

Piśmiennictwo

1. Akers R. M., Bauman D. E., Capuco A. V., Goodman G. T., Tucker H. A.: *Endocrinology* 109, 23, 1987.
2. Akers R. M., Bauman D. E., Goodman G. T., Capuco A. V., Tucker H. A.: *Endocrinology* 109, 31, 1981.
3. Dusza L., Krzymowska H.: *J. Reprod. Fert.* 57, 511, 1979.
4. Dusza L., Krzymowska H.: *J. Reprod. Fert.* 61, 131, 1981.
5. Dusza L., Krzymowska H., Okrasa S., Czarnyszewicz J., Kotwica G., Koziorowski M., Kuźnia S., Czarnocki J., Dąbek J., Nowicka R.: *Adv. Physiol. Sci.* 20, 187, 1981.
6. Kendall J. Z., Richards G. E., Shin L. N., Farris T. S.: *Theriogenology* 17, 677, 1982.
7. Kotwica J., Krzymowski T., Dąbek J.: *Medycyna Wet.* 34, 118, 1978.
8. Lewis A. J., Speer U. C., Haught D. C.: *J. Anim. Sci.* 47, 634, 1978.
9. Nachreiner R. F., Garcia M. C., Ginther O. J.: *Am. J. Vet. Res.* 33, 1489, 1972.
10. Nachreiner R. F., Ginther O. J.: *Am. J. Vet. Res.* 35, 619, 1974.
11. Pejsak Z., Tarasiuk K., Czajkowska A., Kempa W., Płiszka A., Szczepaniak R., Stokowski G., Rutkowski W.: *Medycyna Wet.* 45, 382, 1989.
12. Plaut K., Bauman D. E., Agergaard N., Akers R. M.: *Domestic Anim. Endocr.* 4, 279, 1987.
13. Shiu R. P., Friesen H. G.: *Ann. Rev. Physiol.* 42, 83, 1980.
14. Smith B. B., Wagner W. C.: *Science* 224, 605, 1984.
15. Smith B. B., Wagner W. C.: *Am. J. Vet. Res.* 46, 175, 1985.
16. Taverner M., Bevers M., Bradshaw J. M. C., Dieleman S. J., Willemse A. H., Porter D. G.: *J. Reprod. Fert.* 65, 85, 1982.
17. Taverner M., Willemse A. H., Dieleman S. J., Bevers M.: *Anim. Reprod. Sci.* 1, 257, 1978/1979.
18. Vale G. T., Wagner W. C.: *Theriogenology* 15, 537, 1981.

Adres autora: doc. dr hab. Luiza Dusza, ul. Kaliningradzka 59/17, 10-437 Olsztyn

KRZYSZTOF ANUSZ, MAGDALENA ZALESKA, BOHDAN KOWALSKI,
JERZY JĘDRYKA, JERZY KITA

Isolacja limfocytów krwi obwodowej krów i owiec ciężarnych w gradiencie Gradisolu G

Katedra Epizootologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Summary

Isolation of peripheral blood lymphocytes of pregnant cows and sheep in a Gradisol G gradient

The purpose of the study was to determine the usefulness of Gradisol G (Polfa—Kutno) in the isolation of peripheral blood lymphocytes of pregnant cows and sheep. After isolation the percentage of the individual cells was evaluated using the Thoma's chamber. The morphology, vitality and recovery of the cells compared with the total number of peripheral blood lymphocytes were also assessed. The blastogenic transformation test was applied to evaluate the immunologic activity of lymphocytes isolated in the optimal Gradisol G gradient. The findings were compared with the results obtained using a Lymphoprep (Nyegaard) 1977 gradient. The studies showed that Gradisol G fulfilled all the requirements for the successful isolation of peripheral blood lymphocytes of pregnant cows and sheep. The optimal density to isolate peripheral blood lymphocytes of cows and sheep was 1.077 g/ml.

Isolacja czystej populacji limfocytów jest podstawowym warunkiem do przeprowadzania szeregu badań immunologicznych u ludzi i zwierząt, między innymi testu transformacji blastycznej, który stosuje się do oceny zdolności limfocytów do podjęcia funkcji obronnych, pod wpływem stymulacji antygenowej specyficznej lub niespecyficznej (6). W teście transformacji blastycznej (ttb) bada się aktywność limfocytów krwi obwodowej, rzadziej izolowanych z centralnych i obwodowych elementów układu chłonnego (np. grasicy, śledziony, kępek Peyera czy gruczolu mlekowego).

Isolację limfocytów przeprowadza się najczęściej w gradiencie Ficollu (preparaty Lymphoprep, Ficoll paque, Lymphopaque itp.). Wykazano, że do izolacji limfocytów należy używać ficollu o gęstości optymalnej dla danego gatunku np. dla bydła 1,077—1,084 (10, 16).

U samic ssaków naczelnych i w mniejszym stopniu samic ssaków hodowlanych w okresie poprzedzającym poród występuje ciężowy zespół niedoborów immunologicznych. Między innymi stwierdza się obniżenie aktywności immunologicznej limfocytów T krwi obwo-

dowej (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16). Laboratoria weterynaryjne powinny mieć możliwość wykonania badań stanu odporności samic ciężarnych oraz we wszystkich innych przypadkach, kiedy zwierzęta poddane zostały warunkom stresowym, mogącym wywołać supresję układu immunologicznego. Zakres stosowania metod izolacji komórek układu immunologicznego, będących podstawą dalszych badań stanu odporności zwierzęcia, był w naszym kraju przez długi czas ograniczony, ze względu na konieczność importowania Ficollu. Podjęcie produkcji preparatu Gradisol G pozwala na szersze stosowanie metody w laboratoriach weterynaryjnych i medycznych, co jest ważne zarówno dla diagnostyki klinicznej, jak i badań podstawowych.

Celem pracy była ocena przydatności preparatu Gradisol G produkcji Kutnowskich Zakładów Farmaceutycznych do izolacji limfocytów krwi obwodowej ciężarnych krów i owiec oraz określenie optymalnych gradientów preparatu do izolacji limfocytów krwi obwodowej.

Materiał i metody

Krew żylną do badań pobrano od 50 krów ciężarnych w wieku 3—4 lat i 50 owiec ciężarnych w wieku 2 lat.

Wyprodukowany przez KZF „Polfa” preparat Gradisol G w roztworze wodnym zawiera 28% uropoliny (75% meglumine diatrizate) i 5,5% dekstranu 200 000 (v/w/v).

W celu sprawdzenia optymalnych warunków izolacji limfocytów, w pierwszej fazie krew rozcieńczano za pomocą PBS (Biomed) w stosunku 1:1, bądź pozostawiano nie rozcieńczoną. Tak przygotowaną krew nawarstwiano następnie na testowany Gradisol G w ilości 10 ml krwi rozcieńczonej/nie rozcieńczonej na 4 ml Gradisolu G lub 5 ml krwi rozcieńczonej/nie rozcieńczonej na 2 ml Gradisolu G o gęstościach 1,073; 1,075; 1,077; 1,079; 1,081; 1,082; 1,084. Próbkę wirowano przez różne okresy czasu od 15 do 40 minut w zakresie 80 g—350 g (wirówka MPW 2).

Isolację przeprowadzano w temperaturze pokojowej. Do badań używano stożkowych probówek szklanych o pojemności 10 ml bądź wirówkowych probówek szklanych o pojemności 25 ml. Po wirowaniu uzyskiwano kożuszek limfocytarny na granicy obu faz. Komórki z interfazy zbierano pipetą pasterowską i po trzykrotnym przepłukaniu w MEM (wirowanie 80 g; 100 g) oceniano ich skład ilościowy w komercze Thoma; skład jakościowy, określając morfologicznie

rodzaj komórek w rozmazie; żywotność testem z błękitem trypanu; odzysk poprzez wyluczenia w stosunku do wartości wyjściowych (liczba limfocytów we krwi obwodowej).

Uzyskane wyniki izolacji limfocytów w gradiencie preparatu Gradisol G o optymalnej gęstości porównywano z wynikami izolacji w gradiencie preparatu Lymphoprep 1,077 (Nyegaard).

Aktywność limfocytów wyizolowanych w optymalnym gradiencie preparatu Gradisol G sprawdzano ttb (15) z fitohemaglutyniną o stężeniach 5 i 10 µg/ml. Odczytu dokonywano metodą morfologiczną.

Wyniki i omówienie

Największy odzysk i żywotność limfocytów izolowanych zarówno od krów ciężarnych, jak i owiec ciężarnych, uzyskiwano nawarstwiając na 2 ml Gradisolu G 1,077 5 ml krwi rozcieńczonej 1:1 w PBS i stosując wirowanie w temperaturze pokojowej w 300 g przez 40 minut. Wykazano lepszą przydatność probówek wirówkowych stożkowych (tab. 1, 2). U krów ciężarnych odzysk wynosił 60%, a u owiec ciężarnych 44,5%. Przy takim postępowaniu uzyskiwano również wysoką czystość izolowanych komórek (% limfocytów).

Czystość limfocytów izolowanych z krwi obwodowej krów ciężarnych wynosiła 96,5%. Podczas izolacji limfocytów krwi obwodowej krów ciężarnych w gradiencie Gradisolu G 1,073—1,079 uzyskiwano czystość od 98% (Gradisol G 1,079) do 96,5% (Gradisol G 1,077). Za stosowaniem do izolacji limfocytów krwi obwodowej krów ciężarnych Gradisolu G 1,077 przemawia najwyższy odzysk komórek (tab. 2). Czystość limfocytów izolowanych z krwi obwodowej owiec ciężarnych w gradiencie Gradisolu G 1,077 wynosiła 99% i była wyższa (tab. 1).

Limfocyty wyizolowane w gradiencie Gradisolu G 1,077 i Lymphoprepu 1,077 wykazywały w ttb aktywność immunologiczną w zakresie od 20% do 80%.

Oceniany przez nas w niniejszej pracy polski preparat Gradisol G ma nieco inny skład niż wspomniane powyżej zagraniczne preparaty (między innymi Ficoll zastąpiono dekstranem). Nasze badania wykazały, że optymalna gęstość Gradisolu G do izolacji limfocytów krwi obwodowej krów i owiec ciężarnych wynosi 1,077.

Gęstość ta jest również optymalna dla izolacji limfocytów krwi obwodowej ludzi (17).

Testem transformacji blastycznej stwierdzono zbliżoną aktywność immunologiczną limfocytów krwi obwodowej krów i owiec ciężarnych, które izolowano w gradiencie Gradisolu G 1,077 (Polfa-Kutno) i w gradiencie Lymphoprepu 1,077 (Nyegaard).

Należy stwierdzić, że Gradisol G spełnia wszystkie warunki skutecznej izolacji limfocytów krwi obwodowej krów i owiec ciężarnych.

Piśmiennictwo

1. Anusz K., Zaleska M., Kita J., Kowalski B.: Mat. XV Kongresu Bujatrycznego, Palma de Mallorca, Hiszpania 1988, s. 206.
2. Anusz K., Zaleska M., Kita J.: Ochrona „własnego”, atak na „obce”. Doskonalenie metod diagnostyki, profilaktyki i terapii chorób zwierząt. Program badawczo-rozwojowy, Min. Eduk. Narod. 1983—1990, Lublin 1990, s. 41.
3. Brabin B. J.: Rev. Inf. Dis. 7, 579, 1985.
4. Bulmer R., Hancock K. W.: Clin. Exp. Immunol. 28, 302, 1977.
5. Burrells C., Wells P. W., Sutherland D.: Clin. Exp. Immunol. 33, 410, 1978.
6. Böyum A.: J. Clin. Lab. Invest. 21, suppl. 97, 1968.
7. Hirahara G., Corai I., Tanaka K., Matsuzuki Y., Sumiyoshi Y., Shigima Y.: Clin. Exp. Immunol. 41, 353, 1980.
8. Jha P., Talwar G. P., Hingorani V.: Am. J. Obstet. Gynecol. 8, 965, 1975.
9. Lazary S., Riviera E., De Weck A. L., Gerber H., Nicolet J.: Res. vet. Sci. 17, 344, 1974.
10. Muscoplat C. C., Shope R. E., Chen A. W., Johnson A.: Am. J. Vet. Res. 36, 1243, 1975.
11. Plum J., Thierry M., Sabbe L.: Clin. Exp. Immunol. 31, 45, 1978.
12. Purtilo D. T., Hallgren H. M., Yunis E. J.: Lancet 1, 769, 1972.
13. Sridama V., Pacini F., Yang S. L., Moawad A., Reilly M., De Groot L. J.: N. Engl. J. Med. 307, 352, 1982.
14. Strelkauskas A. J., Wilson B. S., Dray S.: Nature, 258, 331, 1975.
15. Szeleszczuk P., Zaleska M., Szeleszczuk B. M.: Życie wet. 44, 195, 1989.
16. Wells W., Burrells W. B., Martin B.: Clin. Exp. Immunol. 29, 159, 1977.
17. Zeman K., Tchórzewski H., Majewska E., Pokoca L., Pińkowska R.: Immunologia pol. 13, 217, 1988.

Adres autora: lek. wet. Krzysztof Anusz, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Tab. 1. Porównanie odzysku, czystości i żywotności limfocytów izolowanych z krwi obwodowej owiec ciężarnych

Gęstość Gradisolu G (g/ml)	Odzysk (%)	Czystość (% limfocytów)	Żywotność (%)
1,073	10,42 ± 0,68	82,5 ± 3,50	96,0 ± 1,40
1,075	15,25 ± 1,34	89,5 ± 0,71	97,5 ± 0,71
1,077	44,50 ± 1,84	99,0 ± 1,40	98,0 ± 0
1,079	24,20 ± 0,28	95,0 ± 1,41	97,5 ± 0,71
1,081	22,65 ± 4,60	95,0 ± 0	94,5 ± 0,70
1,082	11,83 ± 0,70	79,5 ± 0,70	92,0 ± 1,41
1,084	8,89 ± 1,14	94,0 ± 1,41	86,5 ± 2,12

Tab. 2. Porównanie odzysku, czystości i żywotności limfocytów izolowanych z krwi obwodowej krów ciężarnych

Gęstość Gradisolu G (g/ml)	Odzysk (%)	Czystość (% limfocytów)	Żywotność (%)
1,073	46,10 ± 33,5	97,5 ± 0,70	97,0 ± 1,41
1,075	40,80 ± 4,88	97,0 ± 0	98,0 ± 0
1,077	60,00 ± 2,12	96,5 ± 2,12	99,0 ± 1,40
1,079	40,75 ± 4,40	98,0 ± 0	99,0 ± 1,40
1,081	21,78 ± 3,20	94,5 ± 0,70	97,5 ± 0,70
1,084	15,35 ± 11,80	89,0 ± 7,07	96,5 ± 2,12

SAIF L. J., BROCK K. V., REDMAN D. R., KOHLER E. M.: Dyżentaria zimowa w stadach krów mlecznych: Dane z mikroskopu elektronowego i serologiczne wskazujące na udział koronowirusa w procesie zakaźnym. (Winter dysentery in dairy herds: Electron microscope and serological evidence for an association with coronavirus infection). Vet. Rec. 128, 447—449, 1991 (19)

Kał oraz surowice krów z 6 stad, w których występowała biegunka zimowa oraz od krów zdrowych poddano badaniu w mikroskopie elektronowym oraz badaniom serologicznym na obecność zakażenia koronowirusem. Badania przeprowadzono w zimie 1987—1990. Syndrom zimowej biegunki charakteryzował się ostrą biegunką, niekiedy z domieszką krwi, trwającą kilka dni, która prowadziła do wyraźnego obniżenia mleczności. Śmiertelność była niewielka. U 90% chorych krów wykazano obecność koronowirusa. Ten sam wirus stwierdzono u 11 krów zdrowych. U 73% krów miano przeciwciał neutralizujących szczep Mebus koronowirusa wzrosło czterokrotnie w porównaniu do krów zdrowych. U krów ze stad wolnych od biegunki zimowej nie wykazano obecności koronowirusa w kale, zaś miano przeciwciał nie wzrastało nigdy dwukrotnie. Ponadto w jednym ze stad zakażenia wywoływał rotawirus z grupy B.