

KULTURA QELIZORE ME CIKËL TË SHKURTËR

XHELADIN ÇEKA, AS. PROF. DR. ELSA KONE*

Summary

TISSUE CULTURE

Lymphocyte transformation actually refers to morphological enlargement of small lymphocyte into larger lymphoblasts "in vitro". This change occurs nonspecifically when lymphocytes are exposed in vitro to several mitogens as phytohemagglutinin (PHA), and Con A or to antilymphocyte serum; it also occurs in response to antigens to which donor lymphocytes are sensitive. Also transformation can be measured by actually counting the enlarged blast cells after staining, it is usually evaluated by assaying the total 3H-thymidine uptake. This latter technique is a quantitative measure of DNA synthesis by lymphocytes.

In reality this has been the object of our study, including technical moments of the procedure. Also we demonstrated a lymphoproliferative response to PHA in 100% of 12 voluntary normal humans that have been studied.

Kultura qelizore me cikël të shkurtër bën pjesë në kulturat qelizore në përgjithësi. Ndër të tjera, ajo përdoret gjerësisht dhe me sukses në imunologjinë qelizore. Kështu ajo shërben për të vlerësuar përgjigjen immune in vitro, si dhe aktivitetin e qelizave efektore. Po ashtu kjo metodë mund të përdoret për të analizuar efektet imunorregulluese të nënpopullatave qelizore (1). Nga ana tjetër kulturat qelizore me cikël të shkurtër, ofrojnë dhe avantazhin e studimit të përgjigjes immune në eksperiment.

Nëpërmjet kësaj metode bëhet i mundur purifikimi dhe franksionimi i linjave qelizore të pastra, si dhe rekombinimi i linjave qelizore të caktuara me njera tjetrën, natyrisht në vartësi kjo të interesave të kërkimit. Po ashtu, kultura in vitro, mund të përdoret dhe për vlerësimin e aktivitetit të qelizave efektore, matjen e shpeshtësisë së prekursoreve qelizore (8), vlerësimin e kapacitetit funksional të nënpopullatave që i përgjigjen stimujve të dhënë dhe në kushte in vivo (1) etj.

Pranohet që lezioni imun qendror i munopamjaftueshmërisë së fituar (AIDS), është pakësimi i numrit absolut të nënpopullatës limfociteve CD4+ në gjakun periferik, me pozicion kyç për stadifikimin e ADIS - it. Ky pakësim substancial paraprihet nga humbja e aftësisë limfoproliferative e limfociteve T ndaj stimujve antigjenike. Në një etapë të dytë kjo pasohet me humbjen e kësaj përgjigje ndaj mitogjeneve si PHA etj.

Në këto rethana kuptohet rëndësia e vlerësimit të përgjigjes limfoproliferative ndaj këtyre mitogjeneve (2) në përgjithësi, e ndaj PHA-së në veçanti, si një nga mitogjenet specifike për limfocitet T.

Ndaj qëllimi i këtij punimi qe: a) dhënia e standartizuar e tërë etapave të procedurës bazë të kulturës qelizore në përgjithësi, e asaj me cikël të

shkurtër në veçanti, dhe nëpërmjet të kësaj b) studimi i përgjigjes limfoproliferative në personat klinikisht të shëndoshë, si dhe shpjegimi i bazës teorike të kësaj përgjigje.

Materiali dhe metoda

Linjat qelizore dhe terrenet: qeliza monokleare të purifikuara të gjakut periferik të heparinizuar të 12 subjekteve normale vullnetare, klinikisht të shëndoshë. Terren RPMI 1640 me 2 mM glutamine; 10 mM bufer HEPES; 100 Unitete peniciline/ml; 100 unitete streptomocine/ml dhe 5% plazmë autologe. Ficol-paque, Hanks, Fitohegmaglutinine (PHA) - Difco 1000 X; 3 H-Timidine, likid për shintilim (butan 31% dhe Helium 69%).

Aparaturat: kape sterile, centrifugue, kamer hemocitometrike, termostat me përqendrim CO2 5%, aspirator ARVESTER, matës i rrezatimit, furrë me mikrovalë, paisje të imta laboratorit (piastra me 96 puceta e me fund të sheshtë, letër me fibra xhami për të mbledhur qelizat, pipeta, tuba centrifugimi etj).

Punimi është kryer në shërbimin e imunologjisë të Spitalit "San martino", të Universitetit të Xhenovës Itali, në periudhën tetor 1994-dhjetor 1994.

Përgatitja e suspensioneve qelizore mononukleare: për këtë marrim 20 ml gjak venoz të heparinizuar 20UI/ml (3), për çdo rast të studiuar. Hollojmë çdo mostër gjaku me nga 10 ml Hanks. Në katër tuba plastike centrifugimi me kapacitet 20 ml hedhim nga 6 ml Ficol-paque, mbi të cilin shtesëzojmë nga 7.5 ml gjak/hanks. Centrifugojmë përmbajtjen për 30' me 1800 rrotullime/minutë në temperaturën e dhomës (Figura nr. 1). Me pipete paster mbledhim plazmën me një tub të veçantë dhe monuklearet në një tub tjetër. Lajme mononuklearet e mbledhura dy herë me nga 20 ml

* Dërguar në Redaksi më 6 Qershor 1995, miratuar për botim në 30 Qershor 1995.

Nga Katedra e Histologjisë-Embriologjisë, Fakulteti i Mjekësisë (Xh. Ç, E. K.)

Adresa për letërkëmbim: Xh. Çeka: Katedra e Histologjisë-Embriologjisë, Fakulteti i Mjekësisë.

Hanks, përkatësisht 10' - 1200 rrot/min e 15' - 1000 rrot/min. Shtojmë mbi qelizat e lara 2 ml RPMI - PLAZMËN AUTOLOGE 5%. Numërojmë qelizat mononukleare të suspensioneve të mësipërme me kamer hemocitometrike Burker, pasi kemi bërë më parë hollimin e këtyre suspensioneve 1/10 me krezil violete. Përshtasim çdo suspension qelizor me 4×10^6 qeliza/ml.

Kultivimi i suspensionit qelizor me fitohemaglutinë: Në dy puceta të një pjastre mikrotritimi, hedhim nga 5 μ l PHA me përqendrim 1 μ g/ml. Në dy pucetat e mësipërme dhe në një tjetër pasuese, shtojmë nga 50 μ l suspension qelizor. Inkubojmë përmbajtjen e mësipërme për 4 orë në termostat me temperaturë 37°C e me përqendrim 5% CO₂ dhe me lagështi. Më pas shtojmë në sejcilën pucetë nga 150 μ l terren RPMI - 5% plazëm autologe. Inkubojmë përmbajtjen për 5 ditë si më lart. Pulsojmë qelizat me 20 μ l 3H- timidinë me hollim 1:10 në terren RPMI 1640. Inkubojmë përmbajtjen e mësipërme për 24 orë, në të njëjtat kushte si më lart (Figura nr. 2).

Matja e radioaktivitetit të qelizave të inkubuara:

Eksperimenti mbaron më mbledhjen e qelizave me filtra me fibra qelqi dhe vlerësimin e radioaktivitetit të qelizave të stimuluar, me kontator të rrezatimit β .

Paraqitja e rezultateve: është bërë si mesatare aritmetike e dy vlerave të impulseve të radioaktivitetit për minut $\times 1000$ (Kcpm) për çdo rast të studjuar. $Kcpm = [(V1+V2)/2] \times 20$, që është koeficienti i hollimit të 3H-timidines (Figura nr. 3). Është llogaritur për çdo rast indeksi i stimulimit (IS), që paraqet raportin ndërmjet mesatares së Kcpm të qelizave në eksperiment dhe atyre të kontrollit negativ, të pastimuluara (7). Përgjigja limfoproliferative është konsideruar pozitive kur $IS > 2$ (8).

Rezultatet

Duke ju përmbajtur me rigorozitet tërë elementeve të procedurës, që marrin për bazë sterilitetin, pH, osmolaritetin, terrenet ushqyes, ndarësit e përshtatëshëm, kohën optimale të sejcilës etapë të procedurës, mitogjenet adekuate, si dhe tërë elementet e tjerë të procesurës të përshkruar me detaje në pjesën përkatëse, rezulton se limfocitet ndahen në përbërje të diskut të mononukleareve (Figura nr. 1). Nga ana tjetër mbi këtë bazë është bërë i mundur limfoproliferimi pasues i stimulimit mitogjenik me PHA, si dhe matja e këtij limfoproliferimi nëpërmjet vlerësimit të impulseve të radioaktiviteti të qelizave të stimuluar me PHA dhe të pulsuara me 3H- Timidine. Në mënyrë të përmblodhur rezultatet e kësaj përgjigje janë dhënë në Fig. 3. Sipas kësaj figure, për të tërë rastet e marrë në studim, përgjigja limfoproliferative është e ruajtur. Për tërë këto raste indeksi i stimulimit ka qenë >5 , nga >2 që është kufiri minimal i domosdoshëm për pozitivitet.

Diskutim

Siç shihet gjatë përshkrimit të metodës, moment rëndësishëm i teknikës së kulturës qelizore me cikël të shkurtër, është ndarja e qelizave limfomononukleare me ficol-paque. Ky moment tashmë është ekzauruar plotësisht si në literaturën e huaj, (1,3,7), ashtu dhe në atë tonën (4), ndaj e quajtmë të panevojshëm diskutimin e tij në detaje. Por në të vërtetë sollëm vetëm etapat e realizimit të saj, si dhe e zbatuam me rigorozitet këtë etapë.

Duke gjykuar të njohur përdorimin e kamerës hemocitometrike Burker që ne përdorëm, e quajtmë të panevojshëm dhënien e hollësirave të këtij momenti.

Në të njëjtën kohë, gjykojmë të vlefshme dhënien e disa konsideratave të përgjithëshme, që lidhen me kushtet e kultivimit të limfociteve me PHA. Mbi të gjitha, vlen të theksohet fakti i ndjekjes me rigorozitet i tërë momenteve të procedurës. Është fjala për procedurën bazë të dhënë nga (1,6,8, Bianchi V, Komunikim personal 1994, Manca F. Komunikim personal, 1994) (Figura nr.2). Kjo është përshkruar me detaje në pjesën e procedurës. Duke i marrë të mirëqena parametrat e saj, mbajtja në shifrat e duhura të temperaturës së kultivimit, osmolaritetit, pH, terreneve ushqyes, homogjenitetit të suspensionit qelizor, janë parakusht. (Bianchi V. Komunikim personal 1994).

Në të njëjtin rang vlerësohet nga ky autor (Bianchi V. Komunikim personal 1994), dhe ruajtja e sterilitetit gjatë gjithë procedurës. Kjo për faktin se terrenet ushqyese për qelizat në kulturë, në të njëjtën kohë janë dhe terrene ideale për rritjen dhe zhvillimin e mikroorganizmave të ndryshme. Për këto kushte parandalimi i kontaminimit të mundshëm, i qelizave në kulturë është i domosdoshëm. Kjo si duke bërë kujdes gjatë punës, që presupozon kryerjen e tërë momenteve të procedurës në kape sterile, ashtu dhe në sterilizimin e ajrit atmosferik, sterilizimin e terreneve, shtimin në këto të fundit të antibiotikëve, përdorimin e pipetave, tubave etj., të tëra sterile.

Gjithnjë është e domosdoshme të bëhet testi i sterilitetit të terrenit të përdorur: duke vënë në termostat në temperaturë 37°C, për 24 orë, para përdorimit pasardhës të një tubi me terrenin e dhënë që është në përdorim.

Duke ju përmbajtur këtyre kushteve të sipërtrajtuara, vlerat e limfoproliferacionit ndaj PHA-së, në kulturë, të dhëna në figura nr.3 gjejnë shpjegim si më poshtë:

Një numër mitogjenesh stimulojnë në mënyrë antigjenjovartëse (jospesifike), nënpopullata të caktuara limfocitare, çka çon në proliferim qelizor dhe diferencim të tyre në qeliza efektore. Në përbërje të agjenteve të tillë mitogjenik, futen **lektinat bimore** me natyrë proteinike apo glukoproteinike (8). Këto lidhen në mënyrë jospesifike me grupe të ndryshme sheqeror e të nënpopullatave limfocitare të ndryshme. Megjithatë ndërveprimi i mitogjeneve me grupe të ndryshme sheqerore, të shprehur thajse njësoj në përbërje të glukoproteinave sipërfaqësore të limfociteve T dhe B,

tashmë është i njohur, këto mitogjene nxisin nënpopulata qelizore të veçanta.

E dhëna që fitohet me PHA dhe konkanavalina A (Con A), nxit proliferimin dhe diferencimin vetëm të limfociteve T, të kultivuara me cikël të shkurtër (8), i ka bërë këto mitogjene, pra dhe PHA, të përdorshëm në studimin e vetë proliferimit limfocitar T në kushte normale, apo në rrethana të caktuara imunopamjaftueshmërie.

Siç shihet në figurën nr.3, në të 12 rastet e studiuar, limfocitet e stimuluar si më lart, kanë proliferuar ndjeshëm. Po kështu indeksi i stimulimit mbështet dukshëm këtë pohim. Del qartë që ky indeks është më i madh se 5 për të gjithë rastet e studiuar. Sipas (8), ky indeks është i rëndësishëm edhe kur është vetëm më i madh se 2. Mbi këtë bazë mund të deduktojmë se për të 12 rastet e studiuar aftësia limfoproliferative është e ruajtur.

Në të vërtetë PHA nxit në mënyrë jospesifike limfocitet CD4+ (Biachi V. Komunikim personal 1994), ndërsa shtimi në kulturë i IL2 bën të mundur ripërtëritjen e cikleve të stimulimit.

Por që stimulimi mitogjenik të nxisë fillimin e proceseve metabolike paraprirës të proliferimit dhe të diferencimit limfocitar, duhet që sinjalet e lidhjes sipërfaqësore, të futen në brendësi të këtyre qelizave. Këto momente, apo etapa, përfshijnë ndryshimet në nivelin e nukleotideve ciklike, në metilimin dhe rinovimin e lipideve membranore, në transportin e joneve dhe të molekulave të vogla; si dhe në metabolizmin e acideve nukleinike. Pranohet që lidhja e mitogjeneve me qelizat limfocitare realizohet në disa sekonda, apo e shumta në pak minuta, ndërsa ndryshimet metabolike pasuese kërkojnë deri në disa orë. Madje nëse mitogjeni i dhënë largohet nga kultura, para se të realizohen ndryshimet metabolike, proliferimi dhe diferencimi qelizor nuk ndodh. Ka dhe studime të tjera në këtë fushe, që justifikojnë e në të njëjtën kohe dhe shpjegojnë sjelljen në kulturë të limfociteve T. Në këtë kuadër, sipas (9), në membranën e limfociteve T të virgjëra, apo të pastimuluara (dhe të atyre B), gjendet një shënues i quajtur i quajtur L-selektine. Në kushtet e stimulimit mitogjenik ky shënues bie, e për rrjedhojë limfocitet aktivizohen dhe proliferojnë.

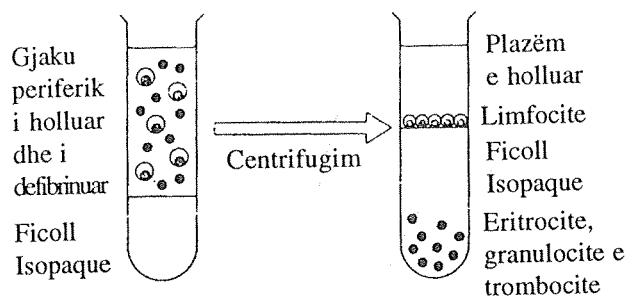


Fig. 1. Ndarja e limfociteve me Ficol-paque

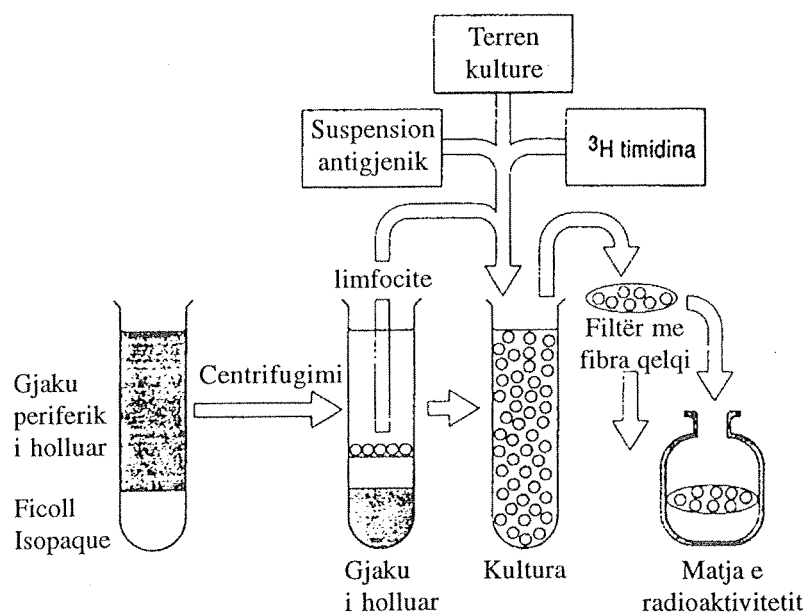


Fig. 2.
Testi i stimulimit limfocitar

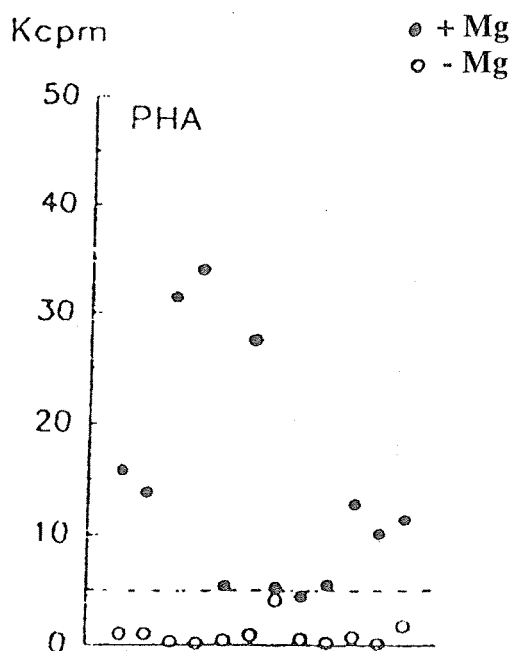


Fig. 3. Përgjigja limfoproliferaive ndaj PHA-së në të 12 rastet normale të studiuar

Si përfundim, mund të themi që nga njera anë ndjekja rigorozë e tërë mementeve të procedurës së kulturës qelizore të dhënë me detaje në paragrafet përkatës, mundëson realizimin me sukses të kësaj teknike studimore eksperimentale moderne në fushën e

biologjisë në përgjithësi, e të imunologjisë qelizore në veçanti.

Nga ana tjetër në bazë të këtij parakushti, në subjektet normale të studiuar, përgjigja limfoproliferaive ndaj PHA-së është e ruajtur.

BIBLIOGRAFIA

1. Andoni L.: Colture cellulari a breve termine, In: Colture cellulari, a cura di Roberto S. Grupo di cooperazione di imunologia; Genoa; 1990; 39-47.
2. Johson J P, Hebel H, Shinaberry R.: Lymphoproliferative response to mitogen and antigen in HIV-infected children, AIDS, research and human retroviruses, 1991; 7; 9; 781-785.
3. Bojum A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand.J. Clin. Lab Invest. 1968; 21; 77-89.
4. Çeka Xh, Hoxha A, Çako.: Identifikimi i limfociteve T me anë të rozetave E. Buletini i shkencave mjekësore; 1987; 1: 85-91.
5. Sulçebe G, Çeka Xh.: Përcaktimi i vlerave të limfociteve T dhe B në gjakun periferik. Buletini i UT.- Seria shkencore; 1987; 1:67-75.
6. Roit I.: Tecniche immunologiche, in Roit I, Brostoff J, Male D, Immunologia, Zanicheli, 1993; 5-11:25-15.
7. Benecerraf B, Unanue R E.: Textbook of Immunology; Williams & Willkins, Baltimore/ London; 1979; 69-71; 96-97.
8. Hood L. E., Wessman I. L.: Wood W. B., Wilson J. H. Immunology, 1984, California, 289, 299, 470-471.
9. Hannet I, Yksel E F, Lydyard P, Denyes V, and DeBruyere M.: Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations, Immunol. Today 199d: 13, 6215-218