

616.15-078

MIKROMETODA TESTU BLASTICKÉ TRANSFORMACE LYMFOCYTŮ Z PLNÉ KRVE A NĚKTERÉ JEJÍ PODMÍNKY

RNDr. M. ŠVEC, mjr. MUDr. Z. REFKA, pplk. MUDr. P. RÁKOSNÍK
Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha
(náčelník: plk. MUDr. Vl. Kotlář, CSc.)

Úvod

V současné době se v klinické i hygienicko-epidemiologické praxi a výzkumu projevuje stále větší tlak na rozšiřování spektra a počtu vyšetření řady imunologických parametrů.

Jedním z používaných testů je metoda vyšetřující blastickou transformací lymfocytů. Využívá se v souvislosti s monitorováním vrozené i získané imunodeficiency, jako kontrola při terapii imunostimulačními nebo imunosupresivními látkami, je vhodná i při sledování působení škodlivin životního a pracovního prostředí na imunologický profil organismu. Tento test využívá jedné z funkcí lymfocytů — in vivo odpovídat na antigenní stimul transformací k produkci imunologicky aktivních dceřinných buněk. Vazba antigenu na receptor lymfocytu dává podnět k řadě pochodů, k zvětšení a dělení lymfocytu. Tato změna — lymfoblastická transformace — navozena v podmínkách in vitro účinkem polyklonálních mitogenů nebo specifických antigenů je nejčastěji měřena buď morfologicky, nebo podle stupně inkorporace prekursoru nukleových kyselin, značeného radioaktivním izotopem. V této práci jsme využili inkorporace tritiem značeného prekursoru DNK do mitogenem stimulovaných lymfocytů, což umožňuje přístrojové hodnocení.

Použitím plné neseparované krve jsme se snažili přiblížit fyziologickým podmínkám a odstraněním separačních postupů bylo dosaženo možnosti zpracovat větší množství vzorků.

V článku jsou uvedeny naše zkušenosti při provádění mikrometody blastické transformace lymfocytů z plné krve.

Materiál a metodika

Princip metody je založen na měření tritiem značeného inkorporovaného prekursoru nukleových kyselin (^3H -thymidinu) v mitogeny stimulovaných lymfocytech. Kvantum vestavěného radionuklidu odpovídá rychlosti tvorby a množství vyprodukované DNK a měří se kapalinovým scintilačním počítačem beta aktivity, v počtu záblesků za minutu (CPM).

1. Příprava kultivačních médií

Jako kultivační média byly používány přípravky ÚSOL: MEM a RPMI-1640, které byly upraveny takto: MEM byl doplněn glutaminem ÚSOL (30 mg/100 ml), NEA-ÚSOL (1 l hv/1000 ml), PNC (100 j/l ml), STM (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), pH bylo nastaveno 7,5% roztokem kyselého uhličitánu sodného ÚSOL, do rozmezí 7,2–7,4. Obdobně bylo doplněno RPMI — 1640, kromě přídavku NEA. Obě média byla testována s přidáním a bez přídavku inaktivovaného fetálního telecího séra (FTS) — Vysoká škola veterinární, Brno.

2. Příprava mitogenů

a) **Phytohaemagglutinin (PHA)** — Wellcome, HA-15. Navážka se rozpustí ve fyziologickém roztoku (ČSL 3) a rozplní do ampulí tak, aby např. dávka 0,4 ml obsahovala 400 μg PHA; zatavené ampule se skladují při -20°C . V čas potřeby se obsah ampule naředí médiem na pracovní koncentraci PHA.

b) **Conkanavalin (CON-A)**, Pharmacia. Zásobní koncentrace 100 μg CON-A v dávce 0,2 ml

se připraví a uchovává stejně, jak je uvedeno u PHA.

c) **Pokeweed mitogen** (PWM), Serva. Příprava, koncentrace a uchovávání zásobního roztoku je totožné s CON-A.

3. Rozplnění mitogenů

Do mikrotitrační destičky s plochým dnem pro kultivaci (Novogen, ÚMG-ČSAV) se naplní médium a mitogeny mikropipetou tak, že první trojice řady jamek obsahuje médium prosté mitogenu, druhá, třetí a čtvrtá trojice příslušné mitogeny v pracovní koncentraci a objemu po 100 μ l.

4. Ředění krve a její rozplnění do kultivační destičky

1 ml heparinizované venózní krve se po dvouhodinové preinkubaci naředí médiem na objem 10 ml. Za míchání na elektromagnetické míchačce MM-2 (Lab. přístroje, Praha) se naředěná krev dává po 100 μ l do všech jamek obsahujících médium a mitogeny.

5. Kultivace

Kultury se inkubují v termostatu při teplotě 37 °C s 90% vlhkostí různou dobu:

- v systému desek zalepených izolepou;
- v exsikátoru s atmosférou 5% CO₂ a destičkách překrytých víčkem; prostředí CO₂ bylo připraveno reakcí vypočteného obsahu kyselého uhličitanu sodného s nadbytkem kyseliny citrónové ve vodném roztoku;
- v termostatu (Heraeus) s řízenou atmosférou 5% CO₂ a 90% vlhkostí, v destičkách překrytých víčkem.

18 hodin před ukončením kultivace byl do všech jamek přidán ³H-thymidin (specifická aktivita 980 GBq/mM — ÚVVVR, Praha) o aktivitě 40 kBq v 5 μ l. Požadovaná aktivita značeného thymidinu byla připravena jeho naředěním fyziologickým roztokem. Kultivace je ukončena zmrazením desky při -20 °C.

6. Sklizení buněk a adjustace filtrů do lahviček

Obsah jamek se převede a promyje vodou pomocí Harvestoru fy Dynatech AG (Branch, NSR) na sklovláknitý filtrační papír (Whatman GFA 934-AH). Filtry jsou po vysušení vloženy do skleněných scintilačních lahviček (Sklo Union-Kavalier TYP — KS-90) naplněných 2 ml scintilačního roztoku (STL-41, Spolana Neratovice).

7. Měření

Uzavřené lahvičky jsou vloženy do stojánku v kapalinovém scintilačním počítači beta aktivity RACKBETA 1217 fy LKB a měřeny prostřednictvím programu pro ³H (30 sekund jed-
nute). Účinnost přístroje byla zjištěna změřen-

na lahvička). Výsledky jsou dány v počtu záblesků za minutu, CPM/min (counts per min) standardu tritia dodaného s přístrojem a vypočtením podle:

$$\text{účinnost} = \frac{\text{CPM}}{\text{DPM}} \cdot 100 = \frac{111.816}{196.100} = 57,05 \%,$$

kde CPM je naměřená hodnota standardu tritia, DPM je počet rozpadů udaný výrobcem a odpovídá 100 % CPM.

8. Vyhodnocení

Z hodnot CPM pro jednotlivé kultivace jsou počítány průměry ($\bar{x}$) a směrodatné odchylky (s) pro příslušné triplet. Porovnáním $\bar{x}$ CPM s hodnotami referenčního pásu pro kontrolní kultivaci (aktivita nestimulovaných buněk) a pro aktivitu buněk po stimulaci jednotlivými mitogeny se posoudí stupeň lymfoblastické transformace v krevních vzorcích.

9. Soubor dárců

Krev byla získána od 106 osob (85 mužů ve věku 19—21 let, 16 mužů ve věku 30—55 let a 5 žen ve věku 32—45 let). Vliv jednotlivých modifikujících faktorů na průběh kultivace byl sledován opakovaným vyšetřováním krve jednoho dárce, jednorázovým vyšetřením souboru dárců nebo opakovaným vyšetřením souboru dárců.

Výsledky

Optimalizace metody

Výsledné hodnoty v CPM, uvedené v tabulkách a grafech, jsou průměrem získaným minimálně z deseti kultur buněk jednoho dárce. Ponecháváme v počátečních experimentech pozorována vyšší variabilita výsledků při použití média MEM proti RPMI za jinak stejných podmínek, bylo v této práci užíváno výhradně média RPMI.

Zjištění vlivu preinkubační teploty krve na konečnou hodnotu CPM bylo provedeno uložení krevních vzorků po odběru na dobu dvou hodin při teplotě místnosti (24 °C), v termostatu (37 °C) a v lednici (4 °C). Porovnáním hodnot výsledků v tab. 1 je zřejmé, že optimální dvouhodinová preinkubační teplota krve je 37 °C.

Tab. 1
Provedeno v termostatu Heraeus; VK = variační koeficient

°C	CPM · 10 ³	s · 10 ³	Vk
37	262,3	9,5	3,6
24	245,2	17,0	6,9
4	225,8	9,9	4,4

Při hledání podmínek pro možnost dlouhodobého skladování neředěné krve bylo zjištěno, že nejvhodnější teplota pro její uložení po dobu 24 h je 4 °C. Poněvadž však skladování krve do druhého dne se ukázalo být zátěží pro standardnost práce, nedoporučujeme je a výsledky neuvádíme.

Vzájemný vztah ředění plné krve, dvou kultivačních časů a přítomnosti inaktivovaného FTS ukazuje tab. 2. Použití inakt. FTS do média k ovlivnění růstových podmínek bylo závažnou otázkou. Ověřili jsme, že jeho přítomnost zřetelně snižuje konečný výtěžek CPM. Testování FTS bylo provedeno pro nejčastěji užívanou koncentraci 10 %. Výsledky v tab. 2 určují důležité kultivační podmínky: ředění krve 1 : 10 (vzorky s koncentrovanější krví byly shledány jako nepoužitelné), dobu inkubace 96 hodin ($V_k = 2,5$) a negativní vliv přítomnosti FTS ve všech koncentracích krve. Čas 72 hodin je uveden proto, že je nejčastěji užívanou dobou v kultivacích kratších než 96 hodin.

Tab. 2

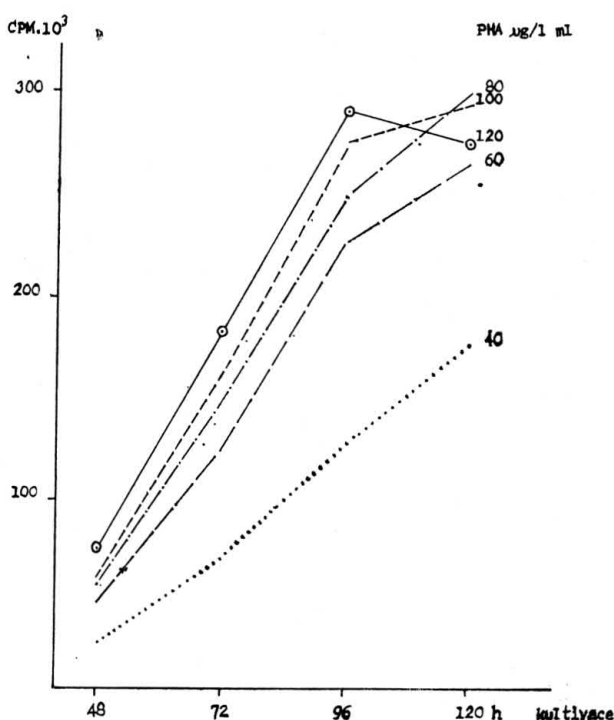
Provedeno v exsikátoru se stimulační dávkou 80 μg PHA/ml; V_k = variační koeficient

Ře- dění krve	72 h CPM . 10 ³	96 h CPM . 10 ³	96 h + 10% FTS CPM . 10 ³
1:10	57,3 $\pm$ 4,2 V_k 7,3	130,2 $\pm$ 3,2 V_k 2,5	56,8 $\pm$ 3,2 V_k 5,7
1:20	49,0 $\pm$ 3,8 V_k 7,7	113,2 $\pm$ 4,3 V_k 3,8	30,8 $\pm$ 4,3 V_k 14,0
1:40	24,2 $\pm$ 2,9 V_k 12,0	37,4 $\pm$ 4,5 V_k 12,0	10,8 $\pm$ 0,9 V_k 8,3

Závislost koncentrace PHA na délce kultivační doby je patrna z grafu 1. Krevní buňky jednoho dárce byly ve tkáňové kultuře stimulovány PHA o koncentraci 40, 60, 80, 100 a 120 $\mu\text{g/l}$ ml média po dobu 48 až 120 hodin.

Z grafu vyplývá, že optimální podmínky reakce jsou zajištěny dávkou PHA 120 $\mu\text{g/l}$ ml média a délkou kultivace 96 hodin, při ředění krve 1 : 10 a použití média RPMI bez FTS.

Byla provedena titrace jednotlivých mitogenů při stanovené kultivační době 96 hodin (HERAEUS) a výsledky jsou znázorněny na grafu 2. PHA je titrován v dávkách od 60 do 180 $\mu\text{g/l}$ ml média. Koncentrace 120 $\mu\text{g/l}$ ml leží v optimální části křivky. CON-A je titrován v dávkách od 5 do 50 $\mu\text{g/l}$ ml média. Koncentrace 15 μg je pro reakci optimální. PWM je titrován v dávkách od 5 do 20 $\mu\text{g/l}$ ml média. Jako nejlepší koncentrace pro reakci lymfoblastické transformace uváděnou metodou je též 15 $\mu\text{g/l}$ ml média. Tyto tři optimální koncentrace mitogenů dávají standardní výsledky, což potvrzují i vyhovující směrodatné odchyl-



Graf 1 Provedeno v termostatu Heraeus

ky. (Kultivační podmínky stanovení jsou stejné jako v předchozím případě.)

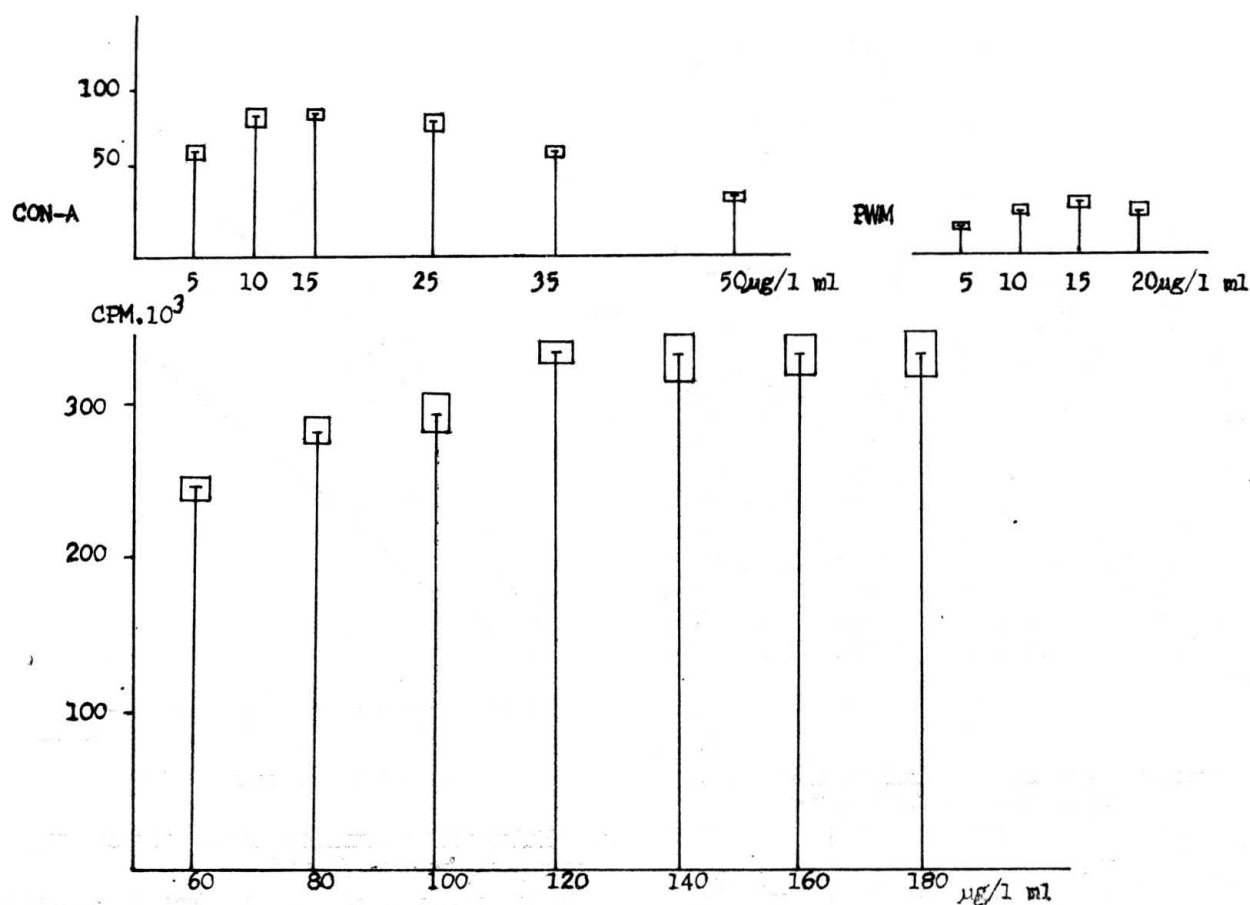
Úspěch dlouhodobé kultivace krevních buněk je podmíněn především optimální hodnotou pH v celém časovém úseku. Poněvadž vlivem metabolických pochodů i atmosféry dochází v buněčných kulturách během inkubace k posunu pH, je nezbytné zabezpečit jeho optimální interval 7,2–7,4. Jako úplně nevhodné se projevilo zamezování přístupu vzduchu přelepením desky izolepou. Pro kultivaci trvající 72 plus 18 hodin je kvalita v exsikátoru upravené atmosféry dostatečná. Zhoršení bylo pozorováno až při prodloužení kultivace na 96 plus 18 hodin. Nejlepších výsledků však bylo dosaženo při použití termostatu s řízenou atmosférou 5% CO₂ a 90% vlhkostí (dále jen termostat). Vlivy ředění krve, délky kultivace a FTS byly obdobné jako při práci s exsikátorem, avšak projevily se vyšší odezvou v CPM. Z tab. 3 je patrné, že při použití termostatu byla za stejných podmínek odpověď testu podstatně vyšší, v porovnání s exsikátorem až o 90 %.

Tab. 3

Exsik. + 5% CO ₂ CPM . 10 ³	Termostat CPM . 10 ³
137,4 $\pm$ 7,8	262,3 $\pm$ 9,5

Referenční hodnoty

Pro získání referenčního pásu jsme použili neparametrickou metodu, opírající se o výběrové percentily, jako způsobu určení kritických



Graf 2

Tab. 4

95% referenční pás v CPM · 10 ³	Kontrolní kultivace	PHA	CON-A	PWM
	do 4,0	196—350	81,19—171,31	18,15—49,52

Tab. 5

Dat.	SA	s	PHA	s	CON-A	s	PWM	s
10/4	1,1	0,92	271,1	3,8	—	—	—	—
11/4	1,0	0,75	283,3	15,6	—	—	—	—
17/4	0,62	0,15	272,0	14,1	94,14	4,1	34,3	2,1
22/9	1,9	1,3	270,4	12,4	86,5	10,1	20,2	1,6

Dárce R. Z. testován opakovaně v intervalech 1 den, 6 dnů a 22 týdnů. Provedeno při optimálních reakčních podmínkách; hodnoty vyjádřeny v CPM.10³

limitů, neboť mezi 2,5 percentylem a 97,5 percentylem leží 95% rozmezí hodnot. Referenční hodnoty získané v naší laboratoři vyšetřením souboru zdravých dárců uvádí tab. 4.

Při opakovaném sledování jednoho dárce se projevila poměrně dobrá stabilita testu, jak ukazují výsledky v tab. 5.

Diskuse

Uvedená metodika má některé výrazné výhody oproti metodě používající separovaných lymfocytů. Je odstraněn separační šok a nežádoucí opracování membrán. Jsou práce uvádějící ovlivnění jednotlivých subpopulací lymfocytů vlivem separačních technik (7).

Test je prováděn v prostředí autologních bílkovin plazmy, odpadá zdlouhavá separace lymfocytů a nastavení jejich koncentrace. Krevní buňky zůstávají ve svém fyziologickém prostředí, změna do situace *in vitro* je menší. Významnou skutečností je také malá spotřeba krve (1,0 ml), což je vhodné zejména pro uplatnění v pediatrické praxi. Přínosem je i možnost vyšetřit najednou poměrně velké množství vzorků (desítky v jedné směně). Inkorporace ^3H -thymidinu jako výsledek proliferace lymfocytů závisí zejména na ředění krve, inkubační době, koncentraci mitogenů a významný je i záporný efekt eventuální přítomnosti FTS. Optimálním ředěním krve se podle našich výsledků ukázalo ředění 1 : 10. Menší ředění vykazovalo nízký výtěžek CPM. Naše nálezy v otázce koncentrace krve v testu se liší od některých literárních údajů (1, 2), ale jsou podobné, jak uvádí S. J. Knox (3). Optimální kultivační doba je v trvání 96 hodin a 18 hodin s ^3H -thymidinem. V tomto časovém úseku dojde k optimálnímu počtu dělení lymfocytů z počátečního, do reakce vstupujícího množství. Zkrácení kultivace vedlo k nižším výtěžkům CPM, prodloužení k vyšší variabilitě výsledků. Titračně byly stanoveny optimální koncentrace mitogenů, vyhovující reakčním podmínkám a současně vykazující standardní stimulační účinky na lymfocyty. Obsah inaktivovaného FTS v kultuře výrazně snížil odpověď buněk v CPM. Při použití plné krve se pozitivně uplatňuje vliv přítomných autologních bílkovin plazmy. Ty vytvářejí prostředí, které se do jisté míry blíží situaci *in vivo* pro krevní buňky optimální. Přídavek FTS je tedy zbytečný a zároveň i nežádoucí, neboť pravděpodobně interferuje s bílkoviny krevní plazmy. Důležitou podmínkou správné funkce celého kultivačního systému se ukázalo používání automatického řízení atmosféry obohacené 5% CO_2 , zabezpečující standardnost prostředí. Nutné je i obohacení média o glutamin a antibiotika těsně před použitím, neboť se tak odstraní vliv eventuálního stárnutí těchto komponent.

Naše výsledky ukazují, že relevantní odpověď lymfocytů může být získána v případě, kdy jsou kultivovány za podmínek blízkých *in vivo*. Opakované vyšetření jednoho dárce ukázalo,

že mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou u nejužívanějšího mitogenu byl rozdíl do 6 %. Při opakovaném vyšetření 16 dárců byl rozdíl do 15 procent. Literatura uvádí i přímý vliv přidání erytrocytů nebo jejich membrán na zlepšení odezvy lymfocytů separovaných na Ficolu, pravděpodobně v důsledku membránových interakcí, důležitých pro optimální buněčnou odpověď (4).

Zkušenosti nás přesvědčily i o přesnějších výsledcích získaných metodou z plné krve proti výsledkům ze separovaných lymfocytů. Při nedostupnosti používání termostatu s řízenou koncentrací CO_2 je možná náhrada exsikátorem s chemicky vyvíjeným CO_2 . Literární prameny (5, 6) uvádějí i možnost náhrady beta kapalinového scintilačního počítače gama počítačem a ^3H -thymidinu jiným prekurzorem nukleových kyselin, který je označen izotopem ^{125}J .

Souhrn

V článku jsou uvedeny zkušenosti s optimalizací stimulace lymfocytů polyklonálními mitogeny a jejich kultivací v systému plné krve, s přístrojovým měřením výsledků. Jsou publikovány referenční hodnoty získané na našem pracovišti.

Literatura

1. BICKER, U. - SCHAUMAN, W. - HAAS, V.: Optimizing the lymphocyte transformation test in the whole blood. I. Optimum condition for thymidine incorporation. *J. Immunopharmacol.*, 5, 1983, s. 1—12.
2. SCHAUMANN, W. - BICKER, U. - HAAS, V.: Optimizing the lymphocyte transformation test in the whole blood. II. Kinetics of thymidine incorporation. *J. Immunopharmacol.*, 5, 1983, č. 13—30.
3. KNOX, S. J. - SHIFRINE, M. - ROSENBLATT, L. S.: Assessment of the *in vitro* radiosensitivity of human peripheral blood lymphocytes. *Radiation Research*, 89, 1982, s. 575—589.
4. JOHNSON, R. A. - SMITH, T. K. - KIRKPATRICK, C. H.: Augmentation of phytohemagglutinin mitogenic activity by erythrocyte membranes. *Cellular Immunol.*, 50, 1976, s. 613.
5. BAKESH, K. - KUMAR: A micromethod for *in vitro* assay of lymphocyte proliferation in mouse whole blood. *Immunol. Methods*, 25, 1979, s. 239—245.
6. HEDGES, M. - HORSNEY, S.: The effect of x-rays and neutrons on lymphocyte death and transformation.
7. KOL, R. - FRIEDLÄNDER, M. - RIKLIS, E. - RAVEM, D.: Separation of human lymphocytes on Ficoll-Paque Gradients. *Radiation Research*, 95, 1983, s. 108—115.

Další literatura u autora.

Klíčová slova: Blastická transformace lymfocytů; Mitogen; Tritium thymidin; Plná krev.