

Układ immunologiczny płazów.
Charakterystyka reakcji zapalnej i odpowiedzi
immunologicznej.
Charakterystyka mikrobiomów.
Metody immunostymulacji u płazów.

Lek.wet. Michał Kwiatkowski
Specjalista Chorób Zwierząt Nieudomowionych
Specjalista Chirurgii Weterynaryjnej

Układ odpornościowy płazów (Amphibia) ma **wszystkie podstawowe komponenty** znane u innych kręgowców jawnożuchwych, ale **wykazuje specyficzne cechy adaptacyjne** wynikające z ich **dwuśrodowiskowego trybu życia, zmienności i unikatowej budowy skóry**.

U płazów rozróżniamy **układ wrodzony (innate)** i **nabyty/swoisty (adaptive)**; oba systemy współdziałają, a ich aktywność jest silnie zależna od stanu rozwojowego (kijanka vs. osobnik dorosły) oraz od warunków środowiskowych (temperatura, wilgotność, ekspozycja chemiczna).

Narządy i struktury limfoidalne

Główne narządy centralne i obwodowe

Grasica (thymus) — miejsce dojrzewania limfocytów T; u płazów występuje u niemowląt i dorosłych, ulega przebudowie podczas metamorfozy.

Śledziona (spleen) — filar odpowiedzi humoralnej i fagocytarnej, magazyn krwinek i centrów immunologicznych.

Miejscowe (mucosa-associated lymphoid tissue) — skóra i błony śluzowe dróg oddechowych oraz przewodu pokarmowego zawierają **komórki prezentujące antygen** (APC), limfocyty, plazmocyty i komórki efektorowe (np. granulocyty).

Węzły limfatyczne są u płazów mniej wyraźne niż u ssaków — istotną rolę pełnią skupienia komórek limfoidalnych w śledzionie i w błonach śluzowych.

Płazy nie posiadają:

Węzłów chłonnych w klasycznym rozumieniu (brak wyraźnie wyodrębnionych struktur).

Układu naczyń limfatycznych tak rozwiniętego jak u ssaków.

Komórki odpornościowe

Monocyty / makrofagi — fagocytoza, produkcja cytokin (IL-1, TNF- α), NO i ROS; kluczowi w inicjacji zapalenia i likwidacji patogenów.

Neutrofile / heterofile — granulocyty uczestniczące w ostrej fazie zapalenia; mogą być mniej liczne/aktywne niż u ssaków, zależnie od gatunku.

Komórki NK-like — obserwowane w badaniach; uczestniczą w odpowiedzi przeciwwirusowej i antynowotworowej.

Limfocyty T i B — obecne i funkcjonalne; płazy mają klasyczne subpopulacje Th i Tc oraz przeciwciała, choć repertuar i mechanizmy różnią się w szczegółach (np. izotypy immunoglobulinowe, tempo odpowiedzi).

Reakcja zapalna — przebieg u płazów (komórkowy i molekularny)

Reakcja zapalna u płazów ma klasyczne etapy podobne do innych kręgowców, ale z kilkoma istotnymi różnicami (tempo, komórkowy skład, modulacja przez skórę i temperaturę)

Molekularne elementy wrodzonej obrony

Receptory rozpoznające wzorce (PRR)

Płazy posiadają zestaw PRR (Toll-like receptors — TLRs, NOD-like receptors itp.), które rozpoznają molekularne wzorce patogenów (PAMP). Ewolucyjna analiza TLR w płazach wskazuje na zachowanie typowych receptorów ale też specyficzne warianty dostosowane do ekosystemu dwusrodowiskowego. **Aktywacja PRR uruchamia kaskady NF- κ B → produkcja cytokin prozapalnych.**

Kaskada dopełniacza

Komponenty dopełniacza (C3 i inne) są obecne i aktywne u płazów; uczestniczą w opsonizacji, tworzeniu błony atakującej (MAC) oraz w modulacji zapalenia.

Antyoksydanty i NO/ROS

Makrofagi płazów produkują tlenek azotu (NO) i reaktywne formy tlenu w celach mikrobiobójczych; równocześnie obecne są mechanizmy antyoksydacyjne chroniące tkanki przed nadmiernym stresem oksydacyjnym.

Peptydy antymikrobowe (AMP)

Skóra płazów wydziela bogatą pulę AMP (np. **magaininy, dermaseptyny** i inne). AMP pełnią rolę pierwszej linii obrony przeciw bakteriom, grzybom i wirusom; są kluczowym elementem przeciwdziałania. Produkcja AMP jest modulowana hormonalnie i środowiskowo.

Komponenty odpowiedzi swoistej (adaptacyjnej) Immunoglobuliny

U płazów występują **izotypy immunoglobulinowe homologiczne do IgM oraz IgY** (funkcjonalny odpowiednik ssaczych IgG/u niektórych grup także IgX); repertuarem i czasem odpowiedzi różnią się między gatunkami i pomiędzy larwami a dorosłymi.

Produkcja przeciwciał jest wolniejsza przy niskiej temperaturze środowiskowej.

Limfocyty T

Istnieją populacje Th1/Th2-like; u wielu gatunków obserwuje się odmienną proporcję typów odpowiedzi w stadium larwalnym (bardziej „innate-like” lub Th2-skłonne) vs dorosłym (bardziej rozbudowana odpowiedź komórkowa).

MHC: u płazów MHC klasy I i II występują, ich różnorodność wpływa na odporność populacji (podatności na patogeny takie jak ranawirusy czy Bd)

Faza inicjacji (minuty–godziny)

Rozpoznanie PAMP/DAMP (wzorce mol) przez PRRs → aktywacja komórek miejscowych (keratynocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne).

Szybkie wydzielanie IL-1 β , TNF- α , chemokin (CCL, CXCL), **które rekrutują** neutrofile/heterofile i monocyty.

Faza efektorowa (godziny–dni)

Napływ fagocytów (makrofagi/heterofile), fagocytoza, uwalnianie ROS/NO i enzymów proteolitycznych.

Aktywacja dopełniacza i opsonizacja, wzmocnienie mikrobiobójstwa przez AMP wydzielane na powierzchni skóry.

Uwaga kliniczna: u płazów „ostra” fagocytoza może być mniej spektakularna niż u ssaków — często obserwujemy przewlekłe, miejscowe ogniska zapalne z dominacją makrofagów i umiarkowaną infiltracją neutrofilów.

Faza rezolucji i naprawy (dni–tygodnie)

Produkcja mediatorów przeciwzapalnych (IL-10, TGF- β) i aktywność makrofagów „M2-like” sprzyjającej gojeniu.

U płazów istotna jest regeneracja tkanek (u niektórych gatunków wysoka zdolność regeneracyjna ogranicza bliznowacenie) — makrofagi i fibroblasty współpracują w procesie rekonstrukcji.

Różnice ontogenetyczne: jak immunologia zmienia się podczas metamorfozy

Kijanki: dominują mechanizmy odporności nieswoiste — bariera skórna jest inna, limfocyty B/T mniej dojrzałe, oporność na patogeny opiera się głównie na fagocytach, AMP i mikrobiomie wodnym.

Metamorfoza: jest okresem krytycznym — przebudowa układu limfatycznego, dojrzewanie grasicy i pojawienie się pełnej odpowiedzi humoralnej; jednocześnie jest to okres zwiększonej wrażliwości na infekcje i toksyny (**efekt „okienka immunologicznego”**).

Związek temperatury z infekcjami i chorobami

Chytridiomykoza (*Batrachochytrium dendrobatidis*)

Optimum wzrostu Bd: 17–23 °C.

Wysoka temperatura (28–30 °C) ogranicza rozwój grzyba, ale też aktywizuje układ odpornościowy płaza.

Leczenie i profilaktyka: „termoterapia” – podgrzanie środowiska do 28–30 °C przez kilka dni zwiększa przeżywalność zakażonych żab. **UWAGA!!!!!!**

Ranawirusy

Replikują się szybciej w wyższej temperaturze (20–25 °C), ale również wyższa temperatura stymuluje odporność komórkową.

W chłodnych porach roku infekcje ranawirusowe mają cięższy przebieg z powodu słabszej reakcji zapalnej.

Termiczna regulacja odporności — mechanizmy molekularne

Stres cieplny (heat-shock proteins, HSPs):

Wzrost temperatury indukuje ekspresję HSP70 i HSP90, które działają jako chaperony molekularne i modulatory odpowiedzi immunologicznej.

HSP mogą aktywować komórki dendrytyczne i zwiększać prezentację antygenów.

Kortykosteron i oś HPA:

Długotrwała ekspozycja na skrajne temperatury (zarówno niskie, jak i wysokie) aktywuje oś podwzgórze–przysadka–nadnercza, zwiększając poziom kortykosteronu → **immunosupresja**.

Zmienność gatunkowa:

Gatunki tropikalne (np. *Agalychnis callidryas*) mają wyższe optimum immunologiczne ($\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$),

Gatunki stref umiarkowanych (np. *Rana temporaria*) — niższe ($\sim 18\text{ }^{\circ}\text{C}$).

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA MIKROBIOMU PŁAZÓW

Mikrobiom płazów to złożony ekosystem bakterii, grzybów, wirusów i **archeonów** zasiedlających skórę, przewód pokarmowy, błony śluzowe i (w mniejszym stopniu) powierzchnie jaj.

Skład mikrobiomu jest dynamiczny, silnie uzależniony od:

środowiska (woda vs. ląd),

stadium rozwojowego (kijanka → dorosły),

temperatury i wilgotności,

rodzaju diety,

interakcji z mikroorganizmami środowiskowymi i symbiontami.

MIKROBIOM SKÓRY PŁAZÓW

Budowa i specyfika środowiska skóry

Skóra płazów to narząd o wyjątkowej strukturze i funkcji biologicznej:

Cienki naskórek z dużą liczbą gruczołów śluzowych i ziarnistych (gruczoły jadowe).

Stała wilgotność i obecność śluzu, bogatego w białka antybakteryjne, peptydy obronne (AMP), immunoglobuliny i śladowe składniki metaboliczne.

Skóra jest aktywnie oddychająca i osmoregulacyjna, przez co ma wysoką przepuszczalność i stały kontakt z drobnoustrojami środowiska wodnego i lądowego.

Pseudomonas, Acinetobacter, Comamonas, Janthinobacterium

kluczowe dla ochrony przed patogenami, wytwarzają metabolity antygrzybicze

Bacteroidetes

Chryseobacterium, Flavobacterium

degradacja związków organicznych, wspomaganie odnowy skóry

Actinobacteria

Microbacterium, Corynebacterium

konkurencja z grzybami patogennymi

Firmicutes

Bacillus, Staphylococcus

regulacja mikrobiomu, produkcja AMP

W środowisku wodnym dominują *Pseudomonas* i *Janthinobacterium* (produkujące violacein, związek hamujący wzrost *Batrachochytrium dendrobatidis* – Bd).

W gatunkach lądowych zwiększony udział *Actinobacteria* i *Bacillus*.

Funkcje mikrobiomu skóry

Ochrona przed patogenami

produkcja antybiotyków, AMP, kwasów organicznych, konkurencja o receptory

zapobieganie chytridiomykozie, ranawirusom

Modulacja odporności

stymulacja komórek dendrytycznych, limfocytów, AMP

regulacja lokalnego mikrośrodowiska immunologicznego

Regulacja pH skóry

kwasy organiczne i amoniak

utrzymanie bariery chemicznej

Regeneracja skóry

symbiotyczne bakterie wspierają gojenie po linieniu

kluczowe w warunkach hodowlanych

Synergia z AMP

bakterie symbiotyczne mogą wzmacniać działanie peptydów obronnych gospodarza

naturalna immunoterapia

Czynniki modulujące mikrobiom skóry

Temperatura: wzrost temperatury powyżej 25 °C zmniejsza różnorodność mikrobiomu i aktywność *Janthinobacterium*.

Wilgotność: niska wilgotność → spadek liczby bakterii hydrofilnych, wzrost potencjalnych patogenów.

pH wody: optymalne 6,5–7,5; przy kwaśnym pH dominują *Flavobacterium* i *Acidovorax*.

Antybiotyki i dezynfekcja: mogą trwale zniszczyć symbiotyczną mikroflorę, zwiększając podatność na infekcje.

Zanieczyszczenia środowiska: pestycydy i metale ciężkie zaburzają skład mikrobiomu, powodując dysbiozę.

MIKROBIOM PRZEWODU POKARMOWEGO

Uwarunkowania fizjologiczne

Przewód pokarmowy płazów ma prostą budowę: jama ustna → krótki żołądek → jelito cienkie i grube → kloaka.

Mikroflora zależy od diety (larwy = roślinożerne / dorosłe = drapieżne) i stadium rozwojowego.

W czasie metamorfozy dochodzi do głębokiej reorganizacji mikrobiomu - z dominacji bakterii fermentacyjnych do dominacji proteolitycznych.

Skład mikroflory jelitowej

Kijanki

Firmicutes, Bacteroidetes, Cyanobacteria

fermentacja polisacharydów, produkcja SCFA (octan, propionian)

Dorośle płazy

Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria

trawienie białek, metabolizm aminokwasów i lipidów

Symbionty ochronne

Lactobacillus, Enterococcus, Bacillus

konkurencja z patogenami, produkcja bakteriocyn

Funkcje mikrobiomu jelitowego

Trawienie i metabolizm

fermentacja węglowodanów, rozkład chityny, synteza witamin (B, K)

Odporność jelitowa

konkurencja z patogenami, stymulacja GALT

Regulacja hormonów

wpływ na oś jelitowo-mózgową i metabolizm kortykosteronu

Rozwój układu immunologicznego

aktywacja limfocytów i produkcja IgM w błonie śluzowej

Detoksykacja

rozkład toksyn środowiskowych, np. fenoli, pestycydów

Dysbioza i jej skutki

Zaburzenia mikrobiomu (np. po stresie, antybiotykach lub skażeniu wody) prowadzą do:

spadku odporności jelitowej,

zaburzeń trawienia i wchłaniania,

**nadmiernego namnażania *Aeromonas hydrophila* i *Pseudomonas* spp.
- bakterii oportunistycznych,**

zwiększonej podatności na ranawirusy i chytridiomykozę (pośrednio przez osłabienie bariery immunologicznej).

RÓŻNICE ŚRODOWISKOWE

Wodne (np. Xenopus, Bombina)

Proteobacteria, Flavobacterium

większa stabilność mikrobiomu, adaptacja do zmiennych pH

Lądowe (np. Bufo, Rana terrestris)

Actinobacteria, Bacillus

mikrobiom odporny na wysychanie

Tropikalne gatunki nadrzewne

Janthinobacterium, Pseudomonas

wysoka aktywność antygrzybicza

Górskie, chłodne siedliska

mniejsza różnorodność, więcej psychrofilnych bakterii

zwiększone ryzyko chytridiomykozy

ZNACZENIE W MEDYCYNIE WETERYNARYJNEJ

**Utrzymanie mikrobiomu = klucz do
zdrowia płazów w hodowlach i
laboratoriach.**

Nieprawidłowa higiena, chlorowana woda,
antybiotyki → dysbioza i immunosupresja.

Stosowanie probiotyków skórnych i jelitowych (np.
Janthinobacterium lividum, *Lactobacillus* spp.)
może chronić przed chytridiomykozą i
ranawirusem.

Warto badać mikrobiom przy przewlekłych
chorobach skóry, zaburzeniach linienia i po terapii
antybiotykowej.

W warunkach fizjologicznych większość płazów wykazuje obecność niepatogennych endosymbiontów jelitowych, takich jak:

pierwotniaki (wiciowce, ameby),

nicienie i przywry w niewielkich ilościach,

sporadycznie larwy tasiemców lub kokcydia o niskiej patogenności.

Oceniając płazy pod względem parazytologicznym, należy pamiętać, że wiele gatunków pasożytów jest komensalnych lub symbiotycznych – ich obecność nie oznacza choroby!!!!!!!

Fizjologiczna flora pasożytnicza w jelitach płazów obejmuje:

Wiciowce

Hexamita intestinalis, Giardia agilis

komensale jelita cienkiego

Ameby

Entamoeba ranarum

komensal jelita grubego

Kokcydia

Eimeria ranae, Isospora sp.

subkliniczne infekcje jelitowe

Nicienie

Oswaldocruzia filiformis, Aplectana acuminata

fizjologiczne mikroinwazje

Przywry

Diplodiscus subclavatus, Haplometra cylindracea

komensale jelita grubego

Tasiemce

Ophiotaenia ranae, Nematotaenia dispar

mała liczba – bezobjawowe

Metody immunostymulacji płazów

Immunostymulacja u płazów obejmuje:

metody środowiskowe,

biologiczne i mikrobiologiczne,

immunochemiczne (farmakologiczne),

żywnościowe i suplementacyjne,

behawioralne i hodowlane.

Immunostymulacja środowiskowa

W praktyce klinicznej utrzymanie stałych parametrów środowiska jest najskuteczniejszym i najbezpieczniejszym sposobem immunostymulacji.

Optymalna temperatura (20–26°C)

zwiększenie aktywności fagocytów i limfocytów

↑ odporność nieswoista i humoralna

Wilgotność 70–90%

utrzymanie integralności bariery skórnej

↓ infekcje oportunistyczne

Dostęp do czystej wody o niskiej zawartości amoniaku i metali ciężkich

ograniczenie stresu oksydacyjnego i toksycznego uszkodzenia skóry

↑ produkcja AMP

Fotoperiod (12–14h światła)

wpływ na oś HPA (kortykosteron–melatonina)

modulacja cytokin prozapalnych

Obecność mikrobiomu skóry i jelit

kolonizacja przez bakterie symbiotyczne

aktywacja TLR (Toll-like receptors), stymulacja odporności lokalnej

Immunostymulacja mikrobiologiczna

Mikrobiom skóry

Bakterie: *Janthinobacterium lividum*, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp.

Wydzielają metabolity przeciwgrzybicze (m.in. violacein, prodigiozyna) chroniące przed *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Mikrobiom skóry aktywuje receptory TLR2/TLR4 w komórkach nabłonka skóry → produkcja peptydów antydrobnoustrojowych (AMPs: dermaseptyny, magaininy, ranatyryny).

Mikrobiom jelitowy

Komensalne bakterie (*Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Citrobacter* sp.) stymulują odporność błony śluzowej przez:

produkcję kwasów organicznych,

konkurencję z patogenami,

modulację cytokin IL-1 β , TNF- α .

Immunostymulacja farmakologiczna i biochemiczna

β -glukany (pochodzenia grzybowego)

Saccharomyces cerevisiae, Lentinula edodes

aktywacja makrofagów, TLR, fagocytozy

podawane z pokarmem lub kąpielowo

Polisacharydy roślinne

np. ekstrakt z aloesu, echinacea

stymulacja produkcji cytokin

u płazów wodnych – podanie w kąpielach

Immunostymulatory bakteryjne (LPS, MDP)

lipopolisacharydy E. coli, muramyldipeptyd

aktywacja TLR4/TLR2, zwiększenie IL-1 β

stosowane doświadczalnie

Witaminy antyoksydacyjne

A, C, E

neutralizacja stresu oksydacyjnego, wspomaga odporność humoralną

A – regeneracja skóry, C – fagocytoza

Minerały śladowe

Zn, Se, Cu, Mn

kofaktory enzymów immunologicznych

suplementacja przez pokarm owadów

Peptydy immunomodulujące

np. magaininy, dermaseptyny

działają jak endogenne antybiotyki

indukują odporność nieswoistą skóry

**β -glukany i witaminy A+C+E to jedyne środki
bezpiecznie stosowane klinicznie u płazów w
hodowlach i lecznicach egzotycznych.**

Immunostymulacja dietetyczna

Karotenoidy (np. β -karoten)

antyoksydant, prekursor wit. A, stymuluje odporność skóry

Kwasy tłuszczowe n-3 (EPA, DHA)

regulacja cytokin przeciwzapalnych

Białko wysokiej jakości (owady, larwy)

źródło aminokwasów do syntezy immunoglobulin

Probiotyki i prebiotyki (np. włókno chitynowe)

wspierają mikrobiom jelitowy

Mikroelementy (Zn, Cu, Fe)

aktywują enzymy oksydacyjne neutrofilii

Immunostymulacja behawioralna i hodowlana

Czynniki behawioralne i etologiczne wpływają bezpośrednio na poziom stresu, a tym samym – kortykosteronu, który hamuje reakcje immunologiczne.

Zasady immunostymulującego utrzymania:

Minimalizacja stresu (brak hałasu, wibracji, nadmiernego światła).

Obecność kryjówek i roślin (redukcja kortykosteronu).

Izolacja chorych osobników.

Regularna wymiana wody (bez chloru, o stabilnym pH 6.8–7.4).

Unikanie nagłych zmian temperatury.

