

Ocena wiarygodności testu rozetowego E w konfrontacji z metodą ilościowej oceny komórek CD2⁺ techniką fluorocytometryczną

ANNA STASIAK-BARMUTA, JANUSZ ŻAK*, URSZULA WIWATOWSKA*

Zakład Alergologii Dziecięcej Akademii Medycznej, ul. Waszyngtona 17, 15-274 Białystok

*Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatricznej Instytutu Diagnostyki Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Białymstoku

Przed blisko ćwierćwieczem wykazano, że spośród różnych elementów komórkowych ludzkiego układu immunologicznego wyłącznie limfocyty T dysponują zdolnością do tworzenia rozet E. Test rozetowy E, z rekomendacji WHO, przez długie lata był najtańszym i najprostszym, a jednocześnie bardzo dokładnym testem ilościowym odnoszącym się do populacji limfocytów T człowieka. Stwierdzono, że cząsteczką tożsamą z receptorem E na limfocytach T jest molekula CD2. Ogromny skok w badaniach ilościowych oceniających subpopulacje komórkowe, stanowiło opracowanie techniki znakowania receptorów powierzchniowych komórki przeciwciałami monoklonalnymi, a do ich oceny zastosowanie cytometru przepływowego. Przy niekwestionowanych zaletach, technika ta pozostaje jednak, ze względu na znaczne koszty aparaturowe i odczynników, ciągle elitarna.

Wobec powyższego, celem niniejszej pracy była ocena wiarygodności testu rozetowego E w odniesieniu do metody znakowania receptora CD2 przeciwciałami monoklonalnymi w odczycie cytometrii przepływowej. Badaniami objęto grupę 34 dzieci w wieku od 3 do 15 roku życia. W przeprowadzonej ocenie porównawczej stwierdzono znamienne niższe wartości odsetkowe i bezwzględne limfocytów T ocenianych techniką testu rozetowego E w odniesieniu do oceny komórek CD2⁺ metodą fluorocytometryczną. Współczynnik korelacji dla obu metod wynosił ponad 0,6. W 5 przypadkach stwierdzono obniżenie wartości odsetkowych limfocytów T zarówno w teście E, jak i ocenie cytometrycznej. Wobec przedstawionych rezultatów oceny porównawczej, test rozetowy E w naszej opinii, przy zachowaniu pewnych wymogów zwiększających jego obiektywizm, jako często jedyny możliwy do wykonania, może być stosowany jako test przesiewowy będący wstępem do bardziej zaawansowanej diagnostyki immunologicznej.

Przed blisko ćwierćwieczem Jondal i wsp. [7] oraz Froland i Natvig [4] wykazali, że spontanicznie powstające w zawiesinie ludzkich limfocytów i krwinek czerwonych barana konglomeraty komórkowe zawierają swoiste struktury złożone z limfocytów T otoczonych ściśle do nich przylegającymi erytrocytami. Twory te nazwano rozetami E. Wykazano, że spośród różnych elementów komórkowych układu immunologicznego wyłącznie limfocyty T dysponują zdolnością do tworzenia rozet E. Zdolność ta stała się podstawą do opracowania metodyki wykonywania tzw. testu rozetowego E, który pozwala na ocenę ilościową obecności limfocytów T w zawiesinach komórkowych, np. w zawiesinie komórek jednojądrzastych wyizolowanych z krwi żyłnej. Badanie to przez długie lata, z rekomendacji WHO [12], było najważniejszym, najtańszym i najprostszym, a jednocześnie bardzo dokładnym testem ilościowym odnoszącym się do populacji limfocytów T człowieka.

Przełom w badaniach nad strukturą powierzchniowych antygenów komórkowych stanowiło

opracowanie przez Kohlera i Milstein'a w latach 80. techniki produkcji przeciwciał monoklonalnych. Przeciwciała te, poprzez swoiste powinowactwo do określonych cząsteczek różnicowania (CD), pozwalają na ocenę ilości komórek o danym fenotypie, zawartych w badanej zawiesinie komórkowej. Stwierdzono, że cząsteczką tożsamą z receptorem E na limfocytach T jest molekula CD2.

Początkowo technika znakowania przeciwciałami monoklonalnymi oparta była o ocenę mikroskopową, co wymagało uprzedniej izolacji komórek na mieszaninie gradientowej. Ogromny skok stanowiło zautomatyzowanie procesu znakowania i oceny przez zastosowanie cytometru przepływowego. Przy niekwestionowanych zaletach, technika ta pozostaje jednak, ze względu na znaczne koszty aparaturowe i odczynnikowe, ciągle elitarna.

Wobec powyższego celem niniejszej pracy była ocena wiarygodności testu rozetowego E w odniesieniu do metody znakowania receptora CD2 przeciwciałami monoklonalnymi w odczycie cytometrii przepływowej.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Badaniami objęto grupę 34 dzieci w wieku od 3 do 15 roku życia. Wymóg zdrowia nie stanowił kryterium kwalifikacyjnego przynależności do ocenianej grupy.

Test rozetowy E

Krew w objętości ok. 5 ml, wprost z igły pobierano do próbki zawierającej 400 jednostek niekonserwowanej heparyny (Sigma) rozpuszczonej w 1 ml fizjologicznego roztworu NaCl. Bezpośrednio po pobraniu przeprowadzano separację komórek jednojądrzastych wg metody Boyum'a [1] opartej na technice wirowania krwi pełnej na mieszaninie gradientowej o gęstości 1,077 g/cm³, złożonej z mieszaniny 9% Ficollu i 34% Uropoliny.

Do przeprowadzenia testu rozetowego sporządzano mieszaninę inkubacyjną o składzie:

1. 10⁶ komórek jednojądrzastych zawieszonych w 0,5 ml płynu Hanksa (WSS Lublin),
2. 0,1 ml 2% zawiesiny erytrocytów barana w płynie Hanksa (krwinki każdorazowo pochodziły od tego samego barana),
3. 0,4 ml surowicy cielej adsorbowanej krwinkami czerwonymi barana, inaktywowanej w temperaturze 56° C.

Po dokładnym wymieszaniu składników, mieszaninę inkubacyjną wirowano przez 5 minut przy 150 g i inkubowano w temperaturze 4° C przez 18 godzin. Po upływie czasu inkubacji pipetą pasteurowską kroplę zawiesiny nanoszono na komorę Bürkera i liczono w mikroskopie świetlnym komórki tworzące "rozety", oraz pozostałe komórki jednojądrzaste obecne w ocenianym preparacie. Za komórkę rozetującą przyjmowano komórkę otoczoną co najmniej trzema krwinkami, przy czym liczono ogółem nie mniej niż 300 komórek, określając odsetek (%) komórek rozetujących. Powstałe w ten sposób rozety określano mianem rozet całkowitych.

Ocena komórek CD2⁺ metodą znakowania przeciwciałami monoklonalnymi w odczycie cytometrii przepływowej

Krew żylną w ilości 2 ml pobierano do próbki morfologicznej zawierającej EDTA. Wstępnie przeprowadzano analizę leukogramu w analizatorze hematologicznym (Coulter MAXM). Oceniano leukocytozę i elementy składowe leukogramu w wartościach odsetkowych i bezwzględnych. Kolejno przygotowywano próbki do analizy cytometrycznej. Do 100 ml krwi pełnej dodawano po 10 ml przeciwciała CD2 (Becton Dickinson). Równolegle każdorazowo stosowano zgodną izotypowo kontrolę negatywną. Po 15 minutach inkubacji w ciemni, w temperaturze pokojowej, próbkę poddawano procesowi szybkiej lizy. Po dokładnym automatycznym wymieszaniu, próbki analizowano w cytometrze przepływowym (Coulter EPICX XL). Każdorazowo analizowano po 10⁴ komórek.

W obu testach wyniki podawano jako wartości odsetkowe (%) i w oparciu o dane leukogramu - wartości bezwzględne (BLLT i BLCD2).

Analiza statystyczna

Wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD) obliczano w sposób rutynowy. Różnice wartości analizowano testem Whitney'a-Mann'a, przyjmując $p < 0,05$ jako różnicę znamioną. Medianę, P25 i P75 obliczano wg procedur ANOVA/MANOVA. Współczynnik korelacji oceniano testem Pearson'a.

WYNIKI

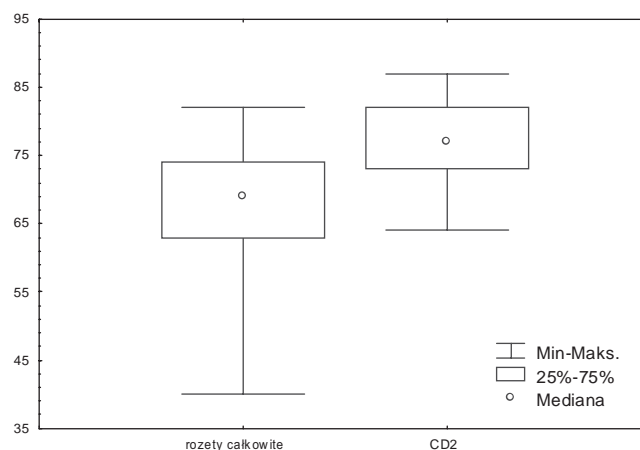
Wartości średnie ± SD, wartości minimum i maksimum dla każdego z ocenianych obiema metodami parametrów zawarto w tabeli I.

Tabela I. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD), wartości minimum i maximum komórek CD2⁺ ocenianych techniką testu rozetowego i metodą fluorocytometryczną

	średnia	SD	min.	max	max-min
leukocyty (G/l)	7,8	3,0	4,3	19,0	14,7
rozety całkowite (%)	68,0	9,1	40,0	82,0	42,0
komórki CD2 ⁺ (%)	76,9	5,6	64,0	87,0	23,0
BLLT (G/l)	1,9	0,9	0,3	5,0	4,7
BLLCD2 ⁺	2,1	0,8	1,0	5,3	4,3

W przeprowadzonej ocenie stwierdzono znamienne niższe wartości odsetkowe i bezwzględne rozet całkowitych w odniesieniu do odpowiednich wartości komórek CD2⁺ ocenianych techniką cytometryczną.

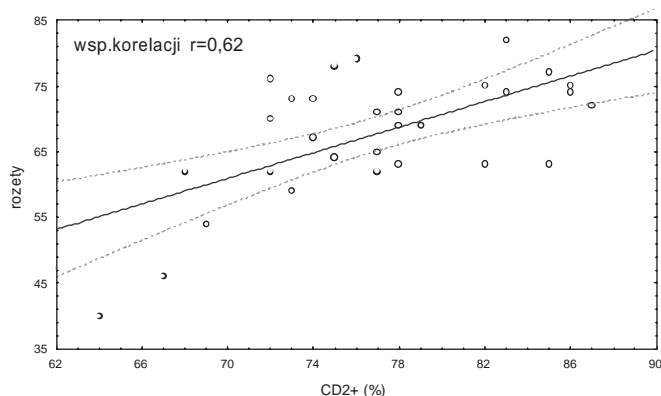
Wartości mediany, P25 i P75, minimum i maksimum komórek CD2⁺ ocenianych oboma testami, przedstawiono na ryc. 1.



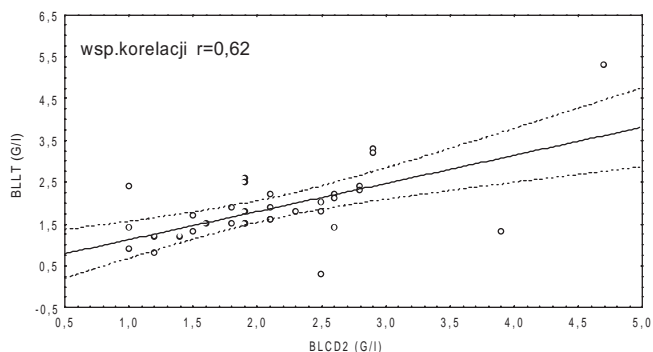
Ryc. 1. Wartości mediany, P25 i P75 odsetka limfocytów T we krwi obwodowej ocenianych techniką testu rozetowego E (rozety całkowite) i metodą fluorocytometryczną (komórki CD2⁺)

Na przedstawionym wykresie zwraca uwagę znaczna rozpiętość pomiędzy wartościami minimum i maksimum w przypadku rozet całkowitych, wynosząca 42% przy różnicy odsetka komórek CD2⁺ blisko o połowę mniejszej, wynoszącej 23%.

W kolejnym etapie obliczano współczynnik korelacji dla wartości odsetkowych i bezwzględnych limfocytów T ocenianych obiema metodami (ryc. 2 i 3).



Ryc. 2. Korelacja pomiędzy wartościami odsetkowymi komórek CD2⁺ krwi obwodowej oznaczanych techniką testu rozetowego E (rozety całkowite) i metodą fluorocytometryczną (CD2⁺)



Ryc. 3. Korelacja pomiędzy wartościami bezwzględnymi komórek CD2⁺ krwi obwodowej oznaczanych techniką testu rozetowego E (BLLT) i metodą fluorocytometryczną (BLCD2)

W obu przypadkach współczynnik korelacji wynosił ponad 0,6.

W badaniach przeprowadzonych uprzednio [13] w oparciu o wyniki badań przeprowadzonych w populacji dzieci zdrowych ustalono wartości referencyjne dla obu ocenianych metod. Stwierdzono progresywny do wieku wzrost wartości odsetkowych zarówno rozet całkowitych, jak i komórek CD2⁺. Wartości bezwzględne wobec fizjologicznego spadku liczby leukocytów i limfocytów, wykazywały, progresywnie do wieku, tendencję spadkową.

W ocenianej w niniejszej pracy grupie 34 dzieci, w 5 przypadkach stwierdzono wartości odsetkowe obu ocenianych parametrów poniżej prawidłowych (tab. II). Średnia wartość obniżonych poniżej prawidłowych rozet

Tabela II. Wartości odsetkowe komórek CD2⁺ u dzieci z niedoborem ilościowym limfocytów T wobec właściwych dla danego wieku wartości referencyjnych ocenianych techniką testu rozetowego E i metodą fluorocytometryczną

wiek (lata)	rozety całkowite (%)		komórki CD2 ⁺ (%)	
	badane	prawidłowe	badane	prawidłowe
3	46	58-63	67	71-74
6	62	63-66	72	74-82
7	40	67-75	64	77-85
8	59	67-75	73	77-85
9	54	67-75	69	77-85

całkowitych wynosiła 52,2±9,1%; komórek CD2⁺ - 69,0±3,6%, co stanowiło ok. 80% średnich wartości prawidłowych dla testu rozetowego i 88% średnich wartości prawidłowych dla oznaczania komórek CD2⁺ techniką cytometrii przepływowej.

DYSKUSJA

Wobec nadrzędnej roli limfocytów T w układzie odpornościowym, wyrażającej się inicjowaniem, ukierunkowaniem, a także regulacją stopnia nasilenia i czasu trwania odpowiedzi immunologicznej, niezmierną wagę przywiązuje się do oceny tej właśnie populacji komórkowej [3,5,18].

Przyjmuje się, że wszystkie ludzkie limfocyty T mają receptory dla krwinek czerwonych barana. Zdolność limfocytów T do łączenia się z erytrocytami barana zależy od powinowactwa struktur glikoproteinowych na błonie komórkowej limfocytów (receptor E, cząsteczka CD2) z glikoproteinami powierzchniowymi erytrocytów.

Cząsteczka CD2 należy, obok CD58, CD48, SLAM, 2B4 oraz LY-9, do nadrodziny immunoglobulin (IgSF) [2]. Rola receptora CD2 pozostaje niejasna. Pojawia się on na powierzchni tymocyta w 15 tygodniu rozwoju płodowego i towarzyszy rozwojowi limfocyta T we wszystkich jego stadiach dojrzałości. Składa się z kilku epitopów, z których niektóre (T11A, T11) występują na spoczynkowych, inne (T11) na aktywowanych limfocytach T. CD2 łącząc się z CD58 (LFA-3) i CD59 na komórce prezentującej antygen uruchamia tzw. alternatywną, niezależną od TCR-CD3, drogę przekazania sygnału aktywującego limfocyty T. Na erytrocytach barana homologiczną w stosunku do LFA-3 jest cząsteczka T11TS. Ludzkie limfocyty T mogą mieć więcej niż jeden typ receptora E. Mają one dwa oddzielne, jakkolwiek strukturalnie podobne receptory: w ok. 70% dla erytrocytów barana i w ok. 60-70% dla erytrocytów mały Rhesus [6,10,11,17].

W pracy niniejszej przedstawiono wyniki oceny ilościowej populacji limfocytów T krwi obwodowej przeprowadzone dwiema metodami niezależnie, testem rozetowym E oraz techniką znakowania przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko receptorowi CD2 w odczynie

cytometrii przepływowej. W przeprowadzonej analizie uzyskano znamienne niższe w odniesieniu do odczytu cytometrycznego wartości odsetkowe i bezwzględne limfocytów T. Stwierdzone różnice mogą naszym zdaniem wynikać z kilku niezależnych przyczyn. Przede wszystkim, jak opisano powyżej, problemy stwarza heterogenność receptora E, czy też cząsteczki CD2. Praktycznym tego wykładnikiem są różne wartości referencyjne dla obu metod. Dla testu rozetowego prawidłowa wartość odsetka rozet całkowitych wynosi ok. 70%, dla komórek CD2⁺ - około 80%.

Kolejną przyczyną obserwowanych różnic jest sama technika izolacji materiału do badań. Do wykonania testu E wymagana jest zawiesina komórek jednojądrzastych, którą uzyskuje się metodą wirowania krwi pełnej na mieszaninie gradientowej o gęstości 1,077 g/cm³. Natomiast w stosowanej przez nas ocenie cytometrycznej, materiał do badań uzyskiwano poprzez automatyczne lizowanie krwi pełnej. W badaniach porównawczych, ocenianych metodą cytometrii przepływowej wykazano, iż sam proces izolacji komórek na mieszaninie gradientowej, powoduje utratę pewnych subpopulacji komórek T. Stosowana przez nas liza krwi pełnej pozwala na ocenę wszystkich komórek zawartych w badanej próbce krwi [8,9,16].

Nie bez wpływu na oceniane w teście E wartości odsetkowe ma pewien subiektywizm oceniającego preparat. Wiadomo, iż w preparatach niebarwionych, przy braku aktywacji układu immunologicznego, sprawą niezwykle trudną jest właściwe zakwalifikowanie komórek jednojądrzastych do populacji monocytów lub limfocytów. Wobec powyższego komórki rozetujące liczone mogą być także wobec monocytów, co wpływa na obniżenie wartości testu rozetowego E. Technika cytometrii przepływowej

błąd ten eliminuje, z jednej strony poprzez precyzyjną automatyczną ocenę objętości komórki i zawartych w jej cytoplazmie ziarnistości, z drugiej zaś poprzez stosowanie przeciwciał monoklonalnych znakujących receptory limfocytów i monocytów co pozwala na precyzyjne oddzielenie obu populacji. Oprócz wymienionych powyżej zalet, technika znakowania przeciwciałami monoklonalnymi komórek CD2 pozwala, oprócz oceny ich ilości poprzez ocenę awidności wiązań receptorowych, również na pośrednie wnioskowanie co do stopnia ich dojrzałości. Test rozetowy E możliwości takich jest pozbawiony.

W przeprowadzonej przez nas ocenie porównawczej obu metod zwraca uwagę istotny statystycznie współczynnik korelacji dla wartości odsetkowych i bezwzględnych limfocytów T wynoszący ponad 0,6, jak również pewnego rodzaju zgodność kwalifikowania stopnia niedoboru ilościowego wobec właściwych dla obu metod wartości referencyjnych.

Wobec niezmiernie wysokich kosztów aparaturowych i odczynnikowych cytometrii przepływowej, test rozetowy E, przy zachowaniu pewnych wymogów zwiększających jego obiektywizm (krwinki czerwone pochodzące od tego samego barana, ocena dynamiki zmian przez tę samą osobę) jako często jedyny możliwy do wykonania, powinien być szeroko stosowany, jako swego rodzaju test przesiewowy będący wstępem do bardziej zaawansowanej diagnostyki immunologicznej.

Doświadczenia własne wskazują na przydatność testu rozetowego E we wstępnej diagnostyce immunologicznej, jak i monitorowaniu zmian ilościowych będących efektem stosowanego leczenia immunotropowego [14, 15].

Piśmiennictwo

1. Boyum A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 1968; 21 (suppl 97): 77-89.
2. Davis S.J., van der Merwe P.A.: The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol. Today.* 1996; 17(4): 177-187.
3. Dąbrowski M.P., Dąbrowska-Bernstein B.K.: Immunoregulatory role of thymus. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA., 1990.
4. Froland S.S., Natvig J.B.: Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers and/or functional characteristics. *Transplant.Rev.* 1973; 16: 163.
5. Hokama Y., Nakamura R.M.: Cell-mediated immunity: T lymphocyte system. *Immunol. Immunopathol.*, Little, Brown and Company, Boston. 1982: 55.
6. Jakóbisiak M.: Aktywacja, proliferacja i różnicowanie limfocytów. w *Immunologia* pod redakcją M.Jakóbisiaka, Wyd.Nauk. PWN, Warszawa 1996.
7. Jondal M., Holm G., Wigzell H.: Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. *J.Exp.Med.* 1972; 136: 207.
8. Monsour J., Bouvin P., Rouger P. i wsp.: A rapid technique for lymphocyte preparation prior to two-color immunofluorescence analysis of lymphocyte subsets using flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 1990; 127: 61-70.
9. Pelegri C., Rodrigez-Palermo M., Paz Morante M. i wsp.: Comparison of four lymphocyte isolation methods applied to rodent T cell subpopulations and B cells. *J.Immunol.Methods* 1995; 187(2): 265-271.
10. Ryżewska A.: Immunologiczne zróżnicowanie limfocytów. w: *Immunologia* pod redakcją S.Mackiewicza, PZWŁ, Warszawa 1991.
11. Sen J., Arceci R.J., Jones W., Burakoff S.J.: Expression and ontogeny of murine CD2. *Eur.J.Immunol.* 1989; 19: 1297.
12. Special Technical Report: Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood, Report of a WHO/IARC-Sponsored Workshop on Human B and T cells, London, 15-17 July 1974 *Scand.J.Immunol.* 1974; 3: 521.
13. Iwaszkiewicz-Pawłowska A., Stasiak-Barmuta A., Żak J.: Ocena subpopulacji limfocytów oznaczanych metodą cytometrii przepływowej u zdrowych dzieci. *Wiadomości Lekarskie* 1998; 51(5-6): 2-7.

14. Stasiak-Barmuta A., Piotrowska T., Hofman J.: Evaluation of the selected immunological parameters in children with atopic bronchial asthma and concomitant infections of the respiratory tract. *Int.Rev.Allergolo.Clin.Immunol.* 1995; 1(5): 33-38.
15. Stasiak-Barmuta A.: Tezy pracy doktorskiej pt: Immunorekonstrukcyjny wpływ wyciągów grasicy cielęcej podawanych chorym z zaburzeniami ilości i/lub funkcji populacji limfocytów grasiczozależnych, Białystok 1992.
16. Tamul K.K., O'Gorman M.R.G., Donovan M. i wsp.: Comparison of a lysed whole blood method to purified cell preparations for lymphocyte immunophenotyping: differences between healthy controls and HIV-positive specimens. *J.Immunol.Methods* 1994; 167(1-2): 237-243.
17. Townsend A.: Molecules at work on the T-cell surface. *Immunol. Today* 1985; 6: 68.
18. Waldman T.A.: Organization of the human immune system. *Dermatol.Clin.* 1990; 8: 593.

E rosetting test comparison with the fluorocytometric method in CD2⁺ cell evaluation

ANNA STASIAK-BARMUTA, JANUSZ ŻAK, URSZULA WIWATOWSKA

Summary

The E rosetting test, recommended by WHO was considered to be the cheapest and the simplest quantitative test for counting human T lymphocytes, being very precise at the same time.

In the 80's, it was found, that molecule CD2 was identical with E receptor in T cells.

The marking technique of surface cell receptors by monoclonal antibodies and their evaluation by the flow cytometry were a giant step in the development of quantitative methods assessing cell subsets. Despite its numerous advantages, this method remains to be exclusive due to very high costs of the equipment and monoclonal antibodies. The aim of this study was to evaluate the reliability of the E rosetting test in comparison with the counting CD2⁺ by the fluorocytometric method.

34 children aged 3-15 years were examined. We found a significant decrease in the percentage and in the absolute number of T cells evaluated by the E rosetting technique in comparison with cytometric method. There was a significant correlation between the two methods, $r=0,6$. In five cases a decrease number of T lymphocytes was observed simultaneously in both tests. However certain criteria increasing its objectivity should be maintained. In our opinion the E rosetting test, as it often is the only available test to be performed, could be used as a screening method for more advanced immunological diagnostics.