

ANALIZA, METODĄ CYTOMETRII PRZEPIYWOWEJ, ODPOWIEDZI LEUKOCYTÓW SZCZURÓW IMMUNIZOWANYCH I ZARAŻONYCH *FASCIOLA HEPATICA*

LUIZA JEDLINA-PANASIUK

Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

ABSTRACT. Flow cytometry analysis of leukocytes response in rats immunized and infected with *Fasciola hepatica*. In the present experiment the differences in blood leucocytes between rats immunised intranasally with cDNA encoding *F. hepatica* GST, challenged with the parasite (group 1) and non-immunised infected rats (group 2) were compared. The number of leukocytes were estimated by flow cytometry on the 1, 5, 9 week after infection. Changes in the level of blood lymphocytes and monocytes were similar, with an increasing tendency in both groups. The level of eosinophils decreased to the 9th week after infection in both groups, however the number of these cells was seven times higher in control rats than in immunised rats.

Key words: cDNA vaccine, *Fasciola hepatica*, flow cytometry.

WSTĘP

Cytometria przepływowa jest stosowana w wielu dziedzinach badawczych takich jak: immunologia, onkologia, toksykologia, genetyka, diagnostyka hematologiczna, wirusologiczna i parazytologiczna (Kawiak i Skierski 1992, Wilkerson i wsp. 1995, Baj 1996, Kawiak 1996, Płytycz 1996, Pojda i Strużyna 1996, Perez i wsp. 1998, Winnicka 2001). W prezentowanych badaniach metoda ta została zastosowana do określenia odpowiedzi leukocytów krwi obwodowej szczurów immunizowanych i zarażonych *Fasciola hepatica*.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 12 szczurach obu płci, szczepu wsobnego Sprague-Dawley. Zwierzęta podzielono na dwie grupy: pierwsza była immunizowana dwukrotnie donosowo 50µg cDNA kodującym GST, a następnie zarażona 30 metacerkariami *F. hepatica*. Grupę drugą, kontrolną, stanowiły zwierzęta nieszczepione lecz zarażone *F. hepatica*. W 1, 5, 9 tygodniu po zarażeniu zwierzęta usypiano podając im 5% ketaminę (narkamon, SPOFA, PRAHA) oraz morbital (BIOWET, Pu-

ławy) a następnie pobierano krew z serca do próbek zawierających 5 mM EDTA-K₂.

Oznaczanie całkowitej liczby leukocytów krwi

200 µl krwi obwodowej rozcieńczano 20-krotnie płynem Turka, który zabarwia jądro leukocytów oraz hemolizuje krwinki czerwone, w mieszalniku Thoma. Po wymieszaniu, komórki liczone w komorze Bürkera.

Przygotowanie prób do badań cytometrycznych

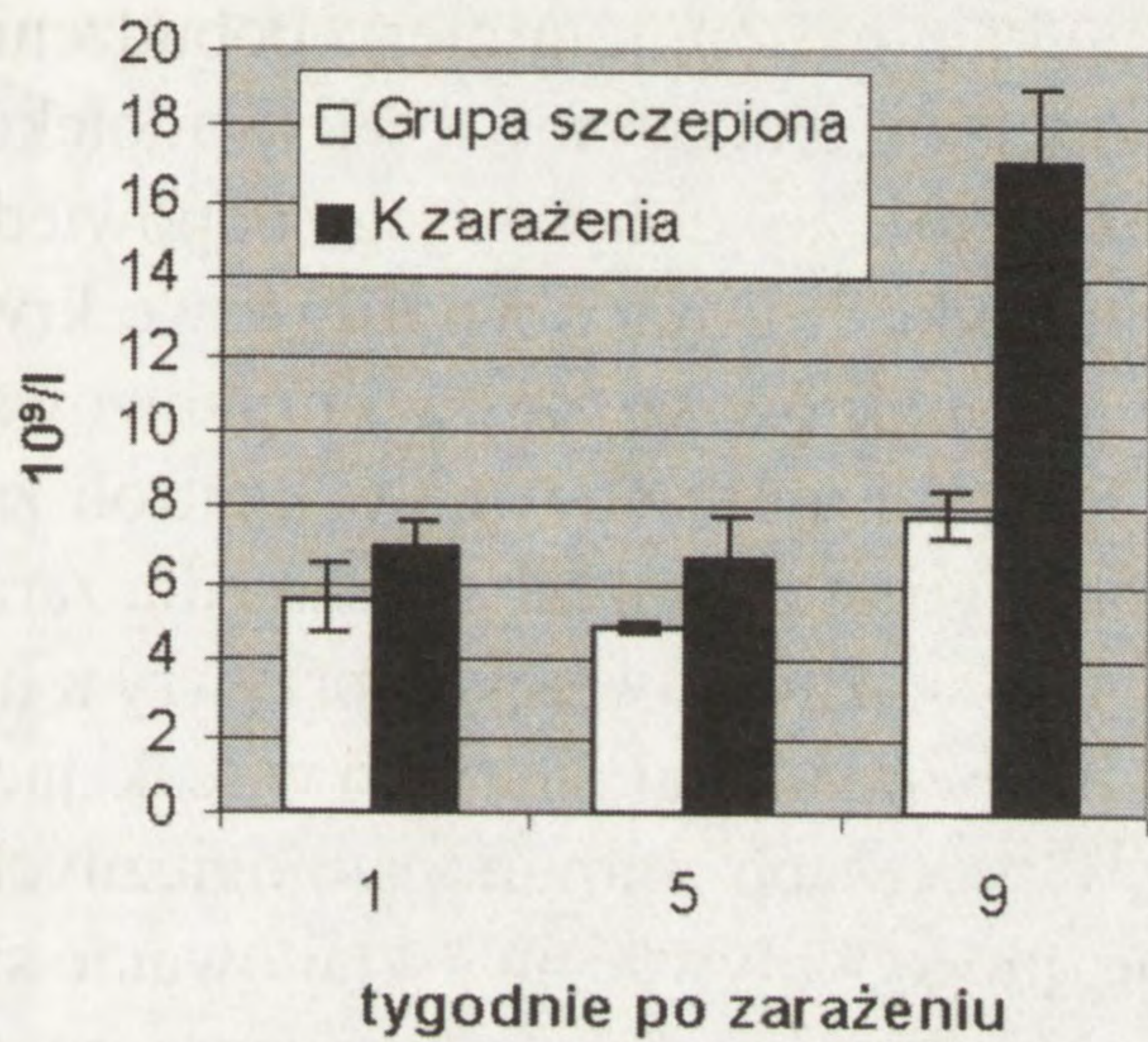
Do badań użyto znakowane fluorochromami przeciwciał monoklonalnych firmy Pharmingen. W próbce cytometrycznej (FALCON) mieszano 50 µl krwi z ustaloną w toku miareczkowania ilością przeciwciał monoklonalnych CD 45+ i przeciwciał poliklonalnych jako kontrolę izotypową. Zawiesinę inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemni 15 minut. Erytrocyty poddawano lizie za pomocą 1 ml mieszaniny lizującej (FACS lysing solution; Becton Dickinson) przez 12 min. Pozostałości błon erytrocytarnych usuwano przez wypłukiwanie w PBS z 10 % ACD, 0,2% Na N₃ i 10 mM EDTA-K₂. Wyznakowane komórki zawieszono w PBS z 0,5% formaldehydem. Następnie komórki wprowadzono do cytometru. Próby analizowano w cytometrze przepływowym FACStrak (Becton Dickinson).

Dane z cytometru zbierano i analizowano przy użyciu programu CellQuest. Intensywność fluorescencji zależy od obecności właściwego antygeny na powierzchni komórki oraz od jego ekspresji. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej wymienionego programu. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci średnich wartości odsetka, co może dawać ogólny pogląd o udziale poszczególnych populacji leukocytów w odpowiedzi immunologicznej szczurów szczepionych i kontrolnych na inwazję *F. hepatica*.

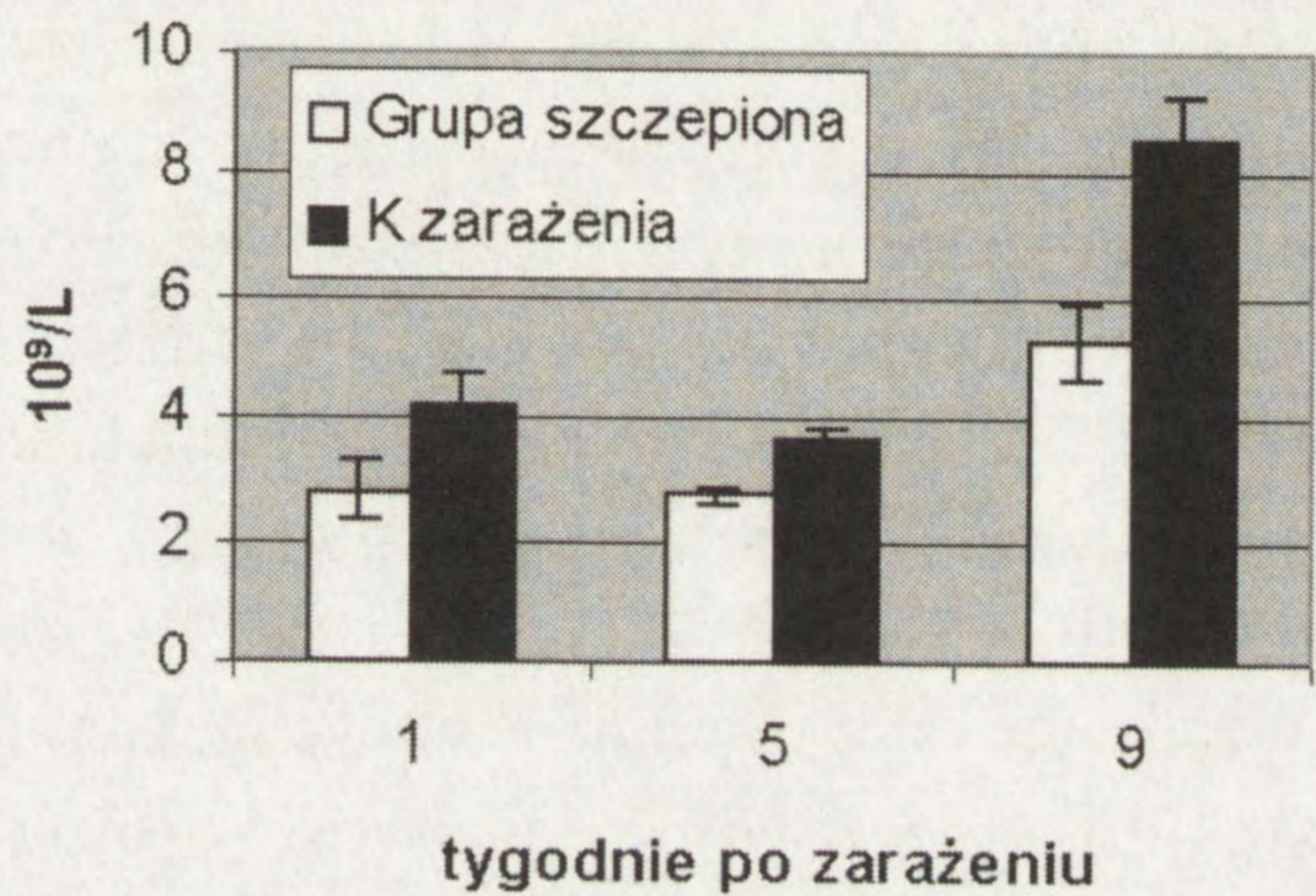
WYNIKI

Badano zmiany w liczebności limfocytów, eozynofilów, monocytów oraz neutrofilów w kolejnych tygodniach po zarażeniu metacerkariami *F. hepatica*. Liczba leukocytów u zarażonych szczurów kontrolnych była istotnie wyższa niż u szczurów szczepionych w 9 tpz. (Rys. 1). Najwyższą liczbę limfocytów – 8,500 10⁹/L odnotowano w grupie kontrolnej w 9 tpz, a najniższą (3,600 10⁹/L) w 5 tpz. W grupie zwierząt immunizowanych, również w 5 tpz stwierdzono najniższą liczbę limfocytów (2,700 10⁹/L), natomiast w 9 tpz liczba ich wynosiła średnio 5,200 10⁹/L (Rys. 2). We krwi szczurów szczepionych cDNA GST, eozynofilia była wyraźnie słabsza niż w grupie kontrolnej i nie przekroczyła 25 % w 1 tpz (Rys. 3).

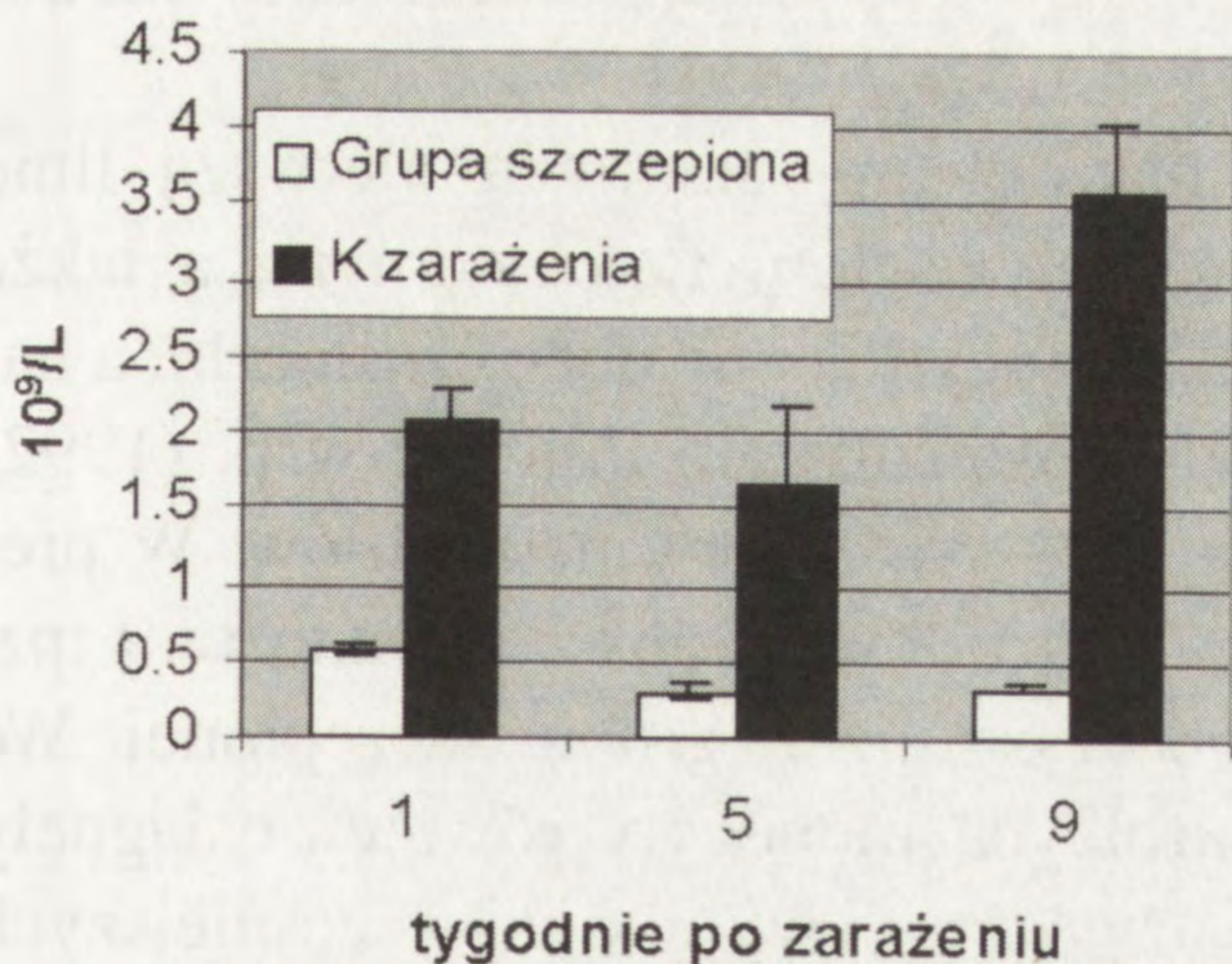
We krwi zwierząt nieszczepionych monocyty osiągnęły poziom maksymalny w 9 tpz. W tym czasie również u szczurów immunizowanych obserwowano maksymalną liczbę monocytów, jej wartość była jednak niższa niż w grupie kontrolnej (Rys. 4). Najwyższy poziom neutrofilów zaobserwowano w grupie kontrolnej w 9 tpz. Był on wtedy 7 razy wyższy niż w grupie szczepionej (Rys. 5).



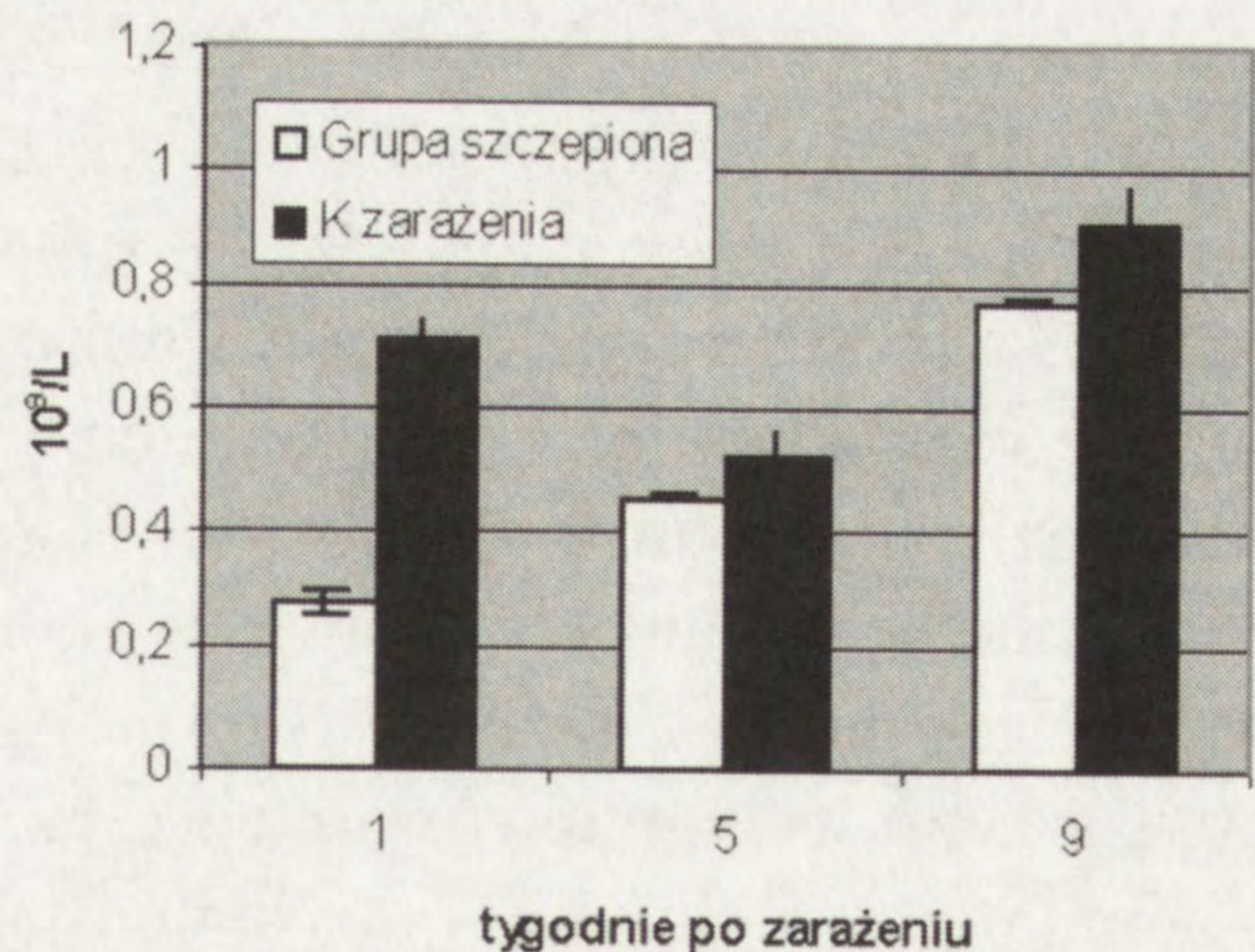
Rys. 1. Bezwzględna liczba leukocytów we krwi obwodowej szczurów w kolejnych tygodniach po zarażeniu *F. hepatica*



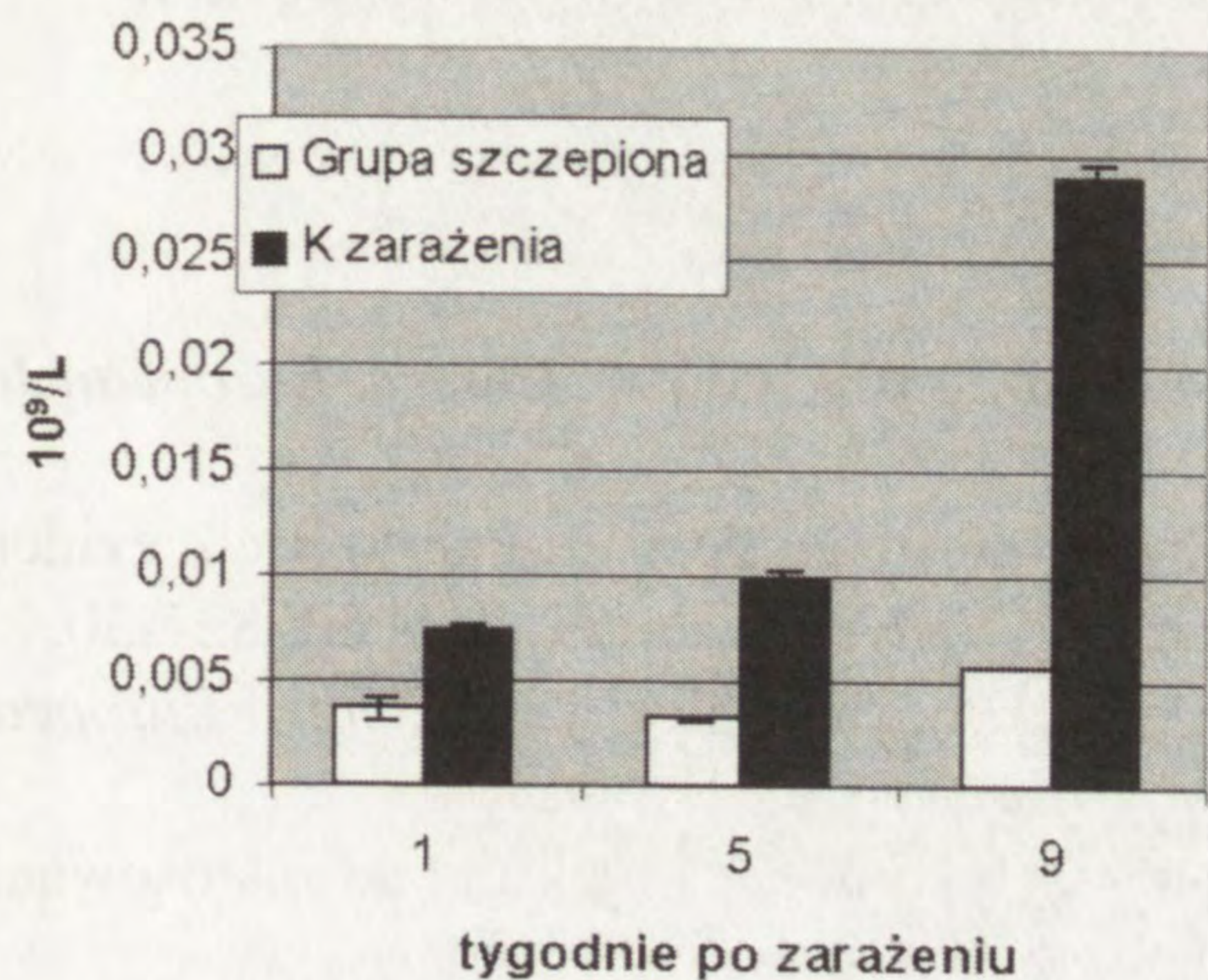
Rys. 2. Bezwzględna liczba limfocytów we krwi obwodowej szczurów w kolejnych tygodniach po zarażeniu *F. hepatica*



Rys. 3. Bezwzględna liczba eozynofiliów we krwi obwodowej szczurów w kolejnych tygodniach po zarażeniu *F. hepatica*.



Rys. 4. Bezwzględna liczba monocytów we krwi obwodowej szczurów w kolejnych tygodniach po zarażeniu *F. hepatica*



Rys. 5. Bezwzględna liczba neutrofilów we krwi obwodowej szczurów w kolejnych tygodniach po zarażeniu *F. hepatica*

DYSKUSJA

W ostatnim czasie coraz większą rolę w procesie rozpoznawania i prognozowania przebiegu wielu chorób odgrywają badania wchodzące w zakres nowych metod analiz laboratoryjnych (Kawiak 1996). Są one niezwykle przydatne w badaniu parametrów krwi obwodowej, w określaniu stanu immunologicznego poprzez badanie komórek pochodzących z różnych materiałów biologicznych (Kawiak i Skierski 1992).

W efekcie zarażenia żywiciela przez *F. hepatica* następuje u niego pobudzenie reakcji obronnych i mobilizacja różnych populacji leukocytów. Wiele molekuł uwalnianych przez tę przywrę do ciała żywiciela może modulować jego odpowiedź obronną. W trakcie eksperymentu badano dynamikę liczby eozynofiliów we krwi zwierząt szczepionych i zarażonych. Poziom eozynofiliów szczurów immunizowanych dwukrotnie cDNA GST był niższy niż wartości obserwowane w kontroli zarażenia. Tak jak w innych robaczycach, eozynofilia jest charakterystyczna dla zarażenia przez *F. hepatica* i jest uważana za ważny wskaźnik inwazji tej przywry u ludzi (Hillyer i Soler de Galanes 1999). Eozynofile biorą udział nie tylko w reakcjach obronnych ssaków, ale również uczestniczą w procesach immunopatologicznych. Ponadto, przez swoje właściwości biologiczne, mogą wpływać na kształtowanie się odpowiedzi immunologicznej. Rola granulocytów kwasochłonnych podczas inwazji *F. hepatica* nie jest do końca jasna. Z pewnością komórki te biorą udział w reakcjach zapalnych i immunopatologicznych, które występują podczas zarażenia tą przywrą (Meeusen i Brandon 1999), jak również w uszkodzaniu tegumentu młodocianych przywr.

Granulocyty obojętnochłonne wraz z makrofagami stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami, dzięki silnym właściwościom fagocytarnym, a także zdolności prezentacji antygenów limfocytom. Fagocytują one obce cząsteczki, a następnie rozkładają je przy udziale enzymów lizosomalnych. Poitou i wsp. (1992) stwierdzili u szczurów zarażonych *F. hepatica* wzrost liczby neutrofilów. W prezentowanych badaniach najwyższy poziom neutrofilów, zaobserwowano w 9 tpz. w grupie kontroli zarażenia. Był on 7 razy wyższy niż w grupie szczepionej. We krwi szczurów immunizowanych oraz kontrolnych monocyty również osiągnęły poziom maksymalny w 9 tpz. Na podstawie uzyskanych wyników i wcześniejszych doniesień (Wędrychowicz i wsp. 2002) można stwierdzić, że wywołanie odpowiedzi immunologicznej na antygen podany w formie cDNA drogą lipotransfekcji błony śluzowej nosa wymaga zastosowania wyższych dawek DNA, niż immunizacja domięśniowa takim samym konstruktem (Wędrychowicz i Wiśniewski 2003).

LITERATURA

- Baj Z. 1996. Wykorzystanie cytometrii przepływowej w badaniach płytek krwi. *Central European Journal of Immunology* 21: 119-127.
- Hillyer G.V., Soler de Galanes M. 1999. Seroepidemiology of schistosomiasis in Puerto Rico: evidence for vanishing endemicity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 827-30.
- Kawiak J. 1996. Rola i miejsce cytometrii przepływowej w badaniach klinicznych. *Central European Journal of Immunology* 21(Supl. 2): 94-981.
- Kawiak J., Skierski 1992. Cytometria przepływowa w badaniach komórek i niektóre jej zastosowania lekarskie. *Postepy Biologii Komórki* 3: 239-254.
- Meeusen E.N.T., Brandon M.R. 1999. The use of antibody-secreting cell probes to reveal tissue-restricted immune responses during infection. *European Journal of Immunology* 24: 469-474.
- Poitou I., Baeza E., Boulard C. 1992. Humoral and cellular immune responses in rats during a prima-

- ry infestation with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 45: 59-71.
- Perez J., Martin De Las Mulas J., Chacon-M De Lara F., Gutierrez-Palomino P.N., Becerrara-Martel C., Martinez-Moreno A. 1998. Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primary and secondarily infected goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 64: 337-348.
- Płytycz B. 1996. Zastosowanie cytometrii przepływowej w immunologii porównawczej. *Central European Journal of Immunology* 21: 182-190.
- Pojda Z., Strużyna J. 1996. Cytometria przepływowa w badaniach komórek krwiotwórczych. *Central European Journal of Immunology* 21: 114-118.
- Wędrychowicz H., Wiśniewski M 2003. Progress in development of vaccines against most important gastrointestinal helminth parasites of humans and animals. *Acta Parasitologica* 48: 238-245.
- Wędrychowicz H., Szymański P., Jedlina-Panasiuk L., Bienkowska-Szewczyk K. 2002. Humoral immune response of rats vaccinated with cDNA or protein form of glutathione-S-transferase of *Fasciola hepatica* to infection with metacercariae of the fluke. *Helminthologia* 39 127-133.
- Wilkerson M.J., Davis W.C., Cheevers W.P. 1995. Peripheral blood and synovial mononuclear cell phenotypes in lentivirus induced arthritis. *Journal of Rheumatology* 22: 8-15.
- Winnicka A. 2001. Immunofenotypowanie limfocytów bydła, owiec i kóz metodą cytometrii przepływowej. *Rozprawy Naukowe i Monografie*. Wydawnictwo SGGW.

Zaakceptowano do druku 14 czerwca 2004