

MINISTERIE VAN MIDDENSTAND EN LANDBOUW

Bestuur voor Onderzoek en Ontwikkeling

Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek – Gent

DEPARTEMENT ZEEVISSERIJ

Onderzoek van de fagocytosecapaciteit bij tarbot (*Psetta maxima*).

D. DECLERCK



Mededelingen van het Departement Zeevisserij
(Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek – Gent)
Publicatie nr. 255 – D/2000/0889/1.

SAMENVATTING

Bij het onderzoek van de fagocytosecapaciteit van tarbot (*Psetta maxima*) werd vooreerst de methode onderzocht om de fagocyten af te zonderen. Daarna werd het fagocytose proces zelf bestudeerd waarbij de invloed van het medium, de temperatuur en de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit werd bepaald. Een goede fagocytosecapaciteit werd bekomen met het AIMV-medium. De toevoeging van serum dat afkomstig was van kabeljauw bleek remmend te werken bij het fagocyteren van de gedode gistcellen. Voor wat de invloed van de temperatuur op de fagocytose betreft, nam bij 4°C circa 60% en bij 12°C en 20°C slechts 30% van de fagocyten deel aan het fagocytoseproces. Uit de proefnemingen omtrent de invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit kwam tot uiting dat de afgezonderde fagocyten 6 dagen bruikbaar waren bij een bewaartemperatuur van 12°C. De bepaling van de fagocytosecapaciteit vond haar toepassing bij de kweek van tarbot waarbij verschillende voedselregimes werden gebruikt. Hierbij kwam tot uiting dat de invloed van het basisregime op de conditie van tarbot minstens 8 weken blijft doorwerken na de vervanging van de basisregimes door visafval.

INLEIDING

Fagocytose is een van de technieken die gebruikt kan worden als indicator voor stressbepaling bij vis (MATHEWS, 1990). Fagocytose, de verslinding van cellen en partikels, biedt vele mogelijkheden in het planten- en dierenrijk, namelijk de opname van partikels van enkele micrometers groot zoals bacteriën of in experimentele situaties zelfs dunne plastieken pareltjes (GREENBERG, 1993)

Fagocyterende cellen hebben een belangrijke functie bij het tot stand komen van de immuunrespons. Tot de fagocyterende cellen behoren zowel de granulocyten, waarvan de neutrofielen in dit kader de belangrijkste zijn als de monocytën/macrofagen. GREENBERG en SILVERSTEIN (1993) noemen de granulocyten polymorfnucleaire leucocyten en de monocytën en macrofagen mononucleaire leucocyten. Monocytën behoren tot het mononucleair - fagocyten-systeem. De monocytën zijn de macrofagen van het bloed. Als monocytën het bloed verlaten naar de weefsels worden ze macrofagen genoemd. Monocytën migreren naar weefselplaatsen van infecties of ontstekingen, waar ze differentiëren in macrofagen die gebroken cellen, dode microorganismen en andere partikels vernietigen (DARNELL et al., 1990).

De verschillende fasen waarbij de fagocytose plaatsgrijpt werden door ROITT en medewerkers (1990) en den OTTOLANDER (1989) beschreven.

Voor de analyses worden voor vis de macrofagen en granulocyten uit de kopnier (pronephros) geïsoleerd. MATHEWS en medewerkers (1990) gaan ervan uit dat de lichtmicroscopische meting van de fagocytose een nauwkeurige en betrouwbare techniek is.

PLASMAN en VRAY (1994) hebben een methode beschreven om de fagocytose activiteit na te gaan door gebruik te maken van fluorescerende partikels zoals bacteriën, gisten of parels. In een ander experiment hebben PLASMAN en VRAY (1993) peritoneale cellen van muizen gescheiden op 12 fracties van Percoll-gradiënten met een eigen densiteit. SANTAREM en FIGUERAS (1994) hebben de effecten bestudeerd van intraperitoneale injecties van *Pasteurella piscicida* o antigen bij tarbot (*Scophthalmus maximus* L.) LERNOUT en OLLEVIER (1992) hebben de invloed van de voedingslipiden op de fagocytosecapaciteit bij de Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*) onderzocht. De invloed van het paaien op de fagocytosecapaciteit van schaar (*Limanda limanda*) werd door DECLERCK (1996) bestudeerd. Uiteindelijk werd door DECLERCK (1998) een onderzoek omtrent de fagocytosecapaciteit van mosselen (*Mytilus edulis*) in de nabijheid van de Belgische kusthavens uitgevoerd.

MATERIAAL en METHODEN

De proefdieren waren afkomstig van de aquacultuur van tarbot. De gemiddelde lengte bedroeg 21cm en het gemiddeld gewicht 170g.

Voor de bloedafname wordt de kieuwboog eerst ontsmet met 70% isopropylalcohol en drooggewreven met absorberend papier. De kieuw wordt doorgeknipt. Voor het onderzoek van de bloedformule wordt 0,5ml bloed in een tapval buisje voorzien van EDTA opgevangen. Na het volledig uitbloeden van de vis wordt de kopnier met steriel dissectiemateriaal weggenomen en in een plastic potje, voorzien van AIMV-medium, gebracht.

Voor de bereiding van 0,5 liter AIMV-medium worden 244ml AIMV + 244ml Leibovitz L15 + 2ml heparine (5000 I.E/ml) en 10ml penicilline\streptomycine (10000 IE/g) angewend. Het AIMV-medium wordt gesteriliseerd met behulp van een membraanfilter (0,22µ) en bewaard bij 4°C.

De kopnier wordt in een homogenisator (V.E.I. catalogus art nr 7351502) gebracht en geplet zonder de bloedcellen te breken en daarna gefiltreerd door een steriele filter van 40µ.

De scheiding van de cellen wordt uitgevoerd met behulp van het Sigma product histopaque-1077.

De gewassen kopnieroplossing (15ml) wordt op 15ml histopaque 1077 aangebracht en gedurende 30 minuten bij 700g (2000T/min) afgecentrifugeerd. Om een betere scheiding te bekomen wordt de temperatuur gedurende het centrifugeren op 12°C gebracht. Hierna wordt de bovenlaag afgezogen en daarna de witte bloedcellenlaag afgezonderd. De witte bloedcellenlaag wordt 2x gewassen met 5ml AIMV-medium en bij 200g gedurende 10 minuten afgecentrifugeerd. Daarna worden de neergeslagen bloedcellen in 5 ml AIMV-medium bewaard. Voor de uitvoering van de fagocytosecapaciteit wordt er naar een concentratie van 40 leucocyten per Kova slide rooster gestreefd.

De overleving van de geïsoleerde (polymorf nucleaire en mononucleaire leucocyten) cellen wordt met trypaanblauw oplossing getest (vitaliteitstest). Het percentage cellen die fagocyteren en de fagocytoseindex worden in functie van de tijd bepaald. De fagocytosetest wordt met behulp van gistcellen uitgevoerd. Er wordt een verhouding bloedcellen \ gistcellen van circa 1 tot 10 nagestreefd. Bij grote fagocytose wordt na ongeveer 4 uur incubatie, een supplement van 20-40µl gistceloplossing aan het medium toegevoegd.

Drie soorten proefnemingen werden uitgevoerd : namelijk de bepaling van het best geschikte medium om de fagocytosetest bij tarbot uit te voeren, het onderzoek van de optimale incubatietemperatuur en de invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit.

RESULTATEN en BESPREKINGEN

Voor wat de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij tarbot betreft, werd zowel het AIMV-medium met kabeljauwserum (test A) of zonder (test B) kabeljauwserum; het PBS-medium (test C) als het RPMI-medium (test D) uitgetest. De incubatietemperatuur waarbij de fagocytose werd uitgevoerd bedroeg 4°C.

Daar de tarbotexemplaren te klein waren om voldoende serum te bekomen werd beroep gedaan op kabeljauwserum. Dit serum bleek goed geschikt bij de bepaling van de fagocytosecapaciteit van bot (*Platichthys flesus*).

Proefopstelling voor de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij tarbot

A- 1000µl WBC + 500µl kabeljauwserum + 70µl gistcellen + 500µl AIMV-medium

B- 1000µl WBC + 70µl gistcellen + 1500µl AIMV-medium

C- 1000µl WBC + 70µl gistcellen + 1000µl PBS-medium

D- 500µl WBC + 70µl gistcellen + 1500µl RPMI-medium

Bij de proefopstelling A, waarbij AIMV-medium en kabeljauwserum werd gebezigd werd geen fagocytose waargenomen. De toevoeging van kabeljauwserum aan het medium bleek de opname van gedode gistcellen door de fagocyten te verhinderen. Deze zienswijze werd bevestigd door proefopstelling B waarbij voldoende fagocytose werd waargenomen in aanwezigheid van het AIMV-medium en zonder kabeljauwserum. Bij de proefopstelling C in aanwezigheid van het PBS-medium en bij proefopstelling D in aanwezigheid van het RPMI-

medium werd eveneens geen fagocytose waargenomen. De proefnemingen werden vijf maal herhaald en gaven steeds dezelfde resultaten.

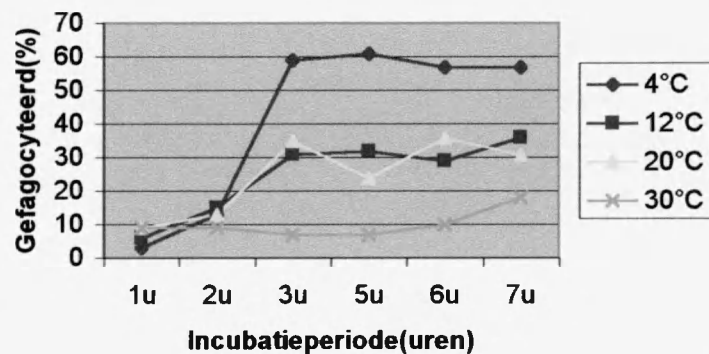
De invloed van de temperatuur op de fagocytosecapaciteit en fagocytoseindex bij tarbot werd bestudeerd. Er werden vier verschillende incubatietemperaturen namelijk : 4°C, 12°C, 20°C en 30°C onderzocht. Het incubatiemedium omvatte 1000µl WBC + 70µl gistcellen + 1500µl AIMV-medium.

In vergelijking met de twee hoogst ingestelde incubatietemperaturen (20°C en 30°C) kwam de fagocytose bij 4°C en 12°C incubatie, trager op gang. Bij 4°C bereikte de fagocytose reeds een maximum na 3 uur incubatie (figuren 1 en 2). Circa 60% van de leucocyten fagocyteerden bij 4°C, terwijl bij 12°C en 20°C slechts 30% aan het fagocytoseproces deelnamen. Het hoogst aantal gefagocyteerde gistcellen per tarbotfagocyt bedroeg 7 à 8. Het fagocyteren bij 30°C kwam gedurende het eerste uur goed op gang, doch viel achteraf stil.

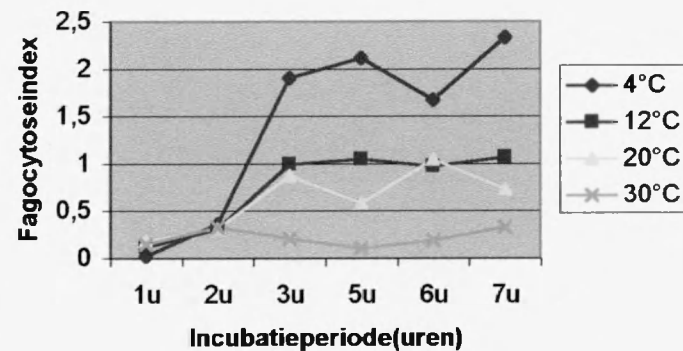
De invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit bij tarbot werd bestudeerd. De afgezonderde fagocyten werden bij 12°C opgeslagen. Na 1d, 2d, 3d, 6d, 8d en 10dagen bewaren werd het fagocytoseproces bij 4°C uitgevoerd. De resultaten werden in de figuren 3 en 4 opgenomen. Bij de fagocyten die slechts 1 dag oud waren kwam het fagocytoseproces slechts langzaam op gang. De oudere fagocyten fagocyteerden bijna onmiddellijk en bereikten reeds een maximum na 3 uur incubatie. De polymorf nucleaire leucocyten en monoccyten verloren hun fagocytosecapaciteit na 10 dagen bewaren bij 12°C.

De bepaling van de fagocytosecapaciteit vond haar toepassing bij de kweek van tarbot waarbij verschillende voedselregimes werden gebruikt. Een eerste lot tarbot juvenielen kreeg het voedsel Provimi, een tweede lot : provimi + visolie + vit C en een derde lot : provimi + visolie + vit C + vit E. Er werden 9 verschillende tarbotten onderzocht; drie van elk lot. Vooral de proefnemingen te starten werden alle tarbotten gedurende 8 weken met visafval gevoederd. Op het bloedmonster van elke vis werd de bepaling van de fagocytosecapaciteit drie maal herhaald. De gemiddelde resultaten van de bepalingen van de fagocytosecapaciteit en de fagocytoseindex zijn in de figuren 5 en 6 opgenomen. Het beste resultaat werd bekomen bij de toevoeging van vitamine C aan het basisvoedsel provimi. De toevoeging van vitamine E deed het effect van de toevoeging van vitamine C teniet. Uit de bepalingen van de fagocytosecapaciteit kwam verder tot uiting dat de invloed van het basisregime een zekere tijd blijft doorwerken na de vervanging van de diverse voedselregimes door visafval.

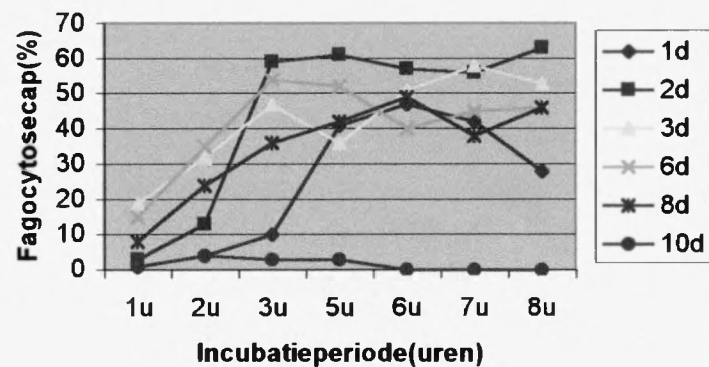
Figuur 1 : Invloed van de incubatietemperatuur op de fagocytosecapaciteit bij tarbot



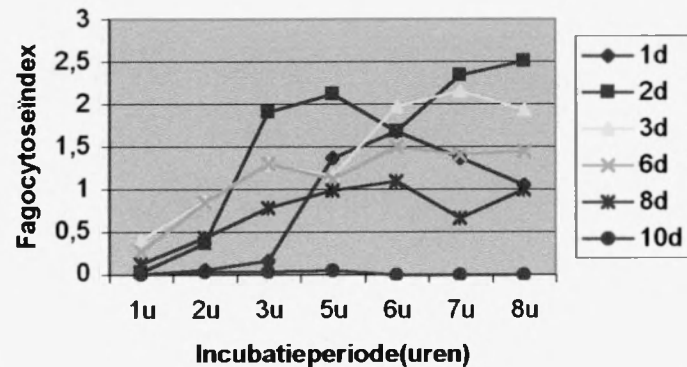
Figuur 2 : Invloed van de incubatietemperatuur op de fagocytoseindex bij tarbot



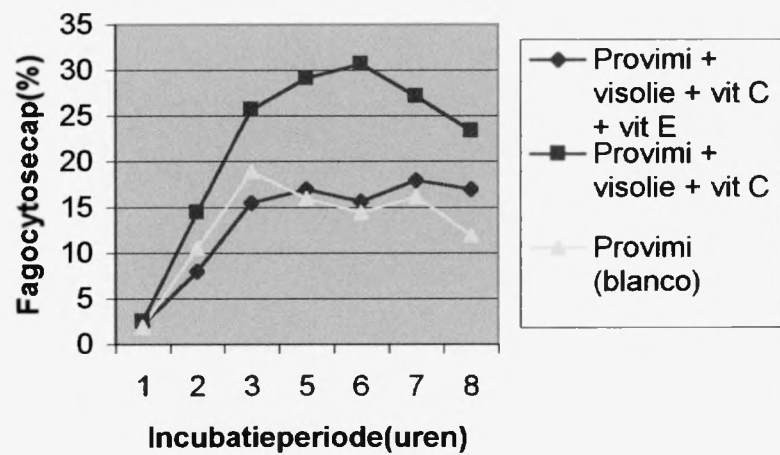
Figuur 3 : Invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit bij tarbot



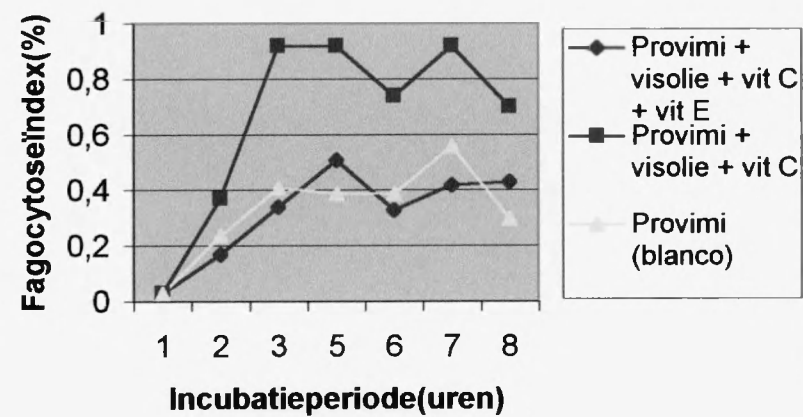
Figuur 4 : Invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytoseindex bij tarbot



Figuur 5 : Invloed van het voedselregime op de fagocytosecapaciteit van tarbot



Figuur 6 : Invloed van het voedselregime op de fagocytoseindex van tarbot



BESLUIT

- Bij het afzonderen van de fagocyten van tarbot laat het gebruik van een homogenisator (V.E.L. catalogus art nr 7351502) toe de kopnier te pletten zonder de bloedcellen te beschadigen.
- Het gebruik van percoll-gradienten voor de scheiding van de leucocyten werd vervangen door histopaque 1077.
- Uit het onderzoek naar de invloed van het incubatiemedium op de fagocytosecapaciteit van tarbot kwam tot uiting dat 1000µl fagocyten + 70µl gistcellen + 1500µl AIMV-medium de beste resultaten gaf.
- De optimale incubatietemperatuur voor de bepaling van de fagocytosecapaciteit van tarbot is 4°C. Bij deze temperatuur fagocyteerden circa 60% van de cellen. Bij hogere temperaturen werd een daling van het aantal fagocyterende cellen vastgesteld.
- Uit de proefnemingen omtrent de invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit kwam tot uiting dat de afgezonderde fagocyten 6 dagen bruikbaar waren bij een bewaartemperatuur van 12°C.
- De bepaling van de fagocytosecapaciteit vond haar toepassing bij de kweek van tarbot waarbij verschillende voedselregimes werden gebruikt. Hierbij kwam tot uiting dat de invloed van het basisregime op de conditie van tarbot, minstens 8 weken blijft doorwerken na de vervanging van de basisregimes door visafval.

d. Referenties

DARNELL et al., 1990. Molecular cell biology. Second edition. New York. Freeman and company. pp. 555 - 560.

DECLERCK D., 1996. Onderzoek van de fagocytosecapaciteit en paaistress bij schar (*Limanda limanda*). Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (CLO Gent) Publicatie nr 240.

den OTTOLANDER G.J.H., 1989. Interne geneeskunde. Negende herziene druk. Utrecht. Bohn, Scheltema en Holkema. 8 - 10 en pp. 46 - 49.

GREENSBERGS S. and SILVERSTEIN, 1993. Phagocytosis. Fundamental immunology. Third edition edited by William E. Paul. New york. Raven Press. Lid. chapter 27, pp. 941 - 949.

LERNOUT M., 1992. Invloed van voedingslipiden op de gewichtstoename en de fagocytosecapaciteit bij de Afrikaanse Meerval (*Clarias gaiepinus* Burchell 1822). Eindverhandeling (onuitgegeven) o.l.v. prof F.Ollevier. Leuven, K.U.L.

MATHEWS ELAINE S., et al., 1990. Assays of immune function in fish macrophages. Techniques used as indicators of environmental stress. Techniques in Fish Immunology. Fish Immunology Technical Communications 1. Edition by Stolen J.S et al.

PLASMAN N. and B. VRAY, 1993. Mouse peritoneal macrophages: characterization of functional subsets following Percoll density gradients. Res. Immunol. 144, pp. 151 - 163.

PLASMAN N. and B. VRAY, 1994. Quantification of bacterial phagocytosis by flow cytometry and spectrofluorimetry. Journal of Immunology Methods. 174, pp. 195 - 202.

RIOTT I. et al., 1989. Immunology. Second edition. London. New York. Churchill livingstone. Gower Medical Publishing. pp. 1.1 - 1.5, and pp. 15.2 - 15.9.

SANTAREM M. and A. FIGUERAS, 1994. Kinetics of phagocytic activity, plaque - forming cells and specific agglutinins of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunised with O antigen of *Vibrio damsela* and *Pasteurella piscicida*. Fish and Shellfish Immunology. 4, pp. 527 - 537.

