

Wpływ Neguvonu na aktywność pochłaniania i liczebność trombocytów karpia

MICHAŁ STOSIK, WIESŁAW DEPTUŁA, ELŻBIETA SOBCZAK*

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego, ul. Felczaka 3a, 71-412 Szczecin
*Wojewódzkie Laboratorium Weterynaryjne, ul. Olbrychta 1, 65-356 Zielona Góra

Stosik M., Deptuła W., Sobczak E.

The effect of Neguvon on phagocytic capacity and number of thrombocytes in carp

Summary

This study aimed at demonstrating thrombocyte involvement in defensive reactions of healthy carps, subjected to experimental intoxication with Neguvon and at selecting parameters which would permit an appraisal of the clinical status of the fish as well as a prognosis of the course of environmentally-conditioned diseases. The experiments demonstrated that Neguvon preparation, acting on carps in conditions of experimental intoxication, induces a significant decrease in the number and phagocytic capacity of thrombocytes (Ipt, %tp indices, respectively), i.e. the cells which represent one of the significant elements of resistance mechanisms in the animals.

The marked reaction of thrombocytes to the presence of toxic substances in water habitats indicates that testing the number and phagocytic capacity of thrombocytes using a standard strain of bacteria may be applied in evaluation of the clinical status of the fish, in prognosing the course of environmentally-induced diseases and, possibly, could be used as a biomarker in evaluating water habitats.

Keywords: thrombocytes, phagocytosis, number.

Substancje chemiczne występujące w środowisku wodnym stwarzają zagrożenie nie tylko dla zdrowia człowieka, ale także dla organizmów zasiedlających zanieczyszczone wody. Większość substancji zanieczyszczających wody powierzchniowe wpływa niekorzystnie między innymi na funkcje elementów układu obronnego ryb (cyt. 12). W warunkach doświadczalnych, z użyciem substancji fosforoorganicznych, pyretroidów oraz metali ciężkich wykazano, że postępująca degradacja środowiska wodnego sprzyja rozwojowi wielu chorób ryb głównie tzw. środowiskowych, a także tła infekcyjnego (cyt. 12). Reakcja organizmu ryb na działanie substancji chemicznych (chemicznych bodźców stresowych) obarczających środowisko ich życia jest przede wszystkim wyrazem rozwoju odpowiadzi stresowej, a ostatecznie, najczęściej niewydolności mechanizmów układu obronnego. Szczególnie słabo rozpoznany obszarem tego zagadnienia jest wpływ obecnych w środowisku wodnym substancji chemicznych na trombocyty, zaliczane obecnie u ludzi i zwierząt stałocieplnych do komórek układu odpornościowego (cyt. 11). Poznanie i określenie roli tych komórek w organizmie ryb poddanych intoksykacji doświadczalnej pozwoli z pewnością na pełniejszą ocenę znaczenia trombocytów jako komórek obronnych.

Celem badań było wykazanie udziału trombocytów w reakcjach obronnych u karpia zdrowych poddanych doświadczalnej intoksykacji Neguvonem oraz uzyskanie danych umożliwiających ocenę stanu klinicznego ryb i prognozowanie przebiegu chorób środowiskowych.

Material i metody

Badania środowiska wodnego. Badaniami objęto 3 próby wody pobrane ze stawu pochodzenia karpia, w czasie odłowu ryb do badań. Próby wody do badań chemicznych i fizycznych pobierano z głębokości około 50 cm, z trzech miejsc stawu, tj. z okolicy dopływu, odpływu oraz z części znajdującej się poza nurtem. Badania chemiczne obejmowały oznaczanie: odczynu wody, tlenu rozpuszczonego, amoniaku zjonizowanego (NH_4^+), amoniaku niezjonizowanego (NH_3), koncentracji ogólnej amoniaku ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$) i fosforanów. Parametry te charakteryzują stan czystości środowiska wodnego stawu rybnego i jego przydatność dla celów hodowlanych. Oznaczenia fizyczne dotyczyły temperatury wody. Badania wykonano według metod obowiązujących w kraju i przyjętych do stosowania w ocenie środowiska wodnego (3, 7). Wyniki badań przedstawiono w tab. 2.

Badania ryb. Materiałem do badań były zdrowe karpie hodowlane (*Cyprinus carpio* L.), w wieku 14 miesięcy, o

Tab. 1. Grupy karpki użyte do badań

Grupa doświadczalna ryb	Liczba ryb użytych do badań	Grupy hodowlane karpki i ich symbole	Stan kliniczny	Wiek (miesiące)	Masa ciała (g ± 10%)
I	28	kroczek – K ₂	intoksykowane Neguvonem	14	105
II	20	kroczek – K ₂	zdrowe – grupa kontrolna	14	105

Tab. 2. Badania fizyczno-chemiczne prób wody ze stawu pochodzenia karpki użytych do badań

Liczba zbadanych prób wody	Temperatura (°C)	Badania chemiczne					
		pH	O ₂ (mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	NH ₃ (mg/l)	NH ₄ ⁺ + NH ₃ (mg/l)	PO ₄ (mg/l)
3	21,4	7,45	8,40	1,80	ns	1,80	0,40

Objaśnienie: ns – nie stwierdzono.

Tab. 3. Wpływ Neguvonu na aktywność pochłaniania i liczbę trombocytów karpki

Grupa doświadczalna ryb	Stan kliniczny	Liczba trombocytów (×10 ⁹ /l)	Aktywność fagocytarna trombocytów	
			Ipt	%tp
I	intoksykowane Neguvonem	27,98 ± 6,81*	1,68 ± 0,22*	12,82 ± 3,17*
II	zdrowe – grupa kontrolna	33,76 ± 4,87	2,13 ± 0,41	17,63 ± 4,09

Objaśnienia: ns – nie stwierdzono, *statystycznie istotny spadek wartości w porównaniu z grupą kontrolną (p ≤ 0,05).

średniej masie ciała 105 g, intoksykowane preparatem Neguvon (grupa I, tab. 1) oraz karpki pochodzące z tej samej obsady, które tworzyły grupę kontrolną (grupa II, tab. 1). Kondycję i stan zdrowia ryb użytych do badań oceniono na podstawie badań klinicznych, anatomopatologicznych i parazytologicznych.

Doświadczalną intoksykację karpki Neguvonem wykonano na 28 karpkach w warunkach w jakich wykonuje się kąpiele lecznicze ryb: do basenu z zawartością 500 litrów wody stawowej wprowadzono 62,5 g preparatu Neguvon (Bayer) (0,125 g na 1 litr wody), a następnie po upływie 2 godzin przeprowadzono kąpiel karpki trwającą 40 minut.

Krew do badań pobierano z serca do probówek z heparyną (50 j.m. na 1 ml krwi) oraz z dodatkiem płynu ACD (acid citrate dextrose). Liczbę trombocytów określono metodą Deissi (10). Zdolność pochłaniania *Staphylococcus aureus* 209P przez trombocyty określono metodą Mantur i wsp. (6), adaptowaną dla ryb (10).

Wyniki, wyrażone indeksem pochłaniania trombocytów (Ipt) oraz procentem trombocytów pochłaniających (% tp), przeanalizowano statystycznie testem t-Studenta dla P ≤ 0,05. Wyliczono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe i istotność różnic między wynikami otrzymanymi

u karpki intoksykowanych i grupy kontrolnej. Wyniki badań przedstawiono w tab. 3.

Wyniki i omówienie

Badania środowiska wodnego. Wyniki badań chemicznych i fizycznych wody stawu, z którego pochodziły karpki, a jednocześnie użytej do doświadczalnej intoksykacji ryb Neguvonem, wskazują na dobre warunki środowiskowe (tab. 2). Woda w stawie pochodzenia ryb spełniała wymagania stawiane akwariom przeznaczonym do hodowli ryb karpkowatych (1, 4, 5).

Badania hematologiczne i immunologiczne. Liczba trombocytów oraz indeks pochłaniania trombocytów i procent trombocytów pochłaniających określone u karpki poddanych doświadczalnej intoksykacji Neguvonem (grupa I, tab. 3) były statystycznie istotnie mniejsze niż u ryb grupy kontrolnej (grupa II, tab. 3).

Brak danych odnośnie do wpływu preparatów fosforoorganicznych na aktywność trombocytów (Ipt, % tp) skłania do porównań wyników badań własnych

ze zdolnością pochłaniania granulocytów obojętnochłonnych u ryb intoksykowanych doświadczalnie preparatami tej grupy. Badania (2, 8, 9) dotyczące wpływu substancji fosforoorganicznych na aktywność metaboliczną, pochłaniania i bójczą granulocytów obojętnochłonnych u ryb poddanych intoksykacji doświadczalnej, wykazały ich supresyjne oddziaływanie na elementy układu odpornościowego tych zwierząt. Stwierdzona w badaniach własnych reakcja trombocytów na Neguvon jest zatem podobna do, obserwowanego przez innych autorów (2, 8, 9), wpływu tego preparatu na funkcje czynnościowe granulocytów obojętnochłonnych. Kierunek zmian w obrębie badanych wskaźników przebiega podobnie jak w przypadku poddania ryb działaniu wyższych stężeń substancji chemicznych (silniejszych bodźców stresowych), przekraczających możliwości adaptacyjne organizmu tych zwierząt, pobudzających centralny układ nerwowy (oś podwzgórze – przysadka mózgowa – komórki międzynerkowe ryb, odpowiadające komórkom kory nadnerczy ssaków) (cyt. 12). W warunkach doświadczalnych wykazano (cyt. 12), że hormon ACTH lub kortykosterydy, uwalniane w następstwie pobudzenia centralnego układu nerwowego, prowadzą do zmniejszenia objętości tkanki limfoidalnej śledziony – narządu pochodzenia trombocytów oraz nerki przedniej. Funkcje tych narządów są ograniczone i zaburzone. Obserwuje się wówczas zmniejszoną ilość komórek układu odpornościowego (cyt. 12), zwłaszcza limfocytów i trombocytów. Osłabione są funkcje czynnościowe komórek warunkujących mechanizmy odporności nieswoistej i swoistej, m.in. w zakresie proliferacji limfocytów oraz chemotaksji i zdolności pochłaniania granulocytów obojętnochłonnych i makrofagów (cyt. 12), a także, jak wynika z badań własnych, trombocytów. Występujące u karpia intoksykowanego Neguvonem, tendencje i kierunki zmian w zakresie liczby i aktywności fagocytarnej trombocytów (Ipt, % tp) podobne są ponadto do wyników uzyskanych u ryb tego samego gatunku objętych ostrymi postaciami *Branchiomycosis* oraz *Erythrodermatitis* (11). Najprawdopodobniej zmiany te, tak jak u karpia z ostrymi postaciami *Branchiomycosis* i *Erythrodermatitis* (11), pozostają w związku z mniejszą liczbą tych komórek w krwi. Taki obraz może rozwijać się w wyniku mniejszego lub wolniejszego uwalniania trombocytów do krwioobiegu oraz intensywniejszego wyczerpywania się zasobów trombocytów dojrzałych, w pełni sprawnych czynnościowo.

Podsumowanie

Badania wykazały, że preparat Neguvon oddziałujący na organizm karpia w warunkach doświadczalnej intoksykacji powoduje istotne zmniejszenie liczby oraz upośledzenie aktywności pochłaniania trombocytów (Ipt, % tp).

Wobec wyraźnie zaznaczonej reakcji trombocytów na obecność substancji toksycznych w środowisku wodnym, badania nad liczbą tych komórek i zdolnością pochłaniania przez nie wzorcowego szczepu bakterii mogą znaleźć zastosowanie w ocenie stanu zdrowia ryb, prognozowaniu przebiegu chorób środowiskowych, a także być może jako biomarker, w ocenie środowiska wodnego.

Piśmiennictwo

1. *Alabaster J. S., Lloyd R. L.*: Water quality criterion for freshwater fish. FAO. Butterworths, London-Boston 1980.
2. *Dunier M., Siwicki A. K.*: Effects of environmental contaminants and chemotherapeutics on fish defense mechanisms. W: „Fish diseases diagnosis and prevention methods”. FAO – Project C5CP/INT/526/JPN, wyd. Siwicki A. K., Anderson D. P., Waługa J. Wyd. IRŚ, Olsztyn 1993, s. 21.
3. *Hermanowicz W., Dożańska W., Dojlido J., Koziorowski B.*: Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków. Arkady, Warszawa 1976.
4. *Krüger A., Niewiadomska-Krüger D.*: Dopuszczalne stężenia mineralnych związków azotowych w wodach do chowu i hodowli ryb karpiowatych. Wyd. IRŚ, Olsztyn 149, 1980.
5. *Krüger A.*: Technologia intensywnej produkcji materiału zarybieniowego karpia. Część I. Technologia intensywnej produkcji narybku letniego karpia w przesadkach I. Wyd. IRŚ, Olsztyn, 133, 1980.
6. *Mantur M., Wołosowicz M., Prokopowicz J., Kemona H.*: Folia Haemat. 113, 691, 1986.
7. *Ostrowska A., Gawliński S., Sztubialka Z.*: Metody analizy i oceny właściwości wód. Katalog, cz. II. Wyd. Inst. Ochrony Środowiska, Warszawa 1991.
8. *Prost M., Sopińska A.*: Medycyna Wet. 44, 455, 1988.
9. *Siwicki A. K., Cossarini-Dunier M., Studnicka M., Demael A.*: Ecotoxicol. Environ. Safety 19, 98, 1990.
10. *Stosik M.*: Proc. 3rd Ichthyohaematological Conf., Litomyśl 1993, s. 125.
11. *Stosik M., Deptuła W.*: Acta Vet. (Beogard) 47, 235, 1997.
12. *Stosik M., Deptuła W.*: Medycyna Wet. 54, 583, 1998.

Adres autora: dr hab. Michał Stosik, ul. Strumykowa 23c/4, 65-101 Zielona Góra

VERVELDE L., JANSE E. M., VERMEULEN A. N., JEURISSEN S. H. M.: Indukcja miejscowej i ogólnej odpowiedzi immunologicznej przy użyciu toksyny przecinkowca cholery jako środka transportującego antygen do lamina propria jelita kurczęcia. (Induction of a local and systemic immune response using cholera toxin as a vehicle to deliver antigen in the lamina propria of the chicken intestine). Vet. Immunol. Immunopathol. 62, 261-272, 1998 (3)

Odpowiedź immunologiczna na antygen rekombinantu *Eimeria tenella* (Ea1A) ulega wzmocnieniu przez toksynę *Vibrio cholerae* (CT). Kurczęta w wieku 5 tygodni immunizowano do jelita ślepego Ea1A skonjugowanego z CT (grupa 1), Ea1A zmieszanego z CT (grupa 2), Ea1A zmieszanego z albuminą surowicy bydła (grupa 3). Grupę 4 kurcząt immunizowano 25 000 sporozoitami *E. tenella*. Wtórna odpowiedź immunologiczną indukowano zakażając kurczęta *per os* 1000 oocyst *E. tenella* po 14 dniach po uodpornieniu. Nabłonek jelit ślepych kurcząt posiada receptory wiążące CT. Po 7 dniach liczba limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ w lamina propria zwiększa się, co świadczy o wpływie CT na układ immunologiczny. W surowicy krwi w grupie 1 i 2 pojawiają się przeciwciała dla CT w klasie IgM i IgG. Antygen Ea1A skonjugowany z CT indukował odpowiedź immunologiczną. Zarówno nasilenie pierwotnej jak i wtórnej odpowiedzi immunologicznej po indukcji Ea1A było znacznie wyższe w przypadku zastosowania do immunizacji Ea1A skonjugowanego z CT.