

Krzysztof KOSTRO

### Wpływ osmolarności gradientu na izolację limfocytów z krwi obwodowej lisów hodowlanych

Effects of Osmolarity of the Gradient on the Lymphocytes Separated from Fox Peripheral Blood

W testach stosowanych do oceny swoistej odpowiedzi immunologicznej konieczne jest użycie możliwie czystej populacji limfocytów (1, 6, 7, 10). Izolacji limfocytów z krwi obwodowej dokonuje się najczęściej poprzez wirowanie rozcieńczonej krwi nałożonej na gradient Ficollu zmieszanego z Uropoliną lub innym preparatem do angiografii (Isopaque, Hypaque itp.). Janot i wsp. (4) oraz Kostro (5) wykazali, że przy użyciu preparatów Lymphoprep i Ficoll-Paque o gęstości  $1,077 \text{ g/cm}^3$  przeznaczonych do izolacji limfocytów ludzkich nie udało się uzyskać czystej populacji komórek jednojądrzastych u lisa ze względu na duże zanieczyszczenie komórkami wielojądrzastymi. Inni autorzy wykazali małą przydatność tych preparatów do izolacji limfocytów u psa (9) i bydła (11). W dostępnym piśmiennictwie nie napotkano danych dotyczących wpływu osmolarności gradientu na izolację limfocytów z krwi obwodowej lisów.

Celem pracy było określenie wpływu osmolarności gradientu na czystość limfocytów izolowanych z krwi obwodowej lisów hodowlanych.

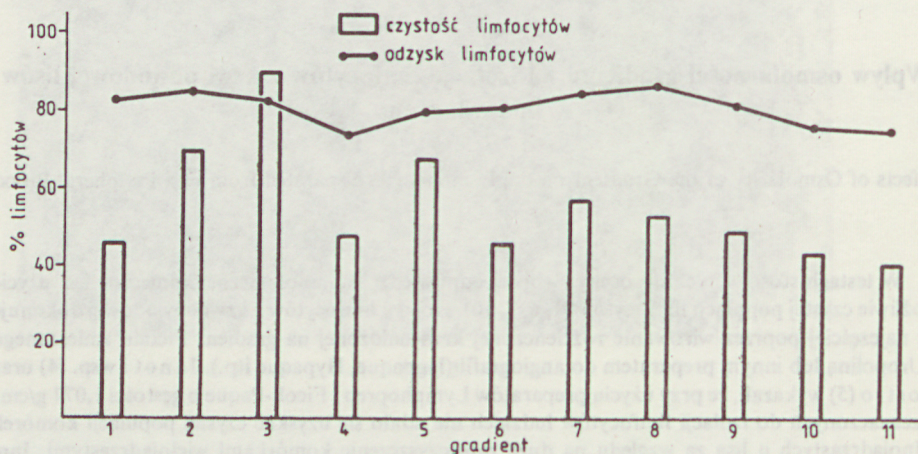
#### MATERIAL I METODY

Gradyenty. Wykaz gradientów wraz z ich opisem podano w tab. 1. Przed przystąpieniem do zaplanowanych badań właściwych określono za pomocą osmometru (Knauer-Semi-Microosmometr, FDR) osmolarność 100 próbek surowicy pochodzących od zdrowych lisów srebrzystych i niebieskich. Stwierdzono, że osmolarność badanych surowic wynosiła średnio  $315 \pm 5 \text{ mmOs/kg}$ . Stosownie do tego przygotowano we własnym zakresie według metody Böyum (3) gradient Ficoll-Uropolina o gęstości  $1,075 \text{ g/cm}^3$  i osmolarności  $315 \text{ mmOs/kg}$ . Osmolarność tego gradientu, jak również Ficoll-Paque ( $315 \text{ mmOs/kg}$ ) otrzymano przez suplementację NaCl (cz.d.a. Sigma).

Izolacja limfocytów. Do badań użyto krew od 40 lisów srebrzystych i niebieskich obojga płci w wieku 1-3 lat. Zwierzęta były żywione systemem tradycyjnym według zalecanych norm z uwzględnieniem dodatków mineralno-witaminowych oraz miały stały dostęp do wody. Pochodziły one z ferm wolnych od chorób zakaźnych i inwazyjnych. Badania przeprowadzono w okresie przedubojowym, tj. w drugiej połowie listopada. Krew pobierano z żyły dostopowej do jałowych strzykawek z odsetkiem heparyny wolnej od środków konserwujących w ilości  $20 \text{ j/ml}$ . Każdą próbkę krwi w ilości  $2 \text{ ml}$  rozcieńczoną płynem Hanksa w stosunku 1:1 nakładano na przygotowane uprzednio gradyenty i wirowano przez 30 min. przy  $400 \times g$  w temperaturze pokojowej. Następnie



zbierano pipetą pasterowską komórki interfazy i płukano 3-krotnie płynem Hanksa z dodatkiem 10% surowicy homologicznej. Komórki po każdym płukaniu wirowano przez 10 min. przy 210xg w 4°C. Jeśli komórki interfazy zawierały domieszkę erytrocytów, wówczas hemolizowano je 0,83% roztworem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  przygotowanym według metody Kroese i wsp. (8). Po przepłukaniu komórki zawieszano w płynie Eaglea w stężeniu  $5 \times 10^6/\text{ml}$ . Żywotność komórek kontrolowana za pomocą barwienia 0,2% błękitem trypanu wynosiła powyżej 95%. Ogólną liczbę leukocytów obliczano w komorze Burkera, natomiast skład jakościowy w preparatach barwionych metodą Pappenheima. Odzysk limfocytów wyrażono w procentach tych komórek uzyskanych w poszczególnych gradientach w stosunku do ich ilości wyjściowej w pełnej krwi. Czystość limfocytów określano jako odsetek tych komórek w odniesieniu do ogólnej liczby leukocytów uzyskanych po gradientach.



Ryc. 1. Wpływ gęstości gradientu na odzysk i czystość limfocytów izolowanych z krwi obwodowej lisów (każdy punkt przedstawia średnie wartości odzysku limfocytów uzyskane z trzech kolejnych badań; każda kolumna średnie wartości czystości limfocytów z trzech kolejnych badań)

The effect of gradient density on salvage and purity of lymphocytes from fox peripheral blood (each point presents mean values of lymphocytes salvage obtained from three successive examinations; each column presents mean values of lymphocytes purity obtained from three successive examinations)

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki izolacji limfocytów z krwi obwodowej lisów hodowlanych przedstawiono schematycznie na ryc. 1 oraz w tab. 1. Najlepsze oczyszczenie populacji limfocytów uzyskano stosując izoosmotyczny w stosunku do krwi lisów gradient Ficoll-Uropolina (315 mmOs/kg) o gęstości  $1,075 \text{ g/cm}^3$ . Dobre wyniki w zakresie oczyszczania dawał również gradient Ficoll-Paque po podwyższeniu osmolarności do 315 mmOs/kg. Testowane gradienty Gradisolu o wzrastającej gęstości i osmolarności dawały w uzyskanej puli komórek interfazy wysokie zanieczyszczenie leukocytami wielojądrzastymi, chociaż w niektórych przypadkach odzysk limfocytów był nieznacznie wyższy w porównaniu do wymienionych gradientów Ficoll-Paque i Ficoll-Uropolina. Najlepszy odzysk limfocytów otrzymano w Gradisolu o gęstości  $1,081 \text{ g/cm}^3$  i osmolarności 305 mmOs/kg, zaś najlepszą czystość w Gradisolu o gęstości  $1,075 \text{ g/cm}^3$  i osmolarności 275 mmOs/kg.



Tab. 1. Wpływ gęstości i osmolarności na odzysk i czystość limfocytów izolowanych z krwi obwodowej lisów (średnie wartości uzyskane z trzech kolejnych badań)  
 The effect of density and osmolality on the salvage and purity of lymphocytes isolated from fox peripheral blood (mean values obtained from three successive examinations)

| Gradient                                                                               | Gęstość<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | Osmolarność<br>(mmOs/kg) | Odzysk<br>limfocytów<br>(x-s %) | Czystość<br>limfocytów<br>(x-s %) |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Ficoll-Paque<br>Pharmacia, Sweden                                                      | 1,077                           | 295                      | 82,4 ± 3,0<br>(74,1 ± 89,7)     | 46,9 ± 2,1<br>(40,6 ± 53,1)       |
| Ficoll-Paque ± NaCl<br>Pharmacia, Sweden                                               | 1,077                           | 315                      | 85,9 ± 2,1<br>(74,6 ± 93,1)     | 70,5 ± 4,2<br>(65,5 ± 78,1)       |
| Ficoll-Uropolina, Ficoll<br>400, Pharmacia, Sweden,<br>Uropolinum 75%, Polfa           | 1,075                           | 315                      | 82,6 ± 3,6<br>(75,1 ± 91,1)     | 90,1 ± 3,3<br>(86,2 ± 95,1)       |
| Gradisol, Uropolinum 75%,<br>Dextran MW20000, Polfa,<br>Pharmaceutical Works,<br>Kutno | 1,073                           | 275                      | 74,6 ± 4,3<br>(70,1 ± 79,4)     | 48,8 ± 3,6<br>(40,1 ± 58,5)       |
| Gradisol, Polfa, Kutno                                                                 | 1,075                           | 275                      | 80,5 ± 2,1<br>(72,4 ± 88,2)     | 68,3 ± 5,1<br>(62,5 ± 74,2)       |
| Gradisol                                                                               | 1,077                           | 285                      | 81,7 ± 2,3<br>(71,1 ± 91,6)     | 46,1 ± 4,2<br>(42,2 ± 54,1)       |
| Gradisol                                                                               | 1,079                           | 290                      | 85,4 ± 3,3<br>(79,1 ± 92,8)     | 57,8 ± 3,1<br>(49,4 ± 65,7)       |
| Gradisol                                                                               | 1,081                           | 305                      | 87,1 ± 1,9<br>(80,6 ± 93,8)     | 53,7 ± 2,4<br>(43,1 ± 58,1)       |
| Gradisol                                                                               | 1,082                           | 325                      | 82,6 ± 4,6<br>(69,6 ± 89,1)     | 49,3 ± 2,8<br>(40,1 ± 57,2)       |
| Gradisol                                                                               | 1,084                           | 335                      | 76,8 ± 5,1<br>(69,3 ± 83,9)     | 44,1 ± 1,8<br>(38,1 ± 53,1)       |
| Gradisol                                                                               | 1,086                           | 340                      | 75,6 ± 4,1<br>(70,1 ± 8,2)      | 44,8 ± 2,9<br>(39,1 ± 52,5)       |

Porównując wyniki czystości i odzysku limfocytów uzyskane w Gradisolu o gęstości 1,075 g/cm<sup>3</sup> z wynikami w gradiencie Ficoll-Uropolina o tym samym ciężarze, lecz o wyższej znacznie osmolarności (315 mmOs/kg), a także uwzględniając wyniki uzyskane na standardowym Ficoll-Paque oraz Ficoll-Paque z dodatkiem NaCl można sądzić, iż obniżenie osmolarności w gradientach nawet przy gęstości optymalnej dla krwi lisów prawdopodobnie rzutuje na gęstość właściwą izolowanych komórek. Można zatem domniemywać, że osmolarność gradientu, podobnie jak jego gęstość, ma zasadniczy wpływ na



uzyskanie wysokiej czystości limfocytów krwi, dlatego oba te parametry powinny być uwzględnione przy doborze gradientu. Warto podkreślić, iż wstępne oznaczenie osmolarności stanowi potwierdzenie danych referencyjnych Benna i wsp. (2), którzy wykazali, że średnia osmolarność surowicy lisów w warunkach fizjologicznych wynosi 322 mmOs/kg z wahaniami od 297 do 346 mmOs/kg. Dobry odzysk i wysoką czystość populacji limfocytów zapewniają gradienty o gęstości i osmolarności takiej jak we krwi lisów.

#### WNIOSKI

Przy doborze właściwej gęstości gradientu do izolacji limfocytów z krwi obwodowej lisów należy dostosować jego osmolarność do osmolarności surowicy tego gatunku.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Barta C.: Lymphocyte transformation (activation) test, in Barta O: Laboratory techniques of veterinary clinical immunology. Charles C. Thomas Publisher (Springfield), s. 86-100, 1984.
  2. Benn D. M., McKeown D. B., Lumsden I. H.: Hematology and biochemistry reference values for the ranch fox. Can. J. Vet. Res. 50, 54, 1986.
  3. Böyum A.: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. 5 (Suppl. 5), 9, 1976.
  4. Janot C., Blancou J., Aubert M. F. A.: Immunité a médiation cellulaire du renard vaccine contre la rage. Comp. Immunol. Infect. Dis. 5, 129, 1982.
  5. Kostro K.: Metoda izolacji limfocytów z krwi obwodowej lisów hodowlanych oraz wykonanie testu rozetkowego EA. Med. Wet. 45, 231, 1989.
  6. Krakowka S., Cockerell C., Koestner A.: Effects of canine distemper virus infection on lymphoid function *in vitro* and *in vivo*. Infect. Immun. 11, 1069, 1975.
  7. Kristensen F., Kristensen B., Lazary S.: The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. Vet. Immunol. Immunopathol. 3, 203, 1982.
  8. Kroese F. G. M., Willemsse A., Slappendel R. J.: Granulocyte function tests in canine infectious diseases: Methods and preliminary clinical results. Vet. Immunol. Immunopathol. 2, 455, 1981.
  9. Thilsted J. P., Shifrine M.: Lymphocyte transformation in the dog: Response of lymphocytes from normal and immune dogs to phytohemagglutinin, coccidioidin and purified-protein derivative. Am. J. Vet. Res. 38, 81, 1977.
  10. Whitacre C. C., Lang R. W.: A technique for separation of canine lymphocytes and their use in the lymphocytotoxic, blastogenic and rosette assays. Transfusion, 15, 346, 1975.
  11. Yang T., Rabinovsky E. D.: Separation and identification of bovine lymphocyte populations. Vet. Immunol. Immunopathol. 14, 77, 1987.
- Wpł. 22 III 1990

#### SUMMARY

The highest purity was obtained when gradient Ficoll-Uropolinum of density 1,075 g/cm<sup>3</sup> and osmolality equal to average fox blood osmolality was used. It is worth while noticing that good purity of lymphocytes was obtained when standard gradient Ficoll-Paque was used and its osmolality was raised to 315 mmOs/kg. It means that both the osmolality and density of a gradient are important obtaining highest purity of lymphocytes from fox peripheral blood.