemnych wg metody podanej przez Muellera i wsp. (16) i przystosowanej do wykonania w rozmazach krwi. Jako substratu użyto octanu alfa naftyli.

Izolację limfocytów do testów rozetowych przeprowadzono poprzez rozdział krwi heparynowej (10 j./ml) z użyciem mieszaniny izolującej (9% Ficoll zmieszany z 75% Uropoliną) o ciężarze właściwym 1,09. Krew (1 ml) nawarstwiano na płyn izolujący (3 ml), znajdujący się w probówkach i wirowano przez 10 min. przy 480 g. Limfocyty zbierano z interfazy i dwukrotnie płukano w płynie Hanksa z dodatkiem 10% inaktywowanej surowicy cielęcej (HBSS+10%CS). Sporządzono zawiesiny komórek o gęstości $2,5 \times 10^6$ /ml. Żywotność komórek sprawdzana za pomocą 0,2% błękitu trypanu wynosiła około 90%.

Test rozetowy EA wykonano używając erytrocytów baranich (SRBC) inkubowanych w płynie Alsevera minimum 7 dni. Po ich trzykrotnym przepłukaniu w HBSS+10%CS wykonywano 5% zawiesinę i inkubowano ją 60 min. w temp. 37°C z surowicą anty SRBC w rozcieńczeniu o jeden niższym od miana aglutynacyjnego. Opłaszczono erytrocyty płukano trzykrotnie w HBSS+10%CS i po ostatnim płukaniu sporządzano 1% zawiesinę. Po połączeniu równych części opłaszczonych erytrocytów oraz limfocytów

inkubowano mieszaninę przez 15 min. w 37°C, odwirowywano 5 min. przy 480 g i odkładano na noc do lodówki. Procent limfocytów tworzących rozetki określano po przeliczeniu 300 komórek, a za rozetę uważano limfocyt z przyłączonymi co najmniej trzema erytrocytami.

Test rozetowy EAC wykonano inkubując 1% zawiesinę opłaszczonych hemolizyną krwinek z równą objętością surowicy mysiej (C3H) rozcieńczonej 1:10 HBSS+10%CS. Po 30 min. inkubacji w temp. 37°C krwinki przemywano dwukrotnie. Rozety przygotowywano i odczytywano, w metodzie EA. Do wybarwienia limfocytów używano błękitu metylenowego. Statystycznej oceny wyników dokonano za pomocą testu analizy wariancji.

Wyniki i omówienie

Stan kliniczny zwierząt w czasie wykonywania badań nie budził zastrzeżeń. Zarówno liczba leukocytów, jak i obraz białokrwinkowy nie wykazywały istotnych odchyśleń od stanu przyjętego za fizjologiczny u psów. W testach rozetowych skoncentrowano się na identyfikacji limfocytów B. Ze względu na pewne trudności, które zawsze towarzyszą ich wykonaniu zastosowano równocześnie nieco wygodniejszą metodę wg Muellera i wsp. (16). Pozwala ona jednocześnie ustalić procent limfocytów T, jak i B, na podstawie spostrzeżenia dokonanego u myszy, że te pierwsze zawierają w cytoplazmie niespecyficzną esterazę, którą odpowiednim barwieniem parazoaniliną można wykazać, a drugie są jej pozbawione. Modyfikacja w postaci wykonania testu w rozmazach krwi pozwala na stosunkowo łatwe wykonanie.

Tab. 1. Procent limfocytów T i B u zdrowych psów

Limfocyty	Rodzaj testu		
	cytoenzymatyczny	EA	EAC
T	70,04 ± 6,15	—	—
B	29,96 ± 6,15	23,78 ± 9,89	30,21 ± 10,17

Stwierdzono (tab. 1), że poziom limfocytów B określany w trzech różnych testach był bardzo podobny. Dużą zbieżność wyników 29,96 i 30,21 otrzymano w teście cytoenzymatycznym i EAC. Większa średnia liczba limfocytów B w teście EAC niż EA jest najprawdopodobniej wynikiem uchwycenia większej ilości receptorów na powierzchni komórek (2). Otrzymane wartości nie odbiegają w zasadniczy sposób od wykazanych przez Bowlesa (3), który stwier-

dził, że 35 do 63% limfocytów krwi u psa tworzy układy rozetowe EAC.

Szersze wprowadzenie metody cytoenzymatycznej będzie możliwe po dalszych badaniach zmierzających do wykazania, że limfocyty esterazododatnie i esterazoujemne są u psów jednocześnie nosicielami innych markerów charakterystycznych dla limfocytów T i B. U myszy udowodniono to ponad wszelką wątpliwość (16, 19). Podobne badania wykonuje się u ludzi (10, 13, 15, 25). U bydła zauważono, że 64,2% limfocytów dających dodatnią reakcję z esterazą tworzy rozety E, a tylko 38,3% również reagujących dodatnio tworzy rozety EAC (25). Śledzenie pewnych procesów patologicznych, zwłaszcza w przebiegu chorób zakaźnych i inwazyjnych zachęca do stosowania różnych technik badawczych z zakresu immunologii, między innymi również oznaczanie poziomu limfocytów T i B. Typowe metody identyfikacji tych komórek znalazły już zastosowanie, chociażby w białaczce u bydła (12, 14). Natomiast test cytoenzymatyczny u dużych zwierząt jest dopiero szerzej wprowadzany, na przykład w listeriozie (24). Znajduje on również zastosowanie w badaniach pewnych stanów chorobowych u ludzi (18).

Wniosek

W ustalaniu odsetka limfocytów T i B we krwi psów mogą być stosowane metody: cytoenzymatyczna, rozetowa EA i EAC. Różnice między ilością oznaczonych tymi metodami limfocytów nie są statystycznie istotne.

Piśmiennictwo

- Babiuk L. A.: *Immunology* 35, 733, 1978.
 - Bianco C., Patrick R., Nussenzweig V.: *J. exp. Med.* 132, 702, 1970.
 - Bowles Ch. A., White G. S., Lucas D.: *J. Immunol.* 114, 399, 1975.
 - Escaradillo C., Binns R. M.: *Int. Arch. Allergy app. Immun.* 48, 267, 1975.
 - Esser R. E., Cosgrove M., Scott G., Cosimi A. B.: *Transplant.* 24, 239, 1977.
 - Fruchtmann R., Uhlenbruck G., Schmid D. D., Cwiik S.: *Zbl. Vet. Med. B* 24, 486, 1977.
 - Grewal E. S., Rouse B. T., Babiuk L.: *Can. J. comp. med.* 40, 298, 1976.
 - Higgins D. A., Stack M. J.: *Clin. exp. Immunol.* 27, 348, 1977.
 - Johansen K. S., Johansen T. S., Talmage D. M.: *J. Allergy clin. Immunol.* 54, 483, 1974.
 - Knowles D. M., Holck S.: *Lab. Invest.* 39, 70, 1978.
 - Krakowska S., Guyot D. J.: *Infect. Immun.* 17, 73, 1977.
 - Lima de G. E., Mitscherlich E.: *Zbl. Vet. Med. B*, 20, 665, 1973.
 - Manceni P. E., Marrosu M. G., Pagni L., Corrale G., Zaccaro D.: *Scand. J. Immunol.* 9, 99, 1979.
 - Mayer Von B., Schlegel W.: *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* 91, 437, 1978.
 - Müller-Hermelink H. K., Heusermann U., Stutte H. J.: *Cell Tiss. Res.* 154, 167, 1974.
 - Mueller J., del Re G. B., Buerki H., Keller H. U., Hess M. W., Cottler H.: *Eur. J. Immunol.* 5, 270, 1975.
 - Nowacki W.: *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 26, 299, 1978.
 - Pinkus G. S., Hargreaves H. K., McLedd J. A., Nadler L. M., Rosenthal D. S., Said J. W.: *Am. J. Pathol.* 97, 17, 1979.
 - Ränki A., Tötterman T. H., Häyry P.: *Clin. exp. Immunol.* 26, 375, 1976.
 - Sarr J., Salmon H., Le Jan Ch.: *Bull. Acad. Vet. France* 51, 323, 1978.
 - Shimizu M., Pan I. C., Hess W. R.: *Am. J. vet. Res.* 37, 309, 1976.
 - Tarr M. J., Olsen R. G., Krakowska G. S., Cockerell G. L., Gabel A. A.: *Am. J. vet. Res.* 38, 1775, 1977.
 - Taylor D., Hokama Y., Perra S. F.: *J. Immunol.* 115, 862, 1975.
 - Wachnik Z., Przymus J., Kronotołowski W.: *Medycyna Wet.* 37, 224, 1981.
 - Yang T. J., Jantzen P. A., Williams Z. F.: *Immunology* 38, 85, 1979.
 - Zander A. R., Boopalam N., Epstein R. B.: *Transplant. Proc.* 7, 369, 1973.
- Adres autora: mgr Anna Czernichowska, ul. Prettlicza 34, 53-407, Wrocław.

Черниковская А., Конопа М., Прзимус Я. — **Применение различных методов для идентификации лимфоцитов Т и В у собак.**

Исследовали возможность применения 3 разных критериев: цитоэнзиматического, розетного EA и розетного EAC для определения уровня лимфоцитов Т и В в крови здоровых собак. Констатировали, что полученное число лимфоцитов В в этих критериях было похоже (соответственно: 29,96, 23,78 и 30,21%). Особенно это отмечалось в цитоэнзиматическом и розетном EAC критериях. И так, эти методы могут применяться у собак при установлении процента лимфоцитов Т и В в крови, причем разности между количеством определенных при их помощи лимфоцитов статистически несущественны.

Czernichowska A., Konopa M., Przymus J. — **The application of various methods for the identification of lymphocytes T and B in dogs.**

There was examined the usefulness of three various tests: cytoenzymatic, rosette EA and EAC test for the determination of the number of lymphocytes T and B in blood of normal dogs. It was found that the number of lymphocytes B obtained in these three tests was comparable (29.96%, 23.78% and 30.21%). Especially, it was clearly recorded in cytoenzymatic and rosette EAC tests. The above mentioned methods can be applied in dogs in order to determine the percentage of lymphocytes T and B in blood, and the differences between the number of lymphocytes determined are not statistically significant.

MENGELING W. L., GUTCKUNST D. E., PIRTLE E. C.: **Odpowiedź immunologiczna u prosiąt na inaktywowaną monowalentną i biwalentną szczepionkę dla parwowirusa prosiąt i wirusa wścieklizny rzekomej. (Antibody response of pigs to inactivated monovalent and bivalent vaccines for porcine parvovirus and pseudorabies virus).** *Am. J. vet. Res.* 41, 1569—1571, 1980 (10).

Odpowiedź immunologiczną przebadano na 30 prosiątach w wieku 8—9 tygodni w 6 grupach doświadczalnych. Grupa I otrzymała monowalentną szczepionkę przeciwko parwowirusom (PPV), grupa II monowalentną szczepionkę przeciwko wściekliznie rzekomej (PRV), grupa III i IV szczepionkę biwalentną PPV + PRV. Szczepionki monowalentne podano w ilości 2 ml, biwalentne w ilości 4 ml, domięśniowo, dwukrotnie w odstępie 2 tygodni. Prosiąta z grupy V i VI stanowiły kontrolę. Po 6 tygodniach po pierwszym podaniu szczepionki prosiąta z grup I, III i V zakażono donosowo i doustnie 10⁸TCID₅₀ wirusa PPV, zaś prosiąta z grupy IV i VI taką samą dawką wirusa PRV. Po iniekcji szczepionki biwalentnej wystąpił wzrost geometryczny średniego miana przeciwciał który w każdym przypadku przewyższał miano uzyskane po stosowaniu szczepionki monowalentnej. Ponowny wzrost miana swoistych przeciwciał po zakażeniu żywym wirusem wskazuje na replikację wirusa w organizmie zwierząt szczepionych. Jednakże natężenie replikacji wirusa u zwierząt szczepionych było znacznie niższe aniżeli u prosiąt z grupy kontrolnej.

G.