

Andrzej K. Siwicki¹, Krzysztof Kazuń¹, Edward Głąbski¹, Elżbieta Terech-Majewska²

¹Zakład Patologii i Immunologii Ryb IRS w Olsztynie

²Katedra Epizootologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie

Kształtowanie się nieswoistej odporności humoralnej u samic trzech linii karpia hodowanego w Polsce

Wstęp

W ostatnich latach pomimo ogromnego postępu w zakresie wprowadzania nowych technologii w chowie i hodowli ryb, a szczególnie intensyfikacji produkcji materiału zarybieniowego, nie obserwuje się znaczących zmian w szeroko pojętej ochronie zdrowia tarlaków. Dotyczy to szczególnie hodowli karpia. W ostatnich latach obserwuje się nawet powrót do ekstensywnej hodowli, co w znaczący sposób ogranicza nakłady na profilaktykę. Pomimo takiej sytuacji pojawiły się nowe, dotychczas nie występujące choroby tła wirusowego czy bakteryjnego, które powodują coraz większe straty w chowie i hodowli karpia (Muller i Lloyd 1994). Badania własne prowadzone na tarlakach karpia w tzw. okresie okołotartowym jednoznacznie wykazały, że stan zdrowotny oraz poziom odporności nieswoistej i przeciwwakacyjnej odporności nieswoistej samców i samic ma decydujący wpływ na jakość i zapłodnienie ikry oraz stan kondycyjny i zdrowotny larw i narybku w pierwszych tygodniach podchowu. Równocześnie obserwowano znaczące zróżnicowanie stanu kondycyjnego i wydolności układu odpornościowego u tarlaków pochodzących z różnych środowisk. Jakość wody, warunki chowu oraz jakość pokarmu ma istotny wpływ na stan kondycyjny oraz w znaczący sposób determinuje poziom wydolności układu immunologicznego, warunkującego odporność na zakażenia wirusowe, bakteryjne czy grzybicze. Przekazywanie potencjału obronnego na potomstwo jest zjawiskiem już potwierdzonym naukowo, a prowadzone badania doświadczalne jednoznacznie wykazały, że istnieją mechanizmy warunkujące przekazywanie przez tarlaki odporności nieswoistej na patogeny drogą transowaryjną, co w znaczący sposób zmieniło poglądy na temat indukowania odporności w pierwszym okresie podchowu.

Układ odpornościowy ryb, niezależnie od różnic anatomicznych i fizjologicznych pomiędzy gatunkami, funkcjonuje za pomocą podobnych struktur i mechanizmów, jakie występują u ssaków i człowieka. Aktualnie przyjmuje się następujący podział mechanizmów obronnych u ryb:

A. odporność nieswoista (wrodzona), na którą składają się:

- bariera mechaniczna w postaci nieuszkodzonej skóry i błon śluzowych,
- działające na powierzchni powłok ciała czynniki humoralne (lizozym, chitynaza) oraz mechaniczne (tłuszcze, śluz),
- czynniki humoralne zawarte w komórkach i płynach tkankowych (lizozym, interferon, układ dopełniacza, białko C-reaktywne, ceruloplazmina, naturalne przeciwciała)
- układ komórek fagocytujących (odporność komórkowa) dotyczący monocytów/makrofagów oraz granulocytów obojętnochłonnych.

B. odporność swoista (nabyta) zależna od wytworzenia swoistych przeciwciał (ryby produkują jedną klasę immunoglobulin IgM), neutralizujących patogeny drobnoustrojów, oraz od ekspansji klonów limfocytów T pomocniczych i cytotoksycznych rozpoznających oraz niszczących patogeny drobnoustroje.

U ryb nieswoiste humoralne i komórkowe mechanizmy stanowią główną linię obrony przeciwwakacyjnej. Do nieswoistych czynników humoralnych wykazujących dużą aktywność u ryb należy lizozym i ceruloplazmina. Lizozym występuje w leukocytach, komórkach fagocytarnych, surowicy, śluzie oraz w komórkach skrzelowych i jajowych. W przeciwieństwie do lizozymu występującego u ssaków, lizozym ryb wykazuje właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne nie tylko wobec bakterii Gram-dodatnich, lecz także Gram-ujemnych. Lizozym jest jednym z najsilniejszych czynników odporności nieswoistej, a jego aktywność jest skorelowana z poziomem immunoglobulin (Stosik i Deptuła 1990). Ceruloplazmina jest białkiem ostrej fazy i spełnia istotną rolę w regulacji poziomu amin biogennych, co umożliwia organizmowi szybkie odzyskanie homeostazy naruszonej przez uraz oraz czynniki zakaźne i środowiskowe (Stosik i Deptuła 1990). Białko całkowite jest podstawowym parametrem określającym przemiany białkowe w organizmie i stanowi cenny wskaźnik stanu kondycyjnego ryb. W odróżnieniu od ssaków, u ryb frakcja gamma-globuli-

nowa zawiera głównie immunoglobuliny klasy IgM oraz w niewielkiej ilości naturalne przeciwciała (Anderson 1993). Odgrywają one istotną rolę w nieswoistej i swoistej odporności humoralnej (Olesen i Jorgensen 1986).

Celem podjętych badań było określenie poziomów wybranych mechanizmów obronnych: aktywności lizozymu i ceruloplazminy oraz poziomu gamma-globulin u samic trzech linii karpia hodowanego w Polsce, które stanowiąc będą podstawę do oceny ich potencjału obronnego.

Materiał i metody

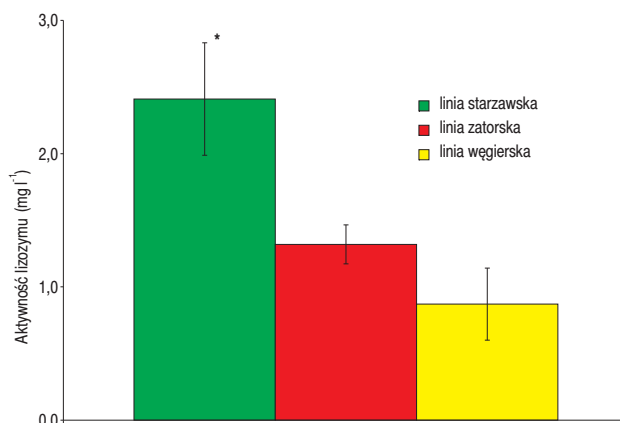
Badania przeprowadzono na samicach selektach (K4) karpia linii starzawskiej, zatorskiej i węgierskiej, które udostępniono do badań w Rybackim Zakładzie Doświadczalnym IRS w Zatorze. Wyselekcjonowane samice (po 10 sztuk każdej linii) przeznaczone na tarlaki były w tym samym wieku (4 lata) i podobnej masie ciała (2,9-3,2 kg). Badania kliniczne samic nie wykazały zmian wskazujących na toczący się proces chorobowy. Przed pobraniem krwi do badań immunologicznych samice wprowadzano w stan znieczulenia ogólnego preparatem Propiscin (IRS Olsztyn). Krew do badań pobierano z żyły ogonowej przy użyciu zestawu Vacuette (Greiner), a następnie wirowano w celu uzyskania surowicy. Badania immunologiczne dotyczyły określenia w surowicy aktywności lizozymu metodą turbidymetryczną (Studnicka i Siwicki 1986) oraz aktywności ceruloplazminy metodą spektrofotometryczną (Siwicki i Studnicka 1986). Równocześnie w surowicy oznaczono poziom białka całkowitego oraz frakcji gamma-globulinowej (Ig) metodą spektrofotometryczną (Siwicki i Anderson 1993)

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy zastosowaniu programu komputerowego Statistica 8.0. Różnice między wartościami średnimi uzyskanymi w badaniach poszczególnych linii oceniano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Istotność różnic między grupami weryfikowano testem „post hoc” Tukeya (HSD), przyjmując za istotne wartości przy $p < 0,05$.

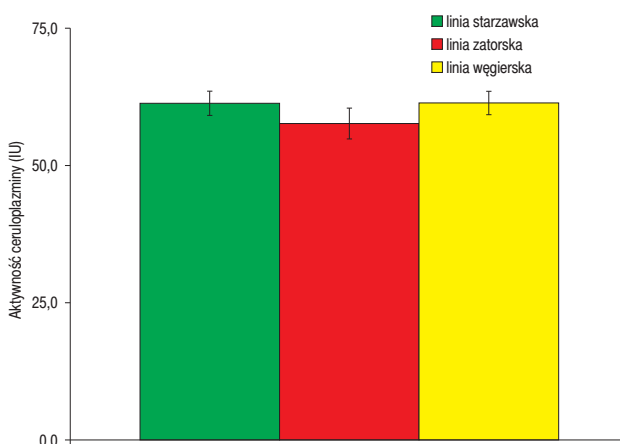
Wyniki i dyskusja

Podjęte badania miały na celu określenie potencjału nieswoistej odporności humoralnej u selektów trzech linii karpia hodowanego w Polsce, które będą stanowiły podstawę do oceny ich potencjału obronnego. Pozwoli to na określenie, które linie karpia i ich krzyżówki będą dawały najwyższą odporność u potomstwa od nich uzyskanego. Ma to istotne znaczenie praktyczne w poszukiwaniu linii i ich krzyżówek o najwyższym potencjale obronnym, gwarantującym wysoką odporność przeciwzakaźną.

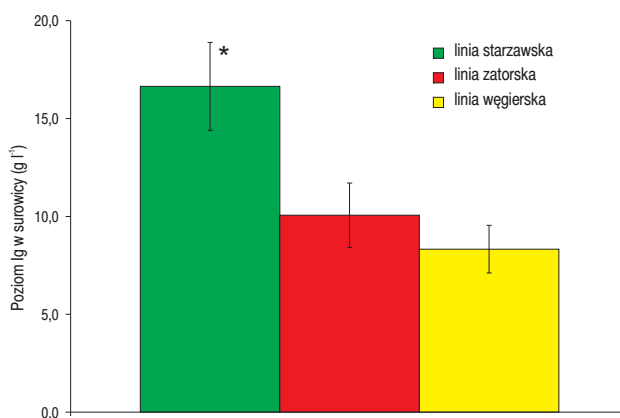
Kształtowanie się aktywności lizozymu w surowicy samic trzech linii karpia wyselekcjonowanych z przeznaczeniem do dalszej hodowli jako tarlaki przedstawiono na rys. 1, kształtowanie się aktywności ceruloplazminy w surowicy



Rys. 1. Kształtowanie się aktywności lizozymu w surowicy u samic trzech linii karpia starzawskiego, zatorskiego i węgierskiego (n= 10, średnie wartości SD; * statystycznie istotne $p < 0,05$).

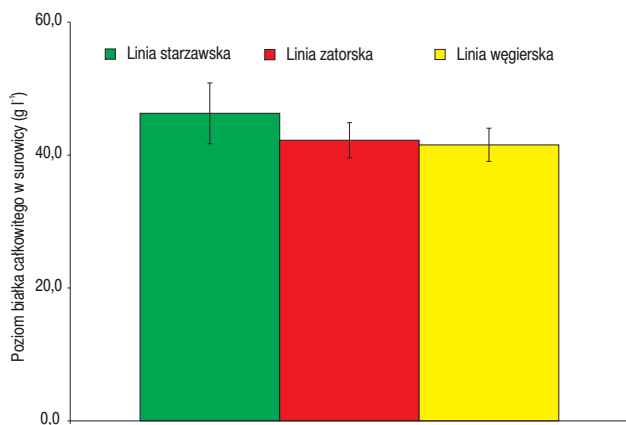


Rys. 2. Kształtowanie się aktywności ceruloplazminy w surowicy u samic trzech linii karpia starzawskiego, zatorskiego i węgierskiego (n= 10, średnie wartości SD; * statystycznie istotne $p < 0,05$).



Rys. 3. Kształtowanie się poziomu Ig w surowicy u samic trzech linii karpia starzawskiego, zatorskiego i węgierskiego (n= 10, średnie wartości SD; * statystycznie istotne $p < 0,05$).

wy tych selektów na rys. 2, poziomu gamma-globulin w surowicy na rys. 3 oraz poziomu białka całkowitego na rys. 4. Analiza uzyskanych wyników badań jednoznacznie wykazała, że najwyższy statystycznie istotny ($P < 0,05$)



Rys. 4. Kształtowanie się poziomu białka całkowitego w surowicy u samic trzech linii karpia starzawskiego, zatorskiego i węgierskiego (n = 10, średnie wartości SD; * statystycznie istotne p < 0,05).

poziom aktywności lizozymu i gamma-globulin stwierdzono u selektów linii starzawskiej, w porównaniu z linią zatorską i węgierską. Natomiast nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między badanymi liniami w aktywności ceruloplazminy i poziomach białka całkowitego. Równocześnie analiza statystyczna wyników badań nie wykazała statystycznie istotnych różnic we wszystkich badanych parametrach nieswoistej odporności humoralnej między linią węgierską a zatorską.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że najwyższy potencjał nieswoistej odporności humoralnej stwier-

dzono u linii starzawskiej, co ma istotne znaczenie w dalszych ukierunkowanych badaniach nad poszukiwaniem linii i ich krzyżówek o najwyższym potencjale odporności na zakażenia wirusowe, bakteryjne czy grzybicze. Brak jest w dostępnej literaturze danych na temat kształtowania się odporności u różnych linii karpia hodowanych w wielu krajach świata. Uzyskane wyniki są pierwszym doniesieniem dotyczącym potencjału obronnego różnych linii karpia i świadczą o konieczności kontynuacji ukierunkowanych badań nad możliwością przekazywania wysokiego potencjału odpornościowego na potomstwo pochodzące od krzyżówek różnych linii. Ma to istotne znaczenie dla ograniczenia strat w hodowli stawowej karpia powodowanej chorobami zakaźnymi.

Literatura

- Anderson D.P. 1993 – Specific immune response in fish – W: Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods. Wyd. IRS Olsztyn: 17-20.
- Muller R., Lloyd R. 1994 – Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish – W: FAO Fishing News Books London: 371 pp.
- Olesen N.J., Jorgensen P.E.V. 1986 – Quantification of serum immunoglobulin in rainbow trout *Salmo gairdneri* under various environmental conditions – Dis. Aquat. Org. 1: 183-189.
- Siwicki A., Anderson D.P. 1993 – Nonspecific defence mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (T-Ig) levels in serum – W: Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods. FAO, IFI Olsztyn: 105-112.
- Siwicki A., Studnicka M. 1986 – Ceruloplasmin activity in carp (*Cyprinus carpio*) – Bamidgeh 38:126-129.
- Stosik M., Deptuła W. 1990 – Mechanizmy odporności swoistej i nieswoistej u ryb – Post. Mikrobiol. 29: 91-98.
- Studnicka M., Siwicki A. 1986 – Lizozym level in carp (*Cyprinus carpio*) – Bamidgeh 2: 22-26.

Przyjęto po recenzji 07.06.2010 r.

FORMATION OF NON-SPECIFIC HUMORAL IMMUNITY IN THREE LINES OF CARP FEMALES REARED IN POLAND

Andrzej K. Siwicki, Krzysztof Kazuń, Edward Głąbski, Elżbieta Terech-Majewska

ABSTRACT. Despite great advances in new technologies for breeding and rearing fish, little progress is noted in prophylactic technologies for spawners, particularly those used in carp rearing. The condition and non-specific immunity of males and females has a decisive impact on the quality and fertilization of spawn, on the course of rearing larvae and fry in the first weeks of life, and on the subsequent stages of rearing. The aim of the current study was to determine the level of lysosome and ceruloplasmin activities and on the level of gamma globulin in the females of three carp lines reared in Poland – starzawski, zatorski, and węgierski. The results of the study indicated unequivocally that the highest non-specific humoral immunity potential was noted in the females from the starzawski line. The highest statistically significant levels of lysosome and gamma globulin activity were noted in selects from this line in comparison to those of the zatorski or węgierski lines. However, no significant differences were noted in the ceruloplasmin activities or total protein levels among the lines studied. This informs the direction of further study, which should focus on identifying lines and their cross-breeds that have the highest potential immunity to viral, bacterial, and fungal infections.

Keywords: carp, non-specific humoral immunity, fish immune system, carp lines