

PRAKTYKA LABORATORYJNA

KRZYSZTOF KOSTRO

Metoda izolacji limfocytów z krwi obwodowej lisów hodowlanych oraz wykonanie testu rozetkowego EA

Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR,
Al. PKWN 30, 20-612 Lublin

Receptory Fc są odpowiedzialne za wiązanie fragmentu Fc immunoglobulin z powierzchnią komórki. Obecność ich wykazano na powierzchni limfocytów, makrofagów, granulocytów obojętnochołonnych, komórek tłuszcznych, nowotworowych, płytek krwi oraz komórek śródbłonkowych łożyska (5, 9, 11, 12, 15, 20, 22). Receptory te znajdujące się na powierzchni limfocytów spełniają ważną rolę w regulacji ich aktywności biologicznej (5, 9, 12, 13, 22) oraz pośredniczą w komórkowej cytotoksyczności (ADCC — antibody-dependent cellular cytotoxicity) zależnej od przeciwciał (5, 11, 12). W wyniku połączenia się receptora Fc znajdującego się na makrofagach i granulocytach obojętnochołonnych z fragmentem przeciwciała opsonizującego antygen następuje jego fagocytoza (1, 5, 18, 23). Ponadto receptory te wykorzystywane są jako markery powierzchniowe pomocne w identyfikowaniu, jak również diagnostyce niektórych stanów chorobowych związanych z zaburzeniami funkcjonowania wymienionych komórek. Obecność struktury i funkcje receptora Fc na powierzchni limfocytów były badane u ludzi (5, 12, 20) oraz różnych gatunków zwierząt (3, 4, 6, 7, 9, 14, 15, 16, 17, 19). W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano prac dotyczących wysterowania limfocytów z receptorem Fc w krwi obwodowej lisów hodowlanych.

Celem niniejszych badań było opracowanie metody izolacji limfocytów z krwi obwodowej lisów oraz wykonanie testu rozetkowego EA.

Materiał i metody

Izolacja limfocytów. Do badań użyto heparynizowanej (20 i/ml) krwi żylnej pobranej od 64 zdrowych lisów srebrzystych i niebieskich obojętnej płci w wieku 1—3 lat pochodzących z różnych ferm hodowlanych w okresie przygotowawczym do rozrodu. Do izolacji limfocytów użyto gotowych preparatów Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) i Lymphoprep (Nyegaard, Oslo, Norway) oraz przygotowanych we własnym zakresie gradientów fikolu (Ficoll 400, Pharmacia, Uppsala, Sweden) zmieszane z uropolimą (Uroplinum 75% Polfa) o gęstości 1,074—1,075, 1,080, 1,084 i 1,088 g/cm³ przygotowanych wg metody Böyum (2). Od każdego lisa pobierano 5 ml krwi z żyły dostopowej. Każdą próbkę krwi rozcieńczoną płynem Hanksa w stosunku 1:1 nakładano na izosmetyczne dla krwi lisa gradienty fikolu z uropolimą i wirowano przez 30 min. przy 400 xg. Następnie zbierano pipetą pasterowską komórki interfazy i płukano

3-krotnie płynem Hanksa. Jeśli komórki interfazy zawierały domieszkę erytrocytów, wówczas hemolizowano je 0,83% roztworem NH₄Cl zbuforowanym Tris (Serva, New York). Po przepłukaniu komórki liczone w komorze Bürkera i zawieszano w płynie Eagle'a w stężeniu 5×10⁶/ml. Żywotność komórek stwierdzoną za pomocą barwienia 0,2% błękitem trypanu wynosiła powyżej 95%. Skład jakościowy leukocytów obliczono na podstawie preparatów barwionych metodą Papanheima. Komórki fagocytyjące usuwano przez dodatek karbonylku żelaza (Merck, Darmstadt) w ilości 5 mg/ml zawiesiny komórek i inkubację w temp. 39°C przez 1 godz. Komórki, które pochłonęły żelazo usuwano za pomocą silnego magnesu. Ponadto wykorzystano zjawisko adhezji makrofagów do powierzchni szklanych. W tym celu zawiesinę komórek inkubowano na jałowych szklanych płytkach Petri przez 45 min. w 39°C. Po inkubacji zbierano zawiesinę komórek, a płytkę płukano 2-krotnie płynem Hanksa.

Otrzymywanie surowic króliczych i lisich przeciwko krwinkom barana. Do uodpornienia użyto 4 królików i 2 lisów niebieskich pochodzących z własnej hodowli. Immunizację wykonano wg metody opisanej przez Higginsa i Stacka (6) z pewnymi modyfikacjami. Przygotowaną 10% zawiesinę świeżych erytrocytów barana podawano dożylnie w ilości 1 ml/kg c.c. w 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 i 13 dniu. Po tym cyklu immunizacji robiono 1-dniową przerwę, po której pobierano krew, a uzyskane surowice kontrolowano odczynem aglutynacji używając 1% zawiesiny krwinek barana. Następnie zwierzęta poddano dalszej immunizacji przez okres 6 miesięcy stosując raz w miesiącu te same dawki antygeny. Narastanie miana surowic kontrolowano odczynem aglutynacji w 10 dniu po każdej iniekcji. Miana aglutynacyjne surowic przeciwko krwinkom barana były zbliżone u wszystkich 4 królików, dlatego też sporządzano bule surowic, które przetrzymywano w -15°C do chwili użycia. Zbliżone miana surowic uzyskano również od 2 lisów, stąd też postąpiono w analogiczny sposób jak u królików.

Otrzymywanie krwinek EA. Wypłukane erytrocyty barana opłaszczano subaglutynacyjnymi stężeniami inaktywowanej (30 min. 56°C) surowic króliczej lub lisiej przeciwko krwinkom barana. Opłaszczanie przeprowadzono w temp. 37°C przez 1 godz. używając 1% zawiesiny krwinek barana. Następnie krwinki płukano 3-krotnie płynem Hanksa i zawieszano w płynie Eagle'a w stężeniu wyjściowym (1%). Do testu używano krwinek EA świeżych lub przetrzymywanych w 4°C nie dłużej niż 5 dni.

Wykonanie testu rozetkowego EA. Równne objętości (0,2 ml) krwinek EA mieszano z równą objętością zawiesiny limfocytów (2×10⁶/ml). W celu ustalenia optymalnych warunków testu EA zawiesinę opłaszczonych krwinek i limfocytów preinkubowano w temp. pokojowej i 39°C przez 0, 15 i 30 min., a także 1, 2 i 4 godzin, po czym wirowano przy 150 xg przez 5 min. i inkubowano w 4°C przez 15 i 30 min.

Tab. 1. Porównawcze wyniki oczyszczania limfocytów z krwi obwodowej lisa przy różnych gęstościach gradientu

Gęstość gradientu g/cm ³	Ogólna liczba leukocytów w mm ³ *		Jakościowy skład leukocytów w pełnej krwi $\bar{x} \pm s$			Odsetek leukocytów w zawiesz- sinię komórek po gradiencie $\bar{x} \pm s$								
	G	M	L	G	M	L								
Fikol- Uropolina 1,074-1,075	6950	4415	66	2	2	32	4	4	2	8	2	88	4	(28,16)
Ficol- Paque 1,077	7500	4000	65	3	3	1	31	3	42	10	3	48	13	(44,88)
Lymphoprep 1,077	8000	800	66	5	4	3	30	8	47	13	2	42	15	(42,6)
Fikol- Uropolina 1,080	7700	500	63	6	5	2	32	8	43	5	3	47	8	(45,04)
Fikol- Uropolina 1,084	7750	1250	65	2	3	2	32	4	54	2	3	37	5	(41,84)
Fikol- Uropolina 1,088	7550	1450	64	4	3	3	33	7	56	2	2	34	4	(41,22)

Objaśnienia: * — średnia liczba leukocytów w m³ dla 10 lisów w danej grupie, (—) w nawiasach podano procentowy odzysk limfocytów po gradiencie w stosunku do ilości wyjściowej w pełnej krwi, G — granulocyt, M — monocyt, L — limfocyt.

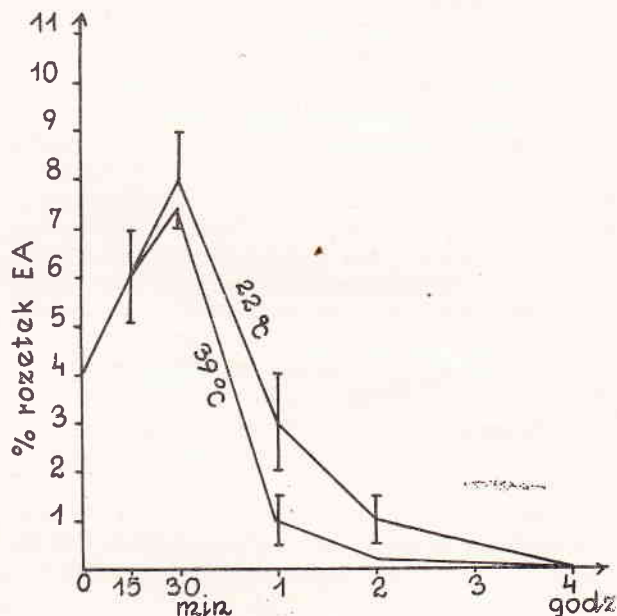
oraz 1, 2, 4 i 16 godz. Po inkubacji osad komórkowy dokładnie zawieszano i dodawano 0,1% roztworu błęno w płynie Eagla w stężeniu wyjściowym (1%). Do limfocytów tworzących rozetki EA określano po przeliczeniu co najmniej 400 komórek. Jako rozetki uważano te limfocyty, które wiązały 3 i więcej krwinek barana. Wyniki opracowano statystycznie przy pomocy trójczynnikowej analizy wariancji testem F-Snedecora.

Próbę kontrolną stanowiły nieopłaszczone 1% krwinki barana zawieszane w płynie Eagla, które testowano podobnie jak opłaszczone krwinki w teście rozetkowym EA. Limfocyty lisa nie tworzą spontanicznych rozetek E z krwinkami barana (dane nie publikowane).

Wyniki i omówienie

Izolacja limfocytów. Wyniki izolacji limfocytów z krwi obwodowej lisa ilustruje tab. 1. Najlepsze oczyszczenie i odzysk populacji limfocytów uzyskano stosując izoosmotyczny gradient ficol/uronolina o gęstości 1,074—1,075 g/cm³. Użyte porównawczo preparaty Ficol-Paque oraz Lymphoprep dały w uzyskanej puli limfocytów duży odsetek zanieczyszczeń komórkami wielojądrzastymi (tab. 1). Inkubacja otrzymanej po gradiencie zawiesziny komórek z karbonylkiem żelaza przyczyniła się do zwiększenia czystości populacji limfocytów. Podobną czystość limfocytów uzyskano również po zastosowaniu metody adherencji komórek żernych do szklanej płytki, lecz powodowało to również utratę części limfocytów (tab. 2). Stąd też inkubacja z karbonylkiem żelaza jest bardziej efektywną metodą dla uzyskania czystej populacji limfocytów.

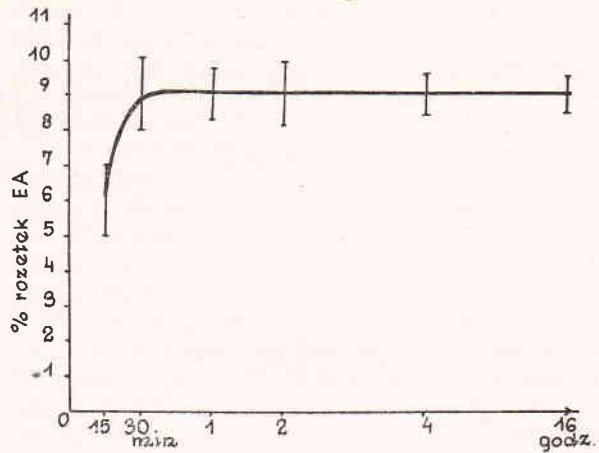
Warunki testu rozetowego EA. Zasadniczy wpływ na wysokość odsetka rozetek



Ryc. 1. Wpływ czasu i temperatury preinkubacji na tworzenie się rozetek EA w krwi obwodowej lisa
Objaśnienie: Wykres przedstawia średnie wartości uzyskane z trzech kolejnych badań

FA w krwi obwodowej lisa ma czas preinkubacji testowanej mieszaniny komórek. Jak widać z ryc. 1, przedłużenie czasu preinkubacji powyżej 30 min. powoduje spadek liczby rozetek. Jest to wyraźnie widoczne podczas preinkubacji w temp. 39°C. Natomiast nie zaobserwowano większego wpływu temperatury preinkubacji na tworzenie się rozetek EA, gdyż uzyskano zbliżone wyniki w obydwu badanych zakresach temperatur tj. 22°C i 39°C (ryc. 1). Podczas inkubacji w 4°C procent komórek tworzących rozetki EA uległ stabilizacji po upływie 30 min.

i przy dalszej inkubacji (do 16 godz.) odsetek komórek rozetkujących utrzymywał się na tym samym poziomie (ryc. 2). W grupie lisów srebrzystych odsetek limfocytów krwi obwodowej tworzących rozetki EA był podobny dla samic i samców i wynosił średnio dla surowicy homologicznej (As-L) $9,13 \pm 2,13$ (7—14) i $9,13 \pm 1,59$ (7—14), zaś dla surowicy heterologicznej (As-K) $9,37 \pm 2,47$ (6—16) i $9,06 \pm 1,95$ (6—12). W grupie lisów niebieskich odsetek komórek tworzących rozetki FA z surowicą homologiczną (As-L) wynosił $9,38 \pm 2,16$ (6—15) dla samic i $8,69 \pm 1,58$ (6—12) dla samców, natomiast z surowicą heterologiczną (As-K) wynosił kolejno $9,44 \pm 1,90$ (7—14) i $8,44 \pm 1,90$ (6—13) tab. 3.



Ryc. 2. Wpływ czasu inkubacji na tworzenie się rozetek EA w krwi obwodowej lisa — temp. inkubacji 4°C

Objaśnienie: Wykres przedstawia średnie wartości z trzech kolejnych badań.

Przy pomocy trójczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem płci, rasy i rodzaju użytej surowicy nie wykazano istotnych różnic w odsetku limfocytów tworzących rozetki EA pomiędzy samicami i samcami, rodzajem użytej surowicy (homologiczna i heterologiczna) oraz rasami lisów niebieskich i srebrzystych (tab. 3).

W dostępnym piśmiennictwie nie napotkano opisu metody izolacji limfocytów od lisów przy zastosowaniu gradientu gęstości. Próby takie podjęli Janot i wsp. (8) i wykazali, że preparat Lymphoprep o gęstości 1,077 g/cm³ przeznaczony przede wszystkim do izolacji limfocytów ludzkich nie pozwala na uzyskanie czystej populacji komórek jednojądrzastych u lisa z uwagi na duże zanieczyszczenie komórkami wieloją-

drzastymi (35—66%). Wyniki tych autorów potwierdzono w badaniach własnych przy użyciu preparatu Lymphoprep i Ficoll-Paque, uzyskując również duży procent komórek wielojądrzastych w populacji limfocytów (32—60). Inni autorzy wykazali małą przydatność tych preparatów do izolacji limfocytów u psa (4, 7, 9, 21, 22) i innych gatunków zwierząt (1, 6, 25). W badaniach własnych stwierdzono, że izoosmotyczny gradient fikol-uropolina o gęstości 1,074—1,075 g/cm³ nadaje się do izolacji limfocytów z krwi obwodowej lisów dając dobry odzysk i wysoką czystość (tab. 1). Mimo, że izolację prowadzono w tych samych warunkach i przy użyciu tej samej serii gradientu zaobserwowano pewne różnice w czystości populacji limfocytów (84—92%) w odniesieniu do poszczególnych badanych próbek. Można domniemywać, że było to związane z cechami osobniczymi. Usunięcie komórek fagocytujących z uzyskanej populacji leukocytów umożliwiło oznaczenie odsetka limfocytów z receptorem Fc lisa. Najwyższy odsetek limfocytów tworzących rozetki EA stwierdzono po 30 min. preinkubacji w temp. 22°C i

Tab. 2. Jakościowy i ilościowy obraz leukocytów lisa w otrzymanej zawieszynie komórek po gradiencie fikol-uropolina o gęstości 1,074—1,075 g/cm³

Zawiesina komórek	Koncentracja komórek w ml	Granulocyty %	Mozocyty %	Limfocyty %
Przed oczyszczeniem	5×10^6	4 ± 2 (2-6)	8 ± 2 (6-10)	88 ± 4 (84-92)
Po inkubacji z karbozylikiem żelaza	$3,9 \times 10^6$	1 ± 1 (0-2)	2 ± 1 (1-3)	97 ± 2 (95-99)
Po inkubacji na płycie szklanej	$3,0 \times 10^6$	$1,5 \pm 0,5$ (1-2)	$2,5 \pm 0,5$ (2-3)	96 ± 1 (95-97)

Objaśnienie: (—) w nawiasach podano minimalne i maksymalne wartości identyfikowanych leukocytów.

Tab. 3. Odsetek rozetek EA w krwi obwodowej lisa przy użyciu homologicznej i heterologicznej surowicy oraz krwinek barana

Gatunek zwierzęcia	Płeć	Liczba zwierząt	Odsetek rozetek EA											
			As-K		Wartość minimalna		Wartość maksymalna		As-L		Wartość minimalna		Wartość maksymalna	
			$\bar{x} \pm s$	V%	na %	na %	$\bar{x} \pm s$	V%	na %	na %	$\bar{x} \pm s$	V%	na %	na %
Lis srebrzysty	samice	16	9,37	26,4	6,00	16,00	9,13	23,3	7,00	14,00	2,47			
	samce	16	9,06	21,5	6,00	12,00	9,13	17,4	7,00	14,00	2,13			
Lis niebieski	samice	16	9,44	20,1	7,00	14,00	9,38	23,0	6,00	15,00	2,16			
	samce	16	8,44	22,5	6,00	13,00	8,69	18,1	6,00	12,00	1,90			
Ogólna liczba	samice	64	9,07				9,08				1,87			
	samce	64	2,05											

Objaśnienia: As-k surowica królika, As-L surowica lisa przeciwko krwinkom barana; * średni odsetek rozetek EA w krwi obwodowej lisów srebrzystych i niebieskich łącznie.

po 30 min. inkubacji w 4°C (ryc. 1). Parametry te można zatem uznać za optymalne przy wykonywaniu testu rozetkowego EA u lisa. Mając na względzie, iż analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w liczbie rozetek EA w krwi obwodowej lisów srebrzystych i niebieskich, średni odsetek limfocytów tworzących rozetki EA można przyjąć jako średnią dla obu tych ras. W przeprowadzonych badaniach odsetek limfocytów z receptorem Fc w warunkach fizjologicznych u lisów srebrzystych i niebieskich wynosił średnio $9,08 \pm 1,96$ (6—16) i ten parametr można przyjąć jako normę fizjologiczną. Uzyskane wyniki stwarzają możliwość dalszych badań nad ilością limfocytów z receptorem Fc w czasie dojrzewania osobniczego, a także w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych.

Wnioski

Uzyskane wyniki pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

1. Do izolacji limfocytów z krwi obwodowej lisa przydatna jest mieszanina fikolu z uropoliną o gęstości gradientu 1,074—1,075 g/cm³, ponieważ umożliwią uzyskanie dobrego odzysku i wysokiej czystości.

2. Optymalne warunki do wykonania testu rozetkowego EA u lisów stanowi 30 min. preinkubacja o 22°C z następującą 30 min. inkubacją w 4°C.

Piśmiennictwo

1. Banks K. L., McGuire T. C.: *Immunology* 28, 581, 1975.
2. Böyum A.: *Scand. J. clin. lab. Invest.* 21, 1, 1968.
3. Binns R. M., Licence S. T.: *J. Immun. Methods* 43, 153, 1981.
4. Chandler J. P., Yang T. J.: *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 65, 62, 1981.
5. Drela N.: *Post. Hig.* 41, 233, 1987.
6. Higgins D. A., Stack M. J.: *J. Immun. Methods* 20, 211, 1978.
7. Ho C. K., Babiuk L. A.: *Immunology* 35, 733, 1978.
8. Janot C., Blancou J., Aubert M. F. A.: *Comp. Immun. infect. Dis.* 5, 129, 1982.
9. Kauffman C. A., Bergman A. G.: *Develop. comp. Immun.* 5, 671, 1981.
10. Krakowka S., Wallace A. L., Ringler S. S., Koestner A.: *Am. J. vet. Res.* 39, 1881, 1978.
11. Kooistra L., Splitter G. A., Albrecht R. M.: *Am. J. vet. Res.* 46, 2626, 1985.
12. Lydyard P. M., Fanger M. W.: *Immunology* 47, 1, 1982.
13. Moretta L., Ferrarini M., Mingari M. C., Moretta A., Webb S. R.: *J. Immun.* 117, 2171, 1976.

14. Revell P. A., Wilson A. B., Coombs R. R. A.: *Int. Archs Allergy* 47, 850, 1974.
15. Ricardo M. I.: *J. Immun.* 125, 2009, 1980.
16. Rojko J. L., Hover E. A., Finn B. L., Olsen R. G.: *Inst. Archs Allergy appl. Immun.* 68, 226, 1982.
17. Schneider R. J., Atkinson J. P., Krause V., Kulczycki A.: *J. Immun.* 126, 935, 1981.
18. Scribner D. J., Fahrney D.: *J. Immun.* 116, 892, 1976.
19. Sire J., Kahn-Perles B., Colle A., Bourgois A.: *Eur. J. Immun.* 10, 116, 1980.
20. Suzuki T., Taki T., Hachimine K., Sadasivan R.: *Molecular Immun.* 18, 55, 1981.
21. Thilsted J. P., Shifrine M.: *Am. J. vet. Res.* 38, 81, 1977.
22. Trull P. A., Yang T. J.: *Cellular Immun.* 74, 182, 1982.
23. Walker W. S.: *J. Immun.* 119, 367, 1977.
24. Wilton J. M. A., Renggli H. H., Lehner T.: *Immunology* 32, 955, 1977.
25. Yang T. J., Rabinovsky E. D.: *Vet. Immun. Immunopath.* 14, 77, 1987.

Adres autora: dr Krzysztof Kostro, ul. Weteranów 42/24 20-044 Lublin

Костро К. — Метод изоляции лимфоцитов в периферической крови разводимых лисиц и выполнение розеточного теста EA

Цель исследований состояла в разработке метода изоляции лимфоцитов из периферической крови разводимых лисиц и выполнении розеточного теста EA. Показано, что наиболее пригодным к изоляции лимфоцитов из периферической крови лисицы является градиент фикол-урополин густотой 1,074—1,075 г/см³. Наивысший процент лимфоцитов, образующих розетки EA, отмечено в условиях 30 мин. преинкубации в темп. 22°C и 30 мин. инкубации в 4°C. Не показано статистически существенных различий в числе клеток образующих розетки EA, в зависимости от породы, пола и вида сыворотки, примененной против кровяных телец барана. Средний процент лимфоцитов в рецепторе Fc в периферической крови синих и серебристо-черных лисиц возрастом 1—3 лет составляет в среднем $9,08 \pm 1,96$.

Kostro K. — The method of lymphocytes isolation from the peripheral blood of foxes and the rosette test EA

The purpose of the work was to elaborate a method of lymphocytes isolation from the peripheral blood of breeding foxes and to perform the rosette test EA. It was found that Ficoll-urupoline (ensity from 1,074 to 1,075 g per 1 ml) was most proper for lymphocytes isolation. The highest percentage of lymphocytes forming EA rosettes was observed at 22°C preincubation for 30 min. and later incubation at 4°C for 30 min. No statistically significant differences were found concerning the number of cells forming EA rosettes in relation to the breed, sex and kind of serum used against sheep erythrocytes. A mean percentage of lymphocytes with Fc receptors in the peripheral blood of blue and silver foxes aged 1—3 years, was 9.08 ± 1.96

CHASNEY C. J.: Rzadki gatunek roztocza Demodex kota. (An unusual species of demodex mite in a cat). *Vet. Rec.* 123, 671—673, 1988 (26/27)

Z zeszkrobiny skóry kotki z objawami silnego świądu i strupiatego zapalenia skóry sporządzono preparaty, w których wykazano obecność pasożytów z rodzaju Demodex. Pasożyty różniły się cechami morfologicznymi od Demodex cati. Na podstawie proporcji między opisthosoma a całkowitą długością ciała pasożyta wyróżniono dwie podgrupy pasożytów: w jednej opisthosoma stanowiła około 1/2 długości ciała roztocza, w drugiej 1/3 długości ciała roztocza. Badanie krwi chorej kotki wykazało leukocytozę i neutrofilie przy braku limfocytozy i eozynofilii. Miejscowe zastosowanie 0,75% roztworu rotenonu w spirytusie metylowym przyniosło częściowe polepszenie, ale zwierzę padło 4 dnia po leczeniu.

G.

HALL S., CIPRIANO J. A., SCHONEWEIS D. A., SMITH J. E., FENWICK B. W.: Izolacja zakaźnych i niezakaźnych Eperythrozoon suis z pełnej krwi świń. (Isolation of infective and noninfective Eperythrozoon suis bodies from the whole blood of infected swine). *Vet Rec.* 123, 651, 1988 (25)

Eperythrozoon suis wywołuje u tuczników ostre schorzenie przebiegające wśród objawów niedokrwistości i żółtaczkę, niedokrwistość u nowo narodzonych prosiąt, opóźnienie rui i śmierć zarodków u macior. Jest on ściśle związany z błoną erythrocyta. Autorzy opisali metodę otrzymywania żywych i martwych E. suis z erythrocytów tak, że uzyskany materiał jest wolny od ścian komórkowych, leukocytów, płytek krwi i większości białek surowicy krwi. Zastosowanie w opisanej metodzie EDTA umożliwia usunięcie E. suis z erythrocytów bez ich uszkodzenia.

G.