

Instytut Biotechnologii i Ochrony Środowiska WSP w Zielonej Górze, *Katedra Mikrobiologii i Immunologii WNP US w Szczecinie, **Zakład Immunodiagnostyki AM w Poznaniu

STOSIK M., DEPTUŁA W.*, TOKARZ-DEPTUŁA B.*,
WIKTOROWICZ K.*, KOSTRZEWA A.**

Cytometryczne badania metabolizmu tlenowego granulocytów obojętnochłonnych u karpia (Cyprinus carpio) zdrowych

Cytometric studies on oxidative metabolism in neutrophilic granulocytes of healthy carps (*Cyprinus carpio*)

Celem badań była adaptacja techniki cytometrycznej oceny wybuchu oddechowego granulocytów obojętnochłonnych (GO) stosowanej u ludzi oraz rozpoznanie możliwości uzyskania wiarygodnej oceny metabolizmu tlenowego GO u karpia zdrowych w różnym wieku.

Badano karpie zdrowe, w wieku od 3 m-cy do 5 lat. Próbkę krwi pełnej heparynizowanej zawieszano w roztworze NaCl i pozostawiano na 30 minut, w temp. 21°C. Do rozcieńczonych prób krwi wprowadzano 15 µL 0,3 mmol DCFH-DA, a następnie po 30 min. inkubacji dodawano 2 µL PMA, 50 µL bakterii znakowanych jodkiem propidyny (JP), 10 µL opsonizowanego zymosan (OZ) lub 20 µL fMLP w celu stymulacji produkcji nadtlenu wodoru przez GO. Po upływie dalszych 20 minut inkubacji do prób dodawano 300 µL płynu lizującego. Próby pozostawiano przez 20 min. po czym dokonywano pomiaru przy użyciu cytometru przepływowego. Pomiar wykonywano w zakresie zielonego widma światła (515–548 nm). Stosując wzmocnienie sygnału analizowano fluorescencję powstałej DCF. Miarą intensywności fluorescencji wybranych populacji komórkowych były wartości „średniego kanału fluorescencji” („SKF”).

Badania wykazały wzrost wartości „SKF” GO w porównaniu z „SKF” uzyskanym dla GO, które nie były aktywowane lub nie uległy aktywacji w odpowiedzi na PMA, bakterie znakowane JP, OZ i fMLP. Fluorescencja GO, porównywana ze „SKF” komórek, które nie były stymulowane PMA, była największa u karpia w wieku 11–21 m-cy, średnia u ryb w wieku 3–9 m-cy, najmniejsza u karpia w wieku 23–29 m-cy oraz u tartaków w wieku >5 lat. Odmienne obrazy obserwowano w przypadku „SKF” wyselekcjonowanej frakcji GO pobudzonych PMA, wobec „SKF” GO, które nie odpowiedziały reakcją pobudzenia na PMA. Wynika z tego, że największa fluorescencja występowała u ryb w wieku 23–29 m-cy oraz u tartaków. Natomiast u pozostałych karpia różnica „SKF” była istotnie mniejsza. Jednocześnie stwierdzono, że najwyższy odsetek GO pobudzonych PMA występował u ryb w wieku 11–21 m-cy, istotnie mniejszy u ryb w wieku 3–9 m-cy oraz najmniejszy u karpia w wieku 23–29 m-cy i tartaków. Poboczny charakter zmian fluorescencji wykazywały, w stosunku do obserwowanego przy użyciu PMA, wartości numeryczne „SKF” w przypadku użycia bakterii znakowanych JP, OZ i fMLP. Wartości numeryczne „SKF” uzyskane przy użyciu tych stymulatorów były jednak niższe, zwłaszcza w przypadku fMLP.

Wartości numeryczne „SKF”, określone przy zastosowaniu zwłaszcza PMA można uznać za dobry i obiektywny wyznacznik czynnościowej funkcji metabolicznej i bakteriobójczej GO oraz marker zdolności tych komórek do fagocytozy.