

de la rifadine et du lampren. Ils ont trouvé des altérations des noyaux cellulaires dans 25-35% des examens effectués: vacuolisation et déformation. Ces modifications sont plus évidentes chez les sujets traités longtemps par ces médicaments. Les sujets de contrôle n'ont pas montré de modifications. Les auteurs sont de l'avis que ces altérations cellulaires sont dues essentiellement à l'influence des médicaments mais il n'est pas exclu le rôle nocif de longue durée des mycobacteries.

PËRCAKTIMI I VLERAVE TË LIMFOCITEVE B DHE T NË GJAKUN PERIFERIK

— KSHIM GENC SULÇEBE — XHELADIN ÇEKA —

(Instituti i studimeve pediatrike, katedra e anatomisë dhe e histologjisë)

Mikroskopia optike nuk vë në dukje asnjë dallim midis limfociteve B dhe T. Por, në nivelin nënqelizor e molekular, ato ndryshojnë nga shumë antigjenë sipërfaqësorë, receptorë e funksione që i fitojnë gjatë diferencimit në organet limfoide parësore. Kur këto ndryshime janë absolute, ato mund të shërbejnë si shënjes (markerë) të këtyre popullatave limfocitare. Të tilla janë imunoglobulinat membranore për limfocitet B, të cilat shërbejnë si receptorë për antigjenin, ndryshe nga imunoglobulinat serike, ku mbizotëron klasa IgG, ato që gjenden në sipërfaqen e limfociteve B janë kryesisht të klasës IgM dhe IgD (5).

Vetia e limfociteve T për të lidhur në 4°C eritrocitet e dashit është përdorur gjerësisht për identifikimin e tyre në gjakun periferik (2, 3, 4, 6). Receptori për eritrocitet e dashit mbi limfocitet T është identifikuar si një glikoproteinë prej 50 kilodaltonë (7). Gjatë diferencimit intratimik të limfociteve T, ky receptor është struktura më e hershme që paraqitet si shënjes i tyre (10) dhe, nga ana funksionale, mendohet se shërben si stimulues i hershëm i shumëzimit dhe diferencimit intratimik në një kohë kur shënjesit e tjerë diferencues të limfociteve T, si receptori për antigjenin (Ti) dhe të tjerë (T3, T4, T8 etj.), akoma s'janë shprehur (8). Shmangia nga norma e limfociteve T dhe B vihet re kryesisht në deficitet imunitare të lindura apo të fituara. Në deficitin imunitar të rëndë e të ndërthurur të latantit kemi gjithmonë ulje të theksuar të limfociteve T, ndërsa limfocitet B mund të jenë gjithashtu të ulura ose në normë. Po kështu, në sindromën Di George, në Ataksi-Teleangiektazi dhe në Wiskott-Aldrich kemi ulje të qëndrueshme të limfociteve T me shifra normale të limfociteve B. Ulje ose mungesë e plotë e limfociteve B vihet re në disa deficite të lindura të imunitetit humoral, si në agamaglobulineminë e lidhur me seksin ose atë autosomike recesive, si edhe në deficitin imunitar me timonë (5, 11). Zakonisht limfocitet T s'janë të prekur në këto sëmundje. Prekje të numrit të limfociteve T ose B periferike mund të kemi gjithashtu në deficitet imunitare dytësore nga shumëzimet malinje, kequshqyerja, sëmundjet e rënda kronike ose infeksionet e ndryshme, si p.sh. në sindromin e deficitit imunitar të fituar (AIDS), nga infeksioni me virusin HIV.

Në këtë artikull ne përshkruajmë karakterizimin e limfociteve B dhe T në gjakun periferik të individëve normalë me metodat e imuno-

fluoreshencës membranore dhe të rozetave E të standartizuara prej nesh, duke përdorur mjaft reagentë jo të kushtueshëm dhe të prodhuar në vend.

Materiali dhe metodat

U ekzaminuan 28 fëmijë të moshës 1 — 42 muaj dhe 10 studentë vullnetarë të moshës 20 vjeç, klinikisht të shëndoshë. Raporti meshkuj femra në të dy grupet ishte i barabartë.

Limfocitet i izoluar me anën e metodës së gradientit të dendësisë (1); Gjaku venoz i heparinizuar dhe i holluar me tretësirën buferike izotonike PBS vendoset me kujdes në një provëz mbi tretësirën ndarëse e përbërë nga përzierja Fikol-Verografinë me dendësi 1077 dhe centrifugohet me 2000 rrotullime në minutë për 30 minuta në 18°C. Pas thithjes së unazës me njëbërthamorët e izoluar, këto shpëlahen dy herë me PBS (1400 rrotullime në minutë, 5 minuta në 4°C) dhe vihen në pezulli me të njëjtën tretësirë. Numërimin e qelizave e bëjnë me anë të hemocitometrit të Burkert-it (14).

Përcaktimin e limfociteve B dhe T e bëjnë përkatësisht sipas teknikave të rekomanduara nga disa autorë (2,9), të modifikuara prej nesh:

a) Identifikimi i qelizave bartëse të imunoglobulinave membranore (Igm pozitive ose limfocitet B)

Mbi precipitatin qelizor që përmban 1.10^6 elemente njëbërthamore hidhet 30 mikrolitra antiserum kundër imunoglobulinave njerëzore tërësore, e konjuguar me izotiocianat të fluoreshinës (Meloy), i prodhuar te dashi dhe i holluar 1/3 me PBS. Përmbajtja e mësipërme inkubohet më tej për 30' në një enë me akull, duke e tundur herë pas here. Në fund të inkubimit bëhen dy larje të qelizave në PBS me 0.1 % azid natriumi (NaN_3) dhe përgatitet preparati për shikimin në pezulli të qelizave midis lamës dhe lamelës. Ekzaminimin mikroskopik e bëjnë me anën e një mikroskopi epifluoreshent me llambë HBO 200, duke numëruar të paktën 300 qeliza.

b) Identifikimi i qelizave rozetëformuese me eritrocitet e dashit (rozetat E ose limfocitet T)

Në një provëz sterile hidhet sasia e pezullisë qelizore që përmban 1.10^6 limfocite, 0.2 ml serum njerëzor AB të inaktivizuar 30 minuta në 56°C dhe të përthithur me eritrocitet e dashit si edhe 0.15 ml pezulli 2 % të eritrociteve të dashit të shpëlarë. Përmbajtja e mësipërme plectrocentrifugohet me 1000 rrotullime në minutë në 4°C, mbahet gjithë natën në këtë temperaturë.

Të nesërmen precipitati limfoeritocitar vihet «butësisht» në pezulli dhe bëhet një ngjyrosje e lehtë me blumetilen. Numërimi i rozetave E bëhet me mikroskop të zakonshëm, duke përdorur hemocitometrin e Burkert-it.

Përpunimi statistikor i të dhënave

Krahasimin e mesatareve e bëjnë me anë të testit t të Student. Për të studiuar bashkëmarëdhënien midis dy serish me vlera të vazhdueshme, përdorim përlogaritjen e koeficientit r.

Rezultatet

Ashtu sikurse raportohet dhe nga autorët e konsultuar (6, 9), imunofluoreshenca membranore paraqitet në formën e një unaze fluoreshente në sipërfaqe të membranës qelizore të limfociteve B, kur këto ruhen në temperaturë të ulët edhe në prani të azidit të natriumit, si frenues i fluiditetit membranor (Fig. nr. 1). Limfocitet T paraqiten në

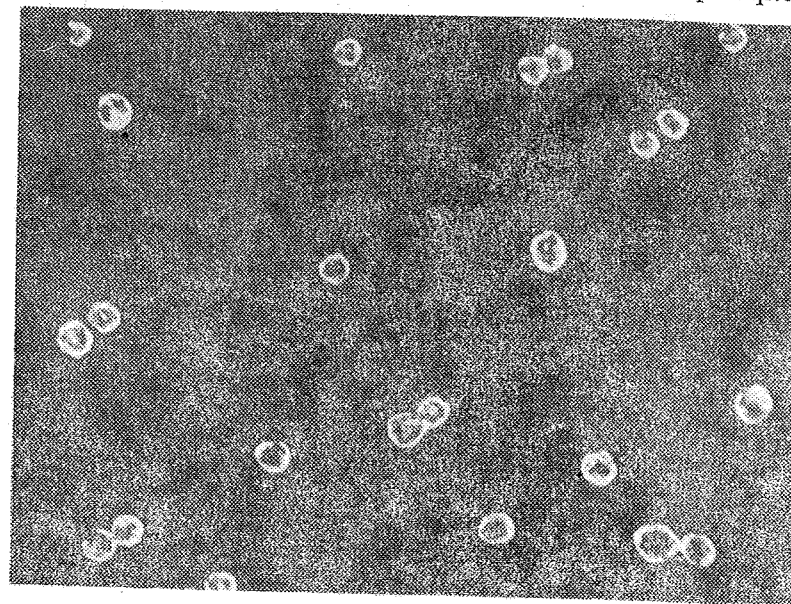


Foto 1 Mikrofotografi e një preparati me limfocite B të shenjuar me imunofluoreshencë.

formën e rozetave, në qendër të të cilave është limfociti T i ngjitur me të paktën 3 eritrocite dashi (Fig. nr. 2).

Shpërndarja e vlerave individuale brenda eksperimentit (koeficienti i variacionit) për rozetat E është lëkundur në shifrat 7 — 12 %.

Në pasqyrën nr. 1 paraqiten vlerat mesatare të limfociteve: B dhe T në kontigjentet e studiuar. Në këto rezultate shpiket një diferencë midis vlerave të limfociteve T në të dyja grup-moshat ($P = 0.01$). Përkundrazi, asnjë diferencë nuk ekziston midis vlerave të limfociteve B ($P > 0.05$). Nuk ekziston asnjë bashkëmarëdhënie në grup-moshën 1-42 muaj ndërmjet vlerave individuale të limfociteve T apo B dhe moshës në muaj (r përkatësisht -0.04 dhe -0.09). Në grafikun nr. 1 tregohet shpërndarja e vlerave të rozetave E në raport me dendurinë e

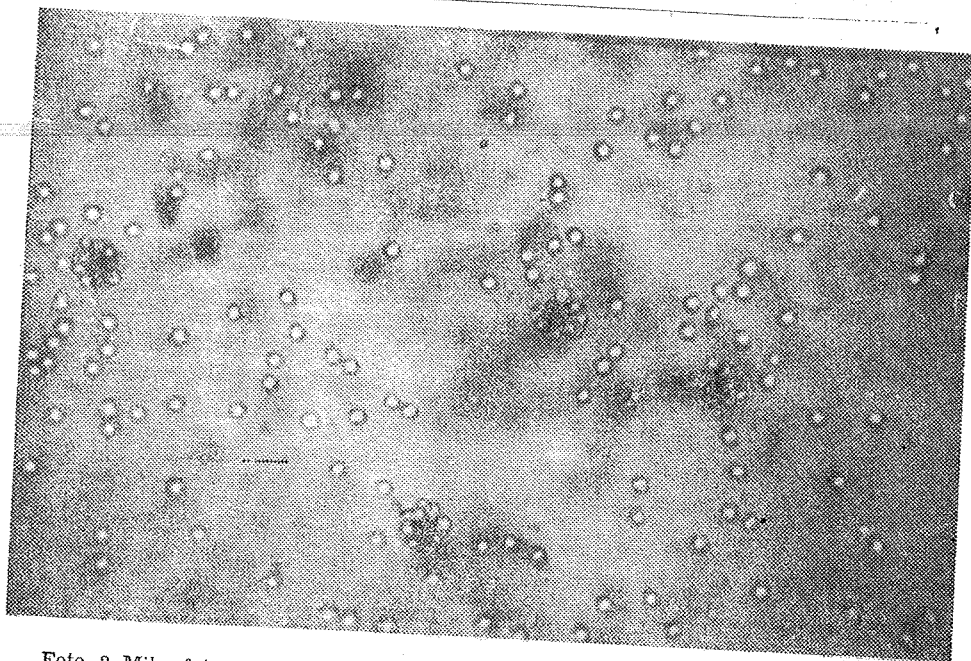


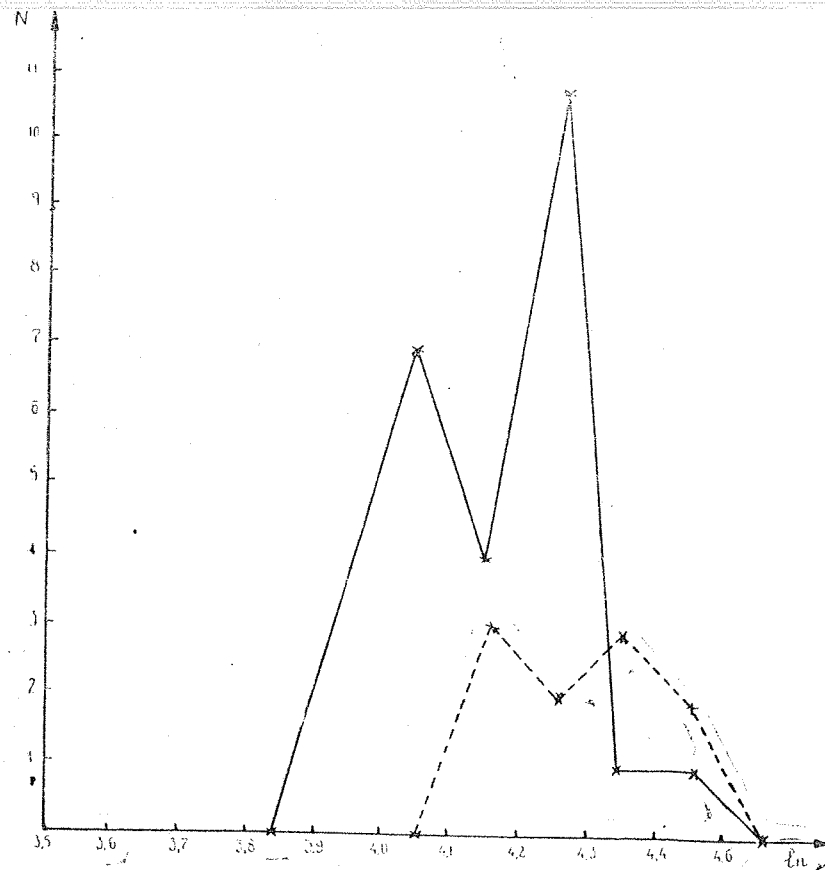
Foto 2 Mikrofotografi e limfociteve T që kanë formuar rozeta me eritrocitet e dashit.

tyre në fëmijët 1-42 muaj dhe të rinjtë 20 vjeçarë. Në të dyja grupmoshat vihet re një shpërndarje bimodale me dy kulme. Në grafikun nr. 2 e njëjta shpërndarje është ndërtuar për limfocitet B, por, në këtë rast, të gjithë individët e studiuar janë grupuar meqenëse asnjë diferencë nuk ekziston midis të dy grupeve. Edhe në këtë rast spikat fakti se individët mund të ndahen pak a shumë në dy grupe për sa i përket shpërndarjes së vlerave të vërejtura.

Diskutim

Për veçimin e limfociteve, ne përdorëm me sukses një tretësirë ndarëse të përbërë nga Fikol dhe Verografinë, duke pasur të njëjtat rezultate me ato të marra me tretësirat e gatëshme si MSL ose Limfoprep. Po ashtu, ne arritëm të zëvendsojmë plotësisht tretësirën Hanks, të përdorur nga autorët e konsultuar (2, 7, 9), me atë PBS në të gjithë procedurat, duke pasur të njëjtët rezultate me një kosto më të ulët. Kujdes i kemi kushtuar ruajtjes të qëndrueshmërisë të pH (7.2 — 7.4) dhe numrit të larjeve, sipas rekomandimeve të disa autorëve (3, 4). Lidhur me sasinë e antiserumit të konjuguar me fluoreshinë që përdorëm për identifikimin e limfociteve B, bëmë titrimin e tij, duke filluar nga 5 deri 25 mikrolitra të holluar me 20-50 mikrolitra. Vërejtëm që fluoreshenca më e mirë pa ndikime negative të sfondit të errët, arrihej me 10 mikrolitra antiserum dhe 20 mikrolitra PBS (hollimi 1/3).

GRAFINO 1: Shpërndarja e vlerave të limfociteve T në grupmoshat e studiuar



LEGJENDA:

— 1-42 muaj
--- 20 vjet

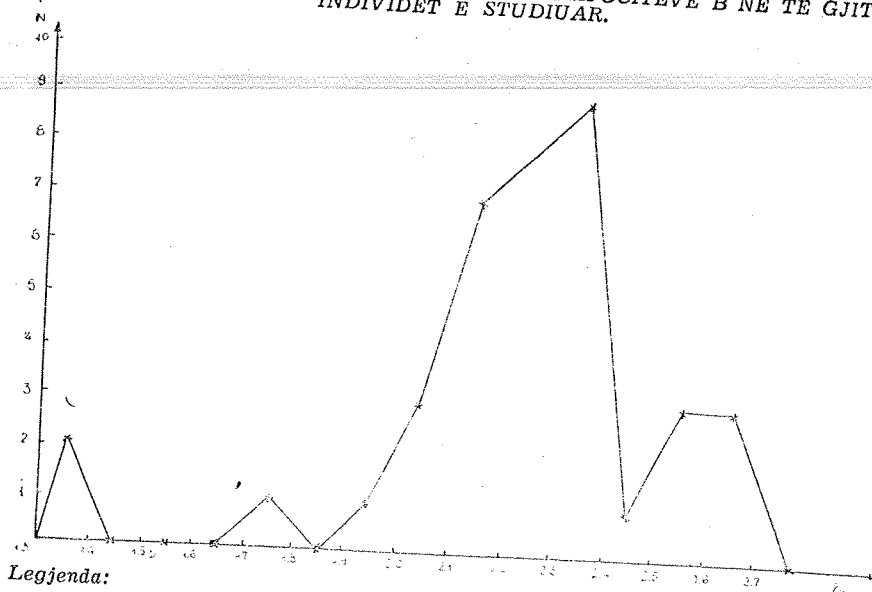
VLERAT E LIMFOCITEVE T JANE PARAFILTRUAR SI LOGARITMI NATYRAL (ln)

N = PERQINDJES E ROZETAVE E

N = numri i individëve

Proteinat membranore lëvizin gjatë membranës dhe në 37°C pa frekuencë të metabolizmit, ato mund të mbledhen në një pol të membranës (dukuria e Cappingu-t), rregull ky nga i cili nuk përjashtohen as immunoglobulinat membranore (6). Për të shmangur këtë dukuri, inkubimin e qelizave e bëmë në enë me akull, ndërsa larjet në tretësirë PBS i

GRAFIKU 2: SHPERNDARJA E VLERAVE TË LIMFOCITEVE B NË TË GJITHË INDIVIDET E STUDIAR.



Legjenda:

— VLERAT E LIMFOCITEVE B JANË PARAQITUR SI LOGARITMI NATYRAL (lg) I PËRQINDJES SË LIMFOCITEVE IGM POZITIVE.
— N = numri i individëve

bëmë me 0.1% azid natriumi, si frenues i metabolizmit membranor. Në këto kushte realizohet pamja e fluoreshencës në formën e agregimit. Monocitet i kemi shmangur nga numërimi, sipas kriterëve morfologjike. Fakti që antiserumi fluoreshent i përdorur është i prodhuar të dashi, na ka ndihmuar për të ulur në minimum imunofluoreshencën jospesifike të shkaktuar nga receptorët për fragmentin Fc të imunoglobulinave, që gjenden në shumë qeliza njëbërthamore, sidomos monocitet (13).

Për realizimin e testit të rozetave E, në vend të serumit fetal të viçit në tretësirën Hanks, RPMI ose terren tjetër kulture të përdorur nga autorë të ndryshëm (2, 3, 4, 7, 8), ne kemi përdorur me sukses tretësirën PBS me 20 % serum njerëzor AB, duke e ulur mjaft koston e analizës.

Gjatë interpretimit të vlerave normale paraprahe të limfociteve B dhe T (pasqyra nr. 1) të marra nga ne me parametrat e sipërm të punës, shohim se këto përfshihen brenda kufijve minimalë e maksimalë të dhënë nga autorë të ndryshëm (2, 3, 4, 5, 13), që për limfocitet B luhaten nga 5 — 25 %, ndërsa për ata T nga 50 — 85 %, mesataret përkatësisht 10 dhe 65 %.

Në këto kushte, propozojmë që vlerat normale paraprahe të laboratorit tonë për limfocitet B dhe T të jenë përkatësisht 4 — 15 % për të dyja grup-moshat dhe 48 — 82 % për grup-moshën 1 — 42 muaj dhe

58 — 87 % për moshën 20 vjeç, duke përdorur një luhatje nga mesatarja aritmetike prej dy shmangiesh standarde ($P = 0.05$). Pavarësisht nga luhatjet e vlerave nga një laborator në tjetrin, përkimi i vlerave tona brenda këtyre kufijve tregon, ndër të tjera, për shkallën e sigurisë së metodikës të zbatuar prej nesh. Nga ana tjetër, kufijtë relativisht të gjerë të vlerave normale të limfociteve T dhe B bëjnë të domosdoshme që vlerat tona paraprahe të jenë referim për interpretimin e përgjigjeve të vlerave të limfociteve T e B, sidomos kur ato ndodhen në kufijtë minimalë. Në këto raste duhen pasur parasysh edhe të dhënat e tjera imunologjike dhe klinike.

Për studimin e shpërndarjes së vlerave të limfociteve T dhe B, ne bëmë shndërrimin logaritmik të tyre, për një paraqitje grafike më të qartë, siç rekomandohet nga një autor (12). Shpërndarja bimodale, e vërejtur si për limfocitet T, ashtu dhe për ato B, flet për praninë e një tipari gjenetik monofaktorial, që duhet konfirmuar në grupe më të mëdha individësh. Mungesa e bashkëmarëdhënieve midis moshës dhe numrit të limfociteve T dhe B te fëmijët, është raportuar edhe nga autorë të tjerë (5), ndërsa diferenca midis vlerave mesatare të limfociteve T te fëmijët 1 — 42 muaj dhe të rinj 20 vjeçarë flet për arritjen e numrit maksimal të tyre në moshën rinore.

Si përfundim, me përcaktimin sasior të limfociteve T dhe B, ne realizojmë kështu një nevojë të ndier nga mjaft klinika të vendit tonë për përcaktimin e bazës qelizore të imunitetit specifik.

Pasqyra nr. 1

Vlerat relative të limfociteve B dhe T në gjakun periferik të rasteve të marra në studim.

Moshë	Raste	Përqindja e limfociteve	
		B	T
1 — 42 muaj	28	10.3 ± 4.7	64.6 ± 17.3
20 vjeç	10	8.6 ± 5.9	72.5 ± 14.6
Gjithsej	38	9.8 ± 5.2	66.7 ± 17.88

Rezultatet janë të shprehur në mesataren aritmetike ± 2 shmangie standarde (kufiri i besimit 95 %).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Boyum A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scan. J. Clin. lab. invest 1968, 21, 77.
- 2) Brain P., Gordon J., Willets W.A.: Rosette formation by peripheral lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 1970, 6, 681.
- 3) Chapel A.M.: Rosette formation. Lancet, 1972, II, 882.
- 4) Chaves M.A., Arranhado E.: Rosette formation and immunosuppressive agents. Lancet 1972, I, 42.
- 5) Durandy A.: Les méthodes d'investigation des déficits de l'immunité spécifique: Nè: Griscelli C, Hitzig W. Les déficits immunitaires congénitaux et acquis. Paris, 1984, 44.
- 6) Greaves M.F., Grosso C.E., Habeshaw J.A., Lombardi L., Rilke E., Stansfeld A.J.: Function and pathology of blood cells. Nè: Franklin-Zucker D, Grea-

- ves M.F., Grossi L.E., Marmont A.M. *Atlas of blood cells*. Philadelphia, Milano, 1981, 347.
- 7) Howard F.D., Ledbetter J.A., Wong J., Bieher C.P., Stinson E.B., Herzenberg L.A.: A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E rosette formation *J. immunol.* 1981, 126, 2117.
 - 8) Meuer S.C., Hussey R.E., Fabbi M., Fox D., Acuto O., Fitzgerald K.A., Hodgdon J.C., Protentis J.P., Schlossman S.F., Reinherz E.L.: An alternative pathway of T-cell activation: A function role for the 50 kDT 11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell*, 1984, 36, 897.
 - 9) Papamichail M., Keith H.I., Halborow E.D., Currey H.L.F.: Subpopulations of human peripheral blood lymphocytes distinguished by combined rosette formation and membrane immunofluorescence. *Lancet* 1972, 11, 64.
 - 10) Reinherz E. L. and Schlossman S.F.: Human T lymphocyte differentiation. *Immunol. today* 1982, 3, 16.
 - 11) Scientific Group on Immunodeficiency (WHO): International workshop on primary immunodeficiency diseases. Academic press inc. 1985, 341.
 - 12) Siber G. R., Ransil B.: Methods for the analysis of antibody responses to vaccines or other stimuli. *Methods in enzymology* 1983, 93, 60.
 - 13) Stites D. P.: Clinical laboratory methods of detection of cellular immune response. Në Stites D.P., Stabo J.D., Fudenberg H.H., Walls J.V.: *Basic and clinical immunology* Los Altos California. 1982, 372.
 - 14) Shurbani N., Vesho P., Veshi A., Kondili A., Çina P.: *Diagnostika e sëmundjeve të brendëshme*. Tiranë, 1975, 459.

Summary

DETERMINATION OF THE RELATIVE VALUES OF B AND T LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD

The determination is carried out by the methods of membrane immunofluorescence and spontaneous rosette formation, using sheep erythrocytes. These methods were modified and standardized by using cheaper reagents prepared in this country instead of the more expensive imported ones. To determine the normal values in this country, 28 children aged between 1 and 42 months and 10 young people aged 20 and clinically healthy were examined. The mean values resulted similar to those reported in the literature. For the T lymphocytes, a significant difference was found between the two age groups, presumably due to the fact that peripheral T lymphocytes reach their maximum value in young. The existence of a probably monofactorial genetic feature is suggested. It is proposed that the preliminary normal values for the B and T lymphocytes in this country should be as follows: 4-15% for the B lymphocytes in both age groups and for the T lymphocytes, 48-82% in the 1-42 month age group and 58-87% in the 20 year age group, with a confidence limit of 95%.

Résumé

DETERMINATION DES VALEURS DES LYMPHOCITES B ET T DANS LE SANG PERIPHERIQUE

L'estimation du nombre des lymphocytes B et T dans le sang périphérique, qui est décrite dans cet article, a été réalisé par les techniques de l'immunofluorescence directe pour les lymphocytes B et des rosettes, spontanées avec les globulines rouge de mouton pour les lymphocytes T.

Afin de déterminer les valeurs normales, l'auteur a étudié 28 enfants âgés de 1 à 42 mois et 10 jeunes volontaires âgés de 20 ans. Les résultats obtenus concordent avec ceux de la littérature.

En ce qui concerne les valeurs des lymphocytes T, on a trouvé une différence significative entre les deux groupes d'âge, qui peut être expliqué par le fait que le nombre des lymphocytes T dans le sang périphérique atteint son maximum pendant la jeunesse. La distribution bimodale des valeurs individuels des lymphocytes B et T témoigne de l'existence d'un caractère génétique probablement monofactoriel. Nous proposons que nos valeurs normales, préliminaires, pour les lymphocytes B dans les deux groupes d'âge soient de 4-15% et pour les lymphocytes T de 48-82% pour le groupe d'âge 1-42 mois et 58-87% pour l'âge de 20 ans.