

SEPARAREA LIMFOCITELOR PRIN METODA FLOTAŢIEI CU UTILIZAREA „ODISTONULUI“

dr. Magda Sîrbu Fekete, Eva Zsigmond, dr. Eva Kóttay-Lakatos,
dr. Magda Zakariás

Investigarea funcţiei celulare a unor serii limfohematopoietice se poate efectua numai după separarea corespunzătoare a lor. Cu ajutorul separării celulare se pot fracţiona dintr-un amestec eterogen, clase de celule cu caracteristici fizice şi funcţionale identice sau asemănătoare (1, 2). Este cunoscut că separarea celulelor se face pe baza unuia sau a mai multor parametri, cum sînt densitatea sau/şi viteza de sedimentare. De exemplu, greutatea moleculară specifică a hematiilor se situează în zona de cca 1,093—1,100 g/cm³, iar a limfocitelor în zona de 1,060—1,100 g/cm³ (2, 5).

Aceste separări au importanţă atît în domeniul cercetărilor imunologice, cît şi în investigaţiile hematologice, deoarece permit concentrarea şi purificarea unor clase particulare de celule limfohematopoietice. În asemenea condiţii, se pot analiza funcţiile specifice, precum şi modificările fizice ale celulelor limfohematopoietice apărute în timpul diferenţierii lor.

Tehnicile de separare celulară sînt deosebit de utile, mai ales în studiul acelor subclase celulare, care nu pot fi diferenţiate morfologic, cu toate că au funcţii diferite, de exemplu limfocitele timo-dependente (T) şi limfocitele burso-dependente (B). Utilizînd populaţiile limfocitare astfel separate la diferite teste funcţionale (de exemplu: testul de stimulare la mitogene, testul de formare a rozetelor etc.) se pot efectua unele analize mai exacte, privind caracteristicile şi funcţiile limfocitare T/B, în scopul interpretării mai juste a rolului lor imunobiologic şi imunopatologic (2).

În lucrarea de faţă expunem metodele noastre de separare a limfocitelor din sângele periferic uman. În elaborarea metodei şi, în speţă, în alegerea unei substanţe ce ar corespunde drept mediu de flotaţie, am pornit de la metoda autorilor A. Böyum, G. Pretlow, precum şi Otto şi Schmidt (3, 4, 5).

Am utilizat o metodă de separare celulară combinată prin centrifugare diferenţiată, respectiv sedimentare spontană cu dextran, urmată de separări simultane de limfocite pe medii de flotaţie, în zona valorilor de 1,065—1,091 g/cm³. Mediul de flotaţie Ficoll—Isopaque, utilizat în mod obişnuit în laboratoarele din străinătate, a fost substituit de noi cu produsul farmaceutic românesc Odiston (U.M.B. Bucureşti). Acest produs, similar celor amintite mai sus, nu este toxic şi nu are efect litic asupra celulelor cu care vine în contact.

1. *Probe de sînge.* Am studiat 15 probe de sînge, provenit de la persoane de grup 0 (I), în vîrstă de cca 30—45 de ani, clinic și hematologic normale. Recoltările de sînge le-am efectuat pe soluția stabilizatoare-anti-coagulantă A.C.D. în raport 1 parte sol. A.C.D. + 9 părți sînge în cantitate totală de 20 ml.

2. *Mediile de flotație.* Am efectuat separări simultane pe 6 medii de flotație Odiston adus la densitatea $A = 1,065$, $C = 1,075$, $E = 1,078$, $E' = 1,080$, $J = 1,083$, $K = 1,091$ g/cm³, cu ajutorul apei distilate și la pH 7,2 cu cîteva picături de NaOH 5 n.

3. *Aparatura.* S-a lucrat cu sticlărie siliconată și cu aparatură obișnuită a unui laborator clinic.

4. *Prepararea suspensiilor limfocitare.* S-a utilizat sînge periferic, proaspăt recoltat. După îndepărtarea trombocitelor, prin centrifugare diferențiată, sîngele integral deplachetat a fost supus unei sedimentări cu dextran 5% (6). Plasma, bogată în leucocite, s-a centrifugat 5 min. la 2 500 tur./min. Sedimentul leucocitar obținut s-a resuspendat în sol. salină de pH 7,2, stratificînd pe cele 6 medii de flotație A, C, E, E', J, K, toate de 2 ml, cîte 1,5 ml suspensie leucocitară, conținînd fiecare fracțiune cca $1,5 \times 10^7$ celule. A urmat apoi o centrifugare de 2 500 tur./min., timp de 20 de minute. Stratul limfocitar format între coloana mediului de flotație și al soluției saline s-a cules cu minuțiozitate, s-a resuspendat și s-a spălat de 2 ori cu sol. Hanks de 7,2 pH. Concentrația celulară dorită s-a obținut de asemenea prin resuspendarea limfocitelor în sol. Hanks.

5. *Evaluarea calitativă a populațiilor limfocitare separate cu ajutorul mediilor de flotație A, C, E, E', J, K.*

În acest scop am efectuat următoarele operații din cele 6 suspensii limfocitare:

a) numărătoarea celulelor (pentru aprecierea cantitativă),

b) prepararea frotiurilor microscopice colorate după May-Grünwald și Giemsa (pentru determinarea gradului de puritate limfocitară),

c) Cu ajutorul testului de citotoxicitate limfocitară am determinat procentajul limfocitelor devitalizate în cursul separărilor, după metoda Terasaki (7). Este cunoscut că limfocitele devitalizate, datorită membranei lor celulare lezate, nu mai sînt capabile să excludă colorantul, astfel ele se colorează, reacția de citotoxicitate limfocitară devenind pozitivă (7).

d) Testul de formare a rozetelor spontane a fost utilizat ca test funcțional pentru limfocitele separate, spre a pune în evidență procentajul limfocitelor „rozetă-formatoare“ față de cele „rozetă-negativă“. Este cunoscut că anumite limfocite umane formează „in vitro“ așa-numitele rozete spontane cu hematiile de oaie nesensibilizate (8).

Rezultate

Datele tabelului reflectă valorile privind calitatea suspensiilor limfocitare, obținute cu cele 6 medii de flotație.

a) Numărul celular limfocitar cel mai crescut, de cca 3×10^6 , s-a obținut în cazul separării pe mediul J (1,083 g/cm³), iar cel mai scăzut, de cca $2,5 \times 10^5$, cu mediul A (1,065 g/cm³), raportat la cca 20/6 ml sînge integral.

b) La examenul microscopic, în cazul separărilor pe mediile A, C, E,

Tabel despre evaluarea calității suspensiilor limfocitare obținute prin separarea pe medii de flotație „Odiston”

Populația limfocitară separată	Medii de flotație „Odiston”					
	A	C	E	E'	J	K
	1,065 g/cm ³	1,075 g/cm ³	1,078 g/cm ³	1,080 g/cm ³	1,083 g/cm ³	1,091 g/cm ³
Numărul celulelor (din 20/8 ml sing: Integral)	2.5×10^6	$1.5 \pm 0.5 \times 10^6$	$2.0 \pm 0.5 \times 10^6$	$2.5 \pm 0.5 \times 10^6$	3×10^6	
Gradul de puritate (%)	96—98		92±2	92±2		contaminat cu hematii
Limfocite devitalizate (%)	10±4 D.S.	10±4 D.S.	5±3 D.S.	10±4 D.S.	10±4 D.S.	neinterpre- tabil
Limfocite „rozetă-formatoare” (%)	84±5 D.S.		59±10 D.S.	45±25 D.S.	45±25 D.S.	
Indice de reproductibilitate (%)		100	100	100	100	

E' J, nu s-au pus în evidență nici trombocite, nici hematii. Suspensia limfocitară obținută prin separarea pe mediul K (1,091 g/cm³) s-a arătat a fi contaminată de hematii. Granulocitele s-au pus în evidență în fracțiunile limfocitare A, C, D, E', J, în cca 8±2%. Monocitele au rămas în suspensie în cazul fiecărei separări, în cca 10±4%. Gradul de puritate a suspensiilor limfocitare „A” a atins, în general, valoarea de 95%. Suspensiile limfocitare separate cu mediile C, E, E' au atins un grad de puritate de cca 92±2%, iar cele separate pe mediul J nu au atins nici 90%. Suspensiile limfocitare obținute pe mediul K au fost neinterpretabile.

c) Procentajul limfocitelor devitalizate de la A, inclusiv E', nu a depășit valoarea de 10±4%.

d) Populația limfocitară obținută în zona de separare A a arătat activitate rozetă-formatoare de cca 84—90%. În cazul separărilor pe medii de flotație C, E, limfocitele prezentau această activitate în 59±10%, iar în fracțiunile E', J în cca 45±25%. În fracțiunea K nu am obținut rezultate concludente.

Concluzii

1. Rezultatele obținute indică o separare limfocitară optimă prin utilizarea Odistonului de 1,077—1,079 g/cm³ densitate. Suspensia limfocitară la acest mediu de flotație atinge un grad de puritate controlată microscopic de cca 92±2%. Pe frotiul efectuat din suspensia limfocitară nu se pun în evidență nici hematii, nici trombocite. Granulocitele pot fi întâlnite în cca 8±2%, iar monocitele în cca 10±5%. Numărul celulelor devitalizate în urma procedurii de separare nu depășește în general valorile de cca 5±3%. Suspensia limfocitară astfel preparată poate fi utilizată chiar la efectuarea de teste sensibile, ca de exemplu testul de formare a rozetelor, testul de citotoxicitate limfocitară etc.

2. Reproducibilitatea metodei are un indice de 100%, similar altor metode cunoscute.

3. Suspensia limfocitară poate fi preparată prin metoda aplicată de noi în cantități suficient de mari, chiar și în condiții sterile.

4. Separarea limfocitelor din singele periferic uman prin metoda flotației cu Odiston, poate fi recomandată în scopul preparării suspensiilor pure, necesare atât în munca de cercetare, cât și în testările curente de serologie limfocitară.*

Bibliografie

1. Shortman K., Brunner K. T., Cerottini J.: J. of Experim. Med. (1972), 1375; 2. Tridente G.: în Vol. A III-a Conferință Națională de Hematologie, București, 1972, p. 153; 3. Böyum A.: Scand. J. Clin., Lab. Invest. (1968), 21, suppl. 97, 31; 4. Otto F., Schmidt D. O.: Blut (1970), 21, 21, 290; 5. Pretlow G. T.: Am. J. of Pathol. (1971), 63, 2, 255; 6. Weerdt Ch. M. van der: Platelet Antigens and Iso-immunisation, Acad. Proefschrift, Drukkerij, Amsterdam, (1965), 10; 7. Mittal K. K., Mickey M. R., Terasaki P. I.: Vox Sang. (1969), 17, 416; 8. Haskill J. S. și colab.: J. of Experim. Med. (1972), 135, 1410.

* Mulțumim, pe această cale, tov. Klára Borsos și Ilona Tóth-Szép pentru prețioasa lor colaborare.