

## IDENTIFIKIMI I LIMFOCITEVE T ME ANËN E ROZETAVE ERITROCITARE (RE)

— XHELADIN ÇEKA — ARBEN HOXHA — KSHM BARDHI ÇAKO —  
(Katedra e anatomisë dhe e histologjisë Laboratori i imunologjisë klinike  
eksperimentale — Spitali klinik nr. 1)

Epoka e imunologjisë moderne filloi atëhere kur u zbulua se limfocitet, si njësi funksionale të imunitetit, ndaheshin në dy klasa të mëdha (18): në limfocite T e B, initiale këto që tregojnë vendin e pjekjes së tyre përkatësisht në timus e në bursën e Fabricius-it apo në ekuivalentin funksional të saj.

Krahas rëndësisë që vazhdon të ketë studimi i popullsisë limfocitare në përgjithësi, në etapën aktuale të studimeve citologjike e citokimike të tyre, është shtruar domosdoshmëria e përpunimit të metodave imunologjike për identifikimin e klasave e nënklasave të veçanta të kësaj linje qelizore (7), si edhe i përcaktimit të vlerave të tyre.

Rëndësi të veçantë merr përcaktimi i vlerave të limfociteve T e B në gjakun periferik, sidomos në sëmundjet imunodeficitare, autoimune, tumorale e infektive, në përcaktimin e tipit të leukozave limfoide (2,15). Po ashtu, me interes është përcaktimi i këtyre vlerave në sarkoidozë, lepër, TBC, lupus eritematoz, artritis reumatoid, mononukleozë infektive (5,15). Pesëvjeçarim e fundit, interes i madh po tregohet për përcaktimin e vlerave të limfociteve T e B në sindromën e imunodeficiencës të fituar (SIDA), ku, krahas të tjerave, është konstatuar një ulje e theksuar apo zhdukje e një nënklase të limfociteve T (4).

Për këto kushte, kuptohet rëndësia klinike e identifikimit të limfociteve T e B. Pavarësisht nga metodat e përdorura për identifikimin e limfociteve T, nëpërmjet testit të rozetave E apo nëpërmjet kundërtrupëve monoklonalë (16) dhe për identifikimin e limfociteve B me anë të antiserumeve kundërimunoglobulinemike njerëzore tërësore apo monospesifike, si pikë e përbashkët në këto procedura është veçimi i limfociteve të gjakut periferik nga elementet e tjera të figuruara.

Në këtë punim po paraqesim identifikimin e limfociteve T me anën e rozetave E, pas veçimit të limfociteve nga elementet e tjera të figuruara, realizuar për herë të parë në vendin tonë në laboratorin e imunologjisë të Spitalit klinik nr. 1, duke lënë për kohë tjetër publikimin e identifikimit të limfociteve B dhe të nënklasave të tyre. Kështu, synimi ynë në këtë artikull është të identifikojmë limfocitet T me anën e rozetave E.

## Materiali

U muarr gjaku periferik i 11 të sëmurëve astmatikë të shtruar në klinikën e alergologjisë të Spitalit klinik nr. 1 Tiranë gjatë periudhës janar-prill 1986, i 2 personave vullnetarë klinikisht të shëndoshë dhe i disa rasteve të tjera me patologji të ndryshme, që u paraqitën në laborator gjatë kësaj periudhe. 5 nga të sëmurët astmatikë qenë me mjekim anti-astmatik pa kortizonikë, ndërsa 6 prej tyre qenë me mjekim me kortizonikë ose deri një javë pas ndërprerjes së këtij mjekimi; 4 qenë meshkuj e 7 femra, të moshës 30-45 vjeç 8 të sëmurë dhe 3 të tjerë — 16-30 vjeç. 2 personat e shëndoshë qenë 20-22 vjeç, të dy meshkuj.

## Metodika

### A — Veçimi i limfociteve

Për identifikimin e limfociteve T e B zakonisht rekomandohen pezullitë e purifikuara të njëbërthamorëve të gjakut. Ndër metodikat më të përdorshme për të marrë këto pezulli, të cilën e kemi zbatuar në punën tonë edhe më parë (10), është centrifugimi i gjakut periferik në bazë të gradientit të dendësisë në tretësirën ndarëse të limfociteve (MSL)\* sipas një autori (3), modifikuar nga disa autorë (1,5,6,9,10,15,17,18,19,20) dhe përshtatur sipas kushteve të laboratorit tonë.

1) Marrim 3-5 ml gjak venoz në mënyrë sterile në një tub plastik të heparinizuar.

2) Bëjmë hollimin e një pjese gjak me 1 pjesë terren 199\*.

3) Në një provëz sterile me fund konik e diametër të brendshëm 13-16 mm, hedhim 3 ml MSL.

4) Në provëzën me MSL hedhim sasinë prej 6-10 ml të përzierjes gjak terren 199, në mënyrë të tillë që gjaku i holluar të mos përziehet me tretësirën ndarëse të limfociteve.

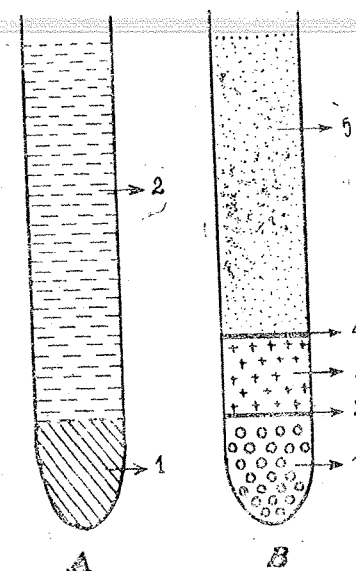
5) Centrifugojmë provëzën me përmbajtjen MSL gjak i holluar me terren 199 në temperaturën e dhomës (18-20°C) me shpejtësi 2000 rrotullime në minutë për 30 minuta. Në fund të centrifugimit elementet përbërëse shtresëzohen në pesë shtresa sipas rëndësës, ku njëbërthamorët vendosen në formë të një unaze ndërmjet tretësirës ndarëse dhe plazmës së holluar me terren 199 (Fig. nr. 1).

6) Me anën e një pipete Pastër, marim përmbajtjen e shtresës së 4-të të njëbërthamorëve të përftuar nga centrifugimi i mësipërm.

7) Bëjmë 3 larje të njëpasnjëshme të njëbërthamorëve me nga 5 cc terren 199, me shpejtësi 1200-1400 rrotullime në minutë në temperaturë 4°C nga 5-10 minuta. Pas çdo larjeje heqim pjesën e ujshme dhe mbi

\* MSL — 10 pjesë Isopaque (Metrizoat Natriumi) 33.9% me dendësi 1.200 g/ml 24 pjesë Ficoll 9%. Dendësia përfundimtare 1.077 g/ml (3).

\*\* Terren 199 është një terren sintetik, që përdoret për kulturat indore. Përmban kripërat e tretësirës Hanks dhe aminoacide dhe vitamina të ndryshme (13).



Legjenda:

### A PARA CENTRIFUGIMIT

1. MSL

2. GJAK I HOLLUAR 1:1 ME TEREN 199

### B PAS CENTRIFUGIMIT

1. ERITROCITE

2. GRANULOCITE + TROMBOCITE

3. MSL

4. MONONUKLEARE + Shumica e TROMBOCITEVE

5. PLAZMA E HOLLUAR me TEREN 199

Fig. 1

qelizat e fundërruara shtojmë sasinë e mësipërme të terrenit 199 dhe i vëmë qelizat në pezulli.

8) Mbi qelizat e fundërruara, që mbeten pas heqjes së pjesës së ujshme në larjen e tretë, shtojmë terren 199 deri në sasinë e përgjithshme qeliza — terren 0.5 — 1 ml në varësi nga qelizat e fundërruara.

9) Përcaktojmë numrin e qelizave për mililitër pezulli qelizore me anë të kamerës hemocitometrike Burkert apo Fuch-Rosenthal, pasi kemi bërë më parë hollimin e pezullisë qelizore të mësipërme me tretësirën Turk. E përshtatim pezullinë limfocitare në vlerat  $4 \times 10^6$  deri  $2 \times 10^7$  limfocite/ml pezulli.

## B — Realizimi i testit të rozetave E

- 1) Në një tub plastik steril me përmasa 10 x 70 ml hedhim: 0.1 ml pezulli limfocitare me përqendrim  $2 \cdot 10^7$  limfocite/ml pezulli apo 0.2 ml nga pezullia me përqendrim  $4 \cdot 10^6$  limfocite/ml pezulli; 0.1 ml pezulli të eritrociteve të dashit të freskëta apo të ruajtura deri në një javë në tretësirë Alsever 1/I (19), të lara disa herë me terren 199 nga 10 minuta në temperaturën 4°C me 1500 rrotullime në minutë, derisa pjesa e ujshme të bëhet e tejdukshme.
- 0.12 ml serum fetal të viçit të dekompletuar, e të përthithur me eritrocite dashi;
- 0.15 ml terren 199.
- 2) Inkubojmë përmbajtjen e mësipërme për 30 minuta në 37°C.
- 3) Bëjmë një centrifugim të lehtë të përmbajtjes në temperaturën 4°C për 5 minuta me shpejtësi 500-1000 rrotullime në minutë.
- 4) Inkubojmë përmbajtjen gjithë natën në frigorifer në temperaturën 4°C.
- 5) Të nesërmen heqim disa pika nga pjesa e ujshme dhe bëjmë një rizepëllim të lehtë të qelizave, duke rrotulluar tubin midis pëllëmbëve të duarve, në mënyrë të tillë që eritrocitet të mos shpëputen nga limfocitet me të cilat janë lidhur.
- 6) Për të lehtësuar leximin e mëvonshëm të njëbërthamorëve, shtojmë 1-2 pika krezilblu 1% apo metilviolet 0.03% në NaCl 0.9% (3).
- 7) Me një mikroskop me dritë të zakonshme, me objektiv 25 x — 40 x, okularë 10 x — 15 x, indeks zmadhimi të tubit 1.6 x, numërojmë qelizat rozetëformuese kundrejt atyre që nuk kanë formuar rozetë. Për këtë, shfrytëzojmë kamerën Burker apo Fuch — Rosenthal. Numërojmë të paktën 300 qeliza. Përfshijmë nga numërimi qelizat e vdekura që nuk formojnë rozetë. Përcaktojmë vlerën relative të limfociteve T (rozetëformuese) ndaj limfociteve në përgjithësi, pasi përjashtojmë nga kjo llogaritje edhe monocitet e identifikuar me kritere morfologjike, që mund të jenë të pranishme në pezullinë njëbërthamore.

## Rezultati

Duke iu përmbajtur parametrave të mësipërme të punës, shohim se limfocitet T, në sasje të receptorëve membranorë për eritrocitet e dashit, kanë formuar strukturat e quajtura rozeta eritrocitare (Re), në qendër të të cilave është limfociti T i lidhur me 3 a më shumë eritrocite dashi (Foto nr. 1).

Në dy rastet e para normale të studiuara, RE që përkatësisht 66 e 68%. Në 5 të sëmuret asmatikë pa mjekim me kortizonikë, RE mesatare qe 51% dhe në 6 të sëmuret e tjerë, që ishin nën mjekim me kortizonikë ose deri në një javë pas ndërprerjes së këtij mjekimi, vlera mesatare e RE qe 44%.

## Diskutim

Siç shihet nga ekspozimi i metodikës, si etapë e parë për identifikimin e limfociteve T është veçimi i limfociteve nga elementet e tjera të figuruara të gjakut. Sistemi izopak fikol (MSL) i rekomanduar nga një

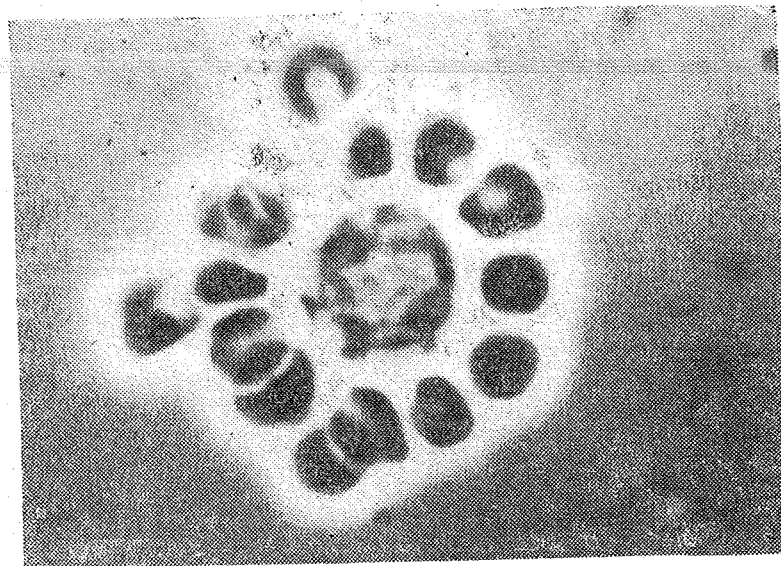


Foto 1

autor (3) dhe autorë të tjerë, bën ndarjen e përbërësve qelizorë të gjakut në dy grupe të mëdha, limfocite dhe monocite në një grup dhe granulocite e eritrocite në grupin tjetër. Në fakt, së bashku me njëbërthamorët, shkojnë edhe shumica e trombociteve, promielocitet e mielocitet dhe të gjitha format e reja të bërthamorëve të gjakut (3).

Ndonëse disa nga autorët e konsultuar (19), rekomandojnë për kryerjen e metodikës sasira më të mëdha gjaku, deri 10-20 ml e MSL 10 ml, ne konstatojmë se, për kryerjen vetëm të testit të RE, kjo sasi gjaku reduktohet në një minimum, që merr parasysh edhe disa humbje të qelizave gjatë larjeve. Duke u bazuar në formulën leukocitare të gjakut periferik të personit që ekzaminojmë (numërin e limfociteve për m/litër gjak) dhe në sasitë e mësipërme të pezullive limfocitare të rekomanduara nga autorë të ndryshëm (1,5,9,19), si edhe duke kryer matje të kontrollit, praktikisht kjo sasi është luatur midis 3-5 ml, ndërsa MSL e nevojshme për sasinë e mësipërme të gjakut të holluar si më lart zbret në 3 ml, siç rekomandon edhe një autor (3). Për rastin ku ne kemi përcaktuar dhe numrin e limfociteve B, kemi punuar me sasi më të mëdha gjaku, të ndarë në mënyrë të barabartë në 2 tuba me nga 3 ml MSL. Rekomandimi i një autori (15) për këtë ndërthurje mendojmë se ka vlerë në përgatitjen e pezullive sa më të pastra limfocitare. Rëndësi të veçantë u kemi kushtuar larjeve të qelizave njëbërthamore të përfutuara pas ndarjes së tyre me MSL, duke këmbëngulur në përgatitjen e pezullive limfocitare sa më të pastra nga serum i njerëzor. Për sa i përket hollimit të gjakut me terren 199, si më lart, kjo përkon dhe me të dhënat e një autori (3). Ky autor, duke përdorur 4 dhe 6 ml nga përzierja me pjesë të barabarta gjaku me EDTA dhe NaCl 0.9%, nuk pa ndryshime në përqindjen e limfociteve të unazës së njëbërthamorëve. Kështu, sipas këtij autori, një ndarje e mirë e limfoci-

teve varet nga raporti i hollimit e jo në lartësinë e kolonës me qeliza të gjakut. Këto të dhëna e bënë këtë autor të konkludonte se, gjatë centrifugimit, limfocitet lëviznin bashkë me eritrocitet dhe granulocitet prirje kjo që reduktohej me hollimin e gjakut.

Për realizimin e testit të 'rozetave E', është shfrytëzuar vetia e limfociteve T për të lidhur eritrocitet e dashit në temperaturë 4 °C (5,8,9,10,14,17), duke formuar formacionin RE, ku limfociti T i lidhur me 3 e më shumë eritrocite dashi. Ky test përdoret gjerësisht për identifikimin e përcaktimit të vlerave tërësore të limfociteve T (8,18). Ndonëse nuk dihet me saktësi natyra dhe specifikiteti i receptorëve lidhës të këtyre limfociteve për eritrocitet e dashit, ka të dhëna se këto nuk duhet të jenë receptorë për imunoglobulinat apo komplementin, por mund të jenë specifike për glukoproteinat apo karbohidratet e eritrociteve të dashit (18).

Në përgjithësi, autorët e konsultuar (3,6,15,19) rekomandojnë pezullinë e limfociteve të përfutuara nga centrifugimi me MSL në tretësirë të apo buferë izotonikë si Hanks, PBS, terren 199, NaCl 0.9% etj. Gjatë punës sonë, në të gjitha procedurat për hollimin e gjakut, larjen dhe inkubimin e qelizave, përdorëm terrenin 199, siç rekomandon edhe një autor (20). Këtë e kemi lidhur me faktin që zbatimi i kësaj metode për herë të parë në vendin tonë kërkonte kushte sa më optimale, kushte të cilat i përmbush plotësisht ky terren, për vetë përmbajtjen e tij. Po për këtë arsye, kemi përdorur serum in fetal të viçit, ndonëse autorë të tjerë (9) rekomandojnë dhe serum in njerëzor AB. Megjithatë në të ardhmen parashikojmë zbatimin e njëkohshëm të terreneve të ndryshme të mësipërme për hollimin e gjakut, e larjen e inkubimin e qelizave, për të përcaktuar dhe bashkëmarrëdhëniet e mundshme që ekzistojnë ndërmjet tyre, si edhe për të përcaktuar buferin me koston më të ulët, pa ndikime negative në rezultate. Ndonëse pikat e tjera të metodikës janë të qarta, vlen të theksohet domosdoshmëria e ngjyritit të limfociteve me krezil blu apo blumetilen. Kjo për faktin se lehtëson leximin e RE, si edhe dallimin e limfociteve që s'kanë formuar rozetë me eritrocitet e pakta njerëzore që mund të jenë në pezullinë njëbërthamore, ndonëse dhe kriteret morfologjike mund të na ndihmojnë për këtë. Ngjyrimi gjithashtu, na ndihmon për përcaktimin e qelizave të vdekura, të cilat nuk formojnë rozetë, edhe po të jenë limfocite T.

Për sa u përket vlerave të limfociteve T, në dy rastet normale të studiuar këto u gjendën brenda kufijve që japin edhe disa autorë (9,12,15,18,20). Ndërsa për vlerat e këtyre limfociteve në të sëmurët astmatikë, diskutimi do të kalonte jashtë qëllimit të këtij artikulli. Megjithëse këto të dhëna kishin si qëllim ilustrimin e këtij testi, paraprakisht mund të them se këto përkojnë edhe me të dhënat e disa autorëve (11,18). Në të ardhmen, krahas publikimit të metodikës për identifikimin e limfociteve B e të nënklasave të tyre dhe të vlerave normale të limfociteve T e B në gjakun periferik do të studiojmë edhe ndryshimet përkatëse të raporteve të këtyre grupeve të limfociteve në sëmundje apo sindrome të ndryshme.

**Përfundim.** Me parametrat e mësipërm të punës, ne realizuam me sukses identifikimin e limfociteve T përmjet rozetave E.

Dorëzuar në redaksi më 24.4.1986

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Bakleran J.A.J.M.: Interrelationship of immunologic characteristics. Proliferation pattern and predmison sensitivity in acute lymphoblastic leukoemic of childhood. Blood 1979, 5, 883.
- 2) Beeson P.B.; MC Dermott W., Wyngaarden J.B.: Immune disease. Në: Cecil textbook of medicine. Philadelphia, London, Toronto. 1979, 126.
- 3) Boyum A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. lab. invest. 1968, 21, 77.
- 4) Cahill K.M.: The immune systems. Në: The AIDS epidemic. New York. 1983, 43.
- 5) Dwylen J, Bullock W.E, Fields J.P.: Disturbance of the blood T: B lymphocyte ratio. Në: Lepramotous leprosy. The N.E.J. of medicine 1973, 288, 1036.
- 6) Ford W.L. — The preparation and labelling of lymphocytes. Në: Handbook of experimental immunology. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, ch 23/7.
- 7) Gluzman D.F, Sudorenko S.P, Nadgornaja V.A.: Citohimijai imunocitologija. Kiev. 1982, 11.
- 8) Greaves M.F., Gross C.E., Habeshow J.A., Lombardi L., Rike F., Stansfeld A.S.: Atlas of blood cells Milano, Philadelphia 1981, 347.
- 9) Grieco M.H.: Immunodiagnosis for clinicians (ed. by Michael H. Grieco, David K. Meriney). Year book medical publishers inc. Chicago — London 1983, 71-73.
- 10) Hoxha A, Çeka Xh., Çako B.: Identifikimi i limfociteve nëpërmjet metodave imunologjike. Referat i mbajtur në sesionin shkencor të katedrës së anatomisë dhe të histologjisë. Dhjetor, 1984.
- 11) Kaplan S.R., Calabresi P.: Drug Terapy. Immunosuppressive agents. The N.E.J. of medicine. 1973, 16, 952.
- 12) Krup M.A., Chaton M.J., Morgen Sh.: Cellular basis of immune responses. Në: Current medical diagnosis treatment. Los Altos, California 1982, 1029.
- 13) Milien 199. Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur. Institut Pasteur production. 1978, 317.
- 14) Papamichail H., Keith H.J., Holborrouw E.J., Currey H.L.F.: Subpopulations of human peripherae blood lymphocytes distinguished by combined rosette formation and membrane immunofluorescence. The Lanar 1972, 7767, 64.
- 15) Rose N.R., Freidman H. — Manual of chlinical immunology. American society for microbiology. Washington DC. 1976. 64.
- 16) Rosen F.S.: The primary immunodeficiencies. The N.E.J. of medicine 1984, 4, 235.
- 17) Smick J.L., Clein G.P., Barker C.R., Collins R.D.: Characterisation of malignant mediastinal lymphoide neoplasm as thymic in origin. The Lancet 1973, 7794, 74.
- 18) Stites D.P., Stabo J.D., Hundenberg H.H., Wells J.V.: Basic and clinical immunology. Los Atlas, California 1982, 80, 257 — 258.
- 19) Stjernsward J., Vanky F., Jondal M., Wigzell H.: Lymphopenia and change in distribution of human Tand B lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. The Lancet 1972, 7765, 1352.
- 20) Urbariah S.J., White A.S.: Tests in immune function. Në: Handbook of experimental immunology. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne 1978, 47.

## Summary

## IDENTIFICATION OF T LYMPHOCYTES BY THE ROSETTE METHOD

After some general considerations on lymphocytes and the current notions concerning the T, B and Nul varieties, the paper discusses the importance of determining the ratio between T and B cells. It describes in particular the technique of identifying the T cells, the preparation of pure suspensions of mononuclear cells according to the Ficoll — Hypaque technique and the identification of T cells according to the rosette method.

## Résumé

## IDENTIFICATION DES LYMPHOCYTES T PAR LES ROSETTES

L'auteur de l'article expose des considérations générales sur les lymphocytes en particulier du type T et le rapport quantitatif avec les lymphocytes de type B. L'identification des lymphocytes T est fait après avoir préparé les suspensions mononucléaires purifiées selon la méthode Ficoll-Hypaque. Enfin il est décrit la méthode d'identification des lymphocytes par les rosettes.

## KUNDËRTRUPËZAT ANTIBËRTHAMORE TEK TË SËMURËT ME POLIARTRIT REUMATOID

— ARBEN HOXHA —

(Laboratori imunologjik, Spitali klinik nr. 1)

Poliartriti reumatoid është një sëmundje inflamatore kronike e indit lidhor, që prek sidomos mbulesën sinoviale të kyçeve. Prej saj sëmurën më shpesh femrat në moshën 20-30 vjeç ose në menopauzë (4).

Diagnostikimi i kësaj sëmundjeje duke u bazuar vetëm në shenjat klinike është i vështirë, pasi mund të ngatërrohet me poliartrit me natyrë tjetër ose kolagjenozat (lupusin eritematoz të përhapur, skleroderminë etj.). Për këtë arsye, është e domosdoshme të kryhen një numër ekzaminimesh biologjike. Ndërmjet tyre, vendin më të rëndësishëm e zënë provat imunologjike: titri i komplementit serik, kërkimi i faktorit reumatoid dhe i kundërtrupëzave antibërthamore.

Përcaktimi i titrit të komplementit në serumin e të sëmurëve me poliartrit reumatoid është një e dhënë biologjike shumë e rëndësishme që ndihmon për ta diferencuar nga lupusi eritematoz i përhapur. Në rastin e parë, ai është normal, kurse në të dytin është i ulur për arsye të fiksimit në inde pas aktivizimit të tij me rrugën klasike. Ulja e titrit të komplementit tek të sëmurët me poliartrit reumatoid mund të konstatohet vetëm në lëngun artikular të tyre (4).

Një tjetër shenjë biologjike shumë e rëndësishme tek këta të sëmurë është gjithashtu edhe gjetja e faktorit reumatoid nëpërmjet testit Valer-Roze, HEAT ose reaksionit gamalateks. Ai është një imunoglobulinë që përmban specifitetin kundërtrupëzor për përcaktuesit antigjenik të klasës IgG.

Gjatë poliartritit reumatoid, tek një numër i konsiderueshëm të sëmurësh vërehet pozitiviteti i kundërtrupëzave kundërbërthamore, por prania e këtyre të fundit nuk pasqyron shkallën e rëndësës së dëmtimit artikular gjatë kësaj sëmundjeje (2).

Objekt i studimit tonë është kërkimi i kundërtrupëzave kundërbërthamore tek të gjithë të sëmurët me poliartrit reumatoid, pavarësisht në se e kanë apo jo të pranishme faktorin reumatoid në serumin e tyre.

## Materiali dhe metoda

Kemi kërkuar faktorin reumatoid dhe kundërtrupëzave kundërbërthamore në serumin e 202 të sëmurëve me poliartrit reumatoid. Prej tyre, 148 (73.27%) ishin femra dhe 54 (26.73%) meshkuj. Si meshkuj,