Kształtowanie się wybranych parametrów odporności wrodzonej i adaptacyjnej u karpia w drugim sezonie hodowlanym

ANTONINA Sopińska, ANNA Grochoła

Zakład Chorób Ryb i Biologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP Lublin, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Otrzymano 09.04.2018

Zaakceptowano 29.05.2018

Sopińska A., Grochoła A.

Selected parameters of innate and adaptive immunity in carp in the second breeding season

Summary

The immune response in fish includes both cellular and humoral components. The aim of the study was to analyze the specific and adaptive immune response of carp using such parameters as the respiratory burst of blood phagocytes, lysosomal serum activity and the proliferative activity of lymphocytes induced by T-dependent mitogens PHA and Con A. Blood samples from 70 clinically healthy carp with body weights from 90 to 400 g were collected during a breeding season of 7 months, in March, April, May, June, July, September and October. The water temperatures in these months were, respectively, 4°C, 11°C, 16°C, 18°C, 22°C, 14°C, 8°C, and the fish were exposed to the stress being caught in March and October.

The effect of low temperature and the stress factor (catching) on the leukocyte population was a reduction in the total number of white blood cells and lymphocytes and an increase in neutrophils. A negative relationship between the respiratory burst in neutrophils stimulated and water temperature was shown. The lowest values occurred at temperatures optimal for carp (18-22°C). Lysozyme activity in the samples increased from March to October and was the highest in autumn. The lowest proliferative activity of T lymphocytes was found in March, the highest in June and July.

This study is the first to show the effect of suboptimal temperatures and the stress of being caught on defense mechanisms in 9 to 16-month-old carp during the breeding season. The results suggest that these mechanisms are influenced by interaction between the endocrine and immune systems, in which the presumably elevated cortisol level has an immunomodulatory function.

Keywords: fish defense mechanism, immune response in fish, adaptive immunity in carp

W rozwoju ewolucyjnym zwierząt ryby są pierwszymi organizmami, u których występuje zarówno odporność wrodzona, jak i w pełni wykształcona odporność adaptacyjna związana z aktywnością limfocytów i produkcją przeciwciał (44). System obronny ryb, uwarunkowany obecnością barier fizycznych, składników humoralnych i komórkowych, zapewnia odporność przeciwko patogenom i pasożytom. Aktywność mechanizmów komórkowych, jak i humoralnych u ryb hodowlanych jest wypadkową wielu zdarzeń, między innymi wieku, płci, odżywiania, a także wpływu czynników środowiskowych i stresogennych towarzyszących hodowli (34). Komórkami odpowiedzialnymi za mechanizmy obronne są fagocyty (neutrofile, monocyty lub makrofagi), komórki cytotoksyczne i limfocyty. Neutrofile i makrofagi są najważniejszymi leukocytami biorącymi udział w regulacji mechanizmów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, limfocyty – w odpow-

wiedzi adaptacyjnej. Neutrofile na drodze zależnej od tlenu i niezależnej, enzymatycznej, wykazują zdolności bakteriobójcze. W następstwie stymulacji komórki te wykazują wzrost zapotrzebowania na tlen i wzmożoną produkcję reaktywnych form tlenu o właściwościach bakteriobójczych, tj.: anion ponadtlenkowy, nadutlenek wodoru, tlen singletowy i rodnik hydroksylowy (9). W odporności wrodzonej u ryb ważną rolę odgrywają składniki humoralne m.in.: lizozym, C3, alfa2-makroglobuliny i C-reaktywne białka, w odpowiedzi swoistej przeciwciała i IgM, IgD (29, 47). Lizozym obecny w śluzie, surowicy krwi, tkankach limfoidalnych i płynach tkankowych ma właściwości enzymu hydrolitycznego (rozkłada ścianę bakterii G⁺ i G⁻), którego aktywność zależy od wieku ryb, pory roku, temperatury wody, pH środowiska, a także działania czynników toksycznych i infekcyjnych (19, 26, 37). Wielu autorów w swych badaniach nad aktywnością

mechanizmów obronnych u ryb podkreśla wpływ temperatury na ich przebieg. Temperatury niższe i wyższe od optymalnych dla danego gatunku ryby hamują lub pobudzają aktywność komórkową i humoralną odpowiedzi immunologicznej, np. temperatury poniżej 14°C niekorzystnie wpływają na aktywność układu immunologicznego karpi (3, 6). Na ogół uważa się, że niskie temperatury wody mają immunosupresyjny wpływ na odporność wrodzoną, ale także wpływają niekorzystnie na odporność adaptacyjną, indukują apoptozę limfocytów B, obniżają aktywność proliferacyjną limfocytów T, a głównie Th (1, 2, 7, 23, 47, 48), ale także są doniesienia, które wskazują, że niskie temperatury wody są przyczyną supresji w odporności adaptacyjnej mierzonej aktywnością limfocytów i produkcją przeciwciał, natomiast nie wpływają istotnie na poziom odporności wrodzonej (29). Niektóre eksperymentalne badania wskazują również na sezonowość jako istotny czynnik, a nawet ważniejszy niż temperatura, wpływający na zmianę parametrów immunologicznych (1, 9, 14, 36, 41, 42).

Znaczący wpływ na poziom odpowiedzi immunologicznej mają czynniki stresogenne towarzyszące hodowli ryb, związane z drastyczną interwencją człowieka, tj.: odłowy, sortowanie ryb, transport i obsadzanie rybami nowych zbiorników wodnych, w dużym zagęszczeniu (22). W 3-letnim cyklu hodowlanym szczególnie wiele czynników stresogennych przypada na drugi sezon produkcyjny. Pomimo że w tym wieku układ immunologiczny u karpi jest już w pełni rozwinięty, silnie działające stresory zakłócają prawidłowe reakcje immunologiczne. Wielokrotnie wykazano, że stres upośledza naturalne mechanizmy obronne ryb, powodując słabszą skuteczność w obronie przed inwazją patogenów: wirusów, bakterii, grzybów czy pasożytów (8, 23, 29, 33). W badaniach prowadzonych na karpniu wykazano między innymi, że wysoki poziom kortyzolu obniża produkcję przeciwciał oraz pobudza apoptozę limfocytów (46), obniża produkcję cytokin prozapalnych oraz anionu nadadtlenkowego, tlenu azotu i fagocytozy (24, 44-46).

Celem badań była analiza odporności nieswoistej i adaptacyjnej karpi mierzonej poziomem wybuchu tlenowego neutrofili, aktywnością lizozymu w surowicy krwi oraz zdolnością proliferacyjną limfocytów na mitogeny T-zależne (PHA i Con A) u ryb 9-16-miesięcznych, podczas całego sezonu hodowlanego, od marca do października.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na karpniach w wieku od 9 do 16 miesięcy, o masie ciała od 90 do 400 g, w drugim sezonie hodowlanym, od marca do października, odławianych z jednego stawu, każdorazowo po 10 sztuk. Podczas odłowów dokonywano pomiaru temperatury wody, która wynosiła, odpowiednio: w marcu $4 \pm 1^\circ\text{C}$, w kwietniu $11 \pm 1^\circ\text{C}$, w maju $16 \pm 1^\circ\text{C}$, w czerwcu $18 \pm 1^\circ\text{C}$, lipcu $22 \pm 1^\circ\text{C}$, we wrześniu $14 \pm 1^\circ\text{C}$, w październiku $8 \pm 1^\circ\text{C}$. Badania

w marcu i październiku wykonywano podczas wiosennych i jesiennych odłowów, w pozostałych okresach podczas odłowów kontrolnych. Ryby w okresie badawczym nie wykazywały objawów chorobowych i nie były poddawane żadnym zabiegom profilaktycznym. Na podstawie badań klinicznych, parazytologicznych i anatomopatologicznych uznano je za zdrowe.

Materiał do badań stanowiła krew, którą pobierano z serca przy użyciu pipety pasteurowskiej, bezpośrednio po odłowieniu, po zastosowaniu anestetyku. Krew pobrana do probówek z heparyną służyła do izolacji komórek oraz wykonania podstawowych badań hematologicznych, a bez heparyny dla pozyskania surowicy. Do anestezji i eutanazji ryb zastosowano preparat MS-222, odpowiednio, w stężeniach: $0,1 \text{ g l}^{-1}$ i $0,2 \text{ g l}^{-1}$ (Sigma). Granulocyty izolowano na Gradisolu (Aqua-Medica, Poland) o gęstości $1,115 \text{ g/ml}$, a limfocyty na Gradisolu o gęstości $1,06 \text{ g/ml}$, następnie sporządzono odpowiednie stężenia wyizolowanych komórek do dalszych badań immunologicznych; dla granulocytów $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, dla limfocytów $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Wyizolowane komórki zawieszono w płynie hodowlanym RPMI-1640 z dodatkiem 10% surowicy cielęcej (FCS, Gibco, UK), 100 U/ml penicyliny i 100 mg/ml streptomycyny.

Aktywność układu immunologicznego ryb oceniano na podstawie: liczby leukocytów, neutrofili i limfocytów w $1 \mu\text{l}$ krwi, procentowej zawartości we krwi limfocytów ANAE+, reaktywności proliferacyjnej limfocytów krwi na mitogeny T-zależne: fitohemaglutyninę (PHA) i konkanawalinę A (Con A) oraz poziomu lizozymu w surowicy krwi.

W pobranych próbkach krwi oznaczano liczbę leukocytów, neutrofili i limfocytów według ogólnie przyjętych metod, obliczając jednocześnie indeks hematologiczny (IH) będący ilorazem limfocytów do granulocytów (30).

Aktywność bójczą komórek fagocytyzujących zależną od tlenu określano na podstawie testu redukcji NBT, który uwidacznia zdolność komórek do wzmożonego uwalniania reaktywnych form tlenu pod wpływem działania czynników stymulujących (35). Jako stymulatora komórek do wywołania „wybuchu tlenowego” użyto estru forbolu (PMA). Mieszaninę granulocytów ($2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$), PMA i NBT (0,12% w PBS) w równych objętościach, po $100 \mu\text{l}$ inkubowano w temperaturze pokojowej przez okres 60 minut. Po inkubacji i usunięciu podłoża oraz przepłukaniu komórek etanolem 70% dokonano lizy komórek w celu uwidocznienia formazanu, ciemnoniebieskiego produktu reakcji. Do rozpadu granulocytów zastosowano $120 \mu\text{l}$ 2N KOH i $140 \mu\text{l}$ DMSO. Stopień zredukowania NBT do formazanu określano na spektrofotometrze (BioRad 550), na podstawie pomiaru gęstości optycznej o długości fali 546 nm .

Ocenę procentowej zawartości limfocytów ANAE+ wśród limfocytów izolowanych z krwi wykonywano przy użyciu metody Muellera (31), która pozwala barwieniem cytochemicznym wykryć w błonie komórkowej limfocytów T α -naftyloesterazę (ANAE).

Reaktywność proliferacyjną limfocytów T badano na mikrohodowlach w obecności mitogenów: PHA w dawce 5 mg ml^{-1} i Con A w ilości $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Sigma). Hodowle inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 28°C w obecności 5% CO_2 . W połowie inkubacji do poszczególnych hodowli dodano po $20 \mu\text{l}$ 3H tymidyny (o aktywności koń-

Tab. 1. Wskaźniki białokrwinkowe u karpia 9-16-miesięcznych ($\bar{x} \pm SD$; n = 10)

Terminy badań	Temp. $\pm 1^\circ\text{C}$	Leukocyty $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$	Neutrofile $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$	Limfocyty $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$	Limfocyty ANAE+%	Indeks hematologiczny IH
Marzec (odłowy)	4	19,22 $\pm$ 1,41	6,60 $\pm$ 1,61	11,20 $\pm$ 1,28*	37,5 $\pm$ 2,8*	1,69 $\pm$ 0,11
Kwiecień	11	25,70 $\pm$ 1,86 Δ	4,76 $\pm$ 0,86 Δ	20,15 $\pm$ 2,30 Δ	44,3 $\pm$ 1,2 Δ	4,23 $\pm$ 0,25
Maj	16	32,80 $\pm$ 2,71	4,08 $\pm$ 1,15	26,32 $\pm$ 1,80	58,4 $\pm$ 3,4	6,45 $\pm$ 0,52 Δ
Czerwiec	18	41,20 $\pm$ 1,73	2,33 $\pm$ 0,82	33,53 $\pm$ 2,70	62,5 $\pm$ 3,8	14,25 $\pm$ 2,10
Lipiec	22	44,50 $\pm$ 3,48	3,03 $\pm$ 0,75	39,18 $\pm$ 2,40	59,7 $\pm$ 3,6	12,93 $\pm$ 2,16
Wrzesień	14	37,40 $\pm$ 2,38 $\circ$	4,23 $\pm$ 1,15 $\circ$	32,50 $\pm$ 1,80 $\circ$	61,7 $\pm$ 3,2	8,06 $\pm$ 0,58 $\circ$
Październik (odłowy)	8	22,52 $\pm$ 1,56*	6,40 $\pm$ 1,25*	15,82 $\pm$ 1,06*	58,8 $\pm$ 4,1	2,47 $\pm$ 0,22*

Objaśnienia: średnie oznaczone poniższymi znakami w porównywanych miesiącach różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$.

* marzec-październik, Δ kwiecień-lipiec, Δ czerwiec-lipiec, $\circ$ wrzesień-lipiec, * październik-lipiec

cowej 0,5 uCi). Ocenę nieswoistej transformacji blastycznej oparto na pomiarze inkorporacji radioaktywnie znakowanego prekursora kwasów nukleinowych 3H tymidyny. Próbkę kontrolną stanowiły hodowle niestymulowane mitogenami. Stopień wbudowania znakowanej tymidyny w DNA transformujących limfocytów wyrażono liczbą impulsów/minutę zliczanych w liczniku scyntylacyjnym Beckmana (LS 5000 TD). Wyniki przedstawiono w postaci indeksu stymulacji SI, porównując uzyskane wartości w próbach komórek stymulowanych do komórek niestymulowanych mitogenem.

Poziom lizozymu w surowicy krwi oznaczano zgodnie z metodą opisaną przez Ellisa (21), przy użyciu zawiesiny bakterii *Micrococcus lysodeicticus* (Sigma) naniesionych do dołków płytek Ellisa z rozcieńczoną surowicą badanych karpia. Absorbancję odczytywano przy długości fali 492 nm, w czasie $t_0 = 0,5$ min i $t_1 = 4,5$ min. Wyniki przedstawiono w μg lizozymu ml^{-1} badanej próby w oparciu o krzywą standardową dla wzorcowego lizozymu.

Wyniki badań poddano analizie statystycznej testem t-Studenta w programie Statistica 6.0, dokonano również porównań na poziomie $p \leq 0,05$ między grupami w miesiącach: marzec-październik, kwiecień-lipiec, czerwiec-lipiec, wrzesień-lipiec i październik-lipiec.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań liczby krwinek białych: leukocytów, neutrofilii i limfocytów, krwi obwodowej karpia w drugim sezonie hodowlanym przedstawiono w tab. 1.

W badanych miesiącach, od marca do października, najwyższą liczbę leukocytów i limfocytów w 1 μl krwi stwierdzono w czerwcu i lipcu, wartości te nie różniły się statystycznie istotnie między sobą i wynosiły: dla leukocytów 41,20 $\pm$ 1,73 i 44,50 $\pm$ 3,48, a dla limfocytów 33,53 $\pm$ 2,70 i 39,18 $\pm$ 2,40. Najniższe wartości tych parametrów wystąpiły w marcu, kwietniu i październiku (tab. 1). Od marca do lipca obserwowano powolny wzrost ogólnej liczby leukocytów i limfocytów (w 1 μl krwi), a następnie w miesiącach jesiennych spadek tych wartości. Porównywane dane między lipcem i wrześniem oraz lipcem i październikiem różniły się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,05$. Bezwzględna liczba neutrofilii w 1 μl krwi karpia 9-16-miesięcznych różniła się znacząco w porównywanych miesiącach (tab. 1). Wysokie wartości tych krwinek wystąpiły w marcu, kwietniu i maju i wy-

nosiły, odpowiednio: 6,60 $\pm$ 1,61, 4,76 $\pm$ 0,86 i 4,08 $\pm$ 1,15 oraz we wrześniu i październiku: 4,23 $\pm$ 1,15 i 6,40 $\pm$ 1,25. Najniższa wartość liczby neutrofilii i 1 μl krwi wystąpiła w czerwcu 2,33 $\pm$ 0,82. Statystycznie istotne różnice wystąpiły w porównywanych miesiącach między lipcem a kwietniem, wrześniem i październikiem na poziomie $p \leq 0,05$.

Procentowy odsetek limfocytów ANAE+ w obrazie krwi u karpia 9-16-miesięcznych przedstawiono w tab. 1. Najwyższą wartość tego parametru stwierdzono w czerwcu 62,5 $\pm$ 3,8, a najniższą w marcu 37,5 $\pm$ 2,8. Statystycznie istotne różnice wystąpiły w porównaniach tego odsetka między marcem a październikiem oraz kwietniem i lipcem, w pozostałych porównywanych miesiącach nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic (tab. 1).

Wartość indeksu hematologicznego była najwyższa w miesiącach letnich: czerwcu, lipcu i wynosiła, odpowiednio: 12,93 $\pm$ 2,90 i 14,25 $\pm$ 2,10, w pozostałych miesiącach wartość ta była statystycznie istotnie niższa niż w lipcu, a najniższe wartości wystąpiły w marcu i październiku i wynosiły, odpowiednio: 1,69 $\pm$ 0,11 i 2,47 $\pm$ 0,22 (tab. 1).

Wyniki aktywności obronnej neutrofilii wyrażonej wybuchem tlenowym przedstawiono w tab. 2. Najwyższe wartości redukcji NBT przez neutrofile stwierdzono w kwietniu i marcu, i wynosiły, odpowiednio: 1,077 $\pm$ 0,14 i 0,853 $\pm$ 0,05. Wszystkie te wartości były statystycznie istotnie wyższe w porównaniu

Tab. 2. Aktywność obronna neutrofilii stymulowanych PMA wyrażona wybuchem tlenowym (NBT) i poziom lizozymu w krwi obwodowej karpia 9-16-miesięcznych ($\bar{x} \pm SD$; n = 10)

Terminy badań	Temp. $\pm 1^\circ\text{C}$	NBT OD 546	Lizozym $\mu\text{g ml}^{-1}$
Marzec (odłowy)	4	0,853 $\pm$ 0,05*	0,19 $\pm$ 0,08*
Kwiecień	11	1,077 $\pm$ 0,14 Δ	0,26 $\pm$ 0,12 Δ
Maj	16	0,430 $\pm$ 0,06	0,34 $\pm$ 0,18
Czerwiec	18	0,280 $\pm$ 0,12	0,38 $\pm$ 0,12
Lipiec	22	0,258 $\pm$ 0,14	0,36 $\pm$ 0,09
Wrzesień	14	0,458 $\pm$ 0,06 $\circ$	0,64 $\pm$ 0,11 $\circ$
Październik (odłowy)	8	0,604 $\pm$ 0,26*	0,58 $\pm$ 0,16*

Objaśnienia: jak w tab.1.

z uzyskanymi w lipcu. W czerwcu i lipcu stwierdzono podobny poziom aktywności granulocytów, który wynosił, odpowiednio: $0,280 \pm 0,12$ i $0,258 \pm 0,14$ (tab. 2).

Poziom lizozymu u karpi 9-16-miesięcznych, od marca do października, przedstawiono w tab. 2. Wraz z czasem obserwacji stwierdzono wzrost tego parametru, który wynosił: $0,19 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}^{-1}$ w marcu, $0,36 \pm 0,14$ w lipcu i $0,64 \pm 0,11$ we wrześniu. W porównywanych grupach stwierdzono na ogół statystycznie istotne różnice na poziomie $p \leq 0,05$.

Aktywność proliferacyjną limfocytów karpia na mitogeny T-zależne przedstawiono w tab. 3. U karpi 9-miesięcznych odławianych w marcu stwierdzono najniższą aktywność proliferacyjną limfocytów T, zaś w czerwcu i lipcu wartość ta była najwyższa. Po stymulacji mitogenem Con A uzyskano nieco niższe wartości niż po stymulacji PHA, ale podobnie kształtujące się w poszczególnych miesiącach obserwacji. Na ogół we wszystkich porównywanych miesiącach wystąpiły statystycznie istotne różnice na poziomie $p \leq 0,05$ (tab. 3).

Karpie, które należą do ryb ciepłolubnych, hodowane w krajach o klimacie umiarkowanym, narażone są na przebywanie w okresie zimy, wczesnej wiosny i jesieni w niskich temperaturach wody, poniżej temperatur optymalnych dla ich rozwoju. Wiele badań wskazuje na wystąpienie w tym okresie u ryb zwiększonej śmiertelności i chorób związanych z tą porą roku (2, 15, 20). W ocenie stanu zdrowia ryb pomocne są badania hematologiczne i immunologiczne z uwzględnieniem czynników wpływających istotnie na wartości fizjologiczne tj.: gatunku ryby, płci i wieku (30). Wyniki badań własnych przedstawione w tab. 1 wskazują na duże zróżnicowanie liczby leukocytów, neutrofili i limfocytów w $1 \mu\text{l}$ krwi obwodowej karpi w zależności od temperatury wody, pory roku i działania czynników stresogennych związanych z wiosennymi i jesiennymi odłowami ryb. Wartości badanych parametrów, uzyskane w badaniach własnych u ryb zdrowych, przebywających w temperaturze wody 22°C , uznano za optymalne i do tych wartości odniesiono pozostałe dane, otrzymane w innych miesiącach. Wpływ stresu termicznego na parametry hematologiczne karpi był wielokrotnie badany w doświadczeniach eksperymentalnych *in vivo* i *in vitro* (30, 36, 38). Uzyskane wyniki badań innych autorów są na ogół zgodne z badaniami własnymi, w których stwierdza się wystąpienie w niskich temperaturach (4°C , 8°C , 11°C) leukopenii, limfopenii i neutrocytozy (9, 42). Nieliczne prace wskazują, że zarówno niska temperatura wody, jak i wszelkie manipulacje z rybą wpływają na podwyższony poziom kortyzolu w surowicy krwi i efekty supresyjne układu immunologicznego, tj. inaktywację syntezy limfocytów i indukcję apoptozy szczególnie limfocytów B (2, 49). Zgodnie z badaniami Engelsma i wsp. (23), wzrost liczby neutrofili w krwi można tłumaczyć spadkiem ich liczby w nerce główowej oraz, zgodnie z Watts i wsp. (46), opornością neutro-

Tab. 3. Aktywność proliferacyjna limfocytów karpi 9-16-miesięcznych ($\bar{x} \pm \text{SD}$; $n = 10$)

Terminy badań	Temp. $\pm 1^\circ\text{C}$	Mitogeny	
		PHA	Con A
Marzec (odłowy)	4	$2,60 \pm 0,22^*$	$1,90 \pm 0,22^*$
Kwiecień	11	$4,20 \pm 0,18^\Delta$	$3,45 \pm 0,31^\Delta$
Maj	16	$6,20 \pm 0,63$	$4,80 \pm 0,22$
Czerwiec	18	$12,6 \pm 0,92$	$8,40 \pm 0,18^\Delta$
Lipiec	22	$10,7 \pm 1,15$	$6,10 \pm 0,38$
Wrzesień	14	$7,20 \pm 0,18^\circ$	$4,50 \pm 0,22^\circ$
Październik (odłowy)	8	$5,30 \pm 0,22^*$	$3,30 \pm 0,35^*$

Objaśnienia: jak w tab. 1

fili w większym stopniu niż limfocytów na apoptozę. Podobny jak w badaniach własnych spadek ogólnej liczby leukocytów i limfocytów w krwi stwierdzili badacze po podaniu rybom kortyzolu, wyjaśniając, że jego podwyższony poziom w surowicy krwi jest przyczyną rozlokowania krwinek białych do innych tkanek i narządów, głównie do skóry (17, 49). Transport limfocytów z naczyń krwionośnych do tkanek może służyć do wzmożenia lokalnych odpowiedzi immunologicznych (17, 18). Zmniejszenie ogólnej liczby limfocytów w krwi obwodowej i wzrost granulocytów w krwi ryb w marcu, kwietniu i październiku wpłynęły istotnie na wartość indeksu hematologicznego. Zgodnie z badaniami hematologów przyjmuje się, że wartości 0-5 wskazują na działanie immunosupresyjne stresu (30). W badaniach własnych najniższe wartości wystąpiły w marcu $1,69 \pm 0,11$, podczas gdy w czerwcu i lipcu wzrosły, odpowiednio, do: $14,25 \pm 2,10$ i $12,93 \pm 2,16$.

Do badań odpowiedzi nieswoistej u karpi wykorzystano test redukcji NBT, który stosowany w wielu badaniach wcześniejszych (40) okazał się czułym wskaźnikiem zmian zachodzących wewnątrz zaktywowanych fagocytów. Pomiar tego parametru wskazuje na wystąpienie w komórkach reaktywnych form tlenu o działaniu bakteriobójczym (35). Badania zdolności redukcyjnych NBT fagocytów karpi podczas całego sezonu hodowlanego wykazały zależność od temperatury wody i działania czynnika stresogennego. Najniższe wartości uzyskano w temperaturach optymalnych dla karpia: $18-22^\circ\text{C}$, a najwyższe w temperaturach: 11°C (w kwietniu) oraz w 4 i 8°C (w marcu i październiku) podczas odłowów ryb. Obniżenie wartości NBT przy temperaturze wody 4°C w porównaniu z wartością uzyskaną w kwietniu przy temperaturze 11°C było następstwem działania nie tylko niskiej temperatury, ale także czynnika stresogennego (odłowu). Badania niektórych autorów potwierdzają immunosupresyjny wpływ adrenaliny i kortyzolu na wybuch tlenowy w makrofagach, aktywność fagocytarną granulocytów i proliferacyjną limfocytów (4, 8, 11, 25). Na sezonowe zmiany aktywności fagocytarnej granulocytów i makrofagów ryb zwraca uwagę wielu auto-

rów i podkreśla negatywną korelację tej aktywności z temperaturą wody (9). Badania wykonane u karpia w zimochowach, w temperaturze 2,5°C wskazują na wystąpienie najwyższej aktywności fagocytarnej i wysokiej zdolności redukcyjnej neutrofilii w zimie, w porównaniu do innych pór roku (9). Obserwowane zmiany wskazują, że w okresie okołozimowym, kiedy następuje obniżenie odporności humoralnej (poziomu Ig i białek surowiczych), komórki fagocytarne przejmują funkcję ochronną i niszczyliśką w stosunku do patogenów. W badaniach nad aktywnością fagocytarną wielu autorów stwierdza zarówno u pstrągów, jak i u ryb karpiowatych, w wysokich temperaturach wody (22°C i 30°C), zmniejszone pochłanianie cząstek obcych, spadek fagocytozy oraz obniżoną zdolność wybuchu tlenowego (13, 14, 32). Podobne wyniki uzyskano w badaniach własnych; w miesiącach letnich (w czerwcu i w lipcu) uzyskano w neutrofilach najniższe zdolności redukcyjne NBT, a obserwowany wzrost aktywności bójczej granulocytów jesienią wskazuje, że ryby nabyły po okresie lata zdolność obronną przeciw czynnikom patogennym.

Wyniki badań drugiego parametru odporności nieswoistej – poziomu lizozymu w surowicy ryb karpia, wskazują na wystąpienie pozytywnej korelacji tej wartości do wzrastającej temperatury wody. Wyniki badań własnych są zgodne z badaniami innych autorów, którzy zależność tę widzą także w badaniach nad innymi składnikami humoralnymi odporności nieswoistej, a także z tymi, którzy nie stwierdzają wpływu podwyższonego poziomu kortyzolu na wzrost aktywności lizozymu (9, 16, 39).

Wyniki badań nad subpopulacją limfocytów T u karpia 9-16-miesięcznych przedstawione w tab. 1 i 3 wskazują na zależność ich wartości od temperatury wody i działania czynnika stresogennego (limfocyty ANAE+ i ich zdolność proliferacyjna). Dane uzyskane przez innych autorów nad aktywnością proliferacyjną limfocytów T w badaniach *in vitro* potwierdzają wrażliwość tych komórek na niską temperaturę i ich supresję w reakcji na mitogeny (10, 12, 28). Niektórzy podkreślają, że od temperatury zależy przede wszystkim odpowiedź immunologiczna limfocytów supresyjnych i pomocniczych (Ts i Th), których aktywność proliferacyjna znacznie spada w temperaturach poniżej 12°C. Na podstawie badań molekularnych wykazano, że limfocyty T nie posiadają zdolności adaptacyjnych do niskich temperatur, które modulują skład lipidowy błony plazmatycznej limfocytów i obniżają odpowiedź immunologiczną (5).

Wyniki badań immunologicznych wykonane u karpia zdrowych podczas drugiego sezonu hodowlanego, poddanych działaniu różnych czynników środowiskowych i manipulacyjnych oraz analiza danych literaturowych wskazują na ścisłe połączenie układu neuroendokrynnego z układem immunologicznym i wskazują na hormonalną modulację odpowiedzi immunologicznej (43, 44).

Piśmiennictwo

1. Ainsworth A. J., Dexiang C., Waterstrat P. R., Greenway T.: Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). I. Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10°C. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991, 100A, 907-912.
2. Atanasova R., Hadjinikolova L.: Cellular and humoral (non-specific) immunity of carp stocking material (*Cyprinus carpio* L.) before and after wintering. *Bulg. J. Agric. Sci.* 2008, 14, 251-255.
3. Avtalion R. R.: Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). *Immunol.* 1969, 17, 927-931.
4. Bayne C. J., Levy S.: Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrophic hormone and catecholamines: mechanisms of action. *J. Leukoc. Biol.* 1991, 50, 554-560.
5. Bly J. E., Buttkle T. M., Clem L. W.: Differential effects of temperature and exogenous fatty acids on mitogen-induced proliferation in channel catfish T and B lymphocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 1990, 95A, 417-424.
6. Bly J. E., Clem L. W.: Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.* 1992, 2, 159-171.
7. Bly J. E., Clem L. W.: Temperature-mediated processes in teleost immunity: In vitro immunosuppression induced by in vivo low temperature in channel catfish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1991, 28, 365-377.
8. Borghetti P., Saleri R., Mocchegiani E., Corradi A., Martelli P.: Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009, 130, 141-162.
9. Buchtiková S., Šimková A., Rohlenová K., Lilius E. M., Hyršl P.: The seasonal changes in innate immunity of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 2011, 318, 169-175.
10. Caspi R. R., Shahrabani R., Kehatidan T.: Heterogeneity of mitogen-responsive lymphocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* 1984, 8, 61-70.
11. Chadzińska M., Tertilt E., Kępa M., Hermesen T., Scheer M., Verburb-van Kemenade Lidij B. M.: Adrenergic regulation of the innate immune response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 2012, 36, 306-316.
12. Clem L. W., Faulmann E., Miller N. W., Ellsaesser C., Lobb C. J., Cuchens M. A.: Temperature-mediated processes in teleost immunity: Differential effects of in vitro and in vivo temperatures on mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 1984, 8, 313-322.
13. Collazos M. E., Barriga C., Ortega E.: Effect of high summer temperatures upon granulocyte phagocytic function of the tench (*Tinca tinca* L.). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1995, 18, 115-121.
14. Collazos M. E., Barriga C., Ortega E.: Seasonal variations in the immune system of cyprinid *Tinca tinca*. Phagocytic function. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1995, 18, 105-113.
15. Collazos M. E., Ortega E., Barriga C.: Effect of temperature on the immune system of cyprinid fish (*Tinca tinca* L.). Blood phagocyte function at low temperature. *Fish Shellfish Immunol.* 1994, 4, 231-238.
16. Demers N. E., Bayne C. J.: The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 1997, 21, 363-373.
17. Dhabhar F. S.: Stress-induced augmentation of immune function-the role of stress hormones, leukocyte trafficking and cytokines. *Brain Behav. Immun.* 2002, 16, 785-798.
18. Dhabhar F. S., Miller A. H., McEwen B. S., Spencer R. L.: Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J. Immunol.* 1995, 154, 5511-5527.
19. Dominguez M., Takemura A., Tsuchiya M.: Effects of changes in environmental factors on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquacult. Res.* 2005, 36, 391-397.
20. Ellis A. E.: Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 1999, 9, 291-308.
21. Ellis A. E.: Lysozyme Assays: In Stolen Aal/SOS. *Tech. Fish Immunology* 1990, 101-103.
22. Ellsaesser C. F., Clem L. W.: Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *J. Fish. Biol.* 1986, 28, 511-521.
23. Engelsma M. Y., Hougee S., Nap D., Hofenk M., Rombout J. H., van Muiswinkel W. B.: Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish Shellfish Immunol.* 2003, 15, 397-410.
24. Esteban M. Á., Rodríguez A., Ayala A. G., Meseguer J.: Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabream (*Sparus aurata* L.). *General Comp. Endocrinol.* 2004, 137, 89-98.

25. Flory C. M., Bayne C. J.: The influence of adrenergic and cholinergic agents on the chemiluminescent and mitogenic responses of leukocytes from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Dev. Comp. Immunol. 1991, 15, 135-142.
26. Hernández A., Tort L.: Annual variation of complement, lysozyme and haemagglutinin levels in serum of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Fish Shellfish Immunol. 2003, 15, 479-481.
27. Le Morvan C., Troutaud D., Deschaux P.: Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. J. Exp. Biol. 1998, 201, 165-168.
28. Le Morvan-Rocher C., Troutaud D., Deschaux P.: Effects of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and nonspecific cytotoxic activity. Dev. Comp. Immunol. 1995, 19, 87-95.
29. Magnadottir B.: Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immunol. 2006, 20, 137-151.
30. Modrá H., Svobodová Z., Kolářová J.: Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. Acta Vet. Brno 1998, 67, 215-226.
31. Mueller J., Brun del Re G., Buerki H., Keller H. U., Hess M. W., Cottier H.: Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. Eur. J. Immunol. 1975, 5, 270-274.
32. Nikoskelainen S., Bylund G., Lilius E.-M.: Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. Dev. Comp. Immunol. 2004, 28, 581-592.
33. Pickering A. D., Pottinger T. G.: Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation plasma cortisol. Fish Physiol. Biochem. 1989, 7, 253-258.
34. Pilarczyk A.: Wpływ czynników genetycznych i pokarmowych na odpowiedź immunologiczną karpia. Praca habilitacyjna, Rozprawy nr 181, Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Szczecinie 1998, s. 1-62.
35. Rossi F.: The O_2^- forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanism of activation and function. Biochim. Biophys. Acta. 1986, 853, 65-89.
36. Saha N. R., Usami T., Suzuki Y.: Seasonal changes in the immune activities of common carp (*Cyprinus carpio*). Fish Physiol. Biochem. 2002, 26, 379-387.
37. Saurabh S., Sahoo P. K.: Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquacult. Res. 2008, 39, 223-239.
38. Schneider B., Ambrosius H.: The influence of environmental temperature on the lymphocyte populations in carp (*Cyprinus carpio*). Biomed. Biochim. Acta 1987, 46, 135-141.
39. Small B. C., Bilodeau A. L.: Effects of cortisol and stress on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) pathogen susceptibility and lysozyme activity following exposure to *Edwardsiella ictaluri*. Gen. Comp. Endocrinol. 2005, 142, 256-262.
40. Sopińska A.: Przydatność testu NBT do badań aktywności metabolicznej granulocytów krwi obwodowej karpia. Med. Weter. 1985, 41, 738-740.
41. Swain P., Dash S., Sahoo P. K., Routray P., Sahoo S. K., Gupta S. D.: Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish Shellfish Immunol. 2007, 22, 38-43.
42. Tolarova S., Davidova M., Simkova A., Flajshans M., Hyrly P.: The seasonal changes of innate immunity of tench, *Tinca tinca* (L.) with different ploidy level. Aquaculture 2014, 432, 46-52.
43. Tort L.: Stress and immune modulation in fish. Dev. Comp. Immunol. 2011, 35, 1366-1375.
44. Verburg-van Kemenade B. M. L., Stolte E. H., Metz J. E., Chadzinska M.: Neuroendocrine-immune interactions in teleost fish. Fish neuroendocrinology. Bernier N., van der Kraak G., Farrell A. P., Brauner C. J. editors. Fish physiology. Vol. 28, Burlington: Academic Press Elsevier Inc. 2009, s. 313-364.
45. Wang T., Secombes C. J.: The cytokine networks of adaptive immunity in fish. Fish Shellfish Immunol. 2013, 35, 1703-1718.
46. Watts M., Munday B. L., Burke C. M.: Immune response of teleost fish. Aust. Vet. J. 2001, 79, 570-574.
47. Weyts F. A., Flik G., Rombout J. H., Verburg-van Kemenade B. M.: Cortisol induces apoptosis in activated B cells, not in other lymphoid cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L. Dev. Comp. Immunol. 1998, 22, 551-562.
48. Weyts F. A., Flik G., Verburg-van Kemenade B. M.: Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. Dev. Comp. Immunol. 1998, 22, 563-572.
49. Wojtaszek J., Dziewulska-Szwajkowska D., Łozinska-Gabska M., Adamowicz A., Dzugaj A.: Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. Gen. Comp. Endocrinol. 2002, 125, 176-183.

Adres autora: prof. dr hab. Antonina Sopińska, Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: antonina.sopinska@up.lublin.pl