

ANTONINA SOPIŃSKA, LESZEK GUZ

Immunostymulujące działanie lewamizolu i preparatu TFX-Polfa u karpia w warunkach hodowlanych

Katedra Chorób Ryb Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Summary

Comparison of immunostimulatory effects of Levamisole and TFX-Polfa in carp under field conditions

Immunostimulatory effects of levamisole and TFX-Polfa have been compared in carp (300 fish of a body weight 150-200 g) under field conditions. Just after being taken from the fishery the carps were exposed to a 1 h medicated bath (10 mg of levamisole/l) and then after 5 weeks they were fed levamisole at a dose of 5 mg/kg of body weight every second day for 2 weeks. After the fish were caught TFX-Polfa was injected intraperitoneally once at a dose of 0,2 mg/fish. During a span of 24 weeks clinical observations were made and immunological profiles were determined. The number of leukocytes and neutrocytes in 1 μ l of blood, metabolic activity of neutrocytes (NBT) and activity of lysozyme (spectrophotometric method) were estimated. It was found that a single immunostimulation of the carp with levamisole activated immunemechanisms in spiring whereas a second dose of levamisole in fodder also activated the immuneprotective mechanisms in summer and autumn. A single dose of TFX-Polfa increased immunologic activity of the carp during the whole period of observation. The level of this activity was higher than that after a second stimulation by levamisole.

Ryby hodowlane po okresie zimowania, odłowach i transporcie z zimochowów do stawów odrostowych są znacznie osłabione i podatne na infekcje wirusowe, bakteryjne, czy grzybicze (1, 3, 7, 10, 18). Sprzyja temu często przedłużający się wiosną okres głodówki, związany z niską temperaturą wody, kiedy ryby nie pobierają pokarmu. Dlatego też aby zapobiec epizootiom, podawano dotychczas rybom profilaktycznie, w okresie wiosennym, antybiotyki w iniekcji dootrzewnowej lub w kąpielach. Okazało się jednak, że leki te wpływają niekorzystnie na układ immunologiczny ryb, obniżając jego aktywność (4, 5, 6, 11, 13, 16). Dotychczasowe badania, przeprowadzone w warunkach eksperymentalnych, zwracają uwagę na zastosowanie preparatów chemicznych, które wykazują wyraźne działanie pobudzające nieswoistą odpowiedź immunologiczną (8, 11, 15, 16, 17, 20, 22). Preparaty te mogłyby znaleźć zastosowanie u ryb w warunkach hodowlanych w przypadku niekorzystnie działających czynników osłabiających układ immunologiczny.

Celem pracy było porównanie wpływu dwu immunostymulatorów: lewamizolu i preparatu TFX na nieswoistą odpowiedź immunologiczną i zdrowotność karpia w warunkach hodowlanych.

Materiał i metody

Badania wykonano w warunkach terenowych, w gospodarstwie rybackim w Zagrodzie woj. chełmskie, w 3 stawach doświadczalnych o powierzchni 400 m² każdy. Doświadczenie rozpoczęto po odłowach wiosennych i trwało przez 24

tygodnie. Ryby podczas tego okresu były karmione paszą granulowaną 3 razy w tygodniu.

Do badań użyto 300 karpia K1, o masie 150-200 g, które podzielono na trzy grupy. Grupę 1 stanowiły ryby kontrolne, którym nie podano żadnych preparatów stymulujących. Grupą 2 objęto ryby, które zostały poddane działaniu lewamizolu bezpośrednio po odłowach oraz po 5 tygodniach. Po odłowach zastosowano kąpiel 1-godzinną w stężeniu 10 mg lewamizolu na 1 l wody (2, 22), natomiast po 5 tygodniach preparat ten był podawany w karmie co drugi dzień w dawce 5 mg/kg. m.c. przez okres 2 tygodni (17). Ten ostatni sposób podania lewamizolu był zastosowany celem przedłużenia jego działania immunostymulującego, bowiem wyniki po jednorazowym zastosowaniu tego środka w kąpeli wykazały, że działanie to utrzymywało się tylko 4-5 tygodni po wykonaniu zabiegu (22). Rybom grupy 3 podano preparat TFX (Jeleniogórskie Zakłady Farmaceutyczne) w iniekcji dootrzewnowej w ilości 0,2 ml (0,2 mg) na sztukę. Preparat ten, jak wykazały badania (18, 20), ma silne działanie stymulujące po podaniu w 96-godzinnej kąpeli, jednakże ten sposób podania w warunkach terenowych – w stawach – nie był możliwy.

Ryby podczas całego okresu obserwacji były poddawane badaniom klinicznym oceniającym ich stan zdrowia.

Po 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24 tygodniach od rozpoczęcia doświadczenia pobierano krew do badań immunologicznych, od 10 ryb każdorazowo. Krew pobierano do próbki zawierającej heparynę oraz do próbki bez heparyny, dla uzyskania surowicy.

W pobranych próbkach krwi oznaczano: liczbę leukocytów i neutrocytów wg ogólnie przyjętych metod, aktywność metaboliczną neutrocytów testem NBT (19, 24) i poziom lizozymu w surowicy krwi metodą spektrofotometryczną (14, 23).

Uzyskane wyniki liczbowe poddano analizie statystycznej testem t-Studenta.

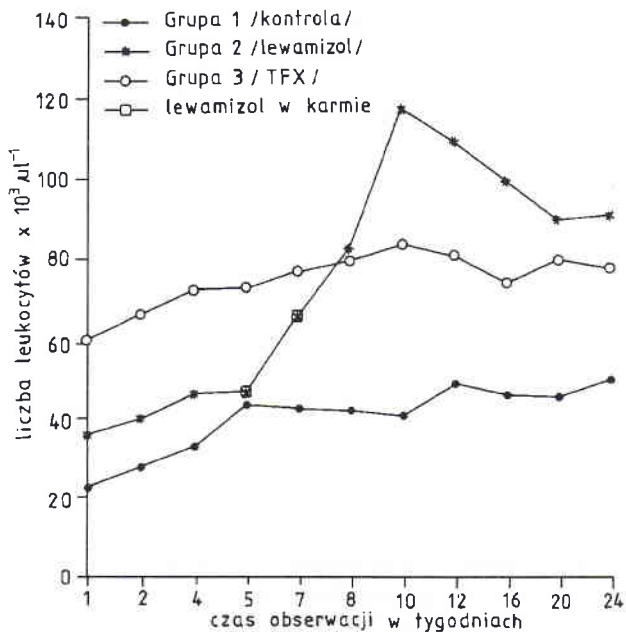
Wyniki i omówienie

Liczba leukocytów. W pierwszym okresie obserwacji w grupie 1, kontrolnej (tab. 1, ryc. 1) liczba leukocytów ($22,5 \pm 4,6 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ krwi) była nieco zaniżona w porównaniu do stanu fizjologicznego ($30-40 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ krwi). Było to przypuszczalnie następstwem stresu, jakiemu były poddane ryby podczas odłowu i innych zabiegów manipulacyjnych związanych z zarybieniem stawu doświadczalnego. W ciągu 5 tygodni obserwacji liczba ta uległa podwyższeniu i wynosiła od 39,5 do 48,2 (tab. 1, ryc. 1). W grupie 2, po podaniu lewamizolu, uzyskano u ryb statystycznie istotnie wyższą liczbę leukocytów niż w grupie kontrolnej w pierwszych 4 tygodniach obserwacji. W 5 tygodniu natomiast nie zaobserwowano istotnej różnicy w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 1, ryc. 1). Wyniki te są zgodne z uzyskanymi wcześniej w warunkach laboratoryjnych (21). Po podaniu lewamizolu w karmie w 7 tygodniu doświadczenia, uzyskano ponownie statystycznie istotnie wyższe wartości, w porównaniu z grupą kontrolną, które utrzymywały się do końca obserwacji. Najwyższą liczbę leukocytów w 1 μ l krwi stwierdzono w 10 tygodniu obserwacji (tab. 1, ryc. 1).

Tab. 1. Wartości badanych wskaźników odporności nieswoistej karpia (n=10) po stymulacji lewamizolem i TFX ($\bar{x} \pm s$)

Liczba tyg.	Data	Grupa 1 (kontrolna)				Grupa 2 (lewamizol)				Grupa 3 (TFX)			
		leukocyty $\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$	neutrocyty $\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$	NBT μg	lizozym $\mu\text{g/ml}$	leukocyty $\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$	neutrocyty $\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$	NBT μg	lizozym $\mu\text{g/ml}$	leukocyty $\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$	neutrocyty $\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$	NBT μg	lizozym $\mu\text{g/ml}$
1	6.04	22,5 4,6	11,3 2,8	17,3 2,3	0,16 0,01	35,5* 4,2	5,5* 1,3	18,1* 2,6	0,44* 0,08	59,3** 7,6	6,4* 1,2	12,1* 2,6	0,53** 0,12
2	13.04	27,4 3,2	8,1 1,6	18,1 1,4	0,23 0,04	39,4* 3,7	4,8* 1,5	18,4* 2,2	0,52* 0,04	65,5** 3,4	7,3** 1,3	20,4** 2,2	1,08** 0,08
4	27.04	32,3 2,1	6,5 1,4	19,4 1,9	0,26 0,03	45,6* 7,4	5,3* 1,2	23,5* 2,8	0,51* 0,02	71,8** 4,5	9,3** 2,1	29,2** 3,6	1,49** 0,06
5	4.05	42,8 2,6	4,2 1,3	19,5 2,6	0,28 0,04	46,0 5,6	5,2* 1,3	22,5 3,2	0,48* 0,11	72,0** 7,1	8,1** 1,7	33,5** 3,2	1,40** 0,08
7	18.05	41,5 2,2	4,8 1,2	20,6 3,1	0,32 0,06	65,1* 4,2	7,1* 1,1	29,3* 3,6	0,62* 0,08	76,0** 4,2	7,8* 1,5	32,3** 1,8	1,21** 0,06
8	25.05	41,0 3,2	4,6 1,5	19,8 3,0	0,31 0,05	81,6* 3,6	8,7** 1,4	34,7** 3,1	0,81* 0,07	78,5* 3,6	7,1* 1,1	31,1* 1,6	1,10** 0,11
10	8.06	39,5 3,5	4,9 1,1	21,4 2,1	0,48 0,04	116** 14,5	8,9** 1,3	34,2** 2,7	0,98** 0,04	82,5* 6,2	6,2* 1,2	28,5* 2,7	0,82* 0,07
12	23.06	47,5 4,2	4,8 0,8	24,3 2,4	0,36 0,03	108** 11,4	7,0* 2,6	32,5** 4,3	0,92** 0,03	79,5* 6,8	6,1* 0,8	29,4* 3,3	0,76* 0,08
16	25.07	44,5 2,6	4,1 0,5	24,7 1,6	0,42 0,03	98,5** 7,6	6,4* 1,6	29,7** 3,1	0,72** 0,02	72,5* 4,6	5,6* 0,9	25,2* 1,8	0,63* 0,16
20	27.08	44,0 3,5	3,3 0,7	25,6 3,2	0,39 0,02	88,5** 6,6	6,2** 0,8	28,5** 2,4	0,56* 0,02	78,3* 3,5	5,1* 1,2	22,5* 1,4	0,64** 0,12
24	25.09	48,2 3,0	3,2 1,1	25,4 3,5	0,44 0,03	89,5** 5,2	5,8** 0,7	27,8** 3,3	0,48 0,05	76,2* 4,5	4,1* 0,6	23,3* 2,7	0,62** 0,05*

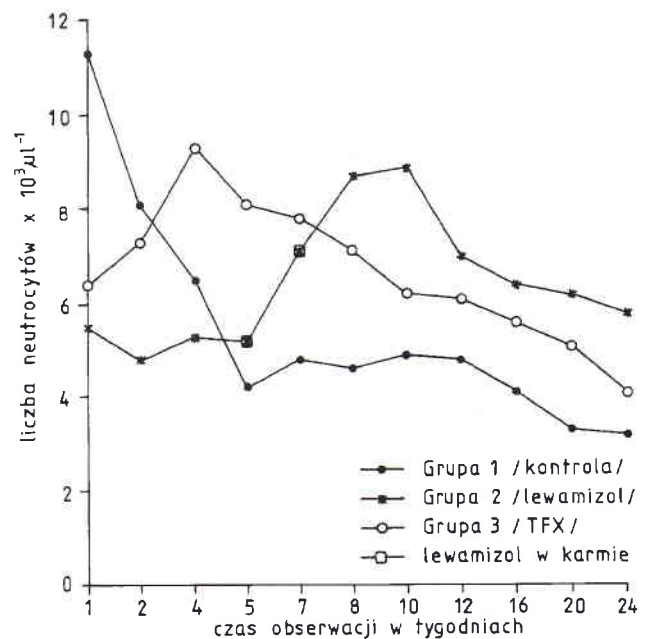
Objaśnienia: □ – lewamizol podawany w karmie, * – różnica istotna przy $p \leq 0,05$ w stosunku do kontroli, • – różnica istotna przy $p \leq 0,05$ lewamizol w stosunku do TFX



Ryc. 1. Średnie wartości liczby leukocytów w 1 µl krwi karpia

W grupie 3 podanie rybom preparatu TFX w iniekcji do otrzewnowej spowodowało statystycznie istotne podwyższenie wartości liczby leukocytów w porównaniu z grupą kontrolną podczas całego doświadczenia. Należy zwrócić uwagę, że podanie lewamizolu w karmie (grupa 2), po 5 tygodniach, spowodowało znacznie wyższy wzrost liczby leukocytów w porównaniu do tej liczby uzyskanej po jednorazowym podaniu TFX (tab. 1, ryc. 1).

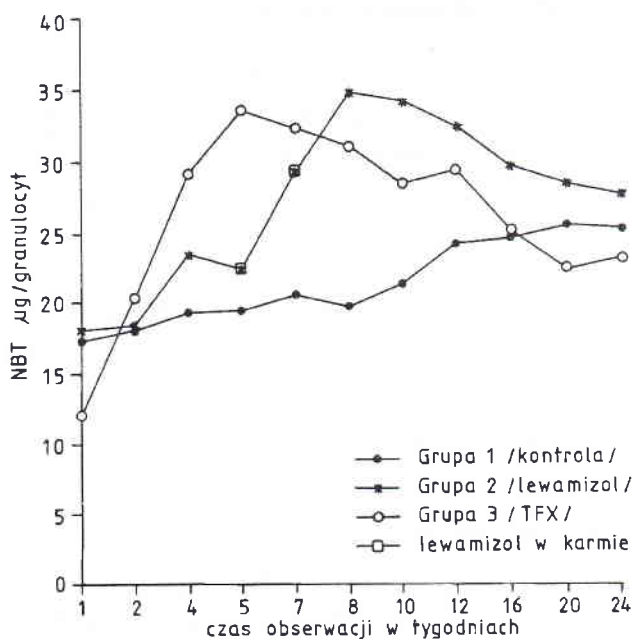
Liczba i aktywność metaboliczna neutrocytów. Od początkowo najwyższej wartości ($11,3 \pm 2,8 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$) następował jednostajny spadek liczby neutrocytów do 5 tygodnia obserwacji (tab. 1, ryc. 2). Od 7-16 tygodnia liczba neutrocytów utrzymywała się na podobnym poziomie ($4,1 \pm 0,5 - 4,9 \pm 1,1$



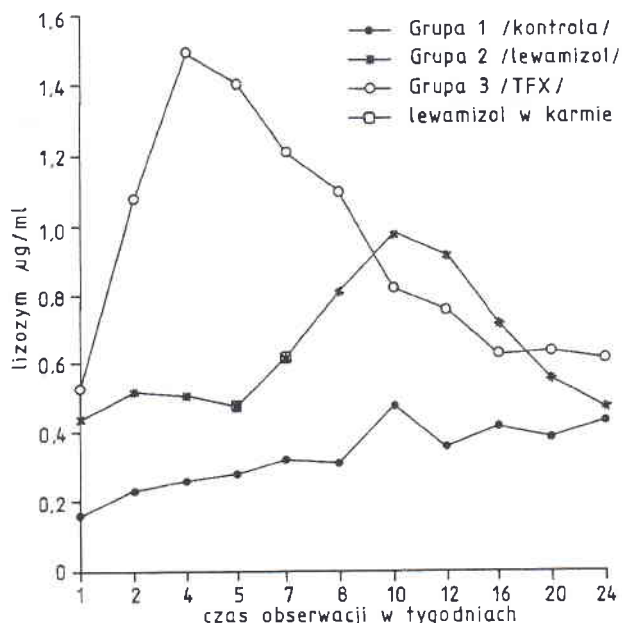
Ryc. 2. Średnie wartości liczby neutrocytów w 1 µl krwi karpia

$\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$) i następnie ulegała powolnemu zmniejszeniu do $3,2 \pm 1,1 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$) (tab. 1, ryc. 2). Najwyższe wartości w 1 tygodniu obserwacji były przypuszczalnie spowodowane działaniem czynników stresotwórczych, którym ryby były poddane po odłowieniu z zimochowów i przeniesieniu do stawów doświadczalnych, zaś w okresie 7-16 tygodni były następstwem podwyższonej temperatury w okresie lata (21).

Aktywność metaboliczna neutrocytów w grupie kontrolnej (tab. 1, ryc. 3), utrzymywała się na podobnym poziomie do 10 tygodnia obserwacji; w pozostałych okresach wartość ta była na ogół niższa. Stymulacja lewamizolem i preparatem TFX (grupa 2 i 3) miała wyraźny wpływ na obie wartości. Szczególnie korzystne było powtórne podanie lewamizolu, po



Ryc. 3. Średnie wartości formazanu NBT w granulocytach krwi karpia



Ryc. 4. Średnie wartości lizozymu w surowicy krwi karpia

Tab. 2. Wartości badanych wskaźników odpowiedzi nieswoistej karpia zdrowych i chorych z objawami erythrodermatitis po stymulacji lewamisolem i TFX ($\bar{x} \pm s$)

Badane parametry 23.06.92 r.	Grupa 1 (kontrolna)		Grupa 2 (lewamisol)		Grupa 3 (TFX)							
	zdrowe	chore	zdrowe	chore	zdrowe	chore						
Leukocyty $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$	47,5	4,2	18,5 ^x	1,7	108,0	11,4	137,5 ^{x*}	17,2	79,5	6,8	84,3 ^{x*}	8,3
Neutrocyty $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$	4,8	0,8	7,5 ^x	1,2	7,0	2,6	12,2 ^{x*}	2,6	6,1	0,8	17,6 ^{x*}	3,4
NBT µg	24,3	2,4	11,3 ^x	1,5	32,5	4,3	29,4 [*]	5,4	29,4	3,3	19,2 ^{x*}	2,3
Lizozym µg/ml	0,36	0,03	0,22 ^x	0,01	0,92	0,03	0,80 ^{x*}	0,02	0,76	0,08	0,65 ^{x*}	0,04

Objaśnienia: x – różnica istotna przy $p \leq 0,05$ ryb chorych w stosunku do ryb zdrowych w każdej grupie doświadczalnej, * – różnica istotna przy $p \leq 0,05$ ryb chorych stymulowanych w stosunku do ryb chorych niestymulowanych

którym w 8 i 10 tygodniu obserwacji uzyskano najwyższą liczbę neutrocytów o wysokiej aktywności metabolicznej (tab. 1, ryc. 2 i 3).

Poziom lizozymu w surowicy krwi. Zawartość lizozymu u karpia grupy 1 (kontrolnej) od najniższej wartości uzyskanej w 1 tygodniu obserwacji na ogół utrzymywała się na podobnym poziomie (tab. 1, ryc. 4). Najwyższy poziom stwierdzony w 10 tygodniu był zapewne wynikiem działania wysokiej temperatury w okresie letnim, co potwierdzają dane piśmiennictwa (9, 22).

W grupie 2 podanie lewamisolu bezpośrednio po odłowach wiosennych spowodowało statystycznie istotny wzrost poziomu lizozymu w porównaniu z grupą kontrolną. Po powtórnej podaniu lewamisolu nastąpił dalszy bardzo wyraźny wzrost tej wartości w surowicy krwi. Najwyższą wartość stwierdzono w 10 tygodniu obserwacji; w następnych tygodniach uległa ona powolnemu obniżeniu i w 24 tygodniu nie była już statystycznie istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej (tab. 1, ryc. 4).

W grupie 3 jednorazowe podanie preparatu TFX spowodowało statystycznie istotny wzrost poziomu lizozymu w surowicy krwi ryb utrzymujący się do końca obserwacji (tab.

1, ryc. 4). Najwyższą wartość poziom ten osiągnął w 4 tygodniu obserwacji. Należy zwrócić uwagę, że aktywność lizozymu po podaniu TFX w grupie 3, była istotnie wyższa w okresie od 1 do 8 tygodnia obserwacji niż po podaniu lewamisolu w grupie 2 (tab. 1, ryc. 4).

Stan zdrowotny ryb. Stan zdrowia ryb nie wykazywał odchyleń od normy do 10 tygodnia obserwacji. Natomiast w 12 tygodniu trwania doświadczenia (23.06.1992) stwierdzono u niektórych ryb objawy wskazujące na wystąpienie erythrodermatitis. Obserwowano je u 30 ryb kontrolnych, u 5 ryb stymulowanych lewamisolem i 9 ryb stymulowanych preparatem TFX. U ryb chorych po stymulacji w porównaniu z rybami chorymi nie poddanymi stymulacji, stwierdzono wyraźną leukocytozę, neutrocytozę oraz podwyższenie aktywności metabolicznej neutrocytów i poziomu lizozymu w surowicy krwi (tab. 2). Stan ten był szczególnie wyraźny u ryb chorych stymulowanych lewamisolem. Najniższe wartości badanych parametrów stwierdzono u ryb chorych nie poddanych stymulacji (tab. 2). Podwyższenie wszystkich badanych parametrów u ryb chorych po wcześniejszym zastosowaniu immunostymulacji świadczy o korzystnym wpływie tego za-

biegu na stan obronności tych ryb wobec czynników chorobowych. Szczególnie skuteczna wydaje się być immunostymulacja lewamizolem, gdyż w tej grupie najniższa liczba ryb uległa zachorowaniu, a preparat ten może być podawany wielokrotnie w okresie hodowlanym ryb, co zapewnia uaktywnienie obronności przez dłuższy czas.

Wnioski

1. Zastosowanie immunostymulacji u karpia hodowlanych stwarza nowe możliwości skutecznej interwencji człowieka w mechanizm działania układu immunologicznego ryb poprzez pobudzenie jego aktywności w okresie zagrożenia zdrowia.
2. Immunostymulacja wykonana lewamizolem jednorazowo w kąpeli powoduje uaktywnienie mechanizmów odpornościowych, utrzymujące się do 5 tygodni; zabieg ten może być polecany szczególnie dla ryb w okresie wiosennym, osłabionych zimowaniem.
3. Przedłużenie działania immunostymulacji lewamizolem (w okresie letnim i jesiennym) jest możliwe tylko po jego powtórny zastosowaniu w karmie.
4. Immunostymulacja preparatem TFX powoduje stały wzrost aktywności immunologicznej ryb. Poziom tej aktywności jest jednak niższy niż po powtórnej immunostymulacji lewamizolem.
5. Zastosowanie immunostymulacji lewamizolem lub preparatem TFX ma wpływ na przebieg procesu chorobowego; szczególnie wysoka liczba leukocytów i neutrocytów oraz podwyższony poziom aktywności lizozymu u ryb z objawami chorobowymi świadczą o wyraźnej mobilizacji ich mechanizmów obronnych do walki z czynnikiem zakaźnym.

Piśmiennictwo

1. Antychowicz J.: *Życie wet.* 67, 12, 1993.
2. Baba T., Watase Y., Yoshinaga Y.: *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 301, 1993.
3. Ellsaesser C.F., Clem L.W.: *J. Fish Biol.* 28, 511, 1989.
4. Grondel J.L., Boester J.A.M.: *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* 2, 211, 1982.
5. Grondel J.L., Glaudemans A.G.M., Van Muiswinkel W.B.: *Vet. Immunol. Immunopathol.* 9, 251, 1985.
6. Grondel J.L., Nouws J.F.M., Van Muiswinkel W.B.: *J. Fish Dis.* 10, 35, 1987.
7. Hunt T.C., Margetts A.R.: *J. Fish Biol. Supl. A*, 31, 1987.
8. Kajita Y., Sakai M., Asuta S., Kobajashi M.: *J. Fish Pathol.* 25, 93, 1990.
9. Muona M., Soiwio A.: *Aquacult.* 106, 75, 1992.
10. Miller N.W., Tripp M.R.: *J. Fish Biol.* 20, 301, 1982.
11. Niemczuk W., Olech W.: *Życie Wet.* 67, 15, 1993.
12. Rijkers G.T., Teunissen A.G., Van Oosterom R., Van Muiswinkel W.B.: *Aquacult.* 19, 177, 1980.
13. Rijkers G.T., Van Oosterom R., Van Muiswinkel W.B.: *Vet. Immunol. Immunopathol.* 9, 251, 1985.
14. Sankeran K., Shanto G.: *Indian. Biochem. Biophys.* 9, 162, 1972.
15. Siwicki A.K.: *J. Fish Biol. Supl. A*, 31, 245, 1987.
16. Siwicki A.K., Anderson P.P., Dixon O.W.: *Immunol. Immunopath.* 23, 195, 1989.
17. Siwicki A.K.: *Stymulowanie odporności nieswoistej w chowie i hodowli ryb. Instrukcja do użytku w rybnictwie śródlądowym.* IRS Olsztyn, 1991.
18. Sniieszko S.F.: *J. Fish Biol.* 6, 197, 1974.
19. Sopińska A.: *Medycyna Wet.* 41, 738, 1985.
20. Sopińska A.: *Efekt immunostymulacji w przebiegu działania czynników osłabiających aktywność komórkowych procesów obronnych karpia.* Praca habił. AR Lublin, 1991.
21. Sopińska A.: *Acta Ichtiol. Pisc.* 13, 59, 1983.
22. Sopińska A., Guz L.: *Medycyna Wet.* 49, 12, 1993.
23. Studnicka M., Siwicki A., Ryka B.: *Bamidgeh* 38, 22, 1986.
24. Sychłowy A., Lukas A.: *Pol. Tyg. Lek.* 33, 45, 1878.

Adres autora: dr hab. Antonina Sopińska, ul. Królowej Jadwigi 6/15, 20-282 Lublin

ALICJA WÓJCIK

artykuł przeglądowy

Rozwój i funkcjonowanie jajnika ptaków domowych – wybrane zagadnienia

Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Akademicka 13, 20-033 Lublin

W jajniku dojrzałej płciowo samicy ptaka w warstwie zewnętrznej, korowej znajdują się pęcherzyki jajowe, zawierające w różnym stadium rozwoju komórki rozrodcze (oocyty). Pęcherzyk jajnikowy spełnia szereg funkcji. Stanowi on ochronę oocytu. Ściana pęcherzyka wydziela estrogeny, które stymulują produkcję prekursorów żółtka. Naczynia krwionośne pęcherzyka dostarczają materiał żółtkowy produkowany prawie całkowicie w wątrobie. Wreszcie pęcherzyk uwalnia drugorzędowy oocyt (owulacja).

Marza i Marza (cyt. 3) dzielą rozwój pęcherzyków jajnikowych na trzy fazy różniące się czasem trwania, tempem wzrostu oraz rodzajem materiału odkładanego w ich treści. W fazie pierwszej (wczesnego rozwoju), trwającej wiele miesięcy, a nawet kilka lat, następuje niewielki wzrost pęcherzyka w wyniku gromadzenia głównie materiału tłuszczowego.

Przy końcu tej fazy oocyt ptaków domowych ma średnicę ok. 1 mm. W drugiej fazie, podczas około 2 miesięcy, odkładane są głównie substancje białkowe (żółtko białe) i np. u kur oocyt osiąga średnicę ok. 4 mm. W trzeciej, końcowej fazie – szybkiego wzrostu, trwającej kilka do kilkunastu dni, pęcherzyk powiększa się znacznie, co wiąże się z gromadzeniem tłuszczowców, białek i odłożeniem karotenoidów. W końcu tej fazy, tj. w pobliżu czasu owulacji, wielkość oocytu jest równa wielkości żółtka w zniesionym jajku. Jego wielkość związana jest z gatunkiem ptaków i np. u kur oocyt osiąga średnicę do 40 mm., masę 15-19 g., a czas trwania fazy szybkiego wzrostu wynosi 6-14 dni, u indyków 11-15 dni, masa oocytu zaś 23-28 g, u przepiórek 5-7 dni, a masa 2,7-3,6 g. Na podstawie tych danych wydaje się, że u większych gatunków oocyty pozostają dłużej w fazie szybkiego wzrostu.