บทที่ 13

ภูมิคุ้มกันของปลา (Fish immunology)

สัตว์มีกระดูกสันหลัง ที่ไม่มีขากรรไกร (Agnatha) เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ปรากฏในซาก fossil โดยมีอายุสืบมาจากยุค Ordovician ลูกหลานของมันคือ hagfish และ lamprey โดยปลาสองชนิดนี้ มีลักษณะรูปร่างโบราณ เหมือนบรรพบุรุษของมัน สัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีขากรรไกรพวกแรกจะปรากฏในยุค Palaeozoic และในช่วง Devonian จะมีสายวิวัฒนาการไป 3 สาย

1. Cartilaginous fish (Chondrichthyes) เป็นปลากินเนื้อในทะเล เช่น sharks, rays

2. Bony fish (Osteichthyes) ซึ่งได้แก่ fleshy-finned fish (Sarcopterygii) ปลาพวกนี้มีวิวัฒนาการขึ้นมาเล็กน้อย เช่น Dipnoi, Coelacanthini ซึ่งกลุ่มนี้จะวิวัฒนาการต่อไปเป็นสัตว์สี่เท้า (tetrapod)

3. Bony fish (Osteichthyes) ได้แก่ Actinopterygii เป็นปลาที่พบมากที่สุด ในปัจจุบันจะอยู่ใน Order Teleostei

Teleosts fish พบมากกว่า 20,000 ชนิดในปัจจุบัน และมากกว่าครึ่งของสัตว์มีกระดูกสันหลังทั้งหมด โดย teleosts พบมากในแหล่งน้ำตามธรรมชาติทั่วไป มีความหลากหลายมาก จึงได้มีการสนใจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการทำประมงมากขึ้นในปัจจุบัน ทำให้มีการศึกษาภูมิคุ้มกันในปลาเพื่อจะได้เข้าใจการตอบสนองของปลาต่อ pathogens และนำไปพัฒนาวิธีการทำวัคซีนในปลา

ปลาที่นิยมนำมาเลี้ยงเพื่อการค้า เช่น salmonids (trout and salmon), carp, catfish, tilapia, eels, sea bass, sea bream, marine flatfish ได้มีการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของปลาโดยใช้ปลา rainbow trout เป็นสัตว์ทดลอง

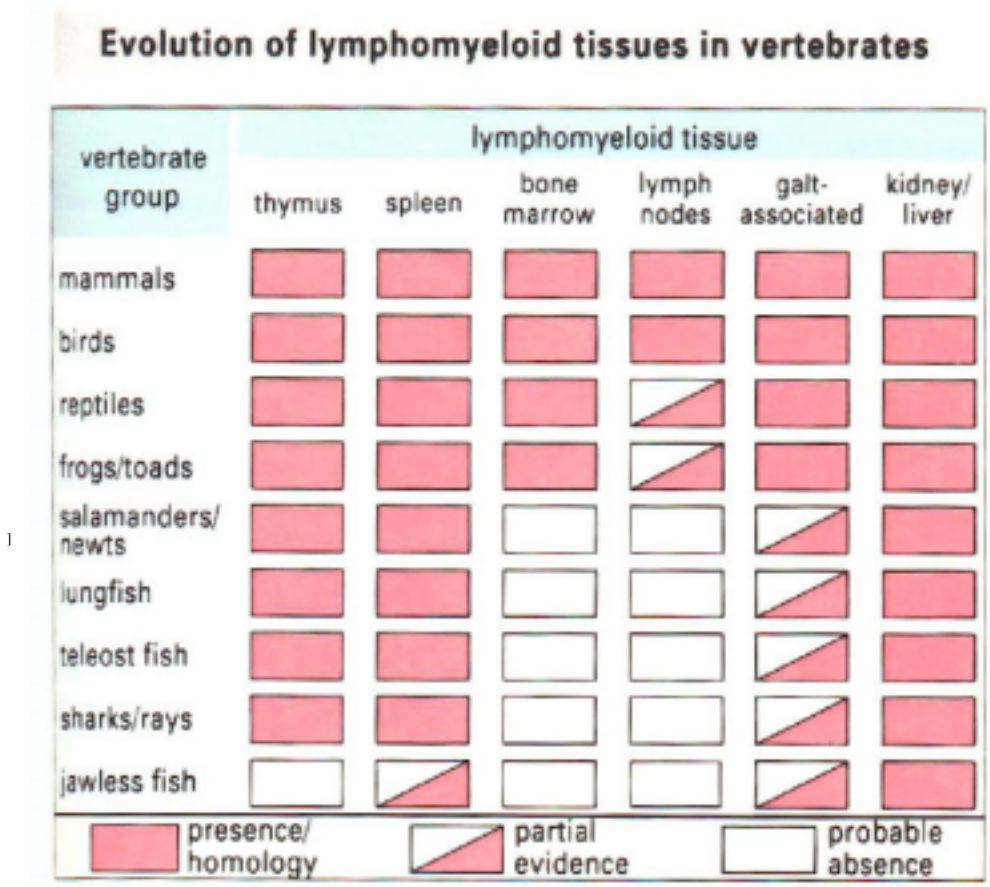
Lymphoid tissue

Lymphoid tissue ของ Agnatha เรียงตัวไม่เป็นระเบียบอยู่บริเวณ haemopoietic area ส่วนในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีขากรรไกรจะพบ thymus, spleen, head kidney (Pronephros) และ trunk kidney (Opisthonephros)

1. Thymus

Thymus เกิดในระยะการพัฒนาของตัวอ่อน โดยเกิดจากการหนาตัวขึ้นของ pharyngeal epithelium แต่ต่างจากใน tetrapod vertebrate ซึ่งเกิดจากการงอกออกมาของ pharyngeal epithelium Thymic cell จะถูกแยกจาก pharyngeal lumen โดยเซลล์บางๆ เพียงชั้นเดียว thymus ในปลาจะประกอบไปด้วย lymphocyte และ lymphoblast อยู่ภายในร่างแหของ reticular epithelial cells

Thymus จะประกอบด้วยชั้น medullary และ cortex บางครั้งอนุพันธ์ของ thymic epithelium ก็พบได้ในปลาเช่น Hassal's corpuscles, myoid cells และ cyst แต่ไม่โดดเด่นเท่ากับใน tetrapods



ภาพที่ 13-1 Lymphoid tissues ที่พบในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ (Roitt, *et al.* 1993)

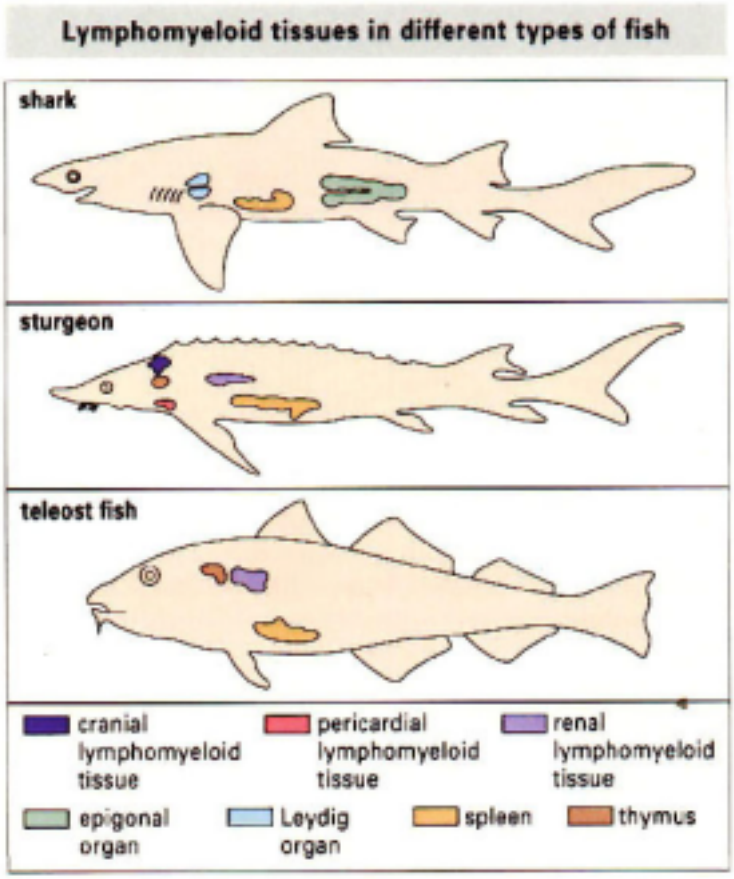
ตารางที่ 13-1 แสดงถึง Adaptive immunity ในกลุ่มของ Cyclostome (โสมทัต, 2538)

Species	Lymphoid tissue	Immune response	Serum globulins
Hagfish	1. ไม่มีต่อมธัยมัส	1. มีการจับกลุ่มต่อเม็ดเลือดแดงแกะ	1. lgM macroglobulins
	2. มี erythropoietic spleen	2. การขับไล่การปลูกถ่ายอวัยวะ	
	3. มี lymphoid cell ในกระแสโลหิต	3. มีการจดจำได้ (memory)	
Lampreys	1. พบ epithelial thymus	1. มีการจับกลุ่มต่อเชื้อ Brucella	1. two gamma globulins
	2. พบ lymphocytic foci	2. การขับไล่การปลูกถ่ายอวัยวะ	
	3. Family of lymphocyte	3. Delayed allergy	
	4. ไม่พบ plasma cell	4. มีการจดจำได้	
		5. cellular proliferation	

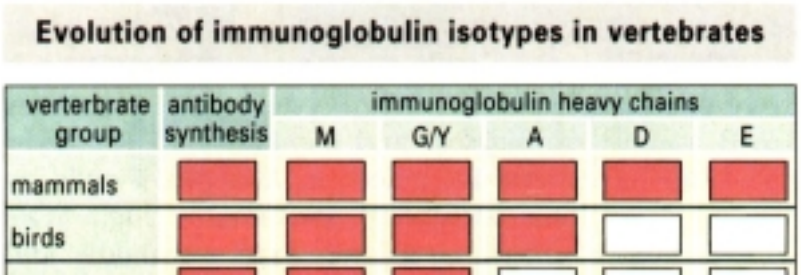
ตารางที่ 13-2 แสดงถึง Adaptive immunity ในกลุ่ม Elasmobranch (โสมทัต, 2538)

Species	Lymphoid tissue	Immune response	Serum globulins

Guitar fish และ	1. มีต่อมธัยมัส	1. ต่อต้านกับแอนติเจนหลายชนิด	1. พบ γglobulin หลายชนิด
Horned shark	2. Involution of thymus in higher form	2. การขับไล่การปลูกถ่ายอวัยวะ	2. พบ alpha และ beta globulin หลายชนิด
	3. spleen	3. เกิด delayed hypersensitivity ที่รุนแรง	
	4. Lymphocytic foci	4. มีการจดจำได้	
	5. Family of lymphocyte		
	6. ไม่พบ plasma cell ในกลุ่มชั้นต่ำ		
	7. พบ plasma cell ในกลุ่มชั้นสูง		



ภาพที่ 13-2 Lymphoid tissue ของปลาชนิดต่าง ๆ (Roitt, *et al.* 1993)



ภาพที่ 13-3 วิวัฒนาการของ immunoglobulin ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Roitt, *et al.* 1993)

ตารางที่ 13-3 แสดงถึง Adaptive immunity ในกลุ่ม Chondrostean (โสมทัต, 2538)

Species	Lymphoid tissue	Immune response	Serum globulins
Paddle fish	1. ต่อมธัยมัส	1. ต่อต้านกับแอนติเจนได้หลายชนิด	1. พบ gamma globulin หลายชนิด
	2. spleen	2. การขับไล่การปลูกถ่ายอวัยวะ	2. พบ alpha และ beta globulin หลายชนิด
	3. family of lymphocyte	3. delayed allergy	
	4. lymphocytic foci หลายกลุ่ม	4. มีความจดจำได้	
	5. plasma cell ใน spleen และ bone marrow	5. plasma cell proliferation	

ในปลา sea bream พบว่าในการพัฒนาของตัวอ่อนของปลา thymus และ head kidney เจริญอยู่ใกล้กัน และปรากฏว่ามีการส่งเซลล์ผ่านระหว่างกัน ได้มีการทดลองโดยนำ thymocytes ที่ติดฉลากด้วย tritiated thymidine ฉีดเข้าไปใน thymus ของปลา rainbow trout จะสามารถตรวจพบ thymocytes ได้ที่ kidney และ spleen จากการทดลองจึงสรุปว่า thymus จะส่ง thymocytes ไปยังบริเวณ kidney และ spleen

Thymus ในปลาเป็น primary lymphoid organ และเป็นแหล่งกำเนิด T-cells เป็นส่วนใหญ่ และ B-cells เป็นส่วนน้อย ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้จากปริมาณ B-cells ที่สามารถเจริญเป็น

plasma cell ใน thymus หรือศึกษาจากการสร้าง antibody ของ thymus ใน culture หรือ ตรวจ antibody-forming cells ใน culture

2. Secondary lymphoid organ

Secondary lymphoid tissue ในสัตว์เลือดเย็นจะปรากฏในอวัยวะที่ sinusoidal blood ไหลผ่าน และเป็นที่ซึ่ง lymphoid cells สามารถรวมกลุ่มตอบสนองต่อ antigen ได้ โดย secondary lymphoid organ ได้แก่ kidney และ spleen

ในปลากระดูกอ่อนสามารถพบ secondary lymphoid organ ได้หลายชนิด เช่น Leydig's organ ใน oesophageal wall, Liver, และ Epigonal organ ใน gonads

2.1 Kidney

Kidney มีบทบาทเหมือนกับ bone marrow ใน tetrapods คือเป็น blood forming organ และเป็นแหล่ง stem cells โดย kidnery ทำหน้าที่เป็น lymphoid organ โดย head kidney และ trunk kidney จะสร้าง cells of the heamopoietic parenchyma เพื่อตอบสนองต่อ antigen ที่มากระตุ้น โดยใน cytoplasm ของ cells ชนิดนี้ จะประกอบด้วย RNA และ pyroninophilic cells ซึ่งจากการทดลองในปลา carp โดยให้ HGG ใน Freund's complete adjuvant จะพบการตอบสนองอย่างมาก ในอาทิตย์ที่ 3 โดยจะพบการรวมกลุ่มของ pyroninophilic cells ใน pronephros antibody-forming cells สามารถพบได้ทั้ง head kidney และ trunk kidney จึงสนับสนุนได้ว่า kidney เป็น antibody-producing organ ที่สำคัญในปลา

Pigment-containing cells (melanomacrophages) พบได้ทั้ง kidney และ spleen melanomacrophages จะพบส่วนประกอบของ melanin เป็นส่วนใหญ่และนอกจากนี้ยังพบ lipofuscin และ haemosiderin ด้วย

Melanomacrophages มีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำลายซากสิ่งที่ไม่ต้องการ, ป้องกันความเสียหายที่เกิดจาก free radical, สะสมเหล็ก, ทำหน้าที่เป็นศูนย์การผลิต memory cell สามารถจดจำ antigen ได้นาน (1 ปีขึ้นไป)

Kidney มีบทบาทสำคัญในการเกิด haemopoeisis ซึ่งจะทำหน้าที่ตั้งแต่เริ่มพัฒนาตัวอ่อน pronephros เป็นอวัยวะแรกที่มี haemopoietic tissue pronephros เป็น excretory kidney ของ larval fish ประกอบด้วย haemopoietic tissue กระจายอยู่ระหว่าง excretory tubules ต่อมาเมื่อมีการพัฒนามากขึ้นบทบาทในการ excretory เป็นของ mesonephros และ opisthonephros ทำให้ pronephros หมดหน้าที่ในการ excretory แต่ pronephros ก็ยังพบในปลา teleosts ซึ่งทำหน้าที่เป็น lymphoid organ (haemopoietic)

2.2 Spleen

เป็นอวัยวะสุดท้ายที่เกิดการพัฒนาของ lymphoid system ใน teleost fish spleen มีส่วนคล้ายกับ kidney คือ haemopoiesis และ immune reactivity melanomacrophages จะพบได้ที่

spleen มากกว่า kidney ในปลา teleost จะมี splenic red pulp และ splenic white pulp ไม่แตกต่างกัน

Ellipsoid จะพบมากใน spleen แต่ไม่พบใน teleost ทุกชนิด ellipsoid จะมีปลายเส้นเลือดฝอยเปิดเข้าแล้วล้อมรอบด้วย sheath of recticular fibres และ macrophages เส้นเลือดฝอยจะเปิดเข้าทาง red pulp sinuses และจะระบายออกทาง venous system

เมื่อทดลองฉีด carbon particles เข้าไป carbon particle จะไปสะสมที่ผนัง ellipsoid ทันที และเมื่อฉีด bacteria ที่ตายแล้วเข้าไป immunoreactivity จะเกิดครั้งแรกที่ ellipsoid และโดย phagocyte ใน red pulp และเมื่อมีการสร้าง specific antibody immunoreactivity จะไม่พบใน ellipsoid

Agnatha ไม่มี spleen แม้ว่าใน lamprey จะมี typhlosal of the gut เป็นที่อยู่ของ heamopoietic tissue ก็ตาม แต่บางครั้งอาจจะเรียกว่าเป็น primitive spleen โดย true spleen จะพบในปลามีขากรรไกร ใน Chondrichthyes จะมี spleen ขนาดใหญ่ มีการแยก red pulp และ white pulp อย่างชัดเจน ใน teleost จะมี ellipsoid เป็น lymphoid organ และพบ plasma cells ใน spleen ของ cartilaginous fishes หลายชนิดและ spleen จะเป็นอวัยวะที่สร้าง antibody เป็นส่วนใหญ่ ใน spleen จะพบ immunoglobulin-containing cells มากกว่าใน lymphoid organ อื่นๆ (Leydig's organ epigonal organ, spiral valve ใน intestine)

3. Mucosa-associated lymphoid tissue

ผิวเมือกบน gut, skin, gill จะถูกปกป้องโดย humoral และ cellular mechanism mucus มีกลไกทางกายภาพที่จะปกป้องตนเองโดยการหลั่งสาร เช่น lysozyme นอกจากนี้ยังพบ immunoglobulin และ specific antibody ในปลาทุกชนิด lymphocytes และ leucocystes จะแทรกซึมผ่าน gut wall lymphocytes จะพบที่ skin และ gill โดยที่ skin จะพบ immunoglobulin-containing lymphocytes ในชั้น epidermis แม้ว่าในปลาจะไม่มี Peyer's patches เหมือน mammal ก็ตามแต่ Agnatha ก็พบ heamopoietic site บริเวณ lamina propria ของ gut wall ส่วนในปลามีขากรรไกรจะพบว่าอยู่บริเวณ internal surface of gut และจะมีมากบริเวณ spiral valve โดยพบว่าการสะสม lymphoid cells บริเวณนี้

ใน teleost fish บริเวณ gut จะพบ lymphoid cells ซึ่งแพร่ขยายทั้ง intestine และจะยังพบ lymphocytes, granulocytes, macrophages, plasma cells อยู่ใต้ intestinal epithelium ซึ่งอาจจะอยู่กระจัดกระจายหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ใน teleost fish สามารถแบ่ง intestine ได้เป็น 2 ส่วน ซึ่งแตกต่างกันคือ anterior first segment และ posterior second segment ในปลา carp จะพบ large intraepitheliar macrophages ใน second segment ดังนั้นจึงพิจารณาได้ว่า posterior part ของ intestine เป็นบริเวณภูมิคุ้มกันที่สำคัญใน teleost fish

Non-specific and specific humoral immunity

1. non-specific immune factors and complement

1.1 Lectins ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของ microorganism หรือทำให้เกิดการตกตะกอนของ soluble substance lectin เป็น protein หรือ glycoprotein โดยมีคุณสมบัติในการจับกับ carbohydrate

1.2 Lytic enzyme จะทำให้ cells แตกได้โดยผ่านทาง complement system lytic enzyme ในที่นี้คือ lysozyme โดย lysozyme สามารถพบได้ใน phagocytic cells, serum, mucus โดย lysozyme จะกระทำกับ peptidoglycan component ของ cell wall ของ microorganism

1.3 Transferrin คือ iron-binding glycoprotein โดย iron เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ microorganism transferrin จะทำให้การเจริญเติบโตของ microorganism หยุดชะงัก เนื่องจากมีความสามารถ iron-binding power สูงกว่า

1.4 Enzyme inhibitor เช่น proteinase และ anti-trypsinases จะทำหน้าที่ทำลายพิษของ pathogen exoenzymes

1.5 Interferon การผลิต interferon ขึ้นกับการติดเชื้อ เช่น เมื่อได้รับ pathogenic viruses

1.6 Complement-reactive protein เป็นส่วนประกอบของ serum ทั่วไป ซึ่งจะเพิ่มความสำคัญมากเมื่อได้รีบ bactreia endotoxin โดย Ca-dependent จะไปจับกับ phosphocholine-containing molecule ซึ่ง molecule นี้จะพบใน cell wall ของ micoroorganism ที่บุกรุก

ดังนั้น ปลาจะมีกลไกในการรักษาตัวเอง และต้านทานเชื้อโรคต่างๆ โดย non-specific defense จะทำงานก่อน specific immunity และมีส่วนคล้ายกับของ invertibrate

Complement

Complement system เป็นส่วนที่สำคัญในการปกป้องตนเอง และต่อต้าน microorganism โดย C3 เป็น key element ของระบบ การกระตุ้น C3 จะมีใน alternative pathway และ classical pathway

Lamprey มีเพียง alternative pathway โดยจะทำให้เกิด phagocytosis มากกว่า cytolysis โดย C3 ของ lamprey จะคล้ายกับ C3 ใน mammal เพราะฉะนั้น จึงเป็นจุดกำเนิดของ complement system

ใน jawed fish จะเริ่มมี classical pathway จะใช้ complement เป็นสื่อในการทำลาย cell

Elasmobranch จะมี complement เพียง 6 component (C1, C2, C3, C4, C8, C9) ในฉลาม จะก่อให้เกิดการแตกของ cell membrane ซึ่งแสดงได้โดยการถ่ายภาพด้วย electron microscope จะเห็นเป็น pore บน target cell membrane ซึ่งจะเกิดคล้ายกับใน mammal

Teleost fish จะมี complement system มีความพิเศษคล้ายของ higher vertebrate ซึ่งมีทั้ง classical pathway และ alternative pathway ซึ่งโครงสร้างและหน้าที่ของระบบ complement จะ

คล้ายกับใน mammal complement ของ teleost fish ทำให้เกิด opsonization โดย phagocytosis และทำให้เกิด cell lysis

2. Immunoglobulins

Agnatha จะพบ immunoglobulins จำนวนน้อยและยังจำแนกลักษณะได้ไม่ดี ส่วนใน hagfish จะพบ lgM ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ complement แต่ยังมีปัญหาเกี่ยวกับ immnoglobulins ของ Agnatha อยู่

Jawed fish จะพบว่ามี immunoglobulins ชนิด lgM ซึ่งมี heavy chain คล้ายกับ μ-chain ของ mammal ส่วน Chondrichthyes และ Dipnoi มี lgM เป็น pentameric molecule คล้ายกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ส่วน Actinopterygii มี lgM เป็น tetrameric molecule นอกจากนี้ monomeric form และ dimeric from สามารถพบได้ในปลา

Teleosts เช่น channel catfish จะมี immunoglobulins ที่มี molecule ต่างกันโดยแตกต่างกันตรง covalent structure ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ light chain บางทีก็สามารถแยก immunoglobulins ออกจาก lgM ได้ เช่น ใน Dipnoi จะมี lgM ที่มี molecular weight น้อยกว่าปกติ จึงเรียกว่า lgN ซึ่งจะคล้ายกับ lgG ของ mammal แต่ก็ยังไม่ทราบว่าการเปลี่ยนแบบนี้จะมีความสำคัญอย่างไร

3. Antibody production : B-cell and cellular co-operation

มีหลักฐานว่า lymphocyte ของปลาคล้ายกับ B-cell และ T-cell ของ mammal โดยสังเกตจากการดูผลที่เกิดจากการให้ hapten-carrier แก่ปลาโดยให้แบบ *in vivo* โดยมีการตรวจพบการสร้าง specific antibody เพื่อต่อต้านกับ hapten โดยจะต้องการ cellular co-operation ในการเกิดปฏิกิริยาด้วย ดังนั้นการตอบสนองของ lymphocyte ในปลาจะมีรูปแบบคล้ายกับ higher vertebrate

การทำปฏิกิริยาโดยตรงระหว่าง monoclonal antibodies กับ homologous immunoglobulin (lg) มีประโยชน์สำหรับปลาหลายๆ ชนิดคือ เมื่อ B-lymphocyte แสดงลักษณะโดยปรากฏ membrane-bound immonoglobulin และ monoclonal antibodies นี้สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง surface lg-positive (slg^{+ve}) lymphocyte และ surface lg negative (slg^{-ve}) lymphocyte โดยในที่นี้ slg^{-ve} lymphocyte จะคล้ายกับ B-lymphocyte ใน mammal

จากการศึกษา teleost fish พบว่า cellular co-operation จะมีบทบาทคล้ายกับ T-cell และ B-cell โดย monocyte ชนิดนี้จะทำหน้าที่เป็น cell สนับสนุน จากการทดลองแบบ *in vitro* การตอบสนองของ anti-hapten antibody ที่อยู่รอบ blood leucocyte ต่อ haptenated protein carrier conjugates (คล้ายกับ T-dependent ใน mammal) จะต้องอาศัย cell 3 ชนิด คือ carrier-specific slg^{+ve} lymphocyte, hapten-specific slg^{+ve} lymphocyte, monocyte โดย monocyte พวกนี้จะมีสารที่มีคุณสมบัติคล้าย cytokine

4. Antibody producing in vivo: immunological memory and tolerance

Secondary antibody response ใน teleost fish จะมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า primary antibody response การชักนำให้เกิดการจดจำขึ้นกับ

Route

Dose

Temperature

Secondary antibody response จะตอบสนองต่อ antigen หลายชนิด เช่น erythocyte, bacterial antigen, virus particle, proteins, lipopolysaccharide, hapten โดยการเพิ่มของการตอบสนองสามารถอยู่ได้นานอย่างน้อย 1 ปี

ลูกปลาที่ฟักออกมาจากไข่จะมีขบวนการปกป้องตัวเองโดย non-specific defense mechanism เช่น phagocytosis ความสามารถในการตอบสนองของปลาต่อ thymus-independent antigen จะมาก่อน thymus-dependent antigen แต่แท้ที่จริง thymus-dependent antigen สามารถทำให้เกิด tolerance ได้ ดังการทดลองในปลา rainbow trout วัยอ่อนซึ่งในช่วงอายุนี้ไม่สามารถผลิต antibody เพื่อต่อต้าน HGG (human gamma globulin) ได้ แต่ถ้าทดลองฉีด HGG ในตัวปลาตอนอายุ 21 วัน หลังจากฟัก ในช่วงอายุวัยอ่อนจะสามารถตอบสนองต่อ thymus-independent bacterial vaccine ได้ ปลา trout สามารถพัฒนาตัวเองให้เกิด tolerance ต่อ HGG ได้ โดยมันจะไม่ตอบสนองต่อ HGG ในการฉีดครั้งที่ 2 หลังจากการฉีดครั้งแรก 8 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับปลาปกติซึ่งฉีด HGG ในช่วงอายุเดียวกันจะมีการสร้าง positive anti HGG มาตอบสนอง และอีกตัวอย่างหนึ่งคือ ทดลองฉีด SRBC (sheep erythrocytes) ในปลา carp อายุ 4 สัปดาห์ และฉีดซ้ำอีกทีหลังจากครั้งแรก 3 เดือน จะไม่พบการตอบสนองคือ ไม่พบการสร้าง antibody แต่ถ้าเทียบกับปลาเมื่อได้รับการฉีด SRBC ครั้งแรกตอนอายุ 4 เดือน จะตรวจพบการสร้าง anti-SRBC มาตอบสนองอย่างมาก จากการทดลองนี้ tolerance สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง antibody ได้และ tolerance ก็อาจเกิดได้ไม่สมบูรณ์เพราะการแพร่ขยายของ lymphoid cell ในการตอบสนองต่อการฉีด antigen ครั้งที่ 2 (HGG) ซึ่งปรากฏใน spleen และ kidney ของปลา

5. Transfer of immunity from mother to young

มีความสนใจในความเป็นไปได้ของการฉีด vaccine ใน hen fish และคาดหวังว่าจะมีการถ่ายทอด protective antibody ไปยัง egg ได้ การผ่านของภูมิคุ้มกันจากแม่ไปยังลูกนั้นเป็นส่วนที่มีประโยชน์มาก ในกรณีที่ pathogen เช่น IPN (infections pancreatic necrosis) virrus ผ่านเข้าไปในตัวอ่อนซึ่งเป็นส่วนที่อ่อนแอ non-specific humoral factors เช่น C-reactive protein และ lectin-like agglutinin ถูกพบได้ในไข่ปลา

จากการทดลอง tilapia, channel catfish : จะส่งถ่าย immue substance ไปยังไข่

ovoviviparous gappy : จะส่งผ่านไปยังลูกปลาที่ออกใหม่

tilapia : จะพบ specific transfer antibody ซึ่งเกิดจากแม่ได้รับ protein antigen หลายชนิดตอนท้อง

channal catfish : จะพบ lgM ใน york, egg membrane

Non-specific and specific cell-mediated immunity

1. Non-specific cellular immunity

การอักเสบจะก่อให้เกิดการรวมตัวของ granulocyte, monocyte (macrophages), lymphocyte เพื่อตอบสนองต่อ antigen หลายชนิด เช่น bacteria, viral, mycotic, protozoan, parasitic infection

granulocyte สามารถพบได้ใน Agnatha และ jawed fish หลายชนิด แม้ว่าในด้านรูปร่างของ granulocyte ของปลาจะแตกต่างกันโดยบทบาทและรูปร่างของ granulocyte ของปลาแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกันและมีอย่างน้อย 1 ชนิด มีหน้าที่คล้ายกับ neutrophil

ในขั้นแรกของการอักเสบจะเกิดการสะสมของ granulocyte ซึ่งจะใช้เวลา 12-24 ชม. ต่อจากนั้นจะเกิดการรวมกันของ monocyte และ lymphocyte leucocyte จะเคลื่อนที่มาโดยการส่งเสริมของ chemoattractants ของ host รวมทั้ง serum, complement fragmene, cytokines และ eicosanoids โดย eicosanoids ที่พบได้ เช่น leukotrienes และ lipoxins ซึ่งจะถูกสร้างโดย macrophage โดยปกติ lipoxins จะสร้างได้ช้ากว่า leukotrienes แต่ในปลาจะไม่เหมือนใน mammal คือ มี lipoxins มากกว่า และ chemoattactant อาจเกิดได้จาก pathogen ด้วย

phagocytes จะแสดงบทบาทสำคัญในขบวนการปกป้องตนเองสามารถพบได้ใน vertebrates ทุกชนิด ในปลาจะพบ cirulating monocytes และ tissue macrophages คอยกำจัด particulate matter จากกระแสเลือดซึ่งเรียกว่า “biphasic” ในขั้นแรกจะกำจัด material มากกว่า 90% ต่อมาจะกำจัดได้หมดจะต้องใช้เวลา 30-60 นาที

ในเหตุการณ์ที่มี phagocyte ปรากฏนั้นจะมีกิจกรรมคล้ายกับ higher vertebrate phagocytosis stage จะประกอบไปด้วย

Recognition
Attachment
Engulfment
Killing
Digestion

ซึ่งคล้ายกับใน mammal ซึ่งต่อมาจะทำให้เกิด oxygen splicing, superoxide anion, hydrogen peroxide, single oxygen, hydroxyl radicle ซึ่งพวก reactive oxygen product จะพบใน neutrophil, macrophage product เหล่านี้จะถูกปล่อยไปใน extracellular environment ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ และเป็นพิษต่อ helminth parasites

เซลล์อีกชนิดคือ non-specific cytotoxic cell (NCC) ซึ่งพบใน blood, spleen, pronephros ของ teleost fish

NCC จะต้องสัมผัสกับ target ในอัตราที่สูงจึงจะเกิด killing ได้ non-specific defence mechanism ในปลาจะคล้ายกับ natural killer (NK) ใน mammal แท้ที่จริง NCC เป็นบรรพบุรุษของ NK แต่มีหน้าที่ต่างกัน NCC ใน channel catfish ไม่มี cytoplasmic granule เหมือนใน NK จึงบ่งชี้ได้ว่าอาจมี mechanism ต่อ target ต่างๆ ต่างกัน ใน teleost fish จะมี eosinophilic granular cell ซึ่งมีหน้าที่คล้ายกับ mast cell ใน higher vertebrate โดยเซลล์นี้ไม่พบใน blood แต่พบในบริเวณที่มีการปะทะกับ antigen เช่น gut, gill

2. Cytokine activity

Cytokine เป็นสารละลายน้ำได้มีบทบาทใน cell mediated reaction cytokine พบได้ในปลา เช่น interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), macrophage activating factor (MAF), interferon gamma (IFN-γ), chemotactic factor (CF) และ macrophage migration inhibition factor (MIF)

IL-1 เป็นจุดเริ่มต้นของปฏิกิริยาโดยจะมีปฏิกิริยาแบบ cascade reaction นอกจากนี้ยังทำให้ T-cell มี receptor เพิ่มขึ้นเพื่อให้เหมาะสมกับ IL-2 โดยการทดลองเอา IL-1 ของคนให้แก่ปลา channel catfish โดย peripheral blood lymphocyte จะเกิดการจำและทำให้เกิด IL-1-like substance ซึ่งจะกระตุ้นการแพร่ขยายของ peripheral blood lymphocyte

IL-2 เป็นสาร polypeptide เหนี่ยวนำให้เกิดการแพร่ขยายของ T-cell และทำให้มี receptor ที่เหมาะสม โดย IL-2 receptor จะถูกสร้างโดยกิจกรรมของ T-cell ที่ปะทะกับ antigen

IFN-γ เป็นตัวกระตุ้นให้ macrophage ทำหน้าที่ดีขึ้น

MIF สามารถพบได้ใน carp pronephric cell โดยการกระตุ้นของ mitogen เช่น concanavalin โดย MIF สามารถพบได้ใน elasmobrnch และ teleost

3. Specific cell-mediated immunity : T-cell function

lymphocyte ในปลาจะมีคุณสมบัติคล้ายกับ T-cell ใน mammal ส่วนใน teleost สามารถแยกเซลล์ชนิดนี้ออกจาก slg^{+ve} b-cells ได้และมันจะแสดงคุณสมบัติคล้ายกับ T-cell

จากการทดลอง slg^{-ve} lymphocyte จะตอบสนองต่อ T-cell mitogen โดยทำหน้าที่คล้าย helper cell คือ ผลิต antibody ต่อต้าน thymus-dependent antigen, ตอบสนองโดยปฏิกิริยา mixed leucocyte reaction (MLR) และมีบทบาทในการผลิต macrophage-activating lymphokines ใน MRL slg^{-ve} cell จะเป็นตัวกระตุ้นคล้ายกับเป็น responder cell ซึ่งต่างจาก T-cell ของ mammal แต่ปลาบางชนิด slg^{-ve} ก็คล้ายกับ T-cell

การทดลองโดยนำ monoclonal antibody ทำปฏิกิริยากับ slg^{-ve} cells ที่ทำในปลา carp และ channal catfish โดย monoclonal antibody จะทำปฏิกิริยาส่วนที่คล้าย thymocytes และ slg^{-ve} lymphocyte บริเวณรอบๆ ซึ่ง lymphocyte พวกนี้จะทำหน้าที่เป็น helper cell ในการผลิต antibody

กิจกรรมของ T-cell นั้นต้องการ accessory cells เช่น monocyte โดย monocyte จะทำหน้าที่ phagocytosis หรือ pinocytosis ตัวที่มากระตุ้นและเกิดการย่อยสลาย ซึ่งทั้งหมดจะเกิดที่ cell surface ของ accessory cell การปรากฏตัวของ antigen ต่อ T-cell นั้นจะเป็นจุดเริ่มต้นของ specific immune response ในปลาซึ่งเหมือนกับใน highte vertebrate

ในการทดสอบ T-cell activity เป็นวิธีที่ทำมานานแล้ว โดยการศึกษา specific cell mediated immunity ในปลา ในที่นี้รวมถึงการทำ skin transplant และ scale transplant และการทดสอบ delayed-type hypersensitivity reaction DTH เป็นปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ T-cell โดยใช้ mycobacteria ที่ตายแล้วเป็น antigen และจะพบการตอบสนองภายใน 1-2 วัน โดยการสะสมของ lymphocyte และ macrophage บริเวณนั้น

DTH สามารถเกิดใน lamprey และ teleost fish ได้ในปลาที่ primitive การทำ allogenic graft จะถูก reject ได้ช้าและเป็นแบบ chronic โดยเชื่อกันว่าเกิด minor histoincompatability reaction ใน teleost fish การตอบสนองต่อ allogenic graft จะเป็นไปอย่างทันทีทันใดแบบ acute จะปรากฏว่าเกิด major histocompatibility complex

การทดลองทำ skin allograft ใน adult carp วันที่ 4 ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส graft จะบวมและมีการกระจายของ melanin pigment และแผลจะหายได้ในเวลา 14 วัน หลังจากนั้นทำ graft ครั้งที่ 2 จะใช้เวลาเพียง 7 วัน ในการสมานแผล