

PAKASTUKSEN VAIKUTUS LEUKOSYTTIEN BIOKEMIAALLISIIN TOIMINTOIHIN

Syventävien opintojen tutkielma
Turun Yliopisto
Oppiaine: Biokemia
8.3.1996

Vesa Oikonen

TURUN YLIOPISTO
Kemian ja biokemian laitos

OIKONEN, VESA: Pakastuksen vaikutus leukosyyttien biokemiallisiin toimintoihin

Syventävien opintojen tutkielma 74 s.

Biokemia

Maaliskuu 1996

Kokeellisen työn ohjaaja: Dosentti Esa-Matti Lilius

Leukosyyttien laaja kliininen, diagnostinen ja kokeellinen käyttö edellyttää sitä, että solut kyetään säilyttämään riittävän pitkään muuttumattomina. Tässä työssä on selvitetty kirjallisuudesta pakastuksen vaikutuksia leukosyyttien biokemiallisiin toimintoihin. Kokeellisesti on tutkittu pakastuksen vaikutusta fagosyyttien reseptoreihin ja oksidaasisysteemin aktivoitumiseen virtaussytometri- ja kemiluminesenssimittausten avulla.

Pakastuksen aiheuttamat soluvauriot johtuvat pääasiassa kahdesta seikasta: muodostuvat jääkiteet rikkovat solujen ja soluorganellien kalvoja, ja jäätyksen aikana sulana pysyvän veden suolaväkevyys kasvaa aiheuttaen hyperosmoottisen stressin. Suojaineilla, lähinnä dimetyylisulfoksidilla (DMSO), vähennetään osmoottisia vaurioita. Erityisen haitallista olisi solunsisäinen jäänmuodostus, joka pyritään välttämään valitsemalla soluille sopiva jäähdytysnopeus, yleensä 1 °/min. Nopealla sulatuksella estetään kiteiden kasvaminen lämpenemisen aikana.

Lymfosyytit, kantasolut ja monosyytit sekä makrofaagit kestävät pakastuksen hyvin; vain pientä solukatoa ja reseptorien irtoamista voi tapahtua. Granulosyytit menettävät kokonaan toimintakykynsä, vaikka niiden morfologia voikin säilyä. Granulosyytit ovat herkkiä osmoottisen paineen muutoksille. Ensin vaurioituvat granulat, joista vapautuvat entsyymit tuhoavat granulosyytit sulatuksen jälkeen.

Monosyyttien FcRI, FcRII- ja komplementtireseptorien havaittiin säilyvän pakastuksessa, mutta FcRIII-reseptorin ekspressio ja zymosaanilla aktivoitu kemiluminesenssi alenivat selvästi. Pakastettuja monosyyttejä voitaneen tulevaisuudessa käyttää pysyvänä laboratorion vertailumateriaalina.

SISÄLLYSLUETTELO

KÄYTETYT LYHENTEET	5
I KIRJALLISUUSOSA	6
PAKASTUKSEN VAIKUTUS LEUKOSYYTTIEN BIOKEMIAALLISIIN TOIMINTOIHIN	
LYHENNELMÄ	6
1 JOHDANTO	7
2 LEUKOSYYTTIEN PAKASTUSMENETELMÄT	9
2.1 Jäätymisen aiheuttamat vauriot	9
2.1.1 Osmoottiset vauriot	9
2.1.2 Mekaaniset vauriot	9
2.1.3 Solunsisäiset vauriot	10
2.2 Alhaisen lämpötilan aiheuttamat vauriot	11
2.3 Suoja-aineet	12
2.3.1 Dimetyylisulfoksidi	12
2.3.2 Glyserolit	13
2.3.3 Glykolit	13
2.4 Suojaavat lisäaineet	14
2.4.1 Hiilihydraatit	14
2.4.2 Aminohapot	14
2.4.3 Askorbiinihappo	15
2.4.4 Polymeerit	15
2.4.5 Seerumivalmisteet	16

2.5	Puskurit	16
2.6	Vitrifikaatio	17
2.6.1	Vitrifikaation periaate	17
2.6.2	Vitrifikaatioliuokset	18
2.6.3	Vitrifikaation käyttömahdollisuudet	18
3	VAURIOIDEN HAVAITSEMINEN	19
3.1	Fagocytoosi ja oksidaasiaktiivisuus	19
3.2	Kemotaksis	20
3.3	Morfologia ja värjäykset	20
3.4	Jakaantuminen	21
3.5	Viabiliteettitesteihin vaikuttavia seikkoja	21
4	ERILAISTEN SOLUTYYPPIEN SÄILYMINEN	23
4.1	Lymfosyytit	23
4.1.1	B-lymfosyytit	23
4.1.2	T-lymfosyytit	23
4.2	Fagosyytit	25
4.2.1	Monosyyttiset solut	25
4.2.2	Granulosyytit	26
4.2.2.1	Neutrofiilit	26
4.2.2.2	Sytoplastit	28
4.3	NK-aktiivisuus	29
4.4	Kantasolut	30
4.5	Leukemiasolulinjat	31

5	PAKASTUSVAURIOILLE ALTISTAVIA TEKIJÖITÄ	33
6	ELÄINTEN LEUKOSYYTTIEN PAKASTUSKESTÄVYYS	34
II	KOKEELLINEN OSA	35
	PAKASTUKSEN VAIKUTUS FAGOSYYTTIEN AKTIVOITUMISEEN	
	LYHENNELMÄ	35
1	JOHDANTO	36
2	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	38
2.1	Reagenssit	38
2.1.1	Puskurit	38
2.1.2	Luminoli ja lusigeniini	38
2.1.3	Dekstraani	39
2.1.4	Metyylivioletti	39
2.1.5	Zymosaani	39
2.1.6	PMA	40
2.2	Solut	40
2.2.1	Leukosyytit	40
2.2.2	Mononukleaarisolut ja granulositytit	41
2.2.2.1	Ficoll-Paque -eristys	41
2.2.2.2	Eristys kaksivaiheisella Percoll-gradientilla	41
2.2.3	Monosyytit	42
2.2.4	Solujen laskenta	42
2.3	Kemiluminesenssimittaukset	43

2.4	Virtaussytometria	44
2.5	Leukosyyttien pakastaminen ja sulattaminen	45
2.6	Tilastolliset menetelmät	45
3	TULOKSET	47
3.1	Pienten DMSO- ja trehaloosipitoisuuksien vaikutus fagosyyttien kemiluminesenssiin	47
3.2	Puskurin ja trehaloosin vaikutus pakastuskestävyyteen	47
3.3	Sulatettujen solujen säilyvyys	51
3.4	Mononukleaarisolujen säilyvyys nestetyössä ja pakastimessa	53
3.5	Erottelemattomien leukosyyttien pakastus	55
3.6	Leukosyyttien kemiluminesenssin kinetiikka	56
3.7	Puhdistuksen ja pakastuksen vaikutus monosyyttien kemiluminesenssiin ja reseptorimääriin	59
4	TULOSTEN TARKASTELU	63
	KIRJALLISUUSLUETTELO	67

KÄYTETYT LYHENTEET

BSA = lehmän seerumin albumiini (bovine serum albumin)

CL = kemiluminesenssi

CMF-HBSS = kalsium- ja magnesiumvapaa HBSS

DMSO = dimetyylisulfoksidi

FCS = vasikan sikiön seerumi (foetal calf serum)

fMLP = N-formyyli-*L*-methionyyli-*L*-leusyyli-*L*-fenylalaniini

GHBSS = HBSS + 0.1 % gelatiinia

HBSS = Hank's balanced salt solution

HES = hydroksietyylitärkkelys (hydroxyethyl starch)

HSA = ihmisen seerumin albumiini (human serum albumin)

NBT = nitroblue tetrazolium

PBS = fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos (phosphate buffered saline)

PEG = polyetyleeniglykoli

PMA = phorbol-12-myristate-13-acetate

PMNL = polymorfonukleaariset leukosyytit

PWM = pokeweed mitogen

RA = retinoic acid

Z⁻ = opsonisoimaton zymosaani

Z⁺ = opsonisoitu zymosaani

I KIRJALLISUUSOSA

PAKASTUKSEN VAIKUTUS LEUKOSYTTIEN BIOKEMIALLIISIIN TOIMINTOIHIN

LYHENNELMÄ

Leukosyyttien laaja kliininen, diagnostinen ja tieteellinen käyttö edellyttää sitä, että solut kyetään säilyttämään riittävän pitkään muuttumattomina. Ilman pakastusta leukosyytit säilyvät vain muutamia tunteja tai vuorokausia, mutta myös pakastus vaurioittaa näytteitä.

Pakastuksen aiheuttamat soluvauriot johtuvat pääasiassa kahdesta seikasta: muodostuvat jääkiteet repivät tai puristavat solujen ja soluorganellien kalvoja, ja jäätyksen aikana sulana olevan veden suolaväkevyys kasvaa aiheuttaen hyperosmoottisen stressin. Suoja-aineilla, lähinnä dimetyylisulfoksidilla (DMSO), vähennetään osmoottisia vaurioita. Erityisen haitallista olisi solunsisäinen jäänmuodostus, joka pyritään välttämään valitsemalla soluille sopiva jäähdytysnopeus, yleensä $1^{\circ}/\text{min}$. Nopealla sulatuksella estetään jääkiteiden kasvaminen lämpenemisen aikana. Pakastuksen ja pesujen yhteydessä solukalvosta saattaa myös irrota reseptoreita, mikä voi vähentää tai hidastaa aktivoitumisreaktioita ja jakaantumista. Jääkiteiden muodostuminen voitaisiin välttää vitrifikoimalla näytteet, mutta tekniikka ei ole vielä riittävän kehittynyttä, jotta näin saataisiin parempia tuloksia kuin perinteisellä pakastuksella.

Lymfosyytit, kantasolut ja monosyytit sekä makrofaagit kestävät pakastuksen hyvin; vain pientä solukatoa ja reseptorien irtoamista voi tapahtua. Granulosyytit menettävät kokonaan toimintakykynsä, vaikka niiden morfologia voikin säilyä. Granulosyytit ovat herkkiä osmoottisen paineen muutoksille. Ensin vaurioituvat granulat, joista vapautuvat entsyymit tuhoavat granulosyytit sulatuksen jälkeen.

Pakastettuja leukosyyttejä käytetään vertailumateriaalina pienentämään immunologisten määritysten koevariaatioita. Immuunivasteen seurannassa näytteiden pakastaminen ja tutkiminen yhdellä kertaa mahdollistaa pientenkin muutosten havaitsemisen.

1 JOHDANTO

Leukosyyttien kliininen ja diagnostinen käyttö sekä tutkimus edellyttävät, että solut kyetään säilyttämään riittävän pitkään muuttumattomina. Muut verisolut, verihiutaleet ja punasolut, säilyvät kylmässä riittävän pitkään useimpiin tarkoituksiin, mutta leukosyytit vain muutamia tunteja tai vuorokausia. Pidempiaikainen säilytys on mahdollista vain pakastamalla.

Luovutetusta verestä voidaan nykyisin käyttää plasma, punasolut ja verihiutaleet, mutta myös valkosoluille olisi kliinistä käyttöä, jos niiden säilytys onnistuisi. Granulosyyttien siirron on todettu olevan hyödyksi potilaille, joilla on granulositytopenia, laaja-alainen tulehdus, tai joiden granulositytit ovat defektiivisiä (Dutcher, 1984). Uudet antibiootit ja luuydinsiirtojen kehittyminen ovat kuitenkin vähentäneet tarvetta granulosityttien siirtoon. Nykyisin esim. syövänhoidossa annetun voimakkaan kemoterapian jälkeen voidaan nopeuttaa leukosyyttien elpymistä verenkierrossa antamalla potilaalle ennen hoitoa kerättyjä ja pakastettuja autologisia kantasoluja. Adoptiivisessa immunoterapiassa voidaan antaa potilaalle esimerkiksi syöpäsoluja vastaan suunnattuja sytotoksisia T-lymfosyyttejä tai makrofaageja (Ichino ja Ishikawa, 1985; Andreesen ja Hennemann, 1991).

Potilailta otetut leukosyyttinäytteet pitäisi pystyä säilyttämään ennen tutkimuksia ja kuljetuksen ajan. Pienetkin muutokset yhden yksilön immuunivasteessa voidaan havaita, jos leukosyyttinäytteet on pakastettu ja ne sulatetaan ja mitataan kaikki yhdellä kertaa (Sears ja Rosenberg, 1977; Birkeland, 1980). Toinen mahdollisuus on käyttää kaikissa kokeissa samaa pakastettua näytettä sisäisenä standardina. Esimerkiksi eri henkilöiltä kerättyjä yhdistettyjä lymfosyyttinäytteitä on käytetty standardina transformaatiotesteissä. IL-2-määritysten toistettavuutta on parannettu käyttämällä pienissä erissä pakastettuja viljeltyjä T-soluja (Gramatzki

et al. , 1982). Pysyvän vertailumateriaalin kerääminen auttaisi huomattavasti myös leukosyyttitutkimusta. Pakastetuista mononukleaarisolusta voidaan etsiä mm. merkkejä syövästä, ja tehdä solutyypin- ja HLA-määrittelyjä; epidemiologisissa tutkimuksissa on kuitenkin otettava huomioon pienetkin muutokset, joita pakastus mahdollisesti aiheuttaa.

Leukosyyttitutkimuksessa on usein käytetty myös erityisistä leukemiasoluviljelmistä saatuja soluja. Ne eivät kuitenkaan vastaa normaaleja leukosyyttejä kaikilta ominaisuuksiltaan, ja viljelmäkin saattaa muuttua ajan kuluessa. Viljelmän ylläpitäminen on suhteellisen vaativaa ja kallista työtä, ja solujen erilaistaminen on aloitettava useita päiviä ennen käyttöä. Leukemiasolulinjat eivät näin ollen ollen poista tarvetta leukosyyttien pakastamiseen.

2 LEUKOSYYTTIEN PAKASTUSMENETELMÄT

2.1 Jäätymisen aiheuttamat vauriot

2.1.1 Osmoottiset vauriot

Solujen ulkopuolella alkava jääkiteiden muodostuminen nostaa suolaväkevyyttä vielä jääty-mättömässä vesitilavuudessa ja johtaa veden virtaamiseen ulos soluista. Myös suoja-aineiden liian nopea lisäys ja poislaimennus aiheuttavat osmoottista stressiä; vaurioiden välttämiseksi ne kannattaisi tehdä +37 °C:ssa, jolloin membraanit läpäisevät paremmin suoja-aineita (McCarthy *et al.* , 1981; McCarthy *et al.* , 1984). Hyperosmoottinen stressi supistaa solun tilavuutta ja vaurioittaa kalvoja sekä irrottaa Fc- ja komplementtireseptoreita (Takahashi *et al.* , 1985b; Takahashi *et al.* , 1985c). Granulosyytit ja verihiutaleet kestävät huonosti osmoottista stressiä, mutta monosyytit, lymfosyytit ja kantasolut paremmin (Law *et al.* , 1983; Takahashi *et al.* , 1985c). Sulatuksen aikana solut altistuvat hypotoniselle stressille, mutta sulatus on silti tehtävä nopeasti, jotta vältettäisiin kiteiden koon kasvaminen.

2.1.2 Mekaaniset vauriot

Solun ulkopuoliset jääkiteet pyritään nopealla jäähdytyksellä pitämään pieninä, jotta ne eivät puristaisi ja repisi soluja. Jäähdytysnopeutta ei kuitenkaan voida nostaa kovin korkeaksi, ettei osmoottinen stressi pahenisi liikaa. Veden pitää ehtiä siirtymään jäätymisen aikana soluista ekstrasellulaaritilaan niin, että soluorganismeja ja rakennetta tuhoava intrasellulaarisen jään

syntyminen estyy (Schwartz ja Diller, 1984). Tavallisessa pakastuksessa sopiva jäähdytysnopeus on 0,5–1,0 °C/min. Paras tulos saavutetaan kontrolloitua pakastusta varten valmistetuilla laitteilla, jotka ottavat huomioon kiteiden muodostumisen ja transitiotilojen aiheuttamat lämpötilan muutokset. Yleensä -10 °:een ja -20 °C:een välillä tapahtuva faasimuutos voi johtaa näytteen lämpötilan nopeaan nousuun 1–5 °:eella (Gray ja Golub, 1984), mikä voi olla tuhoisaa herkille solutyypeille. Jäähdytyksen kontrollointi on sitä tärkeämpää, mitä suurempia eriä pakastetaan. Pienissä erissä esimerkiksi monosyytit voidaan pakastaa sijoittamalla näytteet heti -90 °C pakastimeen ja sieltä nestetyypeen ilman, että saanto huononisi merkittävästi (Myhrvold ja Mørland, 1985). Pienien näytemäärien pakastamista varten on kehitetty yksinkertainen isopropanolia sisältävä jäädytin (Nalgene™ 5100-0001), jolla lämpötilan alenemisnopeudeksi saadaan noin 1 ° minuutissa. Tämän on todettu toimivan ainakin mononukleaarisolujen pakastuksessa (Vingerhoets *et al.* , 1995).

Solujen käsittely, mm. suspension sekoitus ja sentrifugointi, vaurioittavat soluja erityisesti pakastuksen jälkeen (Gorin, 1986). Lymfosyyttien ja monosyyttien vauriot voivat kuitenkin korjaantua itsekseen, jos soluja pidetään sopivissa olosuhteissa sulatuksen jälkeen.

2.1.3 Solunsisäiset vauriot

Primaarinen vaurio soluissa kohdistuu usein lysosomeihin tai granuloihin, ja vasta myöhemmin solukalvoon ja mitokondrioihin (McGann *et al.* , 1988). Jäätymisen aikainen dehydraatio altistaa solun makromolekyylit korkeille elektrolyyttipitoisuuksille, sitä pidempään, mitä hitampi jäähdytys on. Tämä saattaa aiheuttaa muutoksia entsyymien tai muiden proteiinien rakenteessa tai irrottaa niitä solukalvosta tai organellien membraaneista, vaikka ne muuten

kestävätkin hyvin itse pakastusta. Liian nopea jäähditys aikaansaa intrasellulaarista kiteiden muodostumista, mikä vauroittaa pahasti soluorganelleja. Solukalvon läpäisevillä suoja-aineilla pyritään estämään intrasellulaarisen jään syntyminen ja solukoon liiallinen pieneneminen sekä syrjäyttämään kiteytyviä vesimolekyylejä proteiinien ja solukalvojen pinnoilta.

Pitkäaikainen säilytys tulisi tehdä alle $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$:een lämpötilassa, mieluiten nestetyössä $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$:eessa, jotta kaikki vesi olisi jäätyneenä ja entsyymitoiminta soluissa estyisi kokonaan (Mazur, 1984).

2.2 Alhaisen lämpötilan aiheuttamat vauriot

Vaikka pakastus vaurioittaa soluja, ei myöskään säilytys lähellä $0\text{ }^{\circ}\text{C}$:tta ole ongelmattonta. Solujen metabolia hidastuu tällöin, mutta ei lakkaa kokonaan. Reaktiot saattavat hidastua eri tahdissa, jolloin toisiinsa liittyvät reaktiotiet voivat johtaa epätasapainoon. Jotkut yhdisteet voivat saostua, ja dissosiaatiovakiot sekä paikalliset pH-arvot soluissa saattavat muuttua. Jäähditys lopettaa solujen natriumpumpun toiminnan, mikä voi johtaa solujen paisumiseen. Membraanilipideissä voi tapahtua haitallisia faasimuutoksia alhaisissa lämpötiloissa. Myös solususpension puskurin pH voi muuttua, erityisesti karbonaattipuskureissa.

2.3 Suoja-aineet

2.3.1 Dimetyylisulfoksidi

Dimetyylisulfoksidi (DMSO) on yleisimmin leukosyyttien pakastuksessa käytettävä suoja-aine. DMSO läpäisee helposti solukalvon, ja vähentää siksi dehydraation aiheuttamia vahinkoja. DMSO stabiloi fosfolipidikalvoja ja proteiineja alhaisissa lämpötiloissa, mutta saattaa denaturoida fysiologisissa lämpötiloissa (Anchordoguy *et al.* , 1991). Tämän vuoksi DMSO on lisätty solususpensioihin usein +4 °C:ssa, vaikka se silloin läpäiseekin solukalvon huommin ja pitää lisätä hitaammin. Mahdollisimman nopean sulatuksen jälkeen DMSO pitää pestä pois soluista hitaasti huoneenlämpötilassa (Gray ja Golub, 1984; Takahashi *et al.* , 1985a; Schuff-Werner *et al.* , 1988). DMSO:n "toksisuutta" on toisinaan pyritty vähentämään amidien, esim. formamidin, avulla, mutta se on osoitettu tarpeettomaksi tai jopa haitalliseksi (Fahy *et al.* , 1990).

Parhaaksi DMSO-pitoisuudeksi on todettu 5—10 tilavuusprosenttia. Silloin DMSO:n lisäys ja poisto eivät vielä yleensä aiheuta liian suurta osmoottista stressiä.

DMSO voi aiheuttaa ihmisillä mm. pahoinvointia, ja sillä on anti-inflammatorisia vaikutuksia. Tämän vuoksi DMSO ei sovellu leukosyyttien pakastukseen kliinisiä tarkoituksia varten, ellei soluja pestä ennen siirtoa potilaalle. DMSO myös tuhoaa monosyyttien ja granulosityttien tuottamia hapettavia molekyylejä ja radikaaleja, ja vaikuttaa oksidaasisysteemin mittaustuloksiin. Esimerkiksi 5 % (v/v) DMSO:ta alentaa neutrofiilien luminolivahvistetua kemiluminesenssia noin kolmanneksen ja yksikin prosentti DMSO:ta jo noin 10 % (Hastings *et al.* , 1982).

2.3.2 Glyserolit

Jo vuonna 1949 havaittiin, että glyseroli suojaa soluja pakastuksen aikana. Sittemmin sitä on käytetty mm. punasolujen pakastamiseen. Glyseroli läpäisee solukalvon hyvin hitaasti matalissa lämpötiloissa, ja aiheuttaa siksi vaurioita leukosyyteille, jotka ovat hyvin herkkiä osmoottisen stressille (Takahashi *et al.* , 1985b; Takahashi *et al.* , 1985c). Lymfosyyttejä on kuitenkin pakastettu myös glyserolissa (Areman *et al.* , 1988). Glyserolin etuna on, että sillä on vähemmän farmakologisia vaikutuksia kuin DMSO:lla, eikä sitä tarvitse välttämättä pestä pois.

Glyserolista on kehitetty myös paremmin membraanin läpäiseviä johdannaisia, esim. 3-metoksi-1,2-propanidioli. Tämäkään ei kuitenkaan suojaa soluja yhtä hyvin kuin DMSO (Schuff-Werner *et al.* , 1988), mutta sen kliiniset vaikutukset lienevät pienempiä.

2.3.3 Glykolit

Leukosyytit sietävät alhaisissa lämpötiloissa suuria glykolin ja glykolijohdannaisten pitoisuuksia (Takahashi *et al.* , 1985a). Siksi niitä on käytetty lähinnä vitrifikaatioon, jossa tarvitaan hyvin suuria suoja-aineväkevyyksiä.

2.4 Suojaavat lisäaineet

2.4.1 Hiilihydraatit

Disakkaridit suojaavat membraanin rakennetta ja toimintaa solun dehydraation aikana (Crowe *et al.* , 1983; Rudolph ja Crowe, 1985). Hiilihydraatit stabiloivat membraaneja mm. vähentämällä faasitransitioita, joita pienentynyt tilavuus ja suuri suolaväkevyys aiheuttavat. Trehaloosi sitoutuu solukalvon fosfolipidien polaarisiin ryhmiin (Anchordoguy *et al.* , 1987) ja syrjäyttää vesimolekyylejä. Trehaloosin suojavaikutus menetetään kuitenkin, jos pakastusliuos sisältää kalsiumia 50—100 mM (Bakás ja Disalvo, 1991). Jopa intrasellulaarinen vapaa kalsium heikentää trehaloosin tehoa. Ca^{2+} -pitoisuus voi vaikuttaa samalla tavalla muidenkin lipidikalvoja suojaavien aineiden tehoon. Pakastuksen jälkeen mm. sakkaroosi ja laktoosi vähentävät leukosyyttien aggregoitumista. Ne myös suojaavat proteiineja dehydraation aikana (Crowe *et al.* , 1988) ja estävät suurten suolapitoisuuksien aiheuttamia vaurioita.

2.4.2 Aminohapot

Aminohapoista glutamiini ja proliini suojaavat soluja varsin pienissä pitoisuuksissa. *L*-Glutamiini suojaa pakastettavia soluja jo noin 20 mM pitoisuudessa, mutta suoja on riittämätön yksinään. Muut suoja-aineet DMSO, PG, HES ja glyseroli eivät vaikuta glutamiinin tarjoamaan suojaan (Kruuv *et al.* , 1990), joten sitä kannattaa käyttää yhdessä esim. DMSO:n kanssa. Glutamiinin suojavaikutus kohdistuu lähinnä kalvoihin (Kruuv ja Glofcheski, 1992). Proliinia käyttävät pakkassuojana mm. jotkut hyönteiset ja meren selkärangattomat eläimet.

Se suojaa membraaneja muodostamalla hydrofobisia sidoksia lipidien asyyliketjujen kanssa (Rudolph ja Crowe, 1985; Anchordoguy *et al.*, 1987).

2.4.3 Askorbiinihappo

Askorbiinihappo saattaisi suojata membraanien rasvahappoja ja entsyymejä hapettumiselta yhdessä E-vitamiinin (β -tokoferolin) kanssa; ilman E-vitamiinia se saattaa jopa lisätä lipidien peroksidaatiota. Askorbiinihapon lisäämistä voitaisiin harkita varsinkin happiradikaaleja tuottavia fagosyyttejä pakastettaessa. Askorbiinihappo ei kuitenkaan siirry leukosyytteihin ilman inkubointia $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, ja askorbiinihappo voi vaikuttaa sulatuksen jälkeen mittaustuloksiin, mm. aktivoitujen granulosityttien happiradikaalituotantoon (Bolscher *et al.*, 1984).

2.4.4 Polymeerit

Polymeerejä (esim. HES, dekstraani ja Ficoll) käytetään yksinään suoja-aineena monien solutyypin pakastuksessa, esimerkiksi punasoluja on pystytty pakastamaan kohtalaisesti pelkän HES:in avulla. Leukosyyttejä on usein pakastettu niin, että suoja-aineena on sekä DMSO että jokin polymeeri (Bank, 1980a; Lionetti *et al.*, 1980; Makino *et al.*, 1991; Neronov *et al.*, 1992).

Polymeerit eivät läpäise membraaneja, vaan ne vähentävät ekstrasellulaarisen jään syntyä ja kidekokoja. Kun niitä käytetään yhdessä membraaneja läpäisevän suoja-aineen kanssa, optimaalinen jäähdytysnopeus nousee alle 1° :eesta minuutissa noin 10 asteeseen; hitaammassa jäähdytysnopeudessa polymeereistä saattaa olla jopa haittaa (Bank, 1980b).

Polymeerit voivat pahentaa leukosyytteihin kohdistuvaa osmoottista shokkia suoja-aineita lisättäessä, mutta poislaimennuksessa ne vähentävät solujen paisumista. Polymeerien omat osmoottiset vaikutukset on kuitenkin usein jätetty huomiotta liuoksia valmistettaessa, mikä on saattanut aiheuttaa tutkimustulosten virhetulkintoja.

2.4.5 Seerumivalmisteet

Autologista seerumia, FCS:ää, HSA:ta ja BSA:ta on usein käytetty pakastus- ja laimennusliuoksissa (Bank, 1980a). Seerumiproteiinit parantavat leukosyyttien säilyvyyttä muulloin kuin pakastuksen aikana. Niiden hyödyllisyydestä pakastussuspensioissa on kuitenkin ristiriitaista tietoa. Tämä saattaa johtua seerumien mahdollisesti sisältämistä kalsiumista ja leukosyyttejä aktivoivista tai passivoivista tekijöistä, sekä erilaisista pakastusmenetelmistä, joissa seerumi saattaa suojata soluja joltakin sellaiselta vauriolta, esimerkiksi DMSO:n laimennuksen aiheuttamalta, joka toisessa menetelmässä on muutenkin merkityksetön.

Seerumivalmisteet vaikuttavat leukosyyttien toimintaan, mm. alentaen aktivoituneiden granulosityttien kemiluminesenssivastetta (Hastings *et al.* , 1982). Siksi ne on pestävä sulatusten jälkeen pois, ainakin jos soluja aiotaan käyttää CL-mittauksissa.

2.5 Puskurit

Puskuriliuos, johon solut on suspensoitu, ja johon suoja-aineet on liuotettu, voi vaikuttaa hieman optimaaliseen jäähdytys- ja sulatusnopeuteen, sekä joidenkin suoja-aineiden

ominaisuuksiin. Tavallisia puskureita ovat PBS ja HBSS, mutta kasvatusliuoksiakin, kuten RPMI 1640:tä, on käytetty paljon.

Kalsium- ja magnesiumionien vaikutuksesta pakastuksen onnistumiseen on hyvin ristiriitaisia havaintoja. Pakastusliuoksissa on usein käytetty puskureita, jotka eivät sisällä kalsiumia ja magnesiumia, ja silloin kun liuoksiin on lisätty seerumivalmisteita, on nämä ionit sidottu esim. EDTA:lla (Lionetti *et al.*, 1980). Kalsium voi vähentää solukalvon pinnalla vaikuttavien suoja-aineiden tehoa (esim. trehaloosi), mutta toisaalta sen on myös havaittu lisäävän lipidikalvojen stabiiliutta (Bakás ja Disalvo, 1991). Käytännössä pakastusliuosten kalsium- ja magnesiumionimäärillä ei liene todellista merkitystä, sillä soluorganelleissa on kuitenkin suuret intrasellulaariset kalsiumvarastot.

Takahashin *et al.* (1985a) mukaan suolojen ja solukalvoa läpäisemättömien aineiden konsentraatio olisi pidettävä vakaana molaarisuutena (g/L) eikä molaalisuutena (g/L H₂O) liukoisia suoja-aineita, erityisesti glyserolia, käytettäessä. Myös polymeerien, esim. HES:in, aiheuttama muutos liuoksen osmolaalisuudessa olisi otettava huomioon. Useimmiten näin ei ole kuitenkaan tehty, joten merkitys ei liene kovin suuri.

2.6 Vitrifikaatio

2.6.1 Vitrifikaation periaate

Vitrifikaatiossa pyritään siihen, että solun sisäinen ja ulkoinen neste jähmettyisi lasimaiseksi massaksi. Tällöin vältetään jääkiteiden muodostuminen ja siihen liittyvät biologisen

materiaalin mekaaniset ja osmoottiset vauriot. Menetelmä perustuu näytteen hyvin nopeaan jäädyttämiseen ja sulattamiseen, minkä lisäksi tarvitaan suuria suoja-ainepitoisuuksia (noin 25–40 %).

2.6.2 Vitrifikaatioliuokset

Toistaiseksi vitrifikaatio on aikaansaatu parhaiten erilaisilla polyalkoholeilla, mutta myös monenlaisia DMSO:n ja polymeerien seoksia on käytetty. Suoja-aine ei saa olla toksinen suurissakaan pitoisuuksissa ja sillä pitää olla hyvä membraanien läpäisykyky sekä mahdollisimman alhaiset jäähdytys- ja lämmitysnopeudet. Propaani-1,2-diolia eli propyleeniglykolia (PG) on käytetty sekä yksinään että yhdessä muiden yhdisteiden kanssa, sillä se läpäisee hyvin solukalvon, ja solut kestävät hyvin melko suuria PG-pitoisuuksia. Lupaavimpia tähän mennessä tutkittuja aineita ovat *levo*- ja *dekstro*-butaani-2,3-dioli sekä niiden raseeminen seos; vitrifikoituminen tapahtuu alemmalla jäähdytysnopeudella kuin PG:llä, glyserolilla tai butaani-1,3-diolilla (Boutron, 1990). PEG ja glukoosi alentavat vielä merkittävästi tarvittavaa jäähdytysnopeutta (Sutton, 1991). Sulatuksen onnistuminen ilman kiteiden muodostumista edellyttää kuitenkin yhä erittäin nopeaa lämmitystä.

2.6.3 Vitrifikaation käyttömahdollisuudet

Vitrifikaatiossa vältetään jääkiteiden muodostuessa ja sulaessa tapahtuva osmoottinen stressi, joten se voisi soveltua hyvin herkkien solutyypin, kuten granulosityyppien, säilyttämiseen. Toistaiseksi vitrifikaation aikaansaamiseen tarvitaan kuitenkin suuria suoja-ainepitoisuuksia,

joiden lisääminen ja poistaminen sinänsä vaurioittaa soluja. Vitrifikaatiossa näytteiden jäähdytysnopeus ja erityisesti lämmitysnopeus sulatettaessa ovat kriittisiä. Koko näyte pitäisi devitrifikaation välttämiseksi saada sulatettua noin 1–10 sekunnin kuluessa. Suurempia suoja-aineväkevyyksiä käyttämällä selvittää alemmilla jäähdytys- ja lämmitysnopeuksilla, mutta leukosyytit eivät kestäisi niitä. Vaadittujen lämmitysnopeuksien aikaansaaminen edellyttää pientä näytetilavuutta ja esim. mikroaaltojen käyttöä.

Vitrifikaatio on havaittu hyväksi säilytysmenetelmäksi monille solutyypeille, esim. hiiren embryoilta (Kasai *et al.* , 1990). Toisaalta mm. punasolujen vitrifikaatioyritykset ovat johtaneet voimakkaaseen hemolyysiin ja vitrifikoidut verihiutaleet ovat aggregoituneet heikosti (Arnaud ja Pegg, 1990). Monosyyttejä on onnistuttu vitrifikoimaan melko hyvin (Takahashi *et al.* , 1986), mutta ne säilyvät hyvin myös perinteisin menetelmin. Vitrifikaatiolla ei nykyisellään ole merkitystä leukosyyttien säilytyksessä kliinisiin tai analyttisiin tarkoituksiin.

3 VAURIOIDEN HAVAITSEMINEN

3.1 Fagocytoosi ja oksidaasiaktiivisuus

Granulosyyttien, monosyyttien ja makrofaagien fagocytoosikykyä on käytetty paljon pakastusvaurioiden selvittämiseen. Fagocytoositesteissä olisi kiinnitettävä huomiota siihen, että kohde on todella ingestoitu, eikä vain sitoutuneena fagosyytin pintaan, sillä epäspesifistä adheroitumista voi tapahtua pahastikin vaurioituneisiin soluihin. Leukosyyttien vauriot voivat kuitenkin paljastua vasta ingestoitujen bakteerien tuhoamisessa.

Helpoin ja herkin menetelmä havaita vauriot lienee fagosyyttien oksidaasiaktiivisuuden mittaaminen esimerkiksi kemiluminesenssin avulla; sen säilyminen todistaa, että solukalvolla on yhä tarvittavat reseptorit, solut kykenevät fagosytoosiin, ja niiden energiantuotanto toimii. Pulmana ovat pakastuksen yhteydessä kuolleet solut ja niistä vapautuneet aineet, jotka voivat aktivoida tai inhiboida elävien leukosyyttien toimintoja (van Lambalgen *et al.* , 1979); esimerkiksi verihiutaleet ja niiden lyaatti inhiboivat granulosityttien fMLP:llä ja PMA:lla *in vitro* indusoitua superoksidituottoa (McGarrity *et al.* , 1988).

3.2 Kemotaksis

Leukosyyttien suunnatun migraation mittaaminen on hidas, mutta luotettava menetelmä. Esimerkiksi granulositytit menettävät kykynsä kemotaksikseen herkemmin kuin kykynsä fagosytoosiin (Bank, 1980a). Solujen säilytys puutteellisissa mediumissa saattaa kuitenkin vaikuttaa myös kemotaksikseen. Satunnainen migraatio on erotettava suunnatusta, sillä se säilyy usein paremmin (Myhrvold ja Mørland, 1985).

3.3 Morfologia ja värjäykset

Leukosyyttien morfologinen tarkastelu valomikroskoopilla voi antaa harhaanjohtavan kuvan solujen kunnosta; mm. granulositytit näyttävät heti sulatuksen jälkeen normaaleilta (Bank, 1980a), vaikka ovat menettäneet kokonaan toimintakykynsä. Elektronimikroskooppikuvassa on usein voitu havaita vaurioita mm. granuloissa (fagolysosomeissa) ja mitokondrioissa. Leukosyyttien viabiliteetti on monissa tutkimuksissa määritetty vain plasmamembraanin

ehyettä mittaavilla väriaineilla, esimerkiksi FDA-, TB- ja EB-värjäyksellä. Ehjät solut keräävät FDA:ta (fluorescein diacetate) ja hydrolysoivat sen fluoresoivaksi yhdisteeksi, mutta eivät päästä TB:tä (trypan blue) ja EB:tä (ethidium bromide) sisään. Tällä tavoin ehjiksi todetut solut ovat kuitenkin usein menettäneet fagosyyttistä tai kemotaktista aktiivisuuttaan (van der Meulen *et al.* , 1981; Luscincas *et al.* , 1983; Takahashi *et al.* , 1985c; McGann *et al.* , 1988). NBT-pelkistyskoe voi antaa hieman luotettavamman kuvan solujen tilasta (McGann *et al.* , 1981): siinä granulosityttejä inkuboidaan +37 °C:eeassa NBT:n läsnäollessa ja annetaan ingestoida esimerkiksi lateksipartikkeleita, jolloin keltainen NBT pelkistyy solujen happiryöpsähdyksen yhteydessä siniseksi yhdisteeksi (formazan).

3.4 Jakaantuminen

Lymfosyyttien ja kantasolujen tilaa voidaan tarkkailla seuraamalla niiden jakaantumiskykyä. Pakastetut lymfosyytit saavuttavat yleensä normaalin jakaantumisenopeuden myöhemmin kuin tuoreet solut. Kuolleet ja lyoituneet solut, myös erytrosyytit ja trombositit, voivat vaikuttaa jakaantumiseen. Muutokset mononukleaarisolujen populaatioiden suhteissa voivat jopa lisätä pakastettujen solujen jakaantumista (Venkataraman ja Westerman, 1990).

3.5 Viabiliteettitesteihin vaikuttavia seikkoja

Sulatuksen jälkeinen käsittely vaikuttaa leukosyyttien ominaisuuksiin ratkaisevasti. Pesut vaurioittavat soluja ja muuttavat solupopulaatioiden suhteita; erityisesti aktivoituneet solut kuolevat helpommin pesuissa, ja pesut voivat jo sinällään aktivoida fagosyyttejä. Toisaalta

pesussa päästään eroon myös kuolleista soluista ja niistä vapautuneista liukoisista välittäjä-aineista. Varsinkin plasmaproteiineja on vaikea pestä pois, ja plasmatuotteet, kuten HSA, FCS ja BSA, alentavat polymorfonukleaaristen leukosyyttien luminolivahvistettua CL-vastetta (Briheim *et al.* , 1984; Hastings *et al.* , 1982; Holt *et al.* , 1984). FCS voi indusoida lymfosyyttejä (Næss *et al.* , 1986). Sulatuksesta mittauksen alkuun kulunut aika, sekä itse mittauksen kesto, voivat vaikuttaa tuloksiin: Pakastetut granulositytit menettävät nopeasti toimintakykynsä +37 °C:ssa (Bank, 1980a; Frim ja Mazur, 1983). Lymfosyytit ja monosyytit taas saattavat korjata vaurionsa inkuboinnin aikana. Leukosyyttien biokemialliset toiminnot säilyvät parhaiten +4 °C:ssa, mutta tällöin niiden pintareseptorien määrä vähentyy ja niiden palautumiseen tarvitaan inkubointi +37 °C:ssa (Roos ja de Boer, 1986; Dransfield *et al.* , 1988). Monosyytit aggregoituvat spontaanisti säilytettäessä varsinkin alhaisessa lämpötilassa (Mentzer *et al.* , 1986). Polymorfonukleaaristen leukosyyttien ja monosyyttien komplementti-reseptorien määrä plasmamembraanilla riippuu mm. lämpötilasta ja puskurista (Fearon ja Collins, 1983). Jo pelkkä leukosyyttisuspension voimakas sekoitus lisää Fc- ja C3b-reseptoreita ekspressoivien granulosityttien ja lymfosyyttien osuutta, vaikkakaan ei kemiluminesenssia (Næss *et al.* , 1986). Koostumukseltaan monipuoliset kasvatusliuokset alentavat CL-vasteita, mutta solut säilyvät niissä paremmin.

Liuosten Ca²⁺-pitoisuus vaikuttaa solukalvon toimintaan ja leukosyyttien aktivoitumiseen. Antikoagulantteina käytetyt EDTA ja sitraatit sitovat kalsiumia ja voivat mm. irrottaa pysyvästi pintareseptoreita sekä heikentää fagosytoosia. Leukosyyttien puhdistuksessa käytettävät aineet, esim. Ficoll-Hypaque, sisältävät vaihtelevia määriä EDTAa. Antikoagulanttina käytetty hepariini voi vaikuttaa NBT-testiin (Rothwell ja Dumas, 1975) ja tekee verihiutaleista mikroagregaatteja, jotka tapaavat sitoutua lujasti leukosyytteihin (Pertoft

et al. , 1980). Heparini sitoutuu spesifisesti polymorfonukleaarisiin leukosyytteihin (Leculier *et al.* , 1992) ja monosyytteihin (Leung *et al.* , 1989), ja vaikuttaa ainakin PMNL:ien oksidatiiviseen metaboliaan ja degranulaatioon (Cairo *et al.* , 1983).

4 ERILAISTEN SOLUTYYPPIEN SÄILYMINEN

4.1 Lymfosyytit

4.1.1 B-lymfosyytit

Lymfosyyttien rakenne, reseptorit ja biokemialliset toiminnot, mm. blastogeneesi vasteena mitogeneille ja liukoisille antigeeneille, säilyvät pakastuksessa hyvin (Oldham *et al.* , 1976; Simon *et al.* , 1977; Sears *et al.* , 1978; Sleese *et al.* , 1980; Donaldson *et al.* , 1981; Venkataraman ja Westerman, 1986; Hviid *et al.* , 1993). B-lymfosyytit pakastetaan yleensä yhdessä muiden mononuklearisolujen kanssa, ja optimaalisia menetelmiä käytettäessä lymfosyyttien alaryhmien osuudet eivät muutu merkittävästi (Glassman ja Christopher, 1984; Fujiwara *et al.* , 1986; Tollerud *et al.* , 1991).

4.1.2 T-lymfosyytit

T-lymfosyyttien pakastus onnistuu melko hyvin (Donaldson *et al.* , 1981; Szigeti *et al.* , 1981; Hviid *et al.* , 1993). HLA- ja pintamarkkerimääritykset voidaan tehdä pakastetuista

T-lymfosyyteistä. Jos mononukleaarisoluja ei saada eristettyä riittävästi, niin niitä voidaan lisätä IL-2-kasvatuksella näytteen pakastuksen jälkeenkin (Kubo *et al.* , 1991).

Kirjallisuudessa on esitetty ristiriitaisia näkemyksiä alaryhmien suhteiden muutoksista pakastuksessa: Joidenkin mielestä merkittäviä muutoksia ei tapahdu, mutta varsinkin Venkataraman *et al.* (1992) epäilevät, että T_s -solut menettävät pakastuksessa aktiivisuuttaan verrattuna T_h -soluihin, mikä osaltaan johtaisi heidän havaitsemaansa lisääntyneeseen IL-1 ja IL-2-tuotantoon ja solujakautumisen lisääntymiseen. Mieli-pide-erot johtunevat erilaisista puhdistus- ja pakastusmenetelmistä, sillä solujen pakastus ei-optimaalisissa olosuhteissa johtaa helposti T-lymfosyyttien vaurioihin (Hirsén *et al.* , 1983; Ichino ja Ishikawa, 1985). Huolellisesti kehitellyllä menetelmällä pakastettaessa lymfositopopulaatioiden suhteet eivät muutu (Hviid *et al.* , 1993). Usein mukana on pakastettu myös monosyytit, jolloin niiden säilyminen vaikuttaa myös lymfositien toimintaan, varsinkin kun lymfositteille optimoitu pakastusmenetelmä ei ole välttämättä monosyyteille paras mahdollinen. T-lymfosyyttejä pakastettaessa tulisi jäädytysnopeuden olla 0.5 °C/min, eikä yleisimmin käytetty, B-lymfositteille ja monosyyteille sopiva 1 °C/min (Milson ja Keller, 1982).

Pakastettujen LAK-solujen sytotoksisuus on vähentynyt (Letellier *et al.* , 1991), mutta palautuu normaaliksi uudessa inkuboinnissa rIL-2:n kanssa (Schmidt-Wolf *et al.* , 1989). Pakastetuista lymfositteistä indusoituja LAK-soluja voidaan mahdollisesti käyttää eräiden syöpätyyppien adoptiivisessa immunoterapiassa.

4.2 Fagosyytit

4.2.1 Monosyyttiset solut

Veren monosyyttiset solut muodostavat varsin heterogeenisen leukosyyttiryhmän. Monosyytti-makrofaagilinjan solujen tehtävät ovat monimuotoisempia kuin millään muulla tutkitulla solutyypillä; ne osallistuvat elimistön tapahtumien säätelyyn, mutta toimivat myös itse.

Luuytimessä kypsyvät varsinaiset monosyytit viipyvät verenkierrossa noin 3 vrk. Monosyytit vastaavat tiettyihin ärsykkeisiin siirtymällä kudoksiin ja kehittymällä erikoistuneiksi soluiksi, kuten maksan Kupferin solut, dendriittisolut tai makrofaagit, jotka voivat siirtyä toimimaan jopa kehon ulkopuolelle.

Monosyytit kestävät pakastuksen yleisesti ottaen hyvin (de Boer *et al.* , 1981; van der Meulen *et al.* , 1981; Weiner ja Norman, 1981; Tsvetkov *et al.* , 1986). Pakastettujen monosyyttien kyky fagosytoida bakteereja ja käynnistää oksidaasisysteeminsä säilyy ennallaan (Myhrvold ja Mørland, 1985; Hansen *et al.* , 1995), mutta kemotaksis saattaa vähentyä (Stevenson *et al.* , 1984). Veren monosyytit muodostavat kuitenkin eri maturaatio- ja aktivointivaiheiden jatkumon (Dransfield *et al.* , 1988). PGE-2:ta tuottavat monosyyttien ja makrofaagien alapopulaatiot saattavat menettää pakastuksessa suppressoriaktiivisuuttaan, jolloin mononukleaarisolujen IL-1- ja IL-2-tuotto kasvaa, mikä voi näkyä pakastettujen mononukleaarisolujen lisääntyneenä jakaantumisenä ja immunoglobuliinituottona (Venkataraman ja Westerman, 1987; Venkataraman ja Westerman, 1990; Venkataraman *et al.* , 1992; Venkataraman, 1992; Venkataraman, 1994). Kun monosyyttejä ei ole inkuboitu pakastuksen

jälkeen, on niiden kyvyn lisätä PWM-indusoitua lymfosyyttien jakaantumista havaittu vähenevän (Stevenson *et al.* , 1984).

Mononukleaarisolujen pakastuksessa ja siihen liittyvissä pesuissa monosyyttien saanto on yleensä hyvä, noin 75 %, ja hävikit tapahtuvat lymfosyyttipopulaatioissa (Shah *et al.* , 1984), ellei pakastusta ole optimoitu nimenomaan lymfosyyteille (Hviid *et al.* , 1993). Lisääntynyt monosyyttien osuus lienee aiheuttanut virhetulkintoja joissakin aikaisemmissä tutkimuksissa.

Pakastettuja monosyyttejä on käytetty tuoreiden solujen sijasta ainakin fibriinitutkimuksessa (Kierulf ja Andersen, 1991).

Verenkierrosta eristetyistä monosyyteistä ja monosyyttien prekursoreista voidaan valmistaa gamma-interferonin avulla makrofaageja, jotka ovat kasvainsytotoksisia ja tehokkaita lymfokiinien erittäjiä. Niitä voidaan käyttää autologisesti adoptiivisessa immunoterapiassa (Andreesen *et al.* , 1990; Andreesen ja Henneman, 1991); ne voidaan helposti säilyttää pakastettuina.

4.2.2 Granulosyytit

4.2.2.1 Neutrofiilit

Ihmisen neutrofiilit ja verihiutaleet ovat poikkeuksellisia: niitä ei kyetä tyydyttävästi pakastamaan suspensioina (Bank, 1980a; Owens *et al.* , 1991). Kummatkin solutyypit sisältävät runsaasti granuloita, jotka vaurioituvat jäätyamisen aikana, mutta vahinko näkyy vasta kun granuloista vapautuneet entsyymit aktivoituvat +37 °C:ssa (Lionetti *et al.* , 1980; Rowe ja Lenny, 1980; Frim ja Mazur, 1983). Granulosyytit eivät myöskään säily normaaleissa

veripankkiolosuhteissa kuin 1–3 vrk (Yamashita ja Hirai, 1981; Hammer *et al.* , 1986). Sekä elimistössä että kasvatusliuoksissa neutrofiilit käyvät läpi ohjelmoidun kuoleamisen eli apoptoosin, jossa mm. niiden DNA pilkkoutuu. Apoptoosin edistyessä neutrofiilien solukalvossa tapahtuu muutoksia, joiden takia makrofaagit alkavat fagosytoida niitä. Vuorokauden kasvatuksen jälkeen +37 °C:ssa jo yli puolet neutrofiileista voi olla apoptoottisia, vaikka ne Trypan blue -kokeen perusteella näyttäisivätkin eläviltä.

Takahashi *et al.* (1985c) ovat havainneet, että hyperosmoottinen stressi irrottaa polymorfonukleaarista leukosyyteistä IgG-, C3b- ja C3bi-reseptoreita jo 600 mOsm pitoisuudessa, mikä osaltaan johtaa fagosytoosikyvyn menettämiseen. FDA- ja EB-testin mukaan solukalvo ja morfologia säilyvät ehjinä vielä 750 mOsm liuoksessa, vaikka kemotaksis jo heikkenee (Takahashi *et al.* , 1985b). Sen sijaan monosyytit kestävät jopa 1400 mOsm väkevyyden ilman, että niiden fagosytoosi estyy (Takahashi *et al.* , 1985c).

Neutrofiilien onnistuneesta pakastuksesta on aiemmilta vuosilta useita artikkeleita, mutta ne pohjautuvat puutteellisiin viabiliteettitesteihin. Granulosyytit eivät pysty jakautumaan, minkä vuoksi niiden säilymistä joudutaan mittaamaan epäsuorilla menetelmillä. Esimerkiksi trypan blue -ekskluusiokoe ja fluoresenssileimaus FDA:lla tai etidiumbromidilla antavat positiivisia tuloksia, vaikka granulosyytit eivät enää kykenisi fagosytoosiin (McGann *et al.* , 1981). Ns. fagosytoosikokeissakin on usein mitattu pelkkää adherenssia.

Vaurioituneet granulosyytit aggregoituvat sulatuksen jälkeen nopeasti, varsinkin pesuissa. Tätä voidaan estää alhaisella pH:lla, hypotonisella puskurilla ja plasmaproteiineilla (Tsvetkov *et al.* , 1987), sekä deoksiribonukleaasilla ja välttämällä sentrifugointia (Rowe ja Lenny, 1980; Hill *et al.* , 1981).

4.2.2.2 Sytoplastit

Granulosyyteistä valmistetut sytoplastit sisältävät vain harvoja granuloita (fagolysosomeja), joissa olevat entsyymit aiheuttavat pakastettujen granulosyyttien tuhoutumisen. Sytoplasteissa ei ole myöskään tumaa, josta vapautuva DNA aiheuttaa vaurioituneiden neutrofiilien aggregaatiota (Voetman *et al.* , 1984). Sytoplastit voidaan valmistaa eri tavoin: ultrasentrifugilla sytokalasiini-B:n avulla tai ilman (ns. U-sytoplastit), tai lämmittämällä pintoihin kiinnittyneitä granulosyyttejä (ns. sytokineplastit). Sytokineplasteja syntyy neutrofiileista ja eosinofiileista, mutta ei hitaampiliikkeisistä monosyyteistä (Malawista ja de Boisfleury-Chevance, 1982).

Sytoplastit, jotka on valmistettu sytokalasiini-B:n avulla, pystyvät jonkin verran fagosytoimaan ja myös tappamaan bakteereja (Roos *et al.* , 1983), sekä aggregoitumaan ja muuttamaan muotoaan fMLP:n vaikutuksesta, mutta tarvitsevat suuremman fMLP-väkevyyden kuin neutrofiilit (Korchak *et al.* , 1983). Niiden tilavuus tai fMLP-reseptorien määrä ei kuitenkaan kasva aktivoitumisessa, eivätkä ne kykene kerran aggregoiduttuaan enää irrottautumaan toisistaan (Gallin *et al.* , 1984). Sytoplastien oksidaasisysteemi pystytään aktivoimaan myös opsonisoidulla zymosaanilla, mutta niiden kemotaksis on vähentynyt (Roos *et al.* , 1983; Gallin *et al.* , 1984). Sytoplastien valmistus aiheuttaa granuloiden fuusiota plasmamembraaniin (Petrequin *et al.* , 1986), mikä voi vaikuttaa niiden ominaisuuksiin.

Ilman sytokalasiini-B:tä valmistetut U-sytoplastit säilyttävät sekä aktivoituvan oksidaasisysteemin että kemotaksiksen (Malawista ja Van Blaricom, 1987). Ne ovat kuitenkin menettäneet osan liikkumiseen tarvittavista rakenteistaan, jolloin kemotaksis ja siirtyminen solukerrosten läpi on heikentynyt (Huang *et al.* , 1991). U-sytoplastien saanto on vain

10—40 % (Malawista *et al.* , 1989), kun sytokalasiini-B:n avulla saanto on lähes 100 % (Lo *et al.* , 1989).

Sytokineplastit ovat kemotaktisia vielä pakastuksen jälkeenkin, nopeuden ollessa samaa kertaluokkaa kuin tuoreilla granulocyteilla (Malawista ja de Boisfleury-Chevance, 1991) ja ne kykenevät ingestoimaan ja tappamaan bakteereja (Keller ja Bessis, 1975), mutta niillä ei ole aktivoituvaa oksidaasisysteemiä (Dyett *et al.* , 1985).

Kaikki sytoplastit säilyttävät biokemialliset ominaisuutensa pakastettaessa erinomaisesti (Voetman *et al.* , 1984; Roos ja Voetman, 1986; Malawista *et al.* , 1989), ja ne säilyvät myös +4 °C:ssa merkittävästi pidempään kuin alkuperäiset granulocyteit (Malawista *et al.* , 1985). Sytoplastit kestävät myös pakastuksen jälkeisen inkuboinnin +37 °C:ssa, toisin kuin neutrofiilit, vaikka niiden solukalvon rakenne ja osmoottiset ominaisuudet ovat samanlaiset (Yang *et al.* , 1992). Koska sytoplastit ovat rakenteeltaan yksinkertaisempia, niitä voidaan käyttää granulocyteitutkimukseen (Lo *et al.* , 1989). Pakastetuilla sytoplasteilla on tuskin kliinisiä sovelluksia, sillä niiden kyky fagositoida ja tappaa bakteereita on liian huono; sen sijaan niiden suurin merkitys lienee laboratorioden pysyvänä tutkimus- ja vertailumateriaalina.

4.3 NK-aktiivisuus

Osalla makrofaageista ja T-lymfocyteista on NK-aktiivisuutta (natural killer), jota mitataan esimerkiksi sytotoksisuudella K562-soluja vastaan. NK-solut säilyvät huolellisella pakastuksella hyvin (Ichino ja Ishikawa, 1985; Letellier *et al.* , 1991; Hviid *et al.* , 1993). Epätäydelliset pakastusmenetelmät voivat alentaa NK-sytotoksisuutta (Hirsén *et al.* , 1983) ja Fc-reseptorien määrää, mutta inkubointi +37 °C:ssa palauttaa nämä ennalleen (Pross ja Maroun, 1984;

Fujiwara *et al.* , 1986; Yang *et al.* , 1987). On epäilty, että NK-solujen B-soluja suppressoiva aktiivisuus vähenisi pakastuksessa (Venkataraman ja Westerman, 1987).

4.4 Kantasolut

Luuytimeistä eristettyjä hemopoieettisia kantasoluja pystytään pakastamaan tyydyttävästi (Gorin, 1986; Beaujean *et al.* , 1991), mikä mahdollistaa autologiset siirrot, joissa voidaan välttää hylkimisreaktiot. Autologiset luuydinsiirrot on hyväksytty hoitomuodoksi mm. akuutissa leukemiassa. Normaalit kantasolut ovat voimakkaassa kasvussa ja kestävät hyvin pakastusta sekä korjaavat vauriot nopeasti, mutta leukemiasolut sietävät pakastusta selvästi heikommin (Allieri *et al.* , 1991).

Leukosyyttien kantasoluja saadaan eristettyä myös verestä leukafereesillä tai monosyyttifraktion mukana niin runsaasti, että niitä voidaan käyttää terapeuttisiin tarkoituksiin. Ne ovat kuitenkin fysiologisesti erilaisia verrattuna luuytimen kantasoluihin. Periferaalisten kantasolujen pakastus onnistuu hyvin (Scheiwe *et al.* , 1981; Lasky *et al.* , 1982; Adam *et al.* , 1990; Kessinger *et al.* , 1991). Kantasolut voidaan pakastaa jopa ilman kontrolloitua jäähdystystä ja siihen tarvittavia laitteita (Makino *et al.* , 1991). Veren lymfosyyttien ja kantasolujen siirrolla on etuina luuydinsiirtoon verrattuna mm. helpompi solujen toistuvakin eristys ja anestesian välttäminen. Lisäksi syöpäsolut kerääntyvät lähinnä luuytimeen, eivätkä ole niinkään veressä. Sopivilla lääkeaineilla voidaan lisätä hemopoieettisten kantasolujen määrää verenkierrrossa ennen eristystä.

Pakastetut kantasolut on usein annettu potilaalle heti sulatuksen jälkeen ilman pesua.

Pakastetut solut tulisi kuitenkin pestä DMSO:n ja lysoituneiden solujen toksisten vaikutusten välttämiseksi, vaikka siitä seuraisikin pieni hävikki (Beaujean *et al.* , 1991).

4.5 Leukemiasolulinjat

Leukosyyttitutkimuksissa yleisimmin käytettyjä leukemiasolulinjoja ovat HL-60, THP-1 ja U937. Ne kestävät myös pakastuksen hyvin, ja niitä voidaan kasvattaa soluviljelmissä jatkuvasti ja tarvittaessa aikaansaada jakaantumisen pysähtyminen ja erilaistuminen (Harris ja Ralph, 1985; Collins, 1987; Capeillère-Blandin *et al.* , 1990; Auwerx, 1991). Näin saadaan haluttu määrä esim. monosyyttejä, eosinofiilejä tai basofiileja muistuttavia soluja, joita voi olla muuten vaikea saada eristettyä tarpeeksi paljon. HL-60-soluista (morfologialtaan promyelosyyttejä) voidaan tuottaa indusoimalla esim. DMSO:lla, PMA:lla tai RA:lla neutrofiileja, IL-5:llä eosinofiileja, ja RA:n sekä gamma-interferonin tai PMA:n ja $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$:n avulla monosyyttejä ja makrofaageja. U937-soluista (monoblasteja) saadaan tuotettua monosyyttejä RA:lla yhdessä gamma-interferonin kanssa. Monosyyttisen leukemiasolulinjan THP-1 solut muistuttavat monosyyttejä mm. morfologialtaan, erityistuotteiltaan ja membraanin antigeeneiltään, ja niistä voidaan tuottaa PMA:lla makrofaageja (Auwerx, 1991). Leukemia-T-solulinjoja ovat mm. CEM ja Jurkat. KU812 on basofiilinen leukemiasolulinja. Lymfooma-B-solulinjoja ovat mm. Raji ja BJAB, joista ainakin Raji-solut kestävät pakastusta. Myös monoklonaalisten vasta-aineiden valmistukseen tarvittavat myeloomasolut, lymfosyytit ja edellisten hybridoomasolut voidaan pakastaa tyydyttävästi (Neronov *et al.* , 1992).

Viljelmissä tuotetut leukosyytit eivät kuitenkaan aina vastaa täysin luonnollisia soluja (Capeillère-Blandin *et al.* , 1990). Erot erilaistumisen indusoinnissa johtavat erilaisiin ominaisuuksiin. Jatkuvassa viljelyssä voi tapahtua myös mutaatioita, minkä seurauksena solulinjoista on lukuisia variantteja eri laboratorioissa.

Ziegler-Heitbrock *et al.* (1988) ovat saaneet aikaan jatkuvan solulinjan (Mono Mac) ihmisen monosyyteistä. Solujen väitetään kykenevän normaaliin fagosytoosiin ja reaktiivisen hapen tuottoon sekä olevan morfologisesti, sytokemiallisesti ja immunologisesti monosyyttejä. Solut voidaan pakastaa.

5 PAKASTUSVAURIOILLE ALTISTAVIA TEKIJÖITÄ

Leukosyyttien puhdistusmenetelmät, esimerkiksi punasolujen hävitys hypotonisella shokilla tai NH_4Cl -käsittelyllä, voivat vaurioittaa soluja niin, että ne eivät kestä yhtä hyvin pakastusta (Venkataraman ja Westerman, 1986). Puhdistus voi myös johtaa leukosyyttien alapopulaatioiden suhteiden muutoksiin: Monosyyttien eristäminen tehdään usein adherenssiin perustuvilla menetelmillä, jolloin menetetään ei-adherentit monosyytit. Tiheyteen perustuvat menetelmät taas saattavat suosia esim. nuoria monosyyttejä. Verisolujen tiheydet voivat muuttua erotuksen aikana; fagosyytit voivat ingestoida gradienttimateriaalia (Wakefield *et al.*, 1982) ja samalla aktivoitua.

Pakastettavien solususpensioiden pitäisi olla mahdollisimman pieniä tilavuudeltaan, jotta jäähdytys ja sulatus tapahtuisivat riittävän nopeasti ja tasaisesti. Solususpensio ei kuitenkaan saisi olla liian tiheä: ainakin punasolujen on havaittu vaurioituvan enemmän kun hematokriitti on suuri (Pegg, 1981). Gorin (1986) on aggregoitumisen välttämiseksi pakastanut kantasoluja suspensioina, joissa on alle 20 miljoonaa solua millilitrassa. Jos solususpensio ei sisällä granulosityttejä, saa solutiheys olla suurempikin.

Leukosyyttien luovuttajan fysiologinen tila voi vaikuttaa leukosyyttien pakastuskestävyyteen. Monet infektiosairaudet ja niiden hoito muuttavat leukosyyttien alaryhmien ominaisuuksia ja suhteita. Atooppisten henkilöiden granulosityttien on havaittu kestävän laboratorio-käsittelyä heikommin kuin terveiden (Bank, 1980a). Ikääntyneiden henkilöiden solut saattavat kestää huonommin pakastusta kuin nuorten. Naisilla kuukautisten aiheuttama hormonitasojen vaihtelu voi vaikuttaa leukosyyttien pakastuskestävyyteen.

6 ELÄINTEN LEUKOSYYTTIEN PAKASTUSKESTÄVYYS

Leukosyyttitutkimusta on tehty enimmäkseen ihmisen soluilla niiden helpon saatavuuden takia; leukosyytithän jäävät jäljelle, kun luovutetusta verestä on eristetty sen kliinisesti käyttökelpoiset komponentit. Ihmissolujen tutkimuksesta saatu tieto voi myös olla heti käytännön hyödyksi.

Eläinlajien välillä on kuitenkin eroja leukosyyttien pakastuskestävyydessä. Eläinten soluja on yleensä pakastettu samoilla menetelmillä kuin ihmisten, vaikka optimia ei näin välttämättä saavuteta. Sopiva jäähdytys- ja sulatusnopeus sekä suoja-ainepitoisuus riippuvat mm. solun ja soluorganellien membraanien ominaisuuksista, esim. vedenläpäisykyvystä (Mazur, 1984).

Hiiren (Brock, 1987), naudan (Kleinschuster *et al.* , 1979), kaniinin (Lamb *et al.* , 1995) ja lampaiden (Stear *et al.* , 1982) mononukleaarisolujen pakastuksen on havaittu onnistuvan hyvin. Ainakin hiiren pakastettuja lymfosyyttejä voidaan käyttää laboratiokokeissa sisäisenä standardina (Holden *et al.* , 1977). Sian mononukleaarisolut kestävät ilmeisesti pakastusta huonommin, ja myös sian munasolujen ja sperman pakastuksessa on ollut ongelmia (Koch *et al.* , 1991), vaikka näiden solutyypin pakastaminen yleensä on helppoa.

Granulosyyttien pakastus saattaa onnistua joillakin eläinlajeilla, esimerkiksi koirilla (Luscinskas *et al.* , 1983) paremmin kuin ihmisellä, mutta ei kuitenkaan täydellisesti. Toisaalta myös leukosyyttityyppien osuudet ovat erilaisia eri eläinlajeilla, eikä granulosyyttien pakastus olisi välttämättä niin hyödyllistä kuin ihmisellä.

Eläimillä voi vuodenajan vaikutus leukosyyttien ominaisuuksiin olla suurempi kuin ihmisellä. Brock (1987) sekä Brock ja Adler (1989) ovat todenneet hiiren lymfosyyttien pakastuskestävyyden muuttuvan eri vuodenaikoina.

II KOKEELLINEN OSA

PAKASTUKSEN VAIKUTUS FAGOSYYTTIEN AKTIVOITUMISEEN

LYHENNELMÄ

Tässä työssä tutkittiin pakastuksen vaikutusta fagosytoivien leukosyyttien tuottamaan kemiluminesenssiin ja kohteiden tunnistamiseen liittyvien reseptorien määrään. Yhtenä tavoitteena oli löytää menetelmä leukosyyttinäytteiden säilyttämiseksi ja pysyvän vertailumateriaalin muodostamiseksi.

Valkosolut aktivoitiin PMA:lla tai opsonisoidulla tai opsonisoimattomalla zymosaanilla, ja syntynyt kemiluminesenssi vahvistettiin luminolilla. Reseptorien määrät mitattiin virtaus-sytometrillä käyttäen spesifisiä reseptorien vasta-aineita. Solut pakastettiin käyttäen suoja-aineena 10 % DMSO:ta.

Kokeissa vahvistettiin kirjallisuudesta saatu tieto siitä, että tärkeimmät ihmisveressä esiintyvät fagosyytit, neutrofiilit, eivät kestä pakastusta, mutta monosyytit säilyvät kohtuullisesti. Trehaloosin ei havaittu parantavan pakastuksen kestoa tässä menetelmässä. Monosyytit voitiin pakastaa ja mitata sekä puhdistettuina, että yhdessä muiden leukosyyttien kanssa. Pakastuksessa menetettiin yli puolet monosyyttien kemiluminesenssista ja suurin osa FcRIII-reseptoreista, mutta FcRI-, FcRII-, CR1- ja CR3-reseptorit eivät vähentyneet.

Pakastetut monosyytit saattavat sopia vertailumateriaaliksi virtaus-sytometri- ja kemiluminesenssimäärityksiin, jos tulosten hajontaa saadaan pienennettyä.

1 JOHDANTO

Tässä työssä tutkittiin pakastuksen vaikutusta fagosytoivien leukosyyttien tuottamaan kemiluminesenssiin ja kohteiden tunnistamiseen liittyvien reseptorien määrään. Yhtenä tavoitteena oli kehittää menetelmä leukosyyttinäytteiden säilyttämiseksi, jotta niiden avulla voitaisiin suhteuttaa keskenään eri aikoina saadut mittaustulokset.

Kirjallisuuden perusteella tiedetään, että tärkeimmät fagosyyttiset solut, granulosyytit, eivät kestä pakastusta (Bank, 1980a). Sen sijaan monosyytit, joita on 2—8 % leukosyyteistä, keskimäärin 540 solua mikrolitrassa verta, kestävät pakastuksen hyvin (de Boer *et al.*, 1981; van der Meulen *et al.*, 1981). Monosyyttien pieni määrä on aiheuttanut sen, että niiden pakastusta ja käyttöä ei ole tutkittu yhtä intensiivisesti kuin granulosyyttien. Mutta jos lasketaan, että yhdessä pussillisessa luovutettua verta (450 ml) on keskimäärin 240 miljoonaa monosyyttiä, joista voidaan tehdä esimerkiksi 2400 tavallista kemiluminesenssimääritystä, huomataan, että monosyytit voisivat olla aivan käyttökelpoisia pysyvänä vertailumateriaalina.

Muita mahdollisuuksia olisivat granulosyyteistä valmistetut sytoplastit ja leukemiasolulinjat, joiden tiedetään kestävän hyvin pakastusta. Sytoplastien valmistus on kuitenkin hidasta ja kallista, joten niiden kokeilusta luovuttiin tässä työssä. Leukemiasolulinjoista erilaistettujen solujen kemiluminesenssi on selvästi heikompaa ja reseptorimäärät erilaiset kuin monosyyteillä ja granulosyyteillä, joten ne eivät sovellu tutkittuihin tarkoituksiin.

Valkosolut aktivoitiin PMA:lla tai opsonisoidulla tai opsonisoimattomalla zymosaanilla, ja syntynyt kemiluminesenssi vahvistettiin luminolilla. Komplementti- ja Fc-reseptorien määrät mitattiin virtaussytometrillä käyttäen spesifisiä reseptorien vasta-aineita. Solut pakastettiin käyttäen suoja-aineena DMSO:ta.

Kokeissa vahvistui kirjallisuudesta saatu tieto siitä, että tärkeimmät ihmisveressä esiintyvät fagosyytit, neutrofiilit, eivät kestä pakastusta, mutta monosyytit säilyvät kohtuullisesti. Pakastettujen monosyyttien käyttäminen pysyvänä vertailumateriaalina CL-mittauksissa ja reseptorimäärityksissä on periaatteessa mahdollista, jos tulosten vaihtelua pystytään vielä pienentämään.

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Reagenssit

2.1.1 Puskurit

HBSS-puskuri (Hank's Balanced Salt Solution) valmistettiin ilman fenolipunaista liuottamalla litraan tislattua ja ionivaihdettua vettä seuraavat aineet: 8,0 g NaCl; 0,40 g KCl; 185,5 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 60 mg KH_2PO_4 ; 350 mg NaHCO_3 ; 59,5 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 200 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ja 1,0 g *D*-glukoosia. Kalsiumkloridi liuotettiin erikseen ja lisättiin muutoin valmiiseen liuokseen. Liuoksen pH säädettiin tarvittaessa 1 N HCl:llä 7.44:ksi. Liuos steriloi-
tiin suodattamalla mikrofilterin (Gelman Sciences) läpi autoklavoituihin pulloihin, minkä jälkeen puskuri säilytettiin +4 °C:essa. Valmiissa HBSS:ssä ovat dikationien pitoisuudet $[\text{Ca}^{2+}]$ 1,262 mM ja $[\text{Mg}^{2+}]$ 0,811 mM. CMF-HBSS-puskuri tehtiin samalla tavalla, mutta ilman kalsium- ja magnesium-suoloja. GHBSS-puskuri valmistettiin liuottamalla 0,1 % gelatiinia HBSS-puskuriin.

CPB-puskuri (Cryopreservation buffer) tehtiin liuottamalla litraan vettä seuraavat aineet: 8,06 g NaCl; 201 mg KCl; 1,440 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 204 mg KH_2PO_4 ; 88,2 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 203 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ja 1,0 g *D*-glukoosia. Puskurin kalsiumpitoisuus on 0,60 mM ja magnesiumpitoisuus 1,00 mM.

2.1.2 Luminoli ja lusigeniini

Kemiluminesenssin vahvistinaineet luminoli (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftaaliatsiinidioni, Sigma Chemical Co., St Louis, MO.) ja lusigeniini (bis-N-metyyliakridiniumnitraatti, Sigma)

liuotettiin 10 mM kantaliuokseksi boraattipuskuriin, joka sisälsi 50 mM booraksia ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) ja 200 mM boorihappoa. Puskurin pH oli 9. Kantaliuokset säilytettiin pienissä erissä $-20\text{ }^\circ\text{C}$:ssa.

2.1.3 Dekstraani

Leukosyyttien erotukseen käytetty 6 % (w/v) dekstraaniliuos valmistettiin liuottamalla 0,9 g natriumkloridia ja 6 g dekstraania (T500, Pharmacia) 100 ml:aan vettä.

2.1.4 Metyylivioletti

Solujen laskentaan ja tyyppin määrittämiseen käytetty metyyli violettiliuos valmistettiin lisäämällä 100 ml:aan ionivaihdettua vettä 1 ml jäätikkää ja 50 mg metyyli violettiä (Merck).

2.1.5 Zymosaani

Zymosaani on hiivasoluista valmistettua jauhetta, joka sisältää soluseinän hiilihydraatteja ja rasvoja. Valkosolujen kemiluminesenssin aktivoimiseen käytetty zymosaaniliuos valmistettiin suspensoimalla 600 mg zymosaania (Sigma) HBSS-puskuriin. Suspensiota keitettiin vesihauteessa 20 min, minkä jälkeen zymosaani pestiin kaksi kertaa HBSS:llä. Lopuksi zymosaani suspensoitiin 30 ml:aan HBSS-puskuria, ja suspensio jaettiin 1 ml eriin ja säilytettiin pakastettuna $-20\text{ }^\circ\text{C}$:ssa. Näin saatiin 20 mg/ml opsonisoimatonta zymosaania (Z-) sisältävä kantaliuos.

Opsonisoitu zymosaani (Z+) valmistettiin niin, että pesujen jälkeen zymosaania inkuboitiin seerumiliuoksen kanssa 45 min 37 °C:ssa, välillä sekoittaen. Usealta eri henkilöltä kerätty seerumi oli laimennettu 65-prosenttiseksi HBSS-puskurilla. Inkuboinnin jälkeen seerumi poistettiin kahdella HBSS-pesulla, ja opsonisoitu zymosaani suspensoitiin ja säilytettiin kuten opsonisoimaton zymosaani.

2.1.6 PMA

PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate, Sigma) on liuotettu DMSO:hon (dimetyylisulfoksidi, Merck) 160 µM:ksi kantaliuokseksi ja säilytetty pienissä erissä -20 °C:ssa.

2.2 Solut

2.2.1 Leukosyytit

Leukosyytit eristettiin dekstraanisaostuksella buffy coat -fraktiosta, joka sisältää suurimman osan veren valkosoluista. Buffy coat saatiin Punaisen Ristin veripalvelusta ja se oli eristetty normaalien verenluovuttajien verestä. Yhden buffy coat -fraktion tilavuus on 30—50 ml. Jos buffy coat oli vähäplasmaista, se piti laimentaa ennen jatkokäsittelyä noin kaksinkertaiseen tilavuuteen; laimennukseen käytettiin fysiologista suolaliuosta, johon oli lisätty 7,6 g/l natriumsitraattia. Destraaniliuosta lisättiin 10 % buffy coatin määrästä, ja punasolujen annettiin laskeutua pohjalle noin ½—1 h ajan. Punasolujen päältä pipetoitiin talteen leukosyyttikerros, ja se pestiin kaksi kertaa HBSS:llä tai CMF-HBSS:llä. Kolmas pesu tehtiin

GHBS:llä, jonka jälkeen solut suspensoitiin GHBS:ään ja säilytettiin +4 °C:ssa. Solut laskeutuvat putken pohjalle, mutta niiden kemiluminesenssiaktiivisuus säilyy useita tunteja.

Saadun suspension leukosyyteistä suurin osa oli neutrofiileja ja yleensä 5–10 % monosyyttejä. Leukosyyttien lisäksi mukana lienee vielä ollut jonkin verran verihiutaleita ja punasoluja, joita ei laskettu.

2.2.2 Mononuklearisolut ja granulosyytit

2.2.2.1 Ficoll-Paque -eristys

Dekstraanisedimentoidut leukosyytit voitiin ilman pesuja pipetoida Ficoll-Paque -kerroksen (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Upsala, Ruotsi) päälle 50 ml polypropyleeniputkiin (noin 5 ml Ficoll-Paqueta ja jopa 15 ml solususpensiota). Puolen tunnin sentrifugauksen (400 g, 20 °C) jälkeen granulosyytit olivat painuneet pohjalle, ja monosyytit sekä lymfosyytit jääneet kerrokseksi Ficoll-Paquen päälle. Mononuklearisolut ja granulosyytit pipetoitiin talteen, ja pestiin kaksi kertaa HBSS:llä tai CMF-HBSS:llä ja viimeiseksi kerran GHBS:llä.

2.2.2.2 Eristys kaksivaiheisella Percoll-gradientilla

Granulosyytit ja mononuklearisolut voidaan eristää kokoverestä ilman välivaiheita, jos niitä ei tarvita kovin suuria määriä. Terveeltä henkilöltä otettu EDTA:lla (1,5 mg/1 ml verta) antikoaguloitu 10 ml:n verinäyte laimennettiin kaksinkertaiseksi natriumsitraattia sisältävällä fysiologisella suolaliuoksella, ja sitä pipetoitiin 20 ml:aa polypropyleeniputkiin, joihin oli

tehty kaksivaiheinen 20 ml:n Percoll-gradientti. Gradientti koostui pohjalle pipetoidusta 10 ml:sta 76 % SIP-liuosta (tiheys 1.094 g/ml) ja sen päälle pipetoidusta 10 ml:sta 62 % SIP-liuosta (1.078 g/ml). SIP-liuos oli valmistettu lisäämällä 12,42 ml:aan Percollia (Pharmacia) 1,38 ml:aa 1,5 M:sta natriumkloridiliuosta. SIP laimennettiin edelleen HBSS:llä. Putkia sentrifugoitiin puoli tuntia (500 g, 20 °C). Kahteen eri kerrokseen siirtyneet granulosyytit ja mononukleaarisolut pipetoitiin talteen, ja pestiin kaksi kertaa HBSS:llä ja kerran GHBSS:llä.

2.2.3 Monosyytit

Ficoll-Paque -eristetyistä mononukleaarisolusta eristettiin monosyytit sarjalla lyhyitä sentrifugointeja. Tämä eristysmenetelmä perustuu siihen, että lymfosyyttejä suurempina soluina monosyytit laskeutuvat nopeammin suspensiossa putken pohjalle. Eristys voitaisiin tehdä myös ilman sentrifugointeja pelkästään seisottamalla putkia noin ½ h huoneenlämpötilassa, mutta kevyellä sentrifugoinnilla saadaan sama tulos nopeammin. Sentrifugoinnin jälkeen lymfosyyteistä ja trombosyyteistä hieman sameaksi jäänyt supernatantti kaadettiin pois ja pohjalle jääneet solut suspensoitiin uudelleen noin 10 ml:aan CMF-HBSS-puskuria. Sentrifugointi ja suspensointi toistettiin 3—4 kertaa, kunnes monosyyttien puhtaus oli riittävä.

2.2.4 Solujen laskenta

Suspensioista otetuista näytteistä määritettiin leukosyyttien pitoisuudet sekä granulosyyttien ja monosyyttien osuudet. Solut värjättiin lisäämällä näytteeseen arvioidun solupitoisuuden

mukaan tietty määrä metyyliiviolettiliuosta. Leukosyytit laskettiin mikroskoopilla Bürkerin kammion avulla.

2.3 Kemiluminesenssimittaukset

Kemiluminesenssimittaukset tehtiin Wallacin luminometreillä (LKB Wallac 1251 Lumino-meter), joita ohjattiin mikrotietokoneilla. Laitteessa on 25-paikkainen karuselli, jossa näyteputket kiertävät noin tunnin kestävästä mittauksesta ajan, ollen aina 5 sekuntia kerrallaan mittauskammiossa. Jos karuselli oli täynnä, yhden kyvetin mittausten väli oli noin 130 sekuntia. Luminometrillä lämpötilaksi oli säädetty 37 °C.

Kyvetteinä käytettiin kertakäyttöisiä 4 ml:an polypropyleeniputkia, joihin tehtiin 500 µl:an tilavuinen reaktioseos. Kyvetteihin pipetoitiin solususpensiota niin, että solujen määrä kyvetissä oli 100 000, ja luminoli- tai lusigeniiniliuosta niin, että vahvistinaineen pitoisuudeksi tuli 400 µM. Reaktioseoksen tilavuus täytettiin 450 µl:ksi GHBSS-puskurilla ja putket asetettiin luminometriin viideksi minuutiksi, jotta reaktioseos ehtisi lämmetä. Valontuotto-reaktio käynnistettiin lisäämällä putkiin 50 µl 1:10 laimennettua zymosaanisuspensiota (100 µg zymosaania/putki) ja putkia ravistettiin kevyesti. Mittausta jatkettiin, kunnes kaikkien näytteiden kemiluminesenssin maksimikohta oli ohitettu, eli noin 30–60 min.

Laitteisto tulosti mittauksista ajan funktiona kunkin kyvetin kemiluminesenssin (mV), reaktion maksimi-arvon ja -kohdan sekä pylväsiagrammit eri putkien maksimi-arvoista. Mittausalue oli 0—9999 mV; tausta (noin 1 mV) mitattiin joka kokeessa erikseen ja vähennettiin tuloksista.

Saman koesarjan mittaukset tehtiin samalla luminometrillä, sillä eri laitteiden mittausvasteet olivat selvästi erilaiset. Luminometriä keskinäinen kalibrointi tehtiin soluttomalla tasaisesti valoa tuottavalla liuoksella, joka sisälsi 100 µl DMSO:ta, 20 µl lusigeniinikanta-liuosta (10 mM), 330 µl GHBS:ää ja 50 µl:aa 1:1000 veteen laimennettua vetyperoksidia, niin että lopullinen H₂O₂-pitoisuus oli 1 mM. Tämän liuoksen valontuotto oli luminometrillä riippuen 1600—2600 mV; pienempiä arvoja saatiin korvaamalla osa DMSO:sta puskurilla.

2.4 Virtausytometria

Mittauksissa käytetyt FITC-leimatut (fluoreskeiini-isotiosyanaatti) vasta-aineet olivat: FcRI mAb 32.2, FcRII mAb IV.3, FcRIII mAb 3G8 (Medarex Inc., West Lebanon, NH, USA), fykoerytriinikonjugoitu CR1 mAb IOT17 (Immunotech S.A., Marseille, Ranska) ja CR3 mAb Leu15 (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). FITC-leimattu vuohen vasta-aine hiiren Ig:lle ja isotyypikontrollivasta-aineet oli hankittu myös Becton-Dickinsonilta.

HBSS:llä pestyt solut suspensoitiin puskureihin, joihin oli lisätty ylimäärin kutakin monoklonaalista vasta-ainetta, ja seoksia inkuboitiin 30 minuuttia 4 °C:ssa. Sen jälkeen solut pestiin kylmällä HBSS:llä. CR1-leiman kanssa inkuboidut solut leimattiin vielä hiiren Ig:n vasta-aineella samalla tavalla. Leimatut solut suspensoitiin Isoton III -puskuriin (Coulter Electronics, Luton, Englanti) ja säilytettiin mittaukseen asti jäissä. Virtausytometri (FACStar cell sorter) oli Becton-Dickinsonin valmistama.

2.5 Leukosyyttien pakastaminen ja sulattaminen

Solut pakastettiin lisäämällä CPB:hen suspensioituihin soluihin (50 milj./ml) sama tilavuus pakastusliuosta, jossa oli 20 % (v/v) DMSO:ta (Merck) CPB:ssä. Ennen tätä lisättiin solususpensioon trehaloosi (Merck), silloin kun sitä käytettiin. DMSO-liuos lisättiin solususpensioon hitaasti huoneenlämpötilassa välillä sekoittaen. Suspensio jaettiin yleensä 100 µl:an eriin kierrekorkillisiin polypropyleenista valmistettuihin pakastusputkiin (Nalge Company, New York, USA), joiden tilavuus oli 1,2 tai 2,0 ml. Putket asetettiin isopropanolilla täytettyyn 18-paikkaiseen jäädyttimeen (Nalgene™ 5100-0001, Nalge Company), joka siirrettiin heti -70 °C:een pakastimeen. Tällöin jäädyttimen lämpötilan pitäisi laskea noin 1 ° minuutissa. Pidempiaikaista säilytystä varten putket voitiin siirtää aikaisintaan neljän tunnin kuluttua nestetyyppeen.

Näytteet sulatettiin siirtämällä pakastimesta otettu putki heti +37-asteiseen vesihauteeseen, jossa putkea ravisteltiin, kunnes jää oli sulanut. Solususpensio laimennettiin lisäämällä putkiin huoneenlämpötilassa GHBSS-puskuria niin, että solupitoisuudeksi tuli 4 milj./ml. Soluja ei tarvinnut pestä, sillä lopullisessa mittauksessa DMSO-pitoisuus oli vain 0,08 %, ja kun pesuhävikkiä ei syntynyt, soluja ei tarvinnut myöskään laskea.

2.6 Tilastolliset menetelmät

Tulosten eroavaisuuksien tilastolliset merkitsevyydet on laskettu riippumattomalla kaksisuuntaisella Studentin t-testillä. Merkitsevyyden rajana pidettiin p-arvoa 0,05. Rinnakkaisten kokeiden tai mittauskyyvettien tulosten keskiarvojen yhteydessä on mainittu keskiarvon

keskivirhe (SD). Lineaarisia muutoksia tarkasteltiin laskemalla regressiokerroin k ja Pearsonin korrelaatiokerroin r .

3 TULOKSET

3.1 Pienten DMSO- ja trehaloosipitoisuuksien vaikutus fagosyyttien kemiluminesenssiin

Eristin verestä kaksivaiheisella Percoll-gradientilla granulositytit ja mononuklearisolut, ja aktivoin niiden kemiluminesenssin opsonisoidulla ja opsonisoimattomalla zymosaanilla ilman lisäaineita, kolmessa eri DMSO-pitoisuudessa ja kahdessa trehaloosipitoisuudessa. Kemiluminesenssin vahvistimena käytin luminolia ja lusigeniinia. Monosyyttien tulokset ovat taulukossa 1a ja granulosityttien taulukossa 1b. Mononuklearisolut ja granulositytit on mitattu eri luminometreillä, joten mitatut luvut eivät ole täysin vertailukelpoisia.

3.2 Puskurin ja trehaloosin vaikutus pakastuskestävyyteen

Eristin laimennetusta buffy coat -fraktiosta Ficoll-Hypaque-gradientin avulla mononukleariset leukosyytit, ja suspensoin ne HBSS- ja CPB-puskureihin. Soluista 59 % oli monosyyttejä ja alle prosentti granulosityttejä. Pakastin solut kummassakin puskurissa 10 % DMSO:ssa, sekä 0,1 M trehaloosipitoisuudessa että ilman trehaloosia. Mittasin solujen opsonisoidulla ja opsonisoimattomalla zymosaanilla aktivoidun kemiluminesenssin ennen pakastusta ja kolmena eri päivänä sulatetuista näytteistä. Kaikki mittaukset on tehty samalla luminometrillä. Mittaustulokset ovat taulukossa 2, ja säilyneen kemiluminesenssin osuudet ovat kuvassa 1. Eri puskuireilla ja suoja-aineilla saadut erot eivät ole tilastollisesti merkitseviä.

Taulukko 1a. DMSO:n ja trehaloosin vaikutus monosyyttien kemiluminesenssiin

Kyveteissä oli 100000 mononukleaarisolua, joista 21 % oli monosyyttejä.

	Luminoli				Lusigeniini			
	Z+		Z-		Z+		Z-	
Suoja-aine	CL (mV)	Muutos (%)	CL (mV)	Muutos (%)	CL (mV)	Muutos (%)	CL (mV)	Muutos (%)
Ei mitään	79,3		35,2		3,07		0,96	
DMSO 0,05 %	78,6	-1	35,6	1	2,71	-12	1,07	11
DMSO 0,10 %	71,5	-10	30,9	-12	2,89	-6	1,15	20
DMSO 0,50 %	71,4	-10	48	36	2,77	-10	1,55	61
Trehaloosi 1 mM	73,4	-7	38,7	10	3,24	6	0,97	1
Trehaloosi 10 mM	78,3	-1	20,2	-43	2,72	-11	0,70	-27

Taulukko 1b. DMSO:n ja trehaloosin vaikutus granulosyyttien kemiluminesenssiin

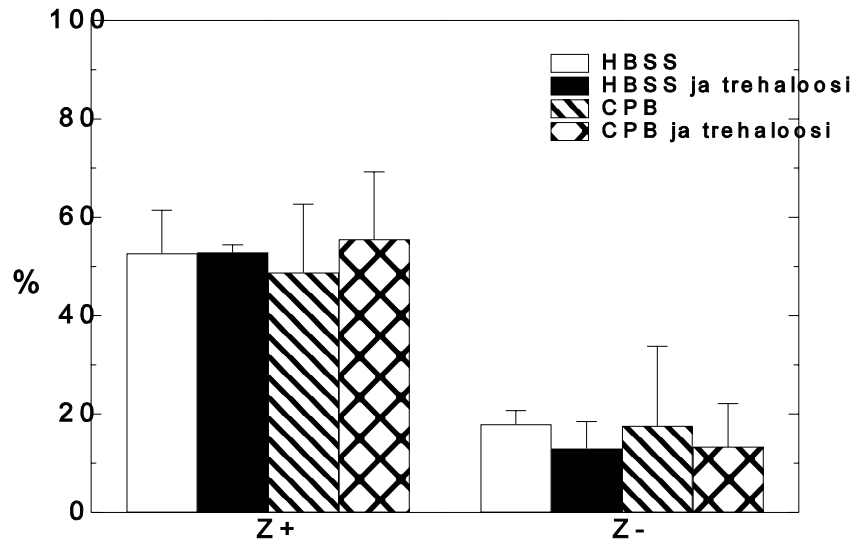
Kyeteissä oli 100000 solua, joista 82 % granulosyyttejä.

Suoja-aine	Luminoli				Lusigeniini			
	Z+		Z-		Z+		Z-	
	CL (mV)	Muutos (%)	CL (mV)	Muutos (%)	CL (mV)	Muutos (%)	CL (mV)	Muutos (%)
Ei mitään	1405		678,5		112,5		70,17	
DMSO 0,05 %	1427	2	707,5	4	126,2	12	68,07	-3
DMSO 0,10 %	1463	4	755,1	11	124,9	11	74,82	6
DMSO 0,50 %	1491	6	841,3	24	142,8	27	92,74	32
Trehaloosi 1 mM	1378	-2	716,7	6	113,2	1	66,92	-5
Trehaloosi 10 mM	1468	4	517,3	-24	105,3	-6	55,37	-21

Taulukko 2. Puskurin ja trehaloosin vaikutus pakastuskestävyyteen

Tuoreiden solujen keskiarvot ja SD:t on laskettu samasta mittauksesta neljän rinnakkaisen kyvetin tulosten väliltä, pakastettujen solujen arvot on laskettu kolmen eri sulatuksen väliltä.

	Z+		Z-	
	CL (mV)	±SD	CL (mV)	±SD
Tuoreet solut:				
HBSS	791	63	196	67
CPB	861	47	339	37
Pakastetut solut:				
HBSS	417	70	17,9	2,8
HBSS ja trehaloosi	418	12	13,0	5,5
CPB	419	120	17,5	16,2
CPB ja trehaloosi	478	118	13,3	8,8



Kuva 1. Mononuklearisolujen kemiluminesenssin säilyvyys
pakastettaessa eri puskureissa ja 0,1 M trehaloosipitoisuudessa

3.3 Sulatettujen solujen säilyvyys

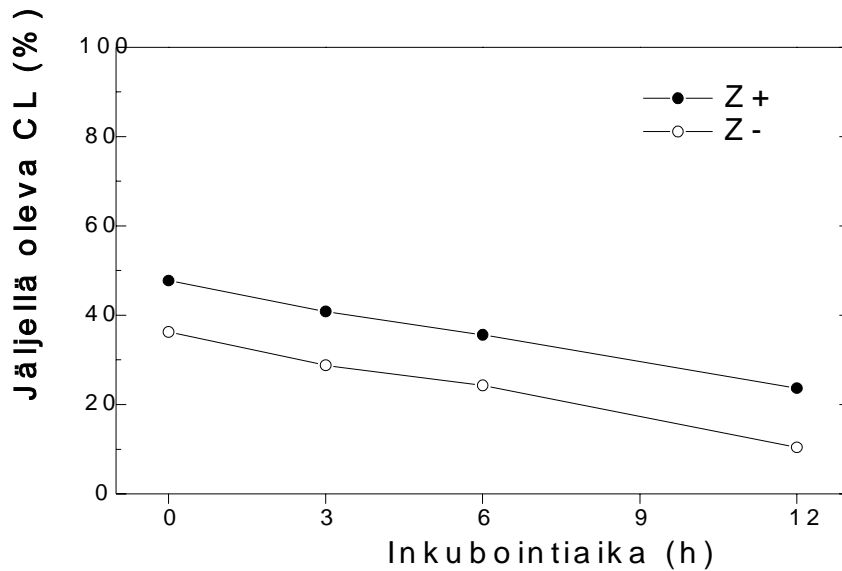
Eristin Ficoll-Hypaquen avulla laimennetusta buffy coat-fraktiosta mononukleaariset leukosyytit, ja suspensoin ne CPB-puskuriin. Soluista 58 % oli monosyyttejä, ja alle prosentti granulosityttejä. Mittasin kemiluminesenssin aktivoituna opsonisoidulla ja opsonisoimattomalla zymosaanilla tuoreista soluista ja sulatetuista soluista heti sulatuksen jälkeen sekä 3, 6 ja 12 tunnin säilytyksen jälkeen. Pidin sulatettuja soluja mittauskyveteissä +4 °C:eessa 200 µl:n tilavuudessa GHBSS-puskurissa; kussakin kyvetissä oli 107 000 solua, joista 62 000 monosyyttejä. Sekä tuoreiden että pakastettujen solujen kemiluminesenssit ovat taulukossa 3, ja kuvassa 2 on sulatettujen solujen CL verrattuna pakastamattomiin soluihin. Sulatettujen

solujen kemiluminesenssi aleni lineaarisesti: opsonisoidulla zymosaanilla regressiosuoran yhtälöksi saatiin $CL(t) = -23 \text{ mVh}^{-1} * t + 561 \text{ mV}$, jossa Pearsonin korrelaatiokerroin $r = 0,999$, ja opsonisoimattomalla zymosaanilla $CL(t) = -25 \text{ mVh}^{-1} * t + 418 \text{ mV}$, jossa $r = 0,997$.

Taulukko 3. Mononukleaarisolujen CL mitattuna tuoreista soluista ja pakastetuista soluista heti sulatuksen jälkeen ja eripituisen säilytyksen jälkeen

Tuoreiden solujen keskiarvot ja SD:t on laskettu neljästä ja pakastettujen solujen kahdesta rinnakkaisesta kyvetistä samassa mittauksessa.

	Z+		Z-	
	CL (mV)	±SD	CL (mV)	±SD
Tuoreet solut	1186	38	1162	38
Pakastetut solut				
0 h	566	13	421	43
3 h	484	38	334	16
6 h	422	76	282	43
12 h	281	7	121	44



Kuva 2. Mononukleaarisolujen kemiluminesenssin säilyvyys sulatuksen jälkeen verrattuna pakastamattomiin soluihin

3.4 Mononukleaarisolujen säilyvyys nestetyössä ja pakastimessa

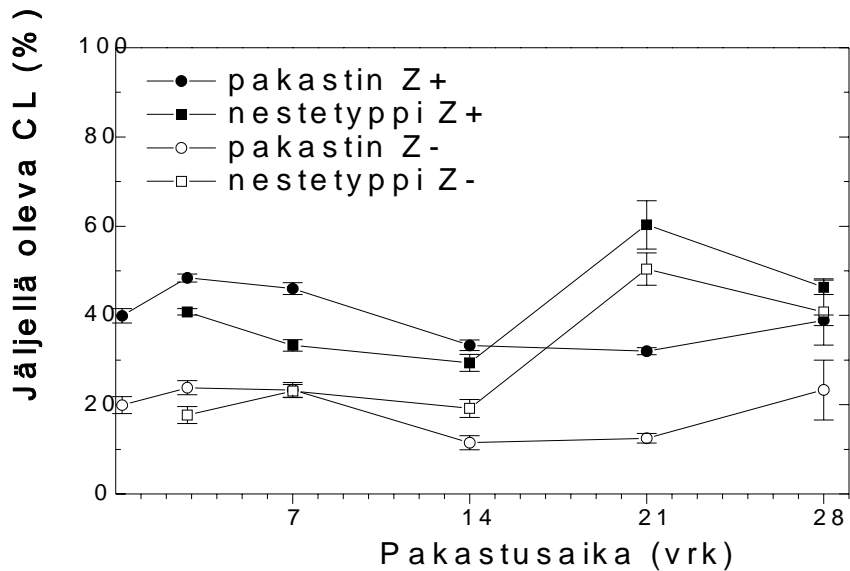
Pakastin mononukleaariset leukosyytit, joista 33 % oli monosyyttejä ja 4 % granulocytejä, sekä nestetyössä (-196 °C) että pakastimessa (-70 °C) pitäen näyteputket koko ajan jäädyttimessä, jotta pakastimen lämpötilan muutokset eivät vahingoittaisi soluja. Pakastuspuskurina oli CPB. Mittasin tuoreista ja sulatetuista soluista kemiluminesenssin aktivoituna opsonisoidulla ja opsonisoimattomalla zymosaanilla. Kyveteissä oli 100 000 solua, joista 33 000 oli monosyyttejä. Taulukossa 4 on esitetty tuoreiden ja eri aikoina sulatettujen solujen CL, ja kuvassa 3 sulatetuissa soluissa jäljellä oleva CL prosentteina tuoreista soluista. Näistä voidaan havaita, että solujen CL ei vähene neljän viikon kuluessa; regressiokertoimet olivat välillä

-1,2—2,1 mV/vrk. Solut eivät säilyneet nestetydessä merkitsevästi paremmin kuin pakastimessa. Nestetydessä säilytettyjen solujen CL:in hajonta oli suurempi, mikä saattaa johtua hankalammasta sulatuksesta.

Taulukko 4. Mononukleaarisolujen CL mitattuna tuoreista ja eri aikoja -196 °C:essä ja -70 °C:essä pakastetuista soluista

Yksittäisten mittausten SD:t on laskettu kolmesta rinnakkaisesta kyvetistä.

	Z+		Z-	
	CL (mV)	±SD	CL (mV)	±SD
Tuoreet solut	335,7	20,6	144,0	4,5
-196 °C:ssa pakastetut				
3 vrk	136,9	2,5	25,4	2,8
7 vrk	111,9	4,5	33,3	2,0
14 vrk	98,8	6,4	27,7	2,9
21 vrk	202,4	18,3	72,6	5,1
28 vrk	155,3	5,4	58,8	10,6
-70 °C:ssa pakastetut				
6 h	133,9	5,3	28,7	2,7
3 vrk	162,5	3,1	34,3	2,3
7 vrk	154,4	4,2	33,5	2,5
14 vrk	111,9	4,0	16,6	2,3
21 vrk	107,4	2,8	18,0	1,6
28 vrk	130,7	4,0	33,6	9,7



Kuva 3. Mononukleaarisolujen säilyvyys nestetyössä ja pakastimessa

3.5 Erottelemattomien leukosyyttien pakastus

Eristin dekstraanisedimentaatiolla buffy coat -fraktiosta leukosyytit, joista 69 % oli granulocytejä ja 4,0 % monosyyttejä. Pakastin solut 600 µl:an erissä pitoisuudessa 10^8 /ml nestetyössä. Mittasin tuoreiden ja sulatettujen solujen opsonisoidulla ja opsonisoimattomalla zymosaanilla aktivoituneen kemiluminesenssin. CL-mittauksissa reagenssien pitoisuudet olivat normaalit, mutta solumääriä vaihdeltiin. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Tuoreiden ja pakastettujen erottelemattomien leukosyyttien CL-vaste ja huipun aika eri solumäärillä

SD:t on laskettu kolmesta rinnakkaisesta kyvetistä.

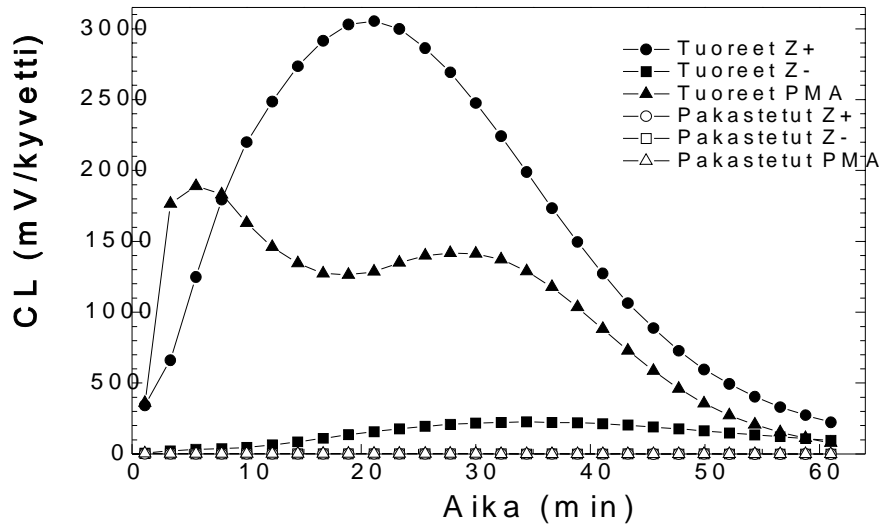
	Z+			Z-		
	CL (mV)	±SD	Aika (min)	CL (mV)	±SD	Aika (min)
Tuoreet						
50·10 ³	791	24	20	232	20	46
100·10 ³	1637	17	20	784	86	46
200·10 ³	2861	64	22	1551	90	48
Pakastetut						
200·10 ³	146	9	18	47	3	28
400·10 ³	335	8	19	123	3	27
800·10 ³	675	14	23	309	11	26

Pakastettujen solujen CL-vaste oli 5 % opsonisoidulla zymosaanilla ja 3 % opsonisoimattomalla zymosaanilla, eli se vastasi monosyyttien osuutta. Metyylivioletilla värjätyt pakastetut solut, myös granulosyytit, näyttivät mikroskoopissa normaaleilta. Pakastetut solut tuottivat korkean CL-vasteen jo ennen zymosaanien lisäämistä, mikä vaikutti erityisesti opsonisoimattomalla zymosaanilla aktivoitujen solujen kinetiikkaan.

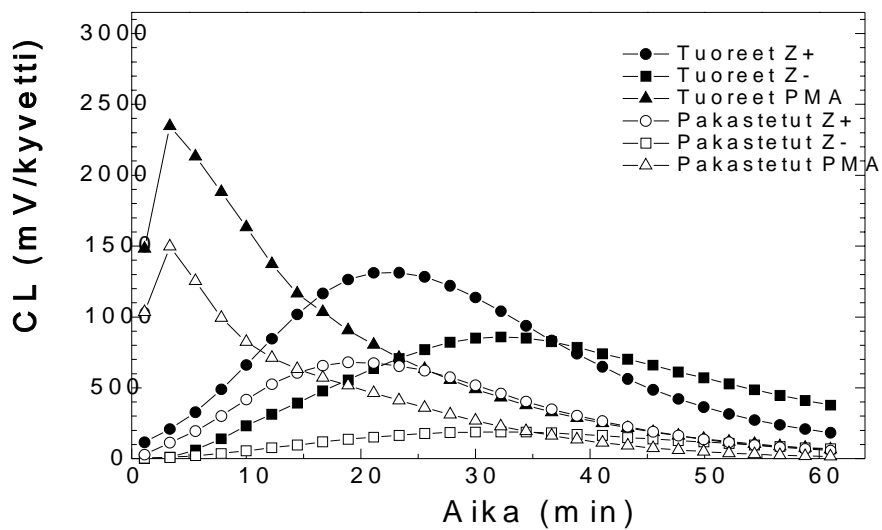
3.6 Leukosyyttien kemiluminesenssin kinetiikka

Mittasin opsonisoidulla ja opsonisoimattomalla zymosaanilla sekä PMA:lla aktivoituja tuoreiden ja pakastettujen granulosyyttien, mononukleaaristen leukosyyttien ja monosyyttien

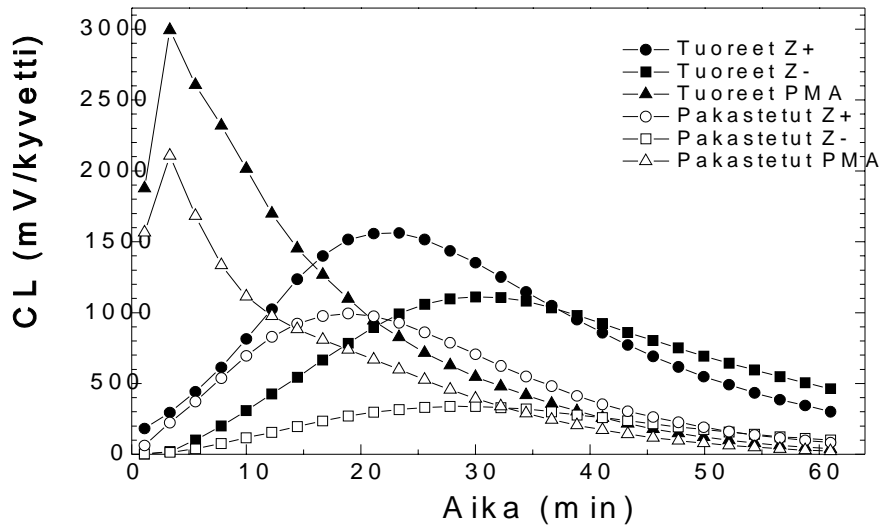
CL-vasteita. Erottelin yhdestä buffy coat -fraktiosta dekstraanisegmentaation jälkeen Ficoll-Hypaquella granulositytit ja mononukleaarisolut, joista eristin edelleen lyhyillä sentrifugoinneilla monosyytit. Granulosyyttien puhtaus oli 100 %. Mononukleaarisolusta 50 % oli monosyyttejä ja muut lymfosyyttejä. Monosyyttien puhtaus oli 77 %, granulosityttejä oli alle yksi prosentti. Pakastin solut 100 μ L:n erissä niin, että granulosityttien tai monosyyttien pitoisuus oli 25 miljoonaa millilitrassa. Kemiluminesenssimittauksissa pipetoin kyvetteihin $1,0 \cdot 10^5$ granulosityttiä tai monosyyttiä; kustakin näytteestä oli kaksi rinnakkaista kyvetiä, joista laskin keskiarvot kuviin 4a, 4b ja 4c. Niistä nähdään, että granulosityttien vaste opsonisoidulle zymosaanille on selvästi suurempi kuin monosyyttien, mutta opsonisoimattomalle pienempi. Zymosaanien aikaansaamien käyrien muodot ovat samanlaiset; sen sijaan PMA aiheuttaa granulosityteillä kaksi huippua, mutta monosyyteillä vain ensimmäisen. Monosyyttien puhdistaminen tai mononukleaaristen leukosyyttien lymfosyytit eivät oleellisesti muuta monosyyttien vasteita ainakaan näillä aktivaattoreilla.



Kuva 4a. Tuoreiden ja pakastettujen granulosityttien kemiluminesenssi aktivaattoreiden lisäämisen jälkeen



Kuva 4b. Tuoreiden ja pakastettujen mononukleaaristen leukosityttien kemiluminesenssi aktivaattoreiden lisäyksen jälkeen

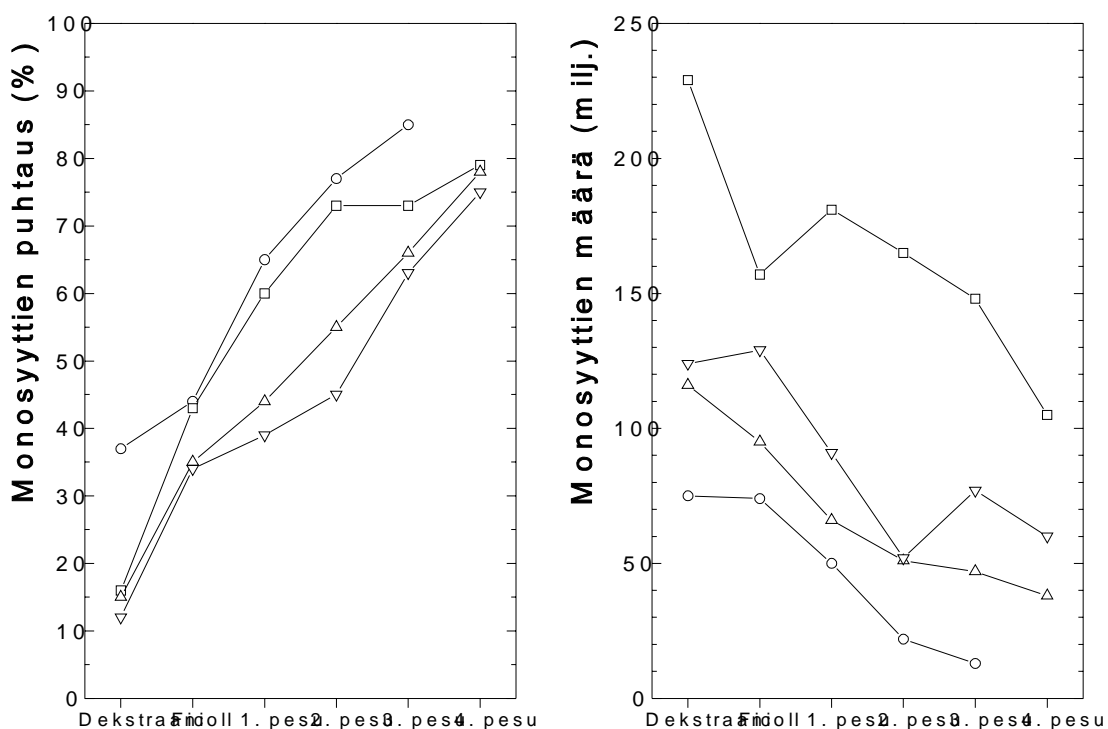


Kuva 4c. Tuoreiden ja pakastettujen monosyyttien kemiluminesenssi aktivaattoreiden lisäyksen jälkeen

3.7 Puhdistuksen ja pakastuksen vaikutus monosyyttien kemiluminesenssiin ja reseptorimääriin

Eristin ja pakastin monosyytit neljästä buffy coat -fraktiosta. Monosyyttien komplementti- ja Fc-reseptorit määritettiin FACS:illa neljässä vaiheessa: dekstraanisedimentoiduista leukosyyteistä, Ficoll-Hypaquella eristetyistä mononukleaarisoluiista, sekä monosyyteistä viimeisen pesun ja 21—33 vrk pakastuksen jälkeen. Mittasin monosyyttien kemiluminesenssin samoista näytteistä, lukuunottamatta dekstraanisedimentoituja soluja, sillä näytteessä olevien granulosityttien ja monosyyttien valontuottoa ei voida erottaa toisistaan. Aktivoin solujen kemiluminesenssin opsonisoidulla ja opsonisoimattomalla zymosaanilla sekä PMA:lla, ja mittasin kustakin näytteestä kaksi rinnakkaista kyvettä.

Monosyyttien puhtaus ja lukumäärä eristyksen eri vaiheissa on esitetty kuvassa 5. Puhdistettujen monosyyttien saanto oli 13—105 miljoonaa, ja puhtaus 75—85 %; FACS:illa tehtyjen määritysten mukaan osuus oli pienempi, 63—87 %.



Kuva 5. Monosyyttien puhtaus ja määrä neljän eristyksen eri vaiheissa

Monosyyttien kemiluminesenssi aleni eristettäessä noin kymmenesosan, mutta ei merkittävästi. Pakastus alensi merkittävästi opsonisoidulla (keskimäärin 66 %) ja opsonisoimattomalla (84 %) zymosaanilla aktivoitua kemiluminesenssia; myös PMA:lla aktivoitu CL aleni (26 %), mutta ei merkittävästi. Keskimääräiset kemiluminesenssit ovat taulukossa 6a.

Monosyyttien eristäminen ei muuttanut komplementti- ja Fc-reseptorien intensiteettejä, mutta alensi merkittävästi FcIII-reseptoria ekspressoivien solujen osuutta 56 %:sta 15 %:iin.

Pakastus alensi merkitsevästi FcIII-reseptorin intensiteettiä (keskimäärin 47 %). Reseptorien intensiteetit ovat taulukossa 6b, ja niitä ekspressoivien solujen osuudet taulukossa 6c.

Taulukko 6a. Monosyyttien kemiluminesenssi puhdistuksen eri vaiheissa ja pakastuksen jälkeen

CL ($\mu\text{V}/\text{solu}$) ja SD on laskettu neljästä eristyksestä.

	Z+		Z-		PMA	
	CL	\pm SD	CL	\pm SD	CL	\pm SD
Ficoll-Hypaque	19	2	15	1	37	3
Viimeinen pesu	17	5	13	4	33	12
Pakastus	5,2	1,5	2,0	0,6	22	7

Taulukko 6b. Monosyyttien komplementti- ja Fc-reseptorien intensiteetit puhdistuksen eri vaiheissa ja pakastuksen jälkeen

Tulokset ovat keskiarvoja neljästä eristyksestä.

	CR1	± SD	CR3	± SD	FcRI	± SD	FcRII	± SD	FcRIII	± SD
Dekstraani	124	51	2360	432	77	9	163	29	118	60
Ficoll-Hypaque	131	52	2342	473	79	7	167	27	150	64
Viimeinen pesu	136	53	2303	562	71	7	142	21	136	63
Pakastus	160	31	2443	284	72	11	129	10	68	23

Taulukko 6c. Komplementti- ja Fc-reseptoreita ekspressoivien monosyyttien osuudet prosentteina puhdistuksen eri vaiheissa ja pakastuksen jälkeen

Tulokset ovat keskiarvoja neljästä eristyksestä.

	CR1	± SD	CR3	± SD	FcRI	± SD	FcRII	± SD	FcRIII	± SD
Dekstraani	96	2	89	5	84	6	96	3	56	12
Ficoll-Hypaque	97	3	89	7	79	16	98	1	15	6
Viimeinen pesu	86	3	97	2	84	7	99	1	8	5
Pakastus	96	2	98	1	81	8	98	1	6	2

4 TULOSTEN TARKASTELU

Tulokset vahvistavat kirjallisuudesta saadut tiedot, että granulositytit eivät kestä pakastusta, mutta monosyytit sietävät sen kohtuullisesti. Pakastukseen käytetyn jäädyttimen havaittiin olevan helppokäyttöinen ja toimivan hyvin, kuten myös Vingerhoets *et al.* (1995) ovat todenneet lymfosyyteillä.

Pakastuksessa suoja-aineena käytettävää DMSO:ta ei tarvitse pestä pois sulatuksen jälkeen, vaan pakastussuspension laimennus leukosyyttien käyttöiheyteen riittää, sillä samalla DMSO-pitoisuus laskee 0,08 %:iin, joka ei enää aiheuta merkittävää muutosta kemiluminesenssiin, kuten nähdään taulukoista 1a ja 1b. Sulatuksen jälkeiset pesut johtaisivat leukosyyttien aggregoitumiseen, mikä vahingoittaisi soluja ja vaikeuttaisi niiden käsittelyä. Kun pakastettu solumäärä tunnetaan, ei soluja tarvitse laskea sulatuksen jälkeen, ei ainakaan ennen mittauksia, mikä nopeuttaa ja helpottaa käytännön työtä merkittävästi. Hastingsin *et al.* (1982) mukaan 1 tilavuusprosentti DMSO:ta alensi neutrofiilien luminolilla vahvistettua ja opsonisoidulla zymosaanilla indusoitua CL-vastetta 10 %. Nyt granulosityttien CL-vaste kuitenkin nousi DMSO:n vaikutuksesta. Ero voi johtua siitä, että Hastings *et al.* olivat liuottaneet luminolin DMSO:hon, johon se liukenee paremmin kuin boraattipuskuriin, ja meillä DMSO:n lisäys oli parantanut luminolin liukoisuutta. Havaittu monosyyttien CL-vasteen aleneminen DMSO:n vaikutuksesta voi johtua siitä, että monosyyttien CL on suuremmaksi osaksi ekstrasellulaarista (Albrecht ja Jungi, 1983), jota DMSO alentaa.

Trehaloosi ei parantanut monosyyttien säilymistä pakastuksessa. Myöskään kokeillut puskurit, HBSS ja CPB (joka ei sisällä HCO_3^- -ionia) eivät eronneet vaikutukseltaan.

Monosyytit säilyvät sulatuksen jälkeen melko hyvin tavallisessa GHBSS-puskurissa, kuten nähdään kuvasta 2. Zymosaaneilla indusoitu kemiluminesenssi alenee vain noin 5 % tunnissa, kun solut säilytetään +4 °C:eessa. Säilyminen kasvatusliuoksessa ja hiilidioksidikaapissa saattaisi olla vielä parempi.

Kirjallisuuden mukaan pitkäaikainen säilytys pitää tehdä alle -130 °C:een lämpötilassa, eli käytännössä nestetyössä (Mazur, 1994). Neljän viikon mittaisessa säilytyksessä ei kuitenkaan vielä havaittu nestetyöpen olevan parempi säilytykseen kuin tavallisen -70 °C:een pakastimen (taulukko 4). Päinvastoin, ehkä hieman hankalamman sulatuksen takia, nestetyössä pakastettujen monosyyttien CL vaihteli enemmän. Ristiriitaa selittää osaksi myös se, että yleensä pakastimen lämpötila voi vaihdella joitakin asteita, mikä voi saada aikaan jääkiteiden kasvua ja olla tuhoisaa soluille. Tässä kokeessa näytteet kuitenkin säilytettiin pakastimessakin jäädyttimessä, mikä esti lämpötilan muutokset.

Monosyyttien eristys ja pakastus alensivat merkitsevästi, 56 %:sta 6 %:iin, niiden solujen osuutta, joilla on pinnallaan FcRIII-reseptoreita. Muiden Fc-reseptorien (FcRI ja FcRII) ja komplementtiresptorien (CR1 ja CR3) ekspresio pysyi ennallaan (taulukko 6c). Eristys ei vähentänyt solua kohti laskettua kemiluminesenssia merkitsevästi, mutta pakastuksen jälkeen enää alle puolet zymosaanien indusoimasta kemiluminesenssista oli jäljellä (taulukko 6a). PMA:n indusoiman CL:n aleneminen oli pienempi, vain 26 %. Tutkittujen reseptorien määrän aleneminen ei yksin selitä kemiluminesenssin voimakasta vähentymistä, koska pelkkä monosyyttien erottelu ei vähentänyt CL-vastetta vastaavasti. Eri aktivaattoreiden aikaansaamien CL-vasteiden erilainen säilyminen viittaa siihen, että vaurio liittyisi kuitenkin kohteiden tunnistamiseen, esimerkiksi immuunikompleksin muodostumiseen. Oponisoimaton zymosaani sitoutuu monosyyttien β -glukaanireseptoriin, mutta oponisoitu zymosaani sitoutuu

myös komplementtireseptoreihin, erityisesti CR3-reseptoriin (Elstad *et al.*, 1994). Hansen *et al.* (1995) eivät havainneet mitään muutoksia bakteerien fagosytoinnissa, FcRIII-reseptorien ekspressiossa tai happiradikaalien tuotossa. Erot johtunevat erilaisista pakastus- ja mittausmenetelmistä: he olivat mm. käyttäneet FCS:ää puskureissaan. Kemiluminesenssi on erityisen herkkä solun tilan indikaattori, sillä se edellyttää koko aktivaatioketjun toimivuutta kohteen tunnistuksesta, ingestiosta, oksidaasisysteemistä ja energiantuotosta aina degranulaatioon ja myeloperoksidaasin eksosytoosiin asti (Albrecht ja Jungi, 1993). Havaitut erot voivat selittyä osaltaan myös sillä, mihin pakastettuja soluja verrataan: jos ns. tuoreista soluista on jo pesty pois suuri osa reseptoreista, ei niitä pakastuksessakaan voi enää paljoka irrota.

Monosyyttejä ei tarvitse välttämättä erotella muista leukosyyteistä, vaan ne voidaan pakastaa ja käyttää yhdessä lymfosyyttien ja jopa granulotsyyttien kanssa. Tällöin vältetään eristyksen aiheuttamat vauriot ja solukato sekä säästetään aikaa. Tavallisesta potilaan verinäytteestä (noin 10 ml) voitaisiin eristää leukosyytit ja pakastaa ne myöhempää mittausta varten. Pakastettua kokoveria ei voida käyttää, sillä hengissä säilyvien monosyyttien määrä on niin pieni, että näytettä ei voida laimentaa tarpeeksi, vaan punasolut vaimentavat kemiluminesenssia liikaa. Monosyyttien kemiluminesenssin kinetiikka säilyy pakastuksessa, mutta kun mittauksessa ovat mukana kuolleet granulotsyytit, niin voimakas spontaani CL häiritsee varsinkin opsonisoimattomalla zymosaanilla tehtäviä mittauksia.

Monosyyttien käytössä voi aiheutua ongelmia siitä, että ne tuottavat suurimman osan esimerkiksi fagosytoosiin tarvitsemastaan energiasta oksidatiivisella fosforylaatiolla, jolloin hapen puute voi vaikuttaa tuloksiin enemmän kuin neutrofiileillä.

Pakastetut monosyytit saattaisivat sopia standardeiksi esim. FACS-määrittelyyn ainakin komplementtireseptorien osalta. Myös kemiluminesenssimäärittelyssä ne voisivat toimia

sisäisinä standardeina, jos tulosten suurta hajontaa saadaan pienennettyä sulattamalla solut aina täsmälleen samalla tavalla. Potilasnäytteet voidaan säilyttää pakastamalla, jos on todettu, että erot voidaan havaita monosyyteissä vielä pakastuksen jälkeen.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Adam, M., Benbunan, M., Femand, J.P., Gisselbrecht, C., Sitthy, X., Maréchal, B., Marchix, T., Gerota, J. (1990) *Bone Marrow Transplant.* 5(Suppl 1), 33-34

Albrecht, D., Jungi, T.W. (1993) *J. Leukoc. Biol.* 54, 300-306

Allieri, M.A., Lopez, M., Douay, L., Mary, J.Y., NGuyen, L., Gorin, N.C. (1991) *Bone Marrow Transplant.* 7, 101-105

Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F., Crowe, J.H. (1987) *Cryobiology* 24, 324-331

Anchordoguy, T.J., Cecchini, C.A., Crowe, J.H., Crowe, L.M. (1991) *Cryobiology* 28, 467-473

Andreesen, R., Scheibenbogen, C., Brugger, W., Krause, S., Meerpohl, H.G., Leser, H.G., Engler, H., Lohr, G.W. (1990) *Cancer Res.* 50, 7450-7456

Andreesen, R., Hennemann, B. (1991) *Pathobiology* 59, 259-263

Areman, E.M., Simonis, T.B., Carter, C.S., Read, E.J., Klein, H.G. (1988) *Transfusion* 28, 151-156

Arnaud, F.G., Pegg, D.E. (1990) *Cryobiology* 27, 130-136

Auwerx, J. (1991) *Experientia* 47, 22-31

Bakás, L.S., Disalvo, E.A. (1991) *Cryobiology* 28, 347-353

Bank, H. (1980a) *Cryobiology* 17, 187-197

Bank, H. (1980b) *Cryobiology* 17, 262-272

Beaujean, F., Hartmann, O., Kuentz, M., Le Forestier, C., Divine, M., Duedari, N. (1991) *Bone Marrow Transplant.* 8, 291-294

Birkeland, S.A., (1980) *J. Immunol. Methods.* 35, 57-67

Bolscher, B.G.J.M., Zoutberg, G.R., Cuperus, R.A., Wever, R. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 784, 189-191

Boutron, P. (1990) *Cryobiology* 27, 55-69

- Briheim, G., Stendahl, O., Dahlgren, C. (1984) *Infect. Immun.* 45, 1-5
- Brock, M.A. (1987) *Cryobiology* 24, 412-419
- Brock, M.A., Adler, W.H. (1989) *Cryobiology* 26, 256-264
- Cairo, M.S., Allen, J., Higgins, C., Baehner, R.L., Boxer, L.A. (1983) *Am. J. Pathol.* 113, 67-74
- Capeillère-Blandin, C., Chauvet, G., Tresset, F., Descamps-Latscha, B. (1990) *Biol. Cell* 69, 73-82
- Collins, S.J. (1987) *Blood* 70, 1233-1244
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Mouradian, R. (1983) *Cryobiology* 20, 346-356
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Rudolph, A.S., Wistrom, C.A., Spargo, B.J., Anchoroguy, T.J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 947, 367-384
- de Boer, M., Reijneke, R., van de Griend, R.J., Loos, J.A., Roos, D. (1981) *J. Immunol. Methods* 43, 225-239
- Donaldson, S.L., Miller, G.A., Rice, P.L., Ranney, R.R., Tew, J.G. (1981) *J. Clin. Immunol.* 1, 106-112
- Dransfield, I., Corcoran, D., Partridge, L.J., Hogg, N., Burton, D.R. (1988) *Immunology* 63, 491-498
- Dutcher, J.P. (1984) *Am. J. Med. Sci.* 287, 11-17
- Dyett, D.E., Malawista, S.E., van Blaricom, G., Melnick, D.A., Malech, H.L. (1985) *J. Immunol.* 135, 2090-2094
- Elstad, M.R., Parker, C.J., Cowley, F.S., Wilcox, L.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. (1994) *J. Immunol.* 152, 220-229
- Fahy, G.M., Lilley, T.H., Linsdell, H., Douglas, M.St.J., Meryman, H.T. (1990) *Cryobiology* 27, 247-268
- Fearon, D.T., Collins, L.A. (1983) *J. Immunol.* 130, 370-375
- Frim, J., Mazur, P. (1983) *Cryobiology* 20, 657-676
- Fujiwara, S., Akiyama, M., Yamakido, M., Seyama, T., Kobuke, K., Hakoda, M., Kyoizumi, S., Jones, S.L. (1986) *J. Immunol. Methods.* 90, 265-273

- Gallin, J.I., Metcalf, J.A., Roos, D., Seligmann, B., Friedman, M.M. (1984) *J. Immunol.* 133, 415-421
- Glassman, A.B., Christopher, J.B. (1984) *Transfusion* 24, 538-539
- Gorin, N.C. (1986) *Clin. Haematol.* 15, 19-48
- Gramatzki, M., Strong, D.M., Grove, S.B., Bonnard, G.D. (1982) *J. Immunol. Methods* 53, 209-220
- Gray, J.D., Golub, S.H. (1984) *Methods Enzymol.* 108, 363-367
- Hammer, M.C., Baltch, A.L., Conroy, J.V., Smith, R.P. (1986) *Cryobiology* 23, 525-530
- Hansen, J.-B., Halvorsen, D.S., Haldorsen, B.C., Olsen, R., Sjursen, H., Kierulf, P. (1995) *J. Leukoc. Biol.* 57: 235-241
- Harris, P., Ralph, P. (1985) *J. Leukoc. Biol.* 37, 407-422
- Hastings, M.J.G, Petricevic, I., Williams, A.J., Cole, P.J., Easmon, C.S.F. (1982) *Br. J. exp. Path.* 63, 147-153
- Hill, R.S., Still, B.J., Mackinder, C.A. (1981) *Cryobiology* 18, 533-540
- Hirsen, D.J., Dubin, B.A., Malham, L.M. (1983) *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* 71, 241-244
- Holden, H.T., Oldham, R.K., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B. (1977) *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 611-622
- Holt, M.E., Ryall, M.E.T., Campbell, A.K. (1984) *Br. J. exp. Path.* 65, 231-241
- Huang, A.J., Silverstein, S.C., Malawista, S.E., (1991) *J. Leukoc. Biol.* 50, 624-627
- Hviid, L., Albeck, G., Hansen, B., Theander, T.G., Talbot, A. (1993) *J. Immunol. Methods.* 157, 135-142
- Ichino, Y., Ishikawa, T. (1985) *J. Immunol. Methods.* 77, 283-290
- Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T., Machida, T. (1990) *J. Reprod. Fertil.* 89, 91-97
- Keller, H.U., Bessis, M. (1975) *Nature* 258, 723-724
- Kessinger, A., Vose, J.M., Bierman, P.J., Armitage, J.O. (1991) *Exp. Hematol.* 19, 1013-1016

- Kierulf, P., Andersen, Å.-B.W. (1991) *Pathobiology* 59: 197-199
- Kleinschuster, S.J., VanKampen, K.R., Spendlove, R., Atluru, D., Zupancic, M.L., Muscoplat, C.C. (1979) *Am. J. Vet. Res.* 40, 1649-1651
- Koch, E., Larak, M., Ellendorff, F. (1991) *Cryobiology* 28, 405-412
- Korchak, H.M., Roos, D., Giedd, K.N., Wynkoop, E.M., Vienne, K., Rutherford, L.E., Buyon, J.P., Rich, A.M., Weissmann, G. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4968-4972
- Kruuv, J., Glofcheski, D.J., Lepock, J.R. (1990) *Cryobiology* 27, 232-246
- Kruuv, J., Glofcheski, D.J. (1992) *Cryobiology* 29, 291-295
- Kubo, K, Tachino, J., Ichikawa, S., Hamamoto, K., Ueda, K. (1991) *Bone Marrow Transplant.* 8, 185-190
- Lamb, L.S., Willoughby, J.B., Willoughby, W.F. (1995) *Cryobiology* 32, 344-357
- Lasky, L.C., Ash, R.C., Kersey, J.H., Zanjani, E.D., McCullough, J. (1982) *Blood* 59, 822-827
- Law, P., Alsop, P., Dooley, D.C., Meryman, H.T. (1983) *Cryobiology* 20, 644-651
- Leculier, C., Benzerara, O., Couprie, N., Francina, A., Lasne, Y., Archimbaud, E., Fiere, D. (1992) *Br. J. Haematol.* 81, 81-85
- Letellier, C., Rameliarison, L., Fizet, D., Ferrer, A.M., Vezon, G. (1991) *Vox Sang.* 61, 90-95
- Leung, L., Saigo, K, Grant, D. (1989) *Blood* 73, 177-184
- Lionetti, F.J., Luscinskas, F.W., Hunt, S.M., Valeri, C.R., Callahan, A.B. (1980) *Cryobiology* 17, 297-310
- Lo, S.K., Detmers, P.A., Levin, S.M., Wright, S.D. (1989) *J. Exp. Med.* 169, 1779-1793
- Luscinskas, F.W., Lionetti, F.J., Melaragno, A.J., Valeri, C.R. (1983) *Cryobiology* 20, 1-6
- Makino, S., Harada, M., Akashi, K., Taniguchi, S., Shibuya, T., Inaba, S., Niho, Y. (1991) *Bone Marrow Transplant.* 8, 239-244
- Malawista, S.E., de Boisfleury-Chevance (1982) *J. Cell Biol.* 95, 960-973
- Malawista, S.E., Van Blaricom, G., Cretella, S.B. (1985) *Inflammation* 9, 99-106

- Malawista, S.E., Van Blaricom, G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 454-458
- Malawista, S.E., Van Blaricom, G, Breitenstein, M.G. (1989) *J. Clin. Invest.* 83, 728-732
- Malawista, S.E., de Boisfleury-Chevance, A. (1991) *J. Leukoc. Biol.* 50, 313-315
- Mazur, P., (1984) *Am. J. Physiol.* 247, C125-C142
- McCarthy, D.M., Goldman, J.M., Peters, T.J. (1981) *Br. J. Haematol.* 49, 227-234
- McCarthy, D.M., Skacel, P., Raja, K., Martin, F., Peters, T.J., Goldman, J.M. (1984) *Br. J. Haematol.* 56, 45-54
- McGann, L.E., Grant, M., Turner, A.R., Turc, J.M. (1981) *Cryobiology* 18, 622
- McGann, L.E., Yang, H., Walterson, M. (1988) *Cryobiology* 25, 178-185
- McGarrity, S.T., Hyers, T.M., Webster, R.O. (1988) *J. Leukoc. Biol.* 44, 93-100
- Mentzer S.J., Guyre, P.M., Burakoff, S.J., Faller, D.V. (1986) *Cell. Immunol.* 101, 312-319
- Milson, T.J., Keller, R.H. (1982) *J. Clin. Lab. Immunol.* 7, 205-213
- Myhrvold, V., Mørland, B. (1985) *Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. C* 93, 43-48
- Næss, A., Halstensen, A., Solberg, C.O. (1986) *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 81, 235-237
- Neronov, A.J., Bratanov, M.B., Tsenov, I.A. (1992) *Cryobiology* 29, 296-299
- Oldham, R.K., Dean, J.H., Cannon, G.B., Ortaldo, J.R., Dunston, G. (1976) *Int. J. Cancer* 18, 145-155
- Owens, M., Cimino, C., Donnelly, J. (1991) *Transfusion* 31, 160-163
- Pegg, D.E. (1981) *Cryobiology* 18, 221-228
- Pertoft, H., Johnsson, A., Wärmegård, B., Seljelid, R. (1980) *J. Immunol. Methods* 33, 221-229
- Petrequin, P.R., Todd III, R.F., Smolen, J.E., Boxer, L.A. (1986) *Blood* 67, 1119-1125
- Pross, H.F., Maroun, J.A. (1984) *J. Immunol. Methods* 68, 235-249
- Roos, D., Voetman, A.A., Meerhof, L.J. (1983) *J. Cell Biol.* 97, 368-377

- Roos, D., de Boer, M. (1986) *Methods Enzymol.* 132, 225-243
- Roos, D., Voetman, A.A. (1986) *Methods Enzymol.* 132, 250-257
- Rothwell, D.J., Doumas, B.T. (1975) *J. Lab. Clin. Med.* 85, 950-956
- Rowe, A.W., Lenny, L.L. (1980) *Cryobiology* 17, 198-212
- Rudolph, A.S., Crowe, J.H. (1985) *Cryobiology* 22, 367-377
- Scheiwe, M.W., Pusztai-Markos, Zs., Essers, U., Seelis, R., Rau, G., Körber, C., Stürner, K.H., Jung, H., Liedtke, B. (1981) *Cryobiology* 18, 344-356
- Schmidt-Wolf, I.G., Aihara, M., Negrin, R.S., Blume, K.G., Chao, N.J. (1989) *J. Immunol. Methods* 125, 185-189
- Schuff-Werner, P., Müller, U., Unger, C, Nagel, G.A., Eibl, H. (1988) *Cryobiology* 25, 487-494
- Schwartz, G.J., Diller, K.R. (1984) *Cryobiology* 21, 654-660
- Sears, H.F., Rosenberg, S.A. (1977) *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 183-187
- Sears, H.F., Tondreau, S.C., Rosenberg, S.A. (1978) *J. Natl. Cancer Inst.* 61, 1011-1016
- Shah, V.O., McCarley, D.L., Weiner, R.S. (1984) *Cryobiology* 21, 475-479
- Simon, J.D., Flinton, L.J., Albala, M.M. (1977) *Transfusion* 17, 23-8
- Slease, R.B., Strong, D.M., Wistar Jr., R., Budd, R.E., Scher, I. (1980) *Cryobiology* 17, 523-529
- Stear, M.J., Allen, D., Spooner, R.L. (1982) *Tissue Antigens* 19, 134-139
- Stevenson, H.C., Bonvini, E., Favilla, T., Miller, P., Akiyama, Y., Hoffman, T., Oldham, R., Kanapa, D. (1984) *J. Leukoc. Biol.* 36, 521-531
- Sutton, R.L. (1991) *Cryobiology*, 28, 530
- Szigeti, R., Stevens, D., Ernberg, I., Klein, G., Masucci, M.G., Svedmyr, E., Klein, E. (1981) *J. Immunol. Methods* 46, 369-374
- Takahashi, T., Bross, J.B., Shaber, R.E., Williams, R.J. (1985a) *Cryobiology* 22, 336-350
- Takahashi, T., Hammett, M.F., Cho, M.S. (1985b) *Cryobiology* 22, 215-236

- Takahashi, T., Inada, S., Pommier, C.G., O'Shea, J.J., Brown, E.J. (1985c) *J. Immunol.* 134, 4062-4068
- Takahashi, T., Hirsh, A., Erbe, E.F., Bross, J.B., Steere, R.L., Williams, R.J. (1986) *Cryobiology* 23, 103-115
- Tsvetkov, Ts., Nickolov, Ch., Buckureshtliev, A., Mincheff, M., Tsoney, L., Terziev, R., Popov, D. (1986) *Cryobiology* 23, 531-536
- Tsvetkov, Tsv.D., Nikolov, Tsh.N., Bukureshliev, A.D., Tsonev, L.I., Minchev, M.S., Tersiev, R.K., Angelova, M.G., (1987) *Cryobiology* 24, 484-487
- Tollerud, D.J., Brown, L.M., Clark, J.W., Neuland, C.Y., Mann, D.L., Pankiw-Trost, L.K., Blattner, W.A. (1991) *J. Clin. Lab. Anal.* 5, 255-261
- van der Meulen, F.W., Reiss, M., Stricker, E.A.M., van Elven, E., von dem Borne, A.E.G.Kr. (1981) *Cryobiology* 18, 337-343
- van Lambalgen, R., Farrant, J., Bradley, B.A. (1979) *J. Immunol. Methods* 27, 327-338
- Venkataraman, M., Westerman, M.P. (1986) *Cryobiology* 23, 199-208
- Venkataraman, M., Westerman, M.P. (1987) *Cryobiology* 24, 103-111
- Venkataraman, M., Westerman, M.P. (1990) *Cryobiology* 27, 137-142
- Venkataraman, M. (1992) *Cryobiology* 29, 165-174
- Venkataraman, M., Rao, D.S., Westerman, M.P. (1992) *J. Lab. Clin. Med.* 120, 453-458
- Venkataraman, M. (1994) *Cryobiology* 31, 468-477
- Vingerhoets, J., Vanham, G., Kestens, L., Gigase, P. (1995) *Cryobiology* 32, 105-108
- Voetman, A.A., Bot, A.A.M, Roos, D. (1984) *Blood* 1, 234-237
- Wakefield, J.St.J., Gale, J.S., Berridge, M.V., Jordan, T.W., Ford, H.C. (1982) *Biochem. J.* 202, 795-797
- Weiner, R.S., Normann, S.J. (1981) *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 255-260
- Yamashita, T., Hirai, J. (1981) *Cryobiology* 18, 453-459
- Yang, H., Walterson, M., McGann, L. (1987) *Cryobiology* 24, 588

Yang, H., Arnaud, F., McGann, L.E. (1992) *Cryobiology* 29, 500-510

Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Thiel, E., Fütterer, A., Herzog, V., Wirtz, A. (1988) *Int. J. Cancer* 41, 456-461