

## The functions of macrophage and melano-macrophage centers in fish immunity

Antychowicz J.

The aim of this review is to present the current opinions on specificity of fish immune system with special emphasis on the role of macrophages, melano-macrophages and melano-macrophage centers in resistance to viral, bacterial and parasitic diseases, as well as toxic substances. Information concerning the influence of extrinsic and intrinsic factors influencing the macrophage activity could be useful in betterment of fish diseases control measures, for instance the non-specific immunostimulation in farm fish. Many authors suggest that effective fish immunostimulation should augment the genes expression in macrophages, increasing their number and activating them towards the pathogens. On the basis of presented information, it could be concluded that macrophage and melano-macrophage centers number should be considered as bioindicators of fish health status and the aquaculture environment degradation.

**Keywords:** fish, immunity, macrophages and melano-macrophage centers.

Ryby są najstarszą grupą kręgowców, której układ odpornościowy działa na podobnych zasadach, jak układ odpornościowy ptaków i ssaków. Podobnie jak u innych gatunków zwierząt, również u ryb układ odpornościowy ulegał ewolucji w wyniku ciągłej presji patogennych mikroorganizmów. Występowanie ryb przez około 580 mln lat, jak również obecność ponad 32 tys. współcześnie żyjących gatunków ryb jest sukcesem, który zawdzięczają wielu przystosowaniom, między innymi w zakresie układu odpornościowego. Podobnie jak u ptaków i ssaków, u ryb występuje odporność wrodzona, czyli naturalna, oraz odporność nabyta. Na uwagę zasługuje fakt, że w trakcie ewolucji kręgowców u ryb po raz pierwszy pojawiły się receptory komórkowe typu immunoglobulin – Ig. Niezależnie od wielu podobieństw w odpowiedzi odpornościowej

## Rola makrofagów i centrów melano-makrofagowych w odporności ryb

Jerzy Antychowicz

występującej u ssaków i ryb, u obu tych grup zwierząt występują również różnice. Rolę szpiku kostnego u ryb pełni nerka głowowa; zachodzi tam między innymi hemato-poeza, powstają granulocyty i monocyty (1). Grasicca, nerka głowowa i śledziona u ryb są głównymi narządami limfatycznymi (2).

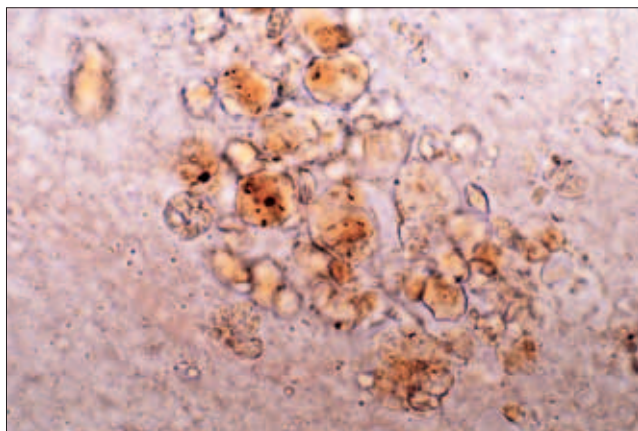
Według Ellis (3) przeżycie ryby, u której doszło do zakażenia zależy przede wszystkim od wrodzonych mechanizmów obronnych, których działanie jest niezależne od uprzedniego kontaktu z określonym czynnikiem patogennym i w małym stopniu zależy od temperatury ciała. To ostatnie jest niezwykle ważnym przystosowaniem organizmu ryby, wiążącym się z tym, że są one zwierzętami zmiennocieplnymi, a temperatura środowiska stale ulega zmianom. Podobnie jak u ssaków i ptaków, również u ryb pewne elementy odporności wrodzonej odgrywają kluczową rolę w inicjowaniu odporności swoistej (4). Poznanie specyfiki mechanizmów odpornościowych występujących u ryb, między innymi roli makrofagów, jest niezbędne do ulepszenia i dalszego rozwijania metod zwalczania oraz diagnostyki chorób ryb, jak również głębszego zrozumienia patogenyzy ich chorób, w tym zatrucia.

Kontakt ryb hodowlanych z czynnikami patogennymi jest częsty w związku z dużym zagęszczeniem ryb w stawach i dużą ilością gospodarstw rybactwa korzystających z jednego dorzecza. Pomimo tego, jeżeli warunki środowiska nie ulegną drastycznemu pogorszeniu, ryba może utrzymać dobry stan zdrowia dzięki posiadaniu powiązanych ze sobą licznych mechanizmów odpornościowych, tworzących złożony system obrony.

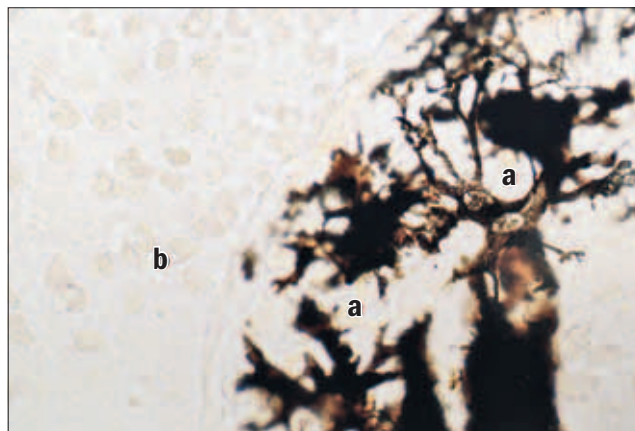
Jednym z bardzo istotnych elementów tego systemu są makrofagi. Makrofagi należą do pierwszej linii obrony organizmu przed patogennymi mikroorganizmami i substancjami toksycznymi, które zdołały przekroczyć bariery obronne (skórę, nabłonek skrzelowy i błonę śluzową przewodu pokarmowego) i dostały się do wnętrza organizmu. Oprócz tego makrofagi usuwają martwe i uszkodzone komórki po przebyciu zakażenia lub zatruciu (5). Makrofagi wchodzi w skład układu jednojądrowych makrofagów, do którego, między innymi, zaliczane są monocyty krwi. Makrofagi są elementem wrodzonego układu odpornościowego i u kręgowców odgrywają istotną rolę zarówno we wrodzonej, jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej (6). Makrofagi ryb pełnią podobne podstawowe funkcje, jak makrofagi ssaków, do których należą: fagocytoza, przygotowanie i prezentacja antygenów oraz wytwarzanie cytokin (białek sygnałowych regulujących współdziałanie komórek układu immunologicznego) i różnych substancji unieszkodliwiających mikroorganizmy chorobotwórcze. Komórki układu odpornościowego ryb kostnoszkieletowych wyposażone są w receptory Toll-podobne (TLR), cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klas I i II (MHC I i II) oraz receptory należące do grupy Ig (7).

### Powstawanie monocytów, makrofagów i centrów melano-makrofagowych

U ryb, podobnie jak u innych kręgowców, występują makrofagi krążące w krwi obwodowej, czyli monocyty i makrofagi osiadłe, czyli histiocyty, posiadające zdolność



Ryc. 1. Makrofagi w mózgu karpia (*Cyprinus carpio*) chorego na myksobolozę wywołaną przez *Myxobolus encephalicus*; preparat niebarwiony



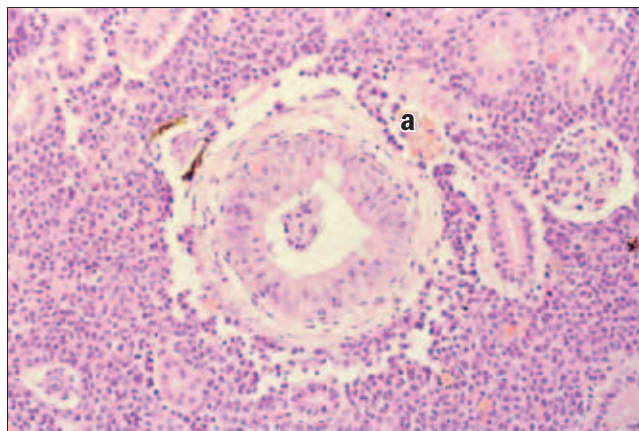
Ryc. 2. Melanofory – a i granulocyty – b karpia; preparat niebarwiony

do przemieszczania się do ogniska zapalnego. Mają one zdolność do chemotaksji i komunikowania się z innymi komórkami. U ssaków monocyty powstają w szpiku kostnym, skąd dostają się do układu krążenia i krążą w krwi przez około 24 godziny. Po upływie tego czasu opuszczają układ krążenia i osiedlają się w różnych tkankach. U zmiennocieplnych kręgowców, między innymi ryb, makrofagi, podobnie jak monocyty i granulocyty, powstają w nerkach głowowych w procesie różnicowania się komórek pnia (8). W miarę potrzeby krążące we krwi monocyty ryb przechodzą do tkanek, zmieniając się w osiadłe makrofagi. W przypadku zakażenia lub inwazji makrofagi ulegają podziałom, zwiększając swoją liczbę w tkance. Makrofagi ryb należących do różnych gatunków mogą się nieco różnić kształtem i wielkością; pewne różnice mogą również występować między makrofagami występującymi w różnych narządach ryby określonego gatunku. Przyczyną różnego wyglądu i różnej wielkości makrofagów może być ich aktualny stan fizjologiczny.

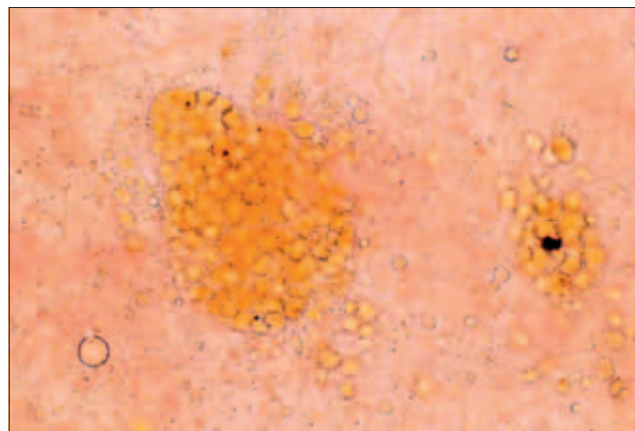
W cytoplazmie makrofagów mogą występować różne barwniki, takie jak melanina, lipofuscyna (ceroid) i hemosyderyna. W związku z tym makrofagi przybierają

brunatne zabarwienie i wówczas noszą nazwę melano-makrofagów (ryc. 1). Powszechnie uważa się, że źródłem melaniny są rozpadające się melanofory – komórki barwnikowe powszechnie występujące w różnych tkankach ryb (ryc. 2). Źródłem hemosyderyny są natomiast rozpadające się erytrocyty. Różnej wielkości skupiska makrofagów można łatwo zaobserwować nie tylko w preparatach histologicznych, lecz również w świeżych (nieutrwalonych i niebarwionych) preparatach sporządzonych ze śledziony, wątroby i nerek głowowych (ryc. 3, 4). Noszą one nazwę centrów melano-makrofagowych (melano-macrophage centers – MMC). U niektórych ryb w centrach melano-makrofagowych stwierdza się również limfocyty (9). Centra melano-makrofagowe występują zwykle w pobliżu rozwidłań dużych naczyń krwionośnych lub w elipsoidach śledziony. Skupiska makrofagów zawierających brunatny barwnik autor obserwował nie tylko w nerkach, ale również w mózgu (ryc. 5) i w skrzelach (ryc. 7). Centra melano-makrofagowe mogą składać się z różnej liczby komórek. Po pochłonięciu przez nie materiału, który ulega fagocytozie, zostają otoczone kilkoma warstwami komórek nabłonkowatych (epitelioidalnych;

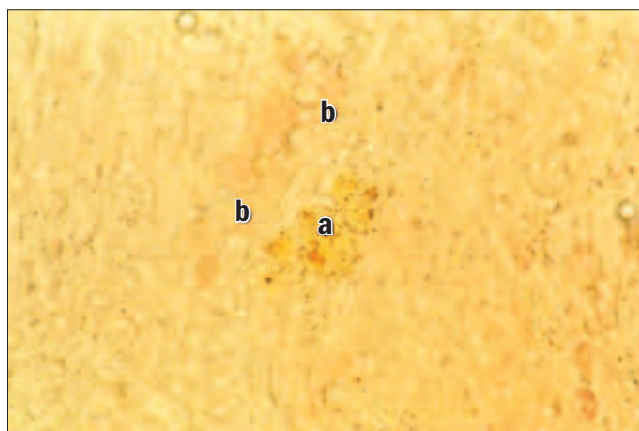
ryc. 8). Niekiedy wokół otorbionego skupiska gromadzą się nowe makrofagi, które z kolei zostają otoczone następną warstwą komórek epitelioidalnych. Zjawisko tego rodzaju autor niejednokrotnie obserwował w nerkach karpia (ryc. 9). Na zewnątrz otorbionego skupiska melanomakrofagów mogą pojawiać się melanofory (ryc. 8, 9). Centra melanomakrofagowe powstają u ryb pod wpływem różnych czynników fizjologicznych, takich jak: starzenie się ryby oraz zużywanie się poszczególnych jej komórek, okresowe głodowania, choroby zakaźne i inwazyjne oraz zatrucia (10, 11). Liczba centrów melano-makrofagowych rośnie wraz z wiekiem ryby, starzeniem się jej komórek i szybkością ich rozpadu. Zjawisko wzrostu liczby i wielkości tych centrów obserwuje się podczas głodowania ryb, szczególnie gdy dochodzi już do autolizy tkanek oraz w przebiegu chorób i zatruc, szczególnie tych, którym towarzyszy hemoliza. Na liczbę centrów ma wpływ temperatura wody. Według Fournie (12) wzrost liczby centrów melano-makrofagowych może wskazywać na degradację środowiska wodnego oraz pogorszenia się zdrowia ryb. Zdaniem Agius i Roberts (9) obecność tych centrów wiąże się przede wszystkim z toczącym się



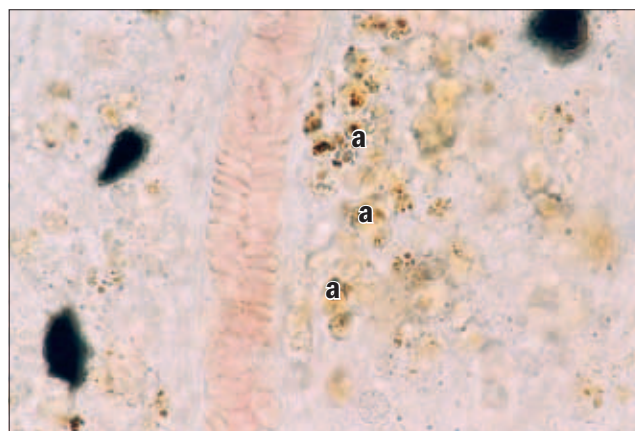
Ryc. 3. Małe skupisko makrofagów w nerce zdrowego karpia - a; barwienie hematoksylina-eoźna



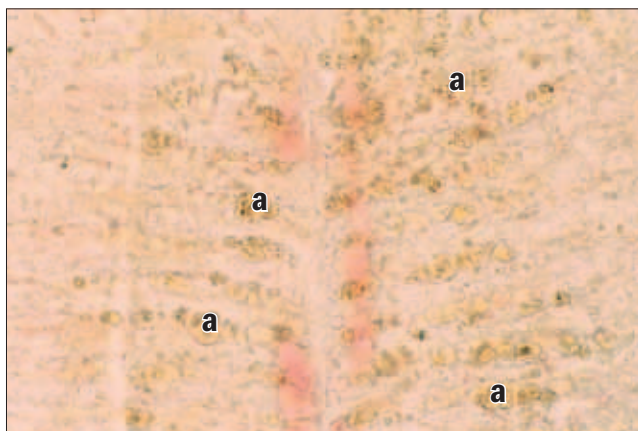
Ryc. 4. Duże skupiska melano-makrofagów w nerce karpia; preparat niebarwiony



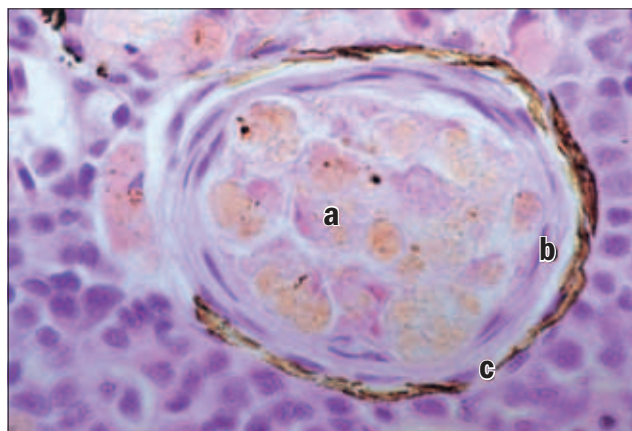
Ryc. 5. Melano-makrofagi gromadzące się w mózgu karpia - a, w pobliżu zgrupowania przedsporogennych stadiów *Myxobolus encephalicus* - b; preparat niebarwiony



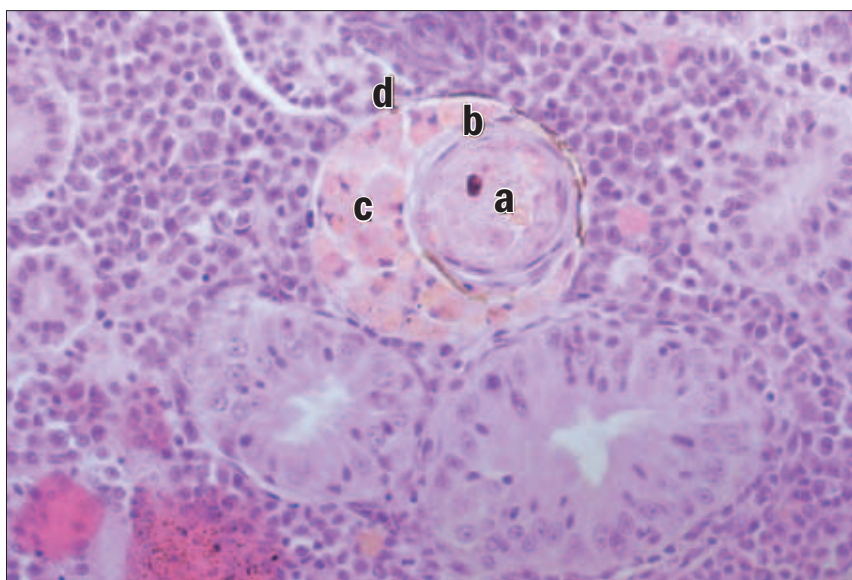
Ryc. 6. Melano-makrofagi - a, gromadzące się w pobliżu rozszerzonego chorobowo naczynia krwionośnego karpia; preparat niebarwiony



**Ryc. 7.** Melano-makrofagi (a) w blaszkach oddechowych, w skrzelach karpia pochodzącego z obiektu stawowego, w którym wystąpiły śnięcia z nieznannej przyczyny; preparat niebarwiony



**Ryc. 8.** Skupisko melano-makrofagów w nerce karpia – a, otoczone komórkami nabłonkowatymi – b oraz cienką warstwą melanoforów – c; barwienie hematoksylina-eozyna



**Ryc. 9.** Skupiska melano-makrofagów – a, w nerce karpia, otoczone warstwą komórek nabłonkowych – b, a następnie przez kolejne melano-makrofagi – c i formującą się drugą warstwą komórek nabłonkowych i melanoforów – d; barwienie hematoksylina-eozyna

lokalnie przewlekłym procesem zapalnym. Uważają oni, podobnie jak niektórzy inni badacze, że centra melano-makroflagowe pełnią funkcje zbliżone do tych, które pełnią węzły limfatyczne ssaków.

W śledzienie i w wątrobie tilapii (*Oreochromis niloticus*) obserwowano znaczną aktywację centrów melano-makroflagowych (wzrost liczby makroflagów) po zastosowaniu probiotyków, w skład których wchodziły bakterie *Bacillus subtilis* i drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Zjawisku temu towarzyszył wzrost odporności na różne patogenne mikroorganizmy (13). Innym dowodem kluczowego znaczenia makroflagów w odporności ryb, może być eksperyment przeprowadzony przez Saeij i wsp. (14). Po iniekcji karpia preparatu, działającego toksycznie na makroflagi, stwierdzono, że zmniejszenie liczby makroflagów spowodowało wystąpienie bakteriemii u ryb. Okazało się, że bakterie miały wywołać bakterie saprofityczne, które zwykle

występują u tych ryb, nie wykazując właściwości chorobotwórczych.

### Rola makroflagów w odpowiedzi immunologicznej

Makroflagi są wielofunkcyjnymi komórkami, których rola polega na: odnajdowaniu i identyfikowaniu obcych i rodzimych antygenów, likwidowaniu zbędnych dla organizmu starzejących się oraz uszkodzonych komórek i produktów ich rozpadu, a także oczyszczaniu tkanek i narządów po przebytym zakażeniu i po uszkodzeniach mechanicznych (15, 16). Makroflagi są u ryb najefektywniejszymi komórkami prezentującymi antygen. Po przetworzeniu antygenów bakteryjnych prezentują je w kontekście antygenów zgodności tkankowej limfocytom. Antygeny prezentowane na powierzchni makroflagów są niezbędne do aktywacji limfocytów T i zapoczątkowania odpowiedzi odpornościowej.

Na błonie komórkowej komórek dendrytycznych ssaków i makroflagów ryb występuje glikoproteinowy receptor CD83, związany z regulacją dojrzewania limfocytów T, ich aktywacją i supresją oraz regulujący działanie limfocytów B. Uważa się, że receptor ten występował u kręgowców, między innymi u ryb, stale w ciągu 450 mln lat ich ewolucji.

Następstwem prezentacji antygenu jest połączenie się makroflagi z limfocytom pomocniczym Th (helper), co stymuluje makroflagi do produkcji wielu substancji niezbędnych do funkcjonowania całego układu odpornościowego. Makroflagi wytwarzają interleukinę-1 (IL-1) oraz czynnik martwicy nowotworów – TNF (tumor necrosis factor). Substancje te biorą udział w procesie zapalnym przez stymulowanie limfocytów i neutrofilów oraz przyciąganie ich do ogniska zapalnego. Interleukina-1 stymuluje ponadto limfocyty T do produkcji interleukiny-2 (IL-2). Interleukina-2 stymuluje z kolei limfocyty pomocnicze Th i limfocyty K (mające zdolność niszczenia mikroorganizmów patogennych i zakażonych komórek gospodarza) do proliferacji. Pod wpływem IL-2 limfocyty T wytwarzają interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). Interferon z kolei stymuluje makroflagi, intensyfikując cały opisany wyżej cykl reakcji. Limfokiny IL-1, IL-2, TNF i IFN- $\gamma$  są substancjami, dzięki którym możliwe jest porozumiewanie się między sobą komórek układu odpornościowego.

Namnażające się limfocyty Th przyczyniają się do intensywnej proliferacji limfocytów B, a następnie, w wyniku rozpoznania antygeny (w którym biorą udział makroflagi, limfocyty T i limfocyty B), dochodzi do produkcji przeciwciał. Będąc elementem wrodzonej odporności, makroflagi są więc niezbędne do inicjowania nabytej odpowiedzi immunologicznej, a następnie do regulacji jej przebiegu.

## Reakcja makrofagów na molekularne wzorce związane z patogenami i ligandy drobnoustrojów

Specyficzne komponenty występujące w potencjalnie patogennych organizmach – molekularne wzorce związane z patogenami (pathogen associated molecular patterns – PAMP) są rozpoznawane przez receptory (pathogen recognition receptors – PRR), występujące między innymi na błonie komórkowej makrofagów i granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilii), jak również w ich wnętrzu. Te ostatnie są szczególnie istotne w zakażeniach wewnątrzkomórkowych. Reakcje PAMP-PRR pobudzają układ immunologiczny, przez co polepszają aktywność wrodzonych mechanizmów odpornościowych kręgowców, między innymi ryb. U ryb odkryto wiele typów receptorów PRR rozpoznających antygen, między innymi receptory Toll-podobne (Toll-like receptors – TLR; 17, 18, 19). Swoiste funkcje tych receptorów zależą od genów, przez które są one kodowane. Uważa się, że receptory TLR są głównymi receptorami makrofagów, oraz że są one odmienne u ryb i u ssaków (20, 21). U ssaków, w zależności od gatunku zwierzęcia, występuje od 10 do 15 wyspecjalizowanych receptorów TLR, z których każdy reaguje na inny ligand patogenne mikroorganizmu, a następnie sygnalizuje jego obecność. Poszczególne ligandy mają zdolność wiązania się z określonym miejscem receptora.

Ligandy występujące na błonie komórkowej mikroorganizmów aktywują powstawanie (ekspresję) określonych typów receptorów TLR. Określone właściwości molekularne mikroorganizmów reprezentowane przez ich ligandy determinują więc typ odpowiedzi immunologicznej (4, 8). Receptory TLR rozpoznają nie tylko PAMP, ale również cząstki powstałe z rozpadu komórek gospodarza, a następnie sygnalizują, wystąpienie zakażenia. Sygnały tego typu mogą doprowadzić do pojawienia się stanu zapalnego.

## Fagocytoza

Makrofagi i neutrofile są najważniejszymi komórkami fagocytującymi u ryb. Posiadają one szereg powierzchniowych receptorów, które, po wykryciu zmienionych patologicznie komponentów komórek gospodarza (np. wskutek wewnątrzkomórkowego zakażenia) albo mikroorganizmów chorobotwórczych, zapoczątkowują szereg zmian w błonie komórkowej, umożliwiając pochłonięcie mikroorganizmów. Fagocytoza jest szczególnie efektywna, jeżeli czynniki zakaźne ulegną opłaszczaniu przez przeciwciała, czyli opsonizacji. W cytoplazmie makrofaga, podobnie jak

w cytoplazmie niektórych innych komórek, występują lizosomy pierwotne, zawierające enzymy trawienne (u ssaków stwierdzono około 40 różnych substancji tego typu). Wchłaniane przez fagocyty chorobotwórcze mikroorganizmy lub szczątki komórek zostają otoczone fragmentem błony komórkowej, która tworzy pęcherzyk zagłębiający się w cytoplazmie nazywany fagosomem. W wyniku jego fuzji z lizosomami, powstaje fagolizosom, wewnątrz którego pochłonięte cząstki ulegają rozkładowi na proste związki chemiczne (22).

Uśmiercanie patogenu wewnątrz makrofagów, ale również mikroorganizmów chorobotwórczych znajdujących się na zewnątrz makrofagów polega na wydzielaniu przez fagocytującą komórkę (pod wpływem stymulacji przez czynnik patogeny) reaktywnego tlenu i tlenku azotu (NO). Indeks fagocytarny (liczba bakterii przypadająca na jedną komórkę fagocytującą) oraz procent komórek fagocytujących badane *in vitro* są wskaźnikiem aktualnego poziomu aktywności makrofagów. Stosuje się je również do kontroli działania substancji immunostymulujących. Maqsood i wsp. (23) udowodnili w ten sposób, że przez stosowanie chitozanu u karpia można zwiększyć odporność tych ryb na zakażenie *Aeromonas hydrophila*. Bardziej precyzyjną metodą badania zmian zachodzących w układzie odpornościowym, między innymi pod wpływem immunostymulantów, jest badanie poziomu ekspresji genów kodujących różne elementy odporności naturalnej, np. efektywność makrofagów (24).

W niektórych przypadkach mikroorganizmy chorobotwórcze unikają destrukcji w makrofagach. Bakterie przeżywające w makrofagach mogą po pewnym czasie, np. wskutek ekspozycji ryby na czynniki stresowe, namnażać się, wywołując przewlekłe zakażenie.

## Reakcja makrofagów ryb na zakażenia wirusowe

W zakresie skuteczności likwidacji patogennych wirusów ryb przez makrofagi badacze wyrażają sprzeczne opinie. Wielu z nich uważa, że wytwarzany w makrofagach reaktywny tlenek azotu odgrywa istotną rolę w zwalczaniu patogennych wirusów ryb (25, 26, 27, 28). Według Tafalla i wsp. (29) jego wytwarzanie jest uzależnione od uprzedniej aktywacji makrofagów przez różne czynniki, między innymi przez interferon IFN $\alpha$  lub lipopolisacharyd bakteryjny (LPS). Niekiedy zakażenie wirusowe u ryby wywołane, np. przez wirus wirusowej posocznicy krwotocznej (VHS), jest czynnikiem pobudzającym do produkcji przez makrofagi wymienionego interferonu (30).

Tlenek azotu (NO) działa bójczo na wiele wirusów ryb, między innymi na wirus VHS (28). Według de Mayer i wsp. (30) wirusobójcze zdolności makrofagów uwarunkowane wytwarzaniem NO są skuteczne tylko wówczas, gdy miano wirusa w organizmie ryby jest niewielkie. W wielu przypadkach makrofagi nie są w stanie zniszczyć wirusa VHS, ponieważ ma on zdolność do replikacji w ich cytoplazmie (31, 32). Jest to niewątpliwie jedna z przyczyn wysokiej śmiertelności, szczególnie młodych pstrągów tęczowych. Brudeseth (33) uważa, że makrofagi przyczyniają się w istotny sposób do rozprzestrzeniania się wirusa VHS w organizmie ryby. Morska postać wirusa VHS nie ma zdolności do zakażenia makrofagów śródłodowych ryb łososiowatych i stąd przypuszczalnie ryby te są mało wrażliwe na zakażenie tym wirusem.

U ryb łososiowatych w nerkach często stwierdza się nosicielstwo (o niskim mianie) wirusa zakaźnej martwicy trzustki (IPN). Zdaniem Ellis (3) jest to dowód na to, że wirus ten wykazuje oporność na działanie enzymów wytwarzanych w makrofagach. Według Ruane i wsp. (34) wirus IPN może wywierać supresyjny wpływ na makrofagi ryb. Uważa się również, że wirus ten, podobnie jak wirus VHS, może namnażać się wewnątrz makrofagów (35).

## Reakcja makrofagów ryb na zakażenia bakteryjne

Reakcję makrofagów ryb na zakażenie bakteryjne przedstawia eksperyment Brattjerd i Evensen (36). Po iniekcji zawiesiny *Vibrio salmonicida* u łososi atlantyckich badacze obserwowali wzrost liczby fagocytów oraz melano-makrofagów w śledzionie. Już po 24 godzinach antygen bakteryjny stwierdzono we wtórnych lizosomach makrofagów i melano-makrofagów (36). Badania te potwierdzają fakt, że pierwszą linią obrony w przypadku dostania się patogennych bakterii do krwiobiegu ryby są makrofagi i melano-makrofagi występujące w sinusoidach śledziony. Biorą one udział w natychmiastowym oczyszczaniu organizmu z bakterii. Uważa się również, że makrofagi po pochłonięciu bakterii lub szczątków komórek wędrują z sinusoidalnych naczyń krwionośnych śledziony do nerek głowowych. Safinaz i wsp. (37) wykazali, że po eksperymentalnym zakażeniu węgorzy przy użyciu zawiesiny *Vibrio ordalii* aktywacji ulegają przede wszystkim centra melano-makrofagowe w nerkach.

O szybkości działania makrofagów ryb w zakresie likwidacji niektórych bakterii mogą świadczyć doświadczenia *in vitro* przeprowadzone przez Espelid i Jorgensen (38). Po zakażeniu hodowli makrofagów bakteriami *Vibrio salmonicida*

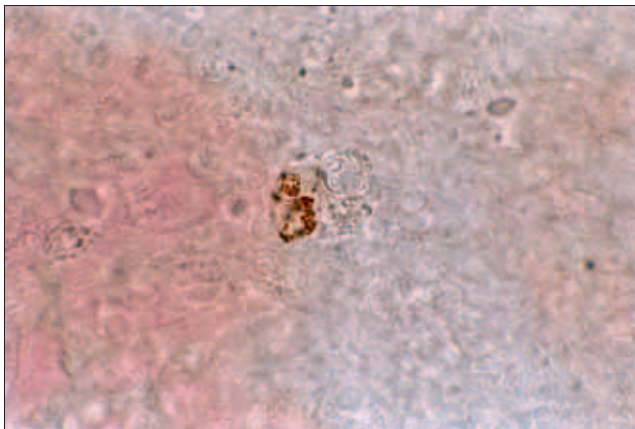
bakterie te szybko zostały przez nie pochłonięte, a następnie uległy degradacji; po 72 godzinach nie udało się stwierdzić obecności kompletnych komórek bakteryjnych wewnątrz makrofagów.

### Reakcja makrofagów ryb na inwazje pasożytów

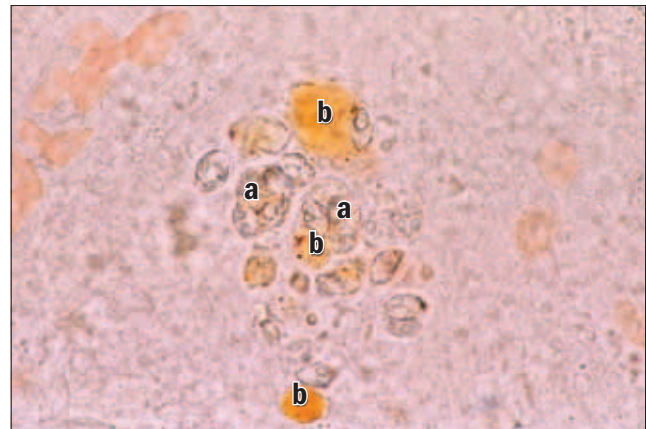
Głównym czynnikiem obronnym przeciwko mikroskopowym pasożytom jest u ryb miejscowy stan zapalny. W przypadku obecności niewielkich jednokomórkowych pasożytów, np. niektórych wiciowców, mikrosporidiów i pasożytów z gromady Myxosporea, procesom zapalnym towarzyszy często fagocytoza (39). W przypadku pasożytów z gromady Myxosporea, np. rodzaju *Myxobolus*, stan zapalny zostaje uruchomiony wówczas, kiedy plazmodia zaczynają przekształcać się w spory (formy inwazyjne pasożyta) lub gdy dojrzałe spory po pęknięciu otaczającej je błony uwalniane są do tkanek ryby (ryc. 10, 11). Zostają one wówczas zwykle pochłonięte przez makrofagi i zgromadzone w centrach melano-makrofagowych (40; ryc. 12). Według Holzer i wsp. (41) i Rodondo i wsp. (42) makrofagi biorące udział w procesie zapalnym pochłaniają głównie spory,

niekiedy również małe plazmodia i transportują je do śledziony, nerek i wątroby, gdzie tworzą centra melano-makrofagowe. W centrach tych makrofagi zawierające pochłonięty materiał zostają otoczone komórkami nabłonkowatymi, które tworzą wokół nich wielowarstwową, ściśle przylegającą otoczkę. Pasożyty zostają po pewnym czasie strawione w wnętrzu makrofagów. Niekiedy wokół ogniska melano-makrofagów i komórek epiteloidalnych gromadzą się melanofory – jest to tak zwana melanizacja guzka pasożytniczego. Autor (nieopublikowane dane z obserwacji 1998–2004) wielokrotnie obserwował zgrupowania melano-makrofagów w nerkach i pęcherzu pławnym karpia chorych na sferosporozę, wywołowaną przez pasożyta *Sphaerospora renicola*. Skupiska melano-makrofagów występowały zwykle w pobliżu kanalików nerkowych, w których rozwijały się plazmodia pasożyta lub gdy w świetle kanalików gromadziły się jego stadia przedsporogenne i spory (ryc. 13). W przebiegu sferosporozy (ryc. 14) w pęcherzu pławnym, w którym wystąpił stan zapalny, stwierdzano zwykle intensywny naciek makrofagów pochłaniających stadia rozwojowe *Sphaerospora renicola* (ryc. 12).

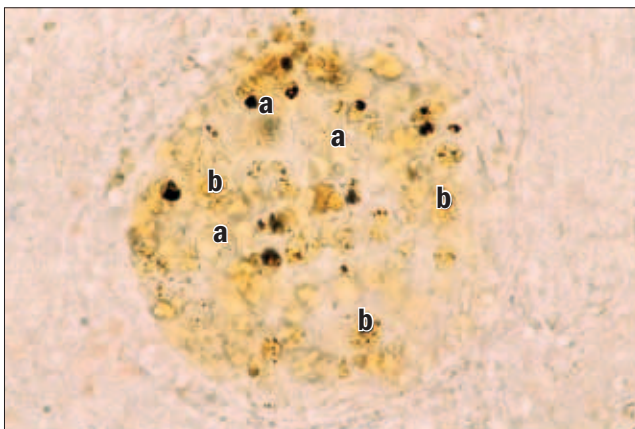
W mózgu zdrowych karpia nie udaje się stwierdzić obecności makrofagów. Nawet w przypadku inwazji pasożyta *Myxobolus encephalicus* w mózgu tej ryby często nie obserwuje się reakcji makrofagów (ryc. 15; nieopublikowane dane z obserwacji autora w latach 2000–2006). Jedynie w niektórych przypadkach i to w okresie dojrzewania spor pasożyta, a szczególnie podczas ich wydostawania się z naczyń krwionośnych, obserwowano lokalne gromadzenie się makrofagów podobne do tych, które występują w nerkach i śledzionie w przebiegu innych chorób. W mózgu w pobliżu naczyń krwionośnych następowało wówczas stopniowe trawienie spor. Przyczyną braku reakcji immunologicznej w przebiegu niektórych przypadków myksobolozji mózgu u karpia, może być upodobnienie się antygenów pasożyta do antygenów ryby. Skutkiem tego antygeny występujące w otocze spory pasożyta, rozpoznawane są przez makrofagi jako własne i nie dochodzi do gromadzenia się makrofagów w miejscu inwazji. Pasożyt ten był już znany na początku dwudziestego wieku (pod nazwą *Lentospora cerebralis*). Jego ciągła obecność w hodowlach karpia jest dowodem zdolności *Myxobolus encephalicus* do



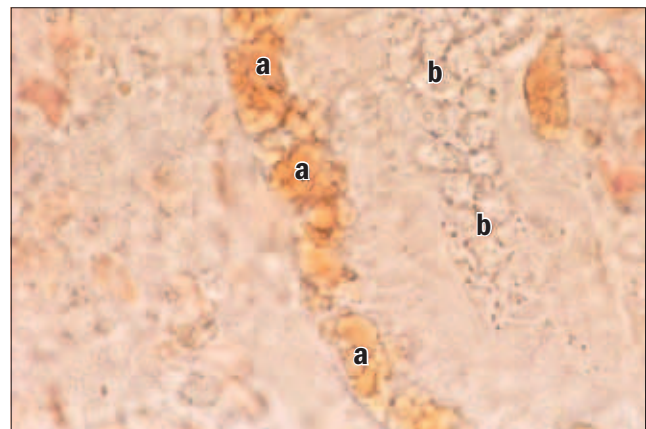
Ryc. 10. Spora *Myxobolus encephalicus* w mózgu karpia pochłaniana przez melano-makrofaga; preparat niebarwiony



Ryc. 11. Grupa spor *Myxobolus encephalicus* – a w mózgu karpia, otoczana przez makrofagi – b; preparat niebarwiony



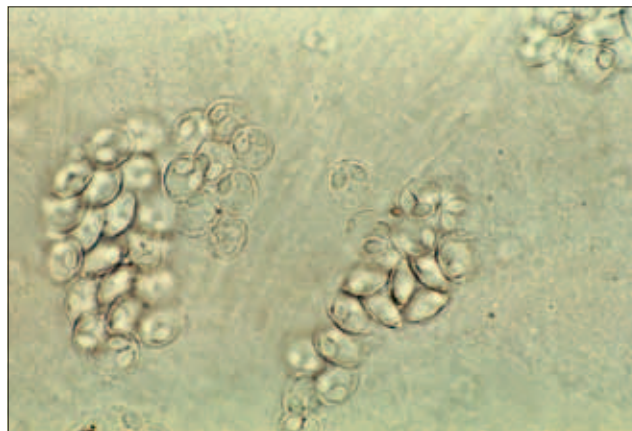
Ryc. 12. Różne stadia rozwojowe *Sphaerospora renicola* – a, w pęcherzu pławnym karpia, pochłaniana przez melano-makrofagi – b; preparat niebarwiony



Ryc. 13. Melano-makrofagi – a w ścianie kanaliką nerkowego zawierającego stadia przedsporogenne i spory *Sphaerospora renicola* – b; preparat niebarwiony



Ryc. 14. Zapalenie pęcherza pławnego karpia wywołane przez *Sphaerospora renicola*



Ryc. 15. Dojrzałe spory *Myxobolus encephalicus* w mózgu karpia; brak odczynu zapalnego i melano-makrofagów; preparat niebarwiony

unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza (43, 44).

Reakcję makrofagów ryb na inwazję mikroskopowych pasożytów dobrze ilustruje eksperyment Vogelbein i wsp. (45). Po 5–8 dniach po zakażeniu ryb kokcydiami *Rivulus marmoratus* stwierdzili oni pojawienie się ognisk zapalnych w wątrobie, objawiający się niewielkimi naciekami eozynofili i heterofili. Po 15–18 dniach w ogniskach zapalnych dominowały jednójadrowe makrofagi, a po 20–25 dniach wewnątrz makrofagów stwierdzono oocysty kokcydii. W następnych dniach, wraz z rozpadem wewnątrz makrofagów form rozwojowych pasożyta oraz pochłanianiem przez makrofagi komórek wątroby, obserwowano pojawienie się brunatnego barwnika oraz powstawanie centrów melano-makrofagowych.

Od dawna w ichtiopatologii znana jest reakcja melano-makrofagów nerkowych na trafiające przypadkowo do nerek jaja pryzmyry digenicicznej *Sanguicola inermis*. Nerki są dla tego pasożyta „ślepy m zaułkiem”, gdzie jego jaja zostają z reguły zniszczone przez makrofagi. Niekiedy ognisko melano-makrofagów zostaje otoczone grubą warstwą komórek nabłonkowych i melanoforów.

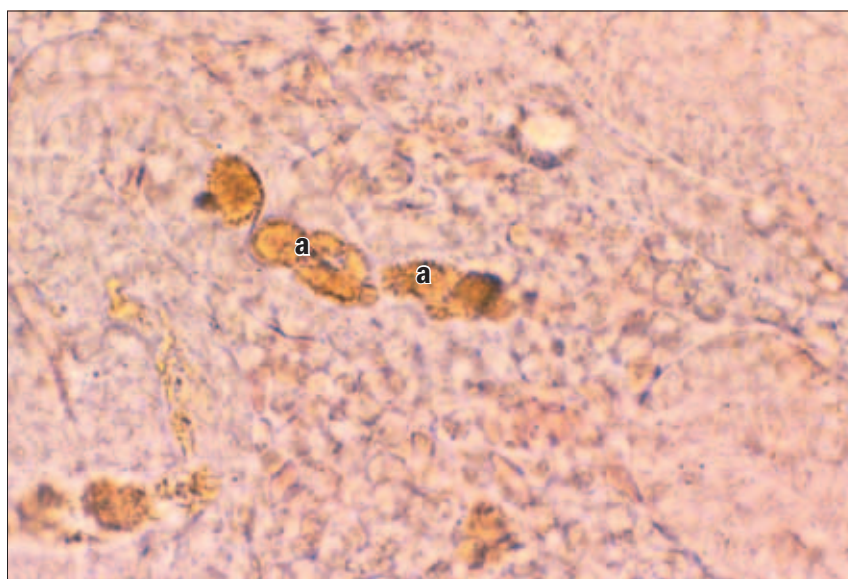
### Reakcja makrofagów na substancje toksyczne i stres związany z zatruciem oraz niedoborem tlenu

Liczba makrofagów u ryb wzrasta w przebiegu zatruc, szczególnie jeżeli pod wpływem substancji toksycznych wystąpi hemoliza. Liczba centrów melano-makrofagowych oraz ich wielkość (związana z liczbą makrofagów w poszczególnych centrach) rośnie u ryb poddawanych działaniu ciągłym stresom środowiskowym powodowanym przez deficyty tlenu lub obecność substancji toksycznych w osadach dennych. Według Fournie (12) obecność ponad 40 centrów melano-makrofagowych przypadających na 1 mm<sup>2</sup> preparatu

histologicznego sporządzonego ze śledziony świadczy o silnym zanieczyszczeniu środowiska wodnego, z towarzyszącym temu deficytem tlenu w wodzie. Praso i wsp. (46) stwierdzili, że karpie hodowane systemem intensywnym w sadzach już po 30 dniach mają znacznie większą liczbę centrów melano-makrofagowych i o większych rozmiarach, niż karpie żyjące w środowisku naturalnym. Przyczyny tego zjawiska można dopatrywać w niskim stanie czystości i niedostatecznym natlenieniu wody przepływającej przez sadze z powodu słabej jej wymiany i występującym w związku z tym stresem u ryb.

Centra melano-makrofagowe reagują na różne substancje toksyczne, szczególnie takie, jak: kadm, cynk, aluminium, rtęć, arsen i inne metale lub ich związki (5, 47, 48, 49, 50). Według Leknes (16) w niektórych melano-makrofagach ryb, oprócz melaniny, lipofuscyny i hemosyderyny, mogą występować cząstki metali i związane z nimi cząstki mineralne, świadczące o przebytych zatruciu (ryc. 16). Według

Agius i Roberts (9) bezpośrednim powodem wzrostu liczby i wielkości centrów melano-makrofagowych jest tak zwany stres środowiskowy. Authman i wsp. (51) uważają natomiast, że wzrost liczby melano-makrofagów i centrów melano-makrofagowych jest spowodowany pojawieniem się, szczególnie w wątrobie, dużej ilości ubocznych produktów związanych z rozpadem tkanek. Według Authman (52) po ekspozycji tilapii nilowej na glin podwyższona liczba centrów melano-makrofagowych zgrupowanych wokół żył głównych wątroby wystąpiła po 24 godzinach i utrzymywała się przez ponad 7 dni. Wielu badaczy, między innymi Agius i Roberts (9), Steinford i wsp. (53) oraz Rabitto i wsp. (54), wyraziło pogląd, że występowanie centrów melano-makrofagowych w śledzionie, nerkach i wątrobie, a szczególnie wzrost ich liczby i wielkości, może być biomarkerem zatrucia środowiska wodnego. Do zastosowania praktycznego niezbędne są jednak normy dla poszczególnych gatunków ryb, kategorii wiekowych oraz dane dotyczące



Ryc. 16. Melano-makrofagi - a, w nerkach karpia, pochłaniające różnokształtne cząstki mineralne; preparat niebarwiony

szybkości reakcji makrofagów w różnych temperaturach wody. Najnowsze badania przeprowadzone przez El-Kasheif (55) potwierdziły, że liczba i wielkość centrów melano-makrofagowych rośnie podczas zatrucia ryb. Autor ten uważa, że zachodzi realna obawa, że wskutek ciągłego powtarzających się przypadków zatruc, aktywność makrofagów może ulegać wyczerpaniu, powodując upośledzenie odporności ryb na zakaźne czynniki patogenne. Szczególnie wrażliwy na substancje toksyczne jest tak zwany wybuch tlenowy związany z aktywnością oksydazy NADPH w komórkach fagocytujących, który jest mechanizmem wewnątrzkomórkowym służącym makrofagom do niszczenia pochłoniętych przez nie patogennych mikroorganizmów. W wyniku zatrucia ryby może on ulec upośledzeniu, obniżając skuteczność zwalczania zakażenia lub inwazji.

### Wpływ genów na efektywność działania makrofagów ryb

Podobnie jak u ssaków, również u ryb pod wpływem stymulującego działania molekularnych wzorców związanych z patogenami (PAMP) dochodzi do ekspresji genów kodujących receptory TLR na komórkach fagocytujących (18, 19). Na przykład w przypadku inwazji pasożytów, u których występują receptory PAMP, do najbardziej intensywnej ekspresji genów, w komórkach gospodarza dochodzi w rejonach występowania pasożytów (39). Geny odgrywają bardzo istotną rolę szczególnie w odporności nieswoistej ryb. Umożliwiają one genetycznie zaprogramowanym komórkom, np. makrofagom, rozróżnianie własnych i obcych antygenów, a następnie zwalczanie mikroorganizmów chorobotwórczych i eliminowanie toksycznych substancji. Genotyp określonego osobnika nie ulega zmianom, natomiast ekspresja poszczególnych genów w różnych komórkach, np. w makrofagach, może być różna. Zależy ona od przebiegu transkrypcji (syntezy RNA na matrycy DNA) oraz translacji (przekształcenia informacji genetycznej zawartej w RNA w specyficzną sekwencję aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym wchodzącym w skład białka występującego w komórce). Właściwości makrofagów oraz ich reakcja na czynniki zewnętrzne, u poszczególnych osobników może być więc różna i zależy od ekspresji określonych genów.

Różnice indywidualne, uwarunkowane między innymi czynnikami genetycznymi, jak również sposobem odżywiania, wiekiem i różnicami w budowie anatomicznej powodują, że mimo jednakowej ekspozycji na czynniki chorobotwórcze niektóre osobniki danej populacji wykazują większą wrażliwość na choroby i zatrucia

niż inne. W warunkach intensywnej hodowli ryby ciągle poddawane są różnego rodzaju stresom, które, osłabiając aktywność różnych elementów odporności, między innymi makrofagów, usposabiają do występowania różnych chorób stanowiących niejednokrotnie poważny problem ekonomiczny.

### Piśmiennictwo

- Zapata A.: Lymphoid organs of teleost fish. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.* 1981, **5**, 1685-1690.
- Zapata A., Diez B., Cejalvo T., Gutierrez F.C., Cortes A.: Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2006, **20**, 126-136.
- Ellis A.E.: Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 2001, **25**, 827-839.
- Uribe C., Floch H., Enriquez R., Moran G.: Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina* 2011, **56**, 486-503.
- Reddy S.J.: Cadmium effect on histo-biomarkers and melano-macrophage centers in liver and kidney of *Cyprinus carpio*. *World J. Fish Marine Sci.* 2012, **4**, 179-184.
- Salomon E.P., Berg L.R., Martin D.W.: *Biology*. Thompson Learning. Brooks/Cole. 2005.
- Plouffe D.A., Hannington P.C., Walsh J.G., Wilson E.C., Belosevic M.: Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation* 2005, **12**, 266-277.
- Joerink M.: *Macrophage polarization: immune responses of carp against parasites*. PhD Thesis Wageningen University. 2006.
- Agius C., Roberts R.J.: Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. *J. Fish. Dis.* 2003, **26**, 499-509.
- Domingos F.X.V., Assis H.C.S., Silva M.D., Damian R.C., Almeida A.L.M., Cestari M.M., Randi M.A.F., Ribeiro C.A.O.: An trophic impact evaluation of two Brazilian estuaries through biomarkers in fish. *J. Braz. Soc. Exotoxicol.* 2009, **4**, 21-30.
- Balamurugan S., Deivasigamani B., Kumaran S., Sakthivel M., Rajsekhar T., Priyadharsini P.: Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bioindicator of environmental change. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2012, **5**, 635-638.
- Fournie J.W., Summers J.K., Courtney L.A., Engle V.D.: Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *J. Aquatic Anim Health* 2001, **13**, 105-116.
- Marzouk M.S., Moustafa M.M., Mohamed M.M.: Evaluation of immunomodulatory effects of some probiotics on cultured *Oreochromis niloticus*. *8-th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Cairo, University Giza, Egypt. 2008.
- Saeji J.P.J., Gronewald A.A., van Rooijen N.N., Haenen O.L.M., Wiegertjes G.: Minor effect of depletion of resident macrophages from peritoneal cavity on resistance of common carp *Cyprinus carpio* to blood flagellates. *Dis. Aquat. Organ.* 2003, **57**, 67-75.
- Fishelson L.: Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney and liver in cardinal fish (*Aponogonidae*, Teleostei) as bioindicators of stress. *J. Morphol.* 2006, **267**, 57-69.
- Leknes I.L.: Melanomacrophage centers and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gourami and platyfish (*Anabantidae*, *Poeciliidae*, *Teleostei*). *Acta. Histochemica* 2007, **109**, 164-168.
- Bricknell I., Dalmo R.A.: The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 2005, **19**, 457-472.
- Takano T., Kondo H., Hirono I., Endo M., Saito-Taki T., Aoki T.: Molecular cloning and characterisation in Toll-like receptor 9 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Molecular Immunol.* 2007, **44**, 1845-1853.
- Takano T., Kondo K., Hirono I., Endo M., Saetotaki T., Aoki T.: Toll-like receptors in teleosts. W: Bonad-Reantso m. G. Jones J. B., Corsin F., Aoki E. (edit): *Disease in Asian Aquaculture*. Selangor, Malaysia 2010.
- Balosevic M., Hannington P.C., Barreda D.R.: Development of goldfish macrophages in vitro. *Fish. Shellfish Immunol.* 2006, **20**, 152-171.
- Uribe E., Steele T.J., Richards R.C., Ewart K.V.: Ligand and pathogen specificity of the Atlantic salmon serum C-type lectin. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013, **1**, 2129-21-38.

- Bogdan C., Rollinghoff M., Diefenbach A.: Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2000, **12**, 64-76.
- Maqsood S., Singh P., Samoon M.H., Balange A.K.: Effect of dietary chitosan on non-specific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Int. Aquat. Res.* 2010, **2**, 77-85.
- Jimero C.D.: *A transcriptomic approach toward understanding PAMP-driven macrophage activation and dietary immunostimulation in fish*. Thesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 2008.
- Croen K.D.: Evidence for antiviral effect of nitric oxide: inhibition of Hermes Simple virus type 1 replication. *J. Clin. Invest.* 1993, **91**, 2446-2452.
- Pertile T.L., Karaca K., Sharma J.M., Walser M.M.: An antiviral effect of nitric oxide: inhibition of retrovirus replication. *Avian Dis.* 1996, **46**, 342-348.
- Lin Y.L., Huang Y.L., Ma S.H., Yeh C.T., Chiou S.Y., Chen L.K., Liao C.L.: Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J. Virol.* 1997, **71**, 5227-5235.
- Tafalla C., Figueras A., Nova B.: Role of nitric oxide on the replication of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999, **72**, 249-256.
- Tafalla C., Nova B.: Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 2000, **24**, 623-631.
- De Mayer E., de Mayer-Guignard J. W: Thompson A. (edit): *The Cytokine Handbook*. Academic Press London. 1991, s. 215-239.
- Estepa A., Frias D., Coll J.M.: Susceptibility of trout kidney macrophages to viral haemorrhagic septicemia virus. *Viral Immunol.* 1992, **4**, 283-292.
- Tafalla C., Figueras A., Nova B.: In vitro interaction of viral haemorrhagic septicemia virus and leucocytes from trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998, **62**, 359-366.
- Brudeseth B.E.: *Novirhabdovirus infections of fish – with emphasis on VHS pathogenesis*. Norwegian School of Veterinary Science. 2009.
- Ruane N., Geoghegan E., Cinneid M.: Infectious pancreatic necrosis virus and its impact on the Irish salmon aquaculture and wild fish sector. *Marine Environment @ Health Series*. 2007, 30.
- Johansen L.H., Sommer A.I.: Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in head kidney and blood leucocytes isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish. Dis.* 1995, **18**, 147-156.
- Brattgjerd S., Evensen O.: A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vet. Pathol.* 1996, **33**, 55-65.
- Safinaz G.M.I., Saleh W.D., Zaki M.: Studies on *Vibrio* infection in cultured freshwater fish. *Life Sci. J.* 2011, **8**, 155-162.
- Espelid S., Jorgensen T.: Antigen processing of *Vibrio salmonicida* by fish (*Salmo salar* L.) macrophages in vitro. *Fish. Shellfish Immunol.* 1992, **2**, 131-141.
- Alvarez-Pelitero P.: Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008, **126**, 171-198.
- Ogawa K., Delgahapitya K.P., Fuyta T., Wakabayashi H.: Histological study on the host response to *Myxobolus Artus* Akhmerov, 1960 (*Myxozoa*, *Myxobolidae*) infection in the skeletal muscles of carp, (*Cyprinus carpio* L.). *J. Fish. Biol.* 1992, **41**, 363-371.
- Holzer A.S., Schachner O.: Myxosporidian and macrophage centers in chub (*Leuciscus cephalus*) quantitative interactions focus on *Myxobolus cyprinid*. *Parasitology* 2001, **122**, 55-62.
- Rondo M.J., Palenzuela D., Alvarez-Pelitero P.: Studies on transmission and life cycle of *Enteromyxum scopthalmi* (*Myxozoa*) an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *Folia. Parasitol.* 2004, **51**, 188-198.
- Antychowicz J., Reichert M.: Occurrence of *Myxobolus encephalicus* (Muslow 1911) in Poland; possible relationship between the parasite infection and clinical symptoms in common carp (*Cyprinus carpio*). *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2005, **49**, 35-39.
- Antychowicz J.: Choroby karpi (*Cyprinus carpio*) występujące w Polsce, wywołane przez pasożyty należące do *Myxospora* (Buettschli 1881). *Med. Weter.* 2003, **59**, 894-898.
- Vogelbein W.K., Fournie J.W., Overstreet R.M.: Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano-macrophage centers in *Rivulus marmoratus*. *J. Fish Biol.* 1987, **31**, 145-153.

46. Praso M.G.V., Librojo-Basilio N.T., Vega R.S.A., Rebanco C.A., Ocampo P.P., Capitan S.S.: Melanomacrophage centers and hepatosomatic index in the common carp (*Cyprinus carpio Linnaeus, 1758*) (*Actinopterygii: Cyprinidae*) introduced to the east and west sites of Laguna de Bay, Philippines. *Philipp. J. Vet. Med.* 2011, **48**, 95-100.
47. Chun-Yang L., Jian-Jie F., Jian-Bo S., Qung-Fang Z., Chung-Gang Y., Gui-Bin J.: Methylmercury accumulation, histopathological effects, and cholinesterase activity alteration in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006, **22**, 225-233.
48. Roy S., Bachattacharya S.: Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of *Channa punctatus*). *Ecotox. Environ. Saf.* 2006, **65**, 218-229.
49. Van Dyk J.C., Pieterse G.M., van Vuren J.H.J.: Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (*Cichlidae*) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotox. Environ. Saf.* 2007, **66**, 432-440.
50. Reddy S.J., Reddy T.K., Reddy D.C.: Influence of heavy metals on biochemical and metabolic biomarkers of Indian major carp *Labeo rohita*. *The Bioscan.* 2011, **6**, 167-173.
51. Authman M.M.N., Bayoumy E.M., Kenawy A.M.: Heavy metal concentrations and liver histopathology of *Oreochromis niloticus* in relation to aquatic pollution. *Global Veterinaria* 2008, **2**, 110-116.
52. Authman M.M.N.: Environmental and experimental studies of aluminium toxicity on the liver of *Oreochromis niloticus* (*Linnaeus, 1758*) fish. *Life Sci. J.* 2011, **8**, 764-773.
53. Steinfeld G.D., Longshaow M., Lyons B.P., Jones G., Green M., Feist S.W.: Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assesment of biological effects of contaminants. *Mar. Environ. Res.* 2003, **55**, 137-159.
54. Rabbito I.S., Costa A.J.R., Assis S.H.C., Pelletier E., Akaishi F.M., Anjos A., Randi M.A.F., Ribeiro O.C.A.: Effects of dietary Pb(II) and tributylion on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Exotoxicol. Environ. Saf.* 2005, **60**, 147-156.
55. El-Kasheif M.A., Gaber H.F., Authman M.M.N., Ibrahim S.A.: Histopathological and physiological observations of the kidney and spleen of the Nile catfish *Clarias gariepinus* inhabiting El-Rahawy drain, Egipt. *J. Appl. Sci. Res.* 2013, **9**, 872-884.
56. Ptak W.: *Podstawy immunologii*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa. 1987.

---

Prof. dr hab. Jerzy Antychowicz,  
e-mail: jerzy.antychowicz@gmail.com