

STEFAN KOSSAKOWSKI, MARIA ŻUK

## Wpływ subletalnych dawek trichlorfonu na rozmieszczenie żelaza ( $^{59}\text{Fe}$ ) w organizmie zwierzęcym

Pracownia Radiobiologii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Trichlorfon (Foschlor, Diptorex, Chlorofos) jest znanym od przeszło 30 lat insektycydem kontaktowym, charakteryzującym się szerokim spektrum działania. Dzięki temu jest on stosowany w zwalczaniu larw gza bydłęcego i innych pasożytów bydła oraz pasożytów świń, koni i owiec (5, 11, 16), w ochronie roślin, a także w dezynsekcji pomieszczeń (12, 13). Trichlorfon charakteryzuje się niską toksycznością dla ssaków, jednak szeroki zakres jego zastosowań prowadzi niejednokrotnie do ostrych zatruc ludzi i zwierząt (4, 8, 11, 14).

Żelazo jest jednym z mikroelementów warunkujących prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Pierwiastek ten jest składnikiem ważnych w biologicznej oksydacji enzymów hemoproteidowych i flawoproteidowych. Jako składnik hemoglobiny odgrywa ważną rolę w transporcie tlenu, w formie zaś mioglobiny stanowi rezerwę tlenową w mięśniach. Ponad połowa żelaza jest zgromadzona w hemoglobinie, znaczne ilości są zlokalizowane w śluzówce jelit, wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym (9, 32, 33). Ponieważ organizm posiada ograniczoną zdolność wydalania żelaza, jego wchłanianie i bilans są regulowane przez błonę śluzową jelit (ferrytyna) i są zależne od wieku zwierzęcia (10), jego stanu zdrowia (30), poziomów endogennego żelaza (9), warunków panujących w przewodzie pokarmowym oraz ilości i chemicznej formy wchłanianego żelaza, a także innych składników diety. Zmiany w przemianie żelaza występują w niektórych chorobach zakaźnych i pasożytniczych (33). Obserwowano też zmiany w metabolizmie żelaza pod wpływem promieniowania jonizującego (35), aminokwasów (19), witaminy A (30), orto- i polifosforanów (38) oraz wapnia (20). Na przemianę żelaza mają również wpływ metale takie jak: kadm, selen, mangan, nikiel i kobalt (4, 7, 22, 27, 28).

Biorąc pod uwagę fakt, że zatrucia trichlorfonem powodują m.in. zaburzenia czynnościowe układu neurohormonalnego i układów enzymatycznych biorących udział w regulacji procesów metabolicznych istnieje prawdopodobieństwo zmian w przemianie żelaza u zatrutych zwierząt. W celu więc ustalenia wpływu subletalnych dawek trichlorfonu na rozmieszczenie żelaza w organizmie zwierzęcym przeprowadzono niniejsze badania.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 180 szczurach (samcach) rasy Wistar o średniej masie ciała  $157,1 \pm 19,3$  g. Zwierzęta karmiono paszą granulowaną LSM, wodę podawano *ad libitum*. Szczury podzielono na 5 grup: I — zwierzęta kontrolne, II — zatrutowe trichlorfonem w dawce 100 mg/kg m.c., III — w dawce 200 mg/kg m.c., IV — 300 mg/kg m.c. i V — zwierzęta zatrutowe trichlorfonem w dawce 300 mg/kg m.c. i leczone. Trichlorfon podawano jednorazowo sonda do żołądka. Po upływie 1 godz. od zatrucia wszystkim szczurom podawano w ten sam sposób żelazo w postaci  $^{59}\text{FeCl}_3$  w ilości 0,5 cm<sup>3</sup> o promieniotwórczości 8,33 kBq. Szczury grupy V po upływie 0,5 godz. od zatrucia pestycydem leczono atropiną i toksobidina. Atropinę wstrzykiwano podskórnie w dawce 1 mg/kg m.c., natomiast toksobidinę podawano domięśniowo w dawce 50 mg/kg m.c. Po upływie 3 i 6 godz. oraz 1, 2, 4 i 8 dni od podania izotopu zwierzęta usypiano chloroformem, po czym pobierano do badań radiometrycznych: żołądek, jelito cienkie i grube, wątrobę, nerki, śledzionę, płuca, serce, mięśnie łopatk i uda, krew, mózg, jądra i prostatę. Próbkę o masie 1 g (krew — 1 cm<sup>3</sup>) lub w całości badano radiometrycznie przy użyciu licznika Geigera-Müllera, typ BOH-45 oraz przelicznika ZR-11. Uzyskane wyniki przedstawiono w procentach podanej dawki radiożelaza w odniesieniu do 1 g świeżej tkanki. Przeprowadzono analizę statystyczną testem t-Studenta wyników poszczególnych grup z grupą kontrolną oraz wyników grupy V (leczonej) z IV (nie leczoną).

### Wyniki i omówienie

Wyniki oznaczeń radiometrycznych stężeń  $^{59}\text{Fe}$  w badanych narządach i tkankach przedstawiono w tab. 1. Wskazują one, że u szczurów kontrolnych rozmieszczenie żelaza w większości narządów przebiega dwufazowo tzn., że po wzroście stężenia następuje jego zmniejszenie. Dotyczy to narządów, w których maksymalne stężenie występuje po 3 godz. — żołądek, po 6 godz. — jelito cienkie i grube, serce i jądra oraz po 2 dniach — płuca, mięśnie, krew i mózg. W pozostałych narządach zaznacza się przebieg 4-fazowy, a mianowicie po maksymalnym wzroście po 3 godz. (prostate) lub 6 godz. (wątroba, nerki, śledzionę) następuje zmniejszenie stężenia po 1 dniu z ponownym wzrostem po 2 dniach i spadkiem stężenia do 8 dnia. Największe stężenia żelaza w ciągu 2 dni występowały w jelicie cienkim, krwi, wątrobie i śledzionie, a po 8 dniach we krwi, wątrobie i śledzionie; najniższe zaś w mięśniach i mózgu. Wyniki te są zgodne z danymi innych autorów (10, 32, 33). Wysokie

Tab. 1. Stężenie <sup>59</sup>Fe w narządach i tkankach

Narządy i tkanki	3 h					6 h					1 d				
	K	100	200	300	300L	K	100	200	300	300L	K	100	200	300	300L
Żołądek	48,8	47,2	76,2	149,3	315,5	40,5	45,9	52,7	132,0	70,3	25,5	34,2	17,9	21,8	132,1
J. cienkie	96,5	32,1	690,4	698,9	684,4	670,3	551,1	393,9	233,9	162,6	231,0	74,5	60,5	213,3	189,0
J. grube	58,9	40,9	8,9	27,7	14,5	133,5	119,0	81,2	61,5	55,4	33,2	41,5	35,4	121,3	107,5
Wątroba	32,4	39,2	29,7	317,2	144,1	365,6	180,7	87,3	49,3	29,2	104,3	91,2	80,9	191,9	114,8
Nerki	13,0	19,9	20,0	137,4	33,8	102,4	70,5	34,0	16,1	9,2	32,5	29,6	17,6	61,3	23,4
Śledziona	62,9	63,2	33,9	794,6	31,2	288,1	211,3	206,7	546,4	15,8	220,4	80,1	50,1	633,4	64,8
Płuca	10,5	104,4	33,0	158,3	42,1	63,8	49,0	26,0	27,8	7,1	28,2	20,8	12,4	111,7	17,9
Serce	13,0	21,0	18,1	83,2	31,6	87,0	46,6	20,3	25,9	11,0	26,5	25,4	20,3	105,5	22,4
M. łopatki	6,1	6,0	2,1	12,5	4,2	10,6	11,3	4,7	3,6	3,1	3,2	7,4	5,9	9,5	13,5
M. uda	2,9	5,1	2,9	10,8	4,2	9,4	8,9	6,0	5,4	0,4	2,8	6,0	5,6	11,2	3,8
Krew	26,8	46,2	62,6	389,3	107,1	173,5	114,6	72,6	111,3	15,9	101,7	38,9	21,2	408,4	45,3
Mózg	4,8	6,9	4,4	18,0	4,9	10,5	10,3	5,4	1,8	1,5	5,9	8,7	5,9	18,7	4,4
Jądra	9,0	13,4	6,7	21,4	7,8	40,2	36,8	13,9	15,0	6,9	12,7	14,7	10,1	16,8	12,4
Prostata	49,3	29,1	12,0	21,0	37,4	35,9	32,3	20,2	34,1	8,4	5,7	63,6	30,5	25,1	7,3

Objaśnienia: K — szczury kontrolne, 100, 200, 300 mg/kg m.c., 300L — 300 mg/kg — leczone.

stężenia żelaza w jelicie cienkim, wątrobie i śledzionie wiążą się z dużą łatwością jego wchłaniania i uwalniania przez te narządy (10, 33), zaś wysokie stężenia we krwi warunkuje duża zawartość żelaza w hemoglobinie erytrocytów (1, 3, 19). Stosunkowo niskie zaś stężenia żelaza w nerkach wiążą się z faktem, że pierwiastek ten wydalany jest głównie z kałem (6), a w znacznie mniejszych ilościach z moczem (34).

Zatrucie szczurów subletalnymi dawkami trichlorfonu wywoływało typowe dla związków fosforoorganicznych objawy chorobowe, które były wyraźnie zaznaczone u szczurów IV grupy (300 mg/kg). Charakteryzowały się niepokojem, nastroszeniem sierści, brakiem apetytu, apatią, ślinotokiem i biegunką, a niekiedy porażeniem kończyn. Objawy te pojawiały się już po ok. 30 min., a ustępowały po upływie 1,5 — 2,5 godz. U zwierząt leczonych przebieg zatrucia był łżejszy; u zwierząt tych po upływie 1,5 godz. nie stwierdzano objawów klinicznych.

Rozmieszczenie żelaza w badanych narządach i tkankach szczurów zatrutych trichlorfonem wykazywało pewne zróżnicowanie w porównaniu ze szczurami kontrolnymi.

U szczurów II grupy (100 mg/kg) rozmieszczenie żelaza ma przebieg fazowy jak u zwierząt kontrolnych z wyjątkiem prostaty. Okresy maksymalnych stężeń opóźnione są we krwi i prostatie, a przyspieszone w płucach, mięśniach i mózgu; w ciągu 4 dni stężenia żelaza są niższe niż u kontrolnych, po 2 dniach we wszystkich próbach z wyjątkiem prostaty różnice są istotne, zaś po 8 dniach stężenia są nieznacznie wyższe.

U szczurów III grupy (200 mg/kg) maksymalne stężenia żelaza stwierdzano po 3 godz. w żołądku i jelicie cienkim, po 6 godz. w jelicie grubym, a po 2 dniach w prostatie, w pozostałych narządach stężenia żelaza wzrastają do 8 dnia. Maksymalne stężenia są wyższe niż u zwierząt kontrolnych, różnice zwłaszcza po 2 i 8 dniach istotne.

U szczurów IV grupy (300 mg/kg) rozmieszczenie żelaza w żołądku i jelitach kształtuje się podobnie jak w grupach I, II i III, w wątrobie i nerkach podobnie jak w grupach I i II. Odmienny przebieg zaznacza się w płucach i sercu (4-fazowy), a w krwi i jądrach, wzrasta do 8 dnia. Najwyższe stężenia stwierdzano w śledzionie, jelicie cienkim i wątrobie; po 8 dniach stężenia we wszystkich narządach były istotnie wyższe aniżeli u zwierząt kontrolnych.

U szczurów V grupy (300 mg/kg — leczone) jedynie w jelicie cienkim po maksymalnym wzroście stężenia żelaza następowało jego zmniejszenie po 6 godz. z ponownym wzrostem po 1 dniu i malejącym stężeniem do 8 dnia. W żołądku i prostatie najwyższe stężenia występowały po 3 godz., w jelicie grubym po 1 dniu, a w pozostałych narządach po 4 dniach i były istotnie wyższe niż w grupie IV, zaś po 8 dniach były niższe aniżeli w grupie IV, a istotnie wyższe niż u szczurów kontrolnych.

Powyższe dane wskazują na różnorodne zmiany w gromadzeniu i eliminacji radiożelaza w narządach szczurów zatrutych subletalnymi dawkami trichlorfonu. Interpretacja tych zmian, jak też ich niejednokrotna korelacja z wielkością dawki trichlorfonu (np. grupy III lub IV) jest trudna z uwagi na wielokierunkowe, niezupełnie poznane zaburzenia metaboliczne przy zatruciach związkami fosforoorganicznymi. Niemniej jednak można przypuszczać, że czynnikami rzutującymi na te zmiany jest pobudzenie u zatrutych zwierząt układu nerwowego cholinergicznego (14, 36), osłabienie czynności tarczycy (17), zmiany aktywności enzymów hydrolitycznych i lipolitycznych (21, 25), aminotransferaz, fosfatyzacji i enzymów układu redoks (15, 37). Istotne znaczenie mogą mieć również zaburzenia w układzie erythropoetycznym, erytrocytarnym ze zmianami w poziomie Hb u zatrutych związkami fosforoorganicznymi zwierząt (23, 24, 29, 31). Nie można również pominąć zmian w składzie elektrolitów stężenia jonów Ca (24, 31) z uwagi na zależności pomiędzy jonami

szczurów zatrutych trichlorfonem (% $\times 10^{-3}$ )

K	2 d				4 d					8 d				
	100	200	300	300L	K	100	200	300	300L	K	100	200	300	300L
43,0	16,1	21,7	32,7	43,3	15,9	16,6	13,9	18,0	42,7	8,1	7,5	20,5	21,2	28,6
85,4	27,2	31,5	118,2	57,9	17,7	15,4	11,2	10,8	27,1	7,6	10,2	21,3	16,2	13,1
35,1	10,7	25,5	41,6	63,8	11,9	19,4	8,2	11,4	21,1	6,3	10,5	18,9	14,6	12,8
275,1	35,2	100,7	216,1	137,6	151,8	92,2	100,2	130,0	196,4	40,0	52,0	240,8	193,4	181,8
107,1	15,6	31,2	111,8	32,8	46,9	42,3	27,4	33,6	77,0	17,2	19,0	84,5	90,8	65,2
253,4	147,4	69,3	394,0	95,0	99,8	83,6	65,7	70,1	162,7	34,8	54,1	134,8	137,4	99,5
107,2	34,3	25,1	108,7	25,3	43,6	35,4	21,4	33,4	87,6	10,6	20,8	80,6	75,2	77,1
85,1	27,1	28,6	84,6	18,9	38,6	34,8	26,4	33,1	74,6	18,3	22,4	77,9	86,4	72,3
12,2	4,7	8,7	12,3	4,8	5,4	5,4	6,0	6,9	11,7	4,5	7,3	9,1	10,9	9,6
9,5	4,7	7,6	9,0	2,9	4,5	5,7	4,6	5,9	9,8	4,6	5,5	11,6	9,1	8,8
572,8	53,3	96,8	641,1	113,6	261,2	215,2	118,8	151,3	557,5	79,4	132,5	511,3	616,3	486,9
23,7	4,4	8,0	19,3	16,6	12,7	7,8	5,8	9,2	17,5	5,7	9,4	21,7	16,4	16,3
29,5	6,5	16,0	22,5	9,7	15,7	14,4	11,3	13,9	24,1	8,2	10,1	31,4	22,8	22,0
25,7	21,5	36,0	19,6	5,8	13,5	16,9	19,8	18,3	17,6	7,3	11,0	17,8	14,1	14,6

Ca i Fe (21). Ponadto wynikiem toksycznego działania trichlorfonu, a raczej jego metabolitu DDVP (2, 26) mogą być również zmiany morfologiczne i histochemiczne różnych narządów (15, 37). W przypadku ze zmian w rozmieszczeniu radiożelaza występujących u zwierząt zatrutych dawką 300 mg/kg nie leczonych (IV) i leczonych (V) należy uwzględnić przeciwinhibitoryczne działanie toksobidiny i antagonizujące działanie acetylocholino działanie atropiny (18).

Podsumowując przedstawione wyniki badań należy stwierdzić, że subletalne dozoładowe dawki trichlorfonu (100, 200, 300 mg/kg) powodują u szczurów zaburzenia regulacyjnego homeopatycznego mechanizmu przemiany żelaza w organizmie. Wyrażają się one po dawce 100 mg/kg przyspieszoną kumulacją żelaza z obniżonymi po 8 dniach stężeniami, a w pozostałych grupach zwolnioną kumulacją ze zwiększonymi stężeniami w badanych narządach.

## Piśmiennictwo

1. Agergaard N., Rotenberg S., Boisen S.: Nord. VetMed. 36 137, 1984.
2. Arihur B. W., Casida J. E.: J. agric. Fd. Chem. 5, 186, 1957.
3. Becker G., Huebers H., Rummel W.: Blut 38, 397, 1979.
4. Bohosiewicz M.: Toksykologia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa, 1979.
5. Chang J., Wescott R. B.: Am. J. vet. Res. 31, 2197, 1970.
6. Crichton R.: Trends Biochem. Sci. 9, 283, 1984.
7. Czauderna M., Samochocka K., Kwiatkowska J.: Int. J. appl. Radiat. Isotopes 35, 1117, 1984.
8. Dimitrijević B., Covačević V., Zivanov D., Terzić L.: Veterinaria, Saraj. 27, 549, 1978.
9. Fisher D. S., Price D. C.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 112, 223, 1963.
10. Forbes G. B., Reina J. C.: J. Nutr. 102, 647, 1972.
11. Furmaga S., Pinkiewicz E., Rubaj B., Uchacz S.: Medycyna wet. 27, 542, 1971.
12. Gahan J. B., Wilson H. G., Keller J. C., Smith C. N.: J. econ. Ent. 50, 789, 1957.
13. Hassal K. A.: The chemistry of pesticides. Their metabolism, mode of action and uses in crop protection. Verlag Chemie, 1982.
14. Kagan J. S.: Toksikologia fosforoorganicznych pesticidov. Medicina, Moskwa, 1977.
15. Kuleta Z.: Zeszyty Nauk. ART Olsztyn. Wet. 12, 1, 1980.
16. Kamyszek E.: Medycyna wet. 33, 354, 1977.
17. Kossakowski S.: Bull. vet. Inst. Puławy 22, 35, 1978.
18. Kossakowski S.: Medycyna wet. 30, 400 i 541, 1974.
19. Kroe D., Kinney T. D., Kaufman N., Klavins J. V.: Blood 21, 541, 1983.
20. Mahoney A. W., Reynolds K., Tso T. B., Hendriks D. G.: Nutr. Rep. Inter. 31, 973, 1985.
21. Mierzejewski T., Siwińska B., Kurek A.: Anals Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sect. DD 34, 105, 1981.

22. Nielsen F. H., Shuler T. R., Mcleod T. G., Zimmerman T. J.: J. Nutr. 114, 128, 1984.
23. Patyra S., Kurek A., Kossakowski S.: Medycyna wet. 30, 478, 1974.
24. Patyra S., Kossakowski S., Stryczek J.: Medycyna wet. 30, 10, 1974.
25. Peziol-Leszczynska M.: Bromat. Chem. Toks. 11, 7, 1978.
26. Reiner E., Krauthacker B., Simeon V., Skrinjaric-Spoljar M.: Biochem. Pharm. 24, 717, 1975.
27. Schafer S. G., Forth W.: J. Nutr. 114, 1989, 1984.
28. Schenhammer A. M., Cherian M. G.: J. Tox. Environ. Hith 12, 361, 1983.
29. Szubartowska E.: Folia Biol. (Kraków), 31, 407, 1983.
30. Staab D. B., Hodges R. E., Matalaf W. K., Smith J. L.: J. Nutr. 114, 840, 1984.
31. Smigielska J.: Medycyna wet. 33, 534, 1977.
32. Task groups of metal accumulation: Environ. Physiol. Biochem. 3, 65, 1973.
33. Underwood E. J.: Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, 1977.
34. Van Bruvaene R., Gerber G. B., Kirckman R.: Health Phys. 46, 1069, 1984.
35. Vacha J., Dungal J., Hala J., Znojil V.: Exp. Hematol. 11, 714, 1983.
36. Wiśniewski K., Szymański A., Panek R.: Bromat. Chem. Toks. 11, 7, 1978.
37. Wójcik J.: Roczniki PZH 36, 383, 1975.
38. Zemel M. B., Bidari M. T.: J. Fd Sci. 48, 567, 1983.

Adres autora: prof. dr hab. Stefan Kossakowski, ul. Wojska Polskiego 5/3, 24-100 Puławy

### Коссаковский С., Жук М. — Влияние сублетальных доз трихлорфона на размещение железа ( $^{59}\text{Fe}$ ) в животном организме

Исследования провели на 180 крысах породы Вистар, разделенных на 5 групп: I — контрольные животные, II — отравленные внутрижелудочно трихлорфеном в дозе 100 мг/кг, III — 200 мг/кг, IV — 300 мг/кг и V — в дозе 300 мг/кг, леченные атропином и токсобидином. Через час после отравления крысам ввели внутрижелудочно  $^{59}\text{FeCl}_3$  в количества 0,5 см<sup>3</sup> с радиоактивностью 8,33 кВб. Радиометрические исследования желудка, тонкой и толстой кишки, печени, почек, селезенки, легких, сердца, мышц, крови, мозга, ядер и простаты проводили через 3 и 6 часов, а также через 1, 2, 4 и 8 суток после отравления.

Результаты показывают, что размещение железа у контрольных крыс протекает в двух фазах в органах. Максимальная концентрация в которых отмечается через 3 ч. — желудок, через 6 ч. — тонкая и толстая кишки, сердце и ядра, а также через 2 сутком — легкие, мышцы, кровь и мозг либо в 4 фазах после максимального роста через 3 ч. (простата), 6 ч. (печень, почки, селезенка) происходит уменьшение концентрации до 1 суток с ростом заново через 2 суток и понижением концентрации до 8 суток. У крыс, отравленных трихлорфеном, появляются расстройства регуляторного гомеопатического механизма обмена железа.

Они отличаются во II группе (100 мг/кг) ускоренной кумуляцией железа с пониженными через 3 дней концентрациями, а в остальных группах замедленной кумуляцией с увеличенными концентрациями в исследуемых органах: в группе леченых крыс (300 мг/кг) изменения выражены слабее чем у нелеченых.

Kossakowski S., Żuk M. — The effect of sublethal doses of trichlorophon on the distribution of  $^{59}\text{Fe}$  in an animal organism

The examinations were carried out on 180 rats, Wistar breed, allotted into 5 groups: I — control animals, II — animals poisoned with trichlorophon in a dose of 100 mg/kg, III — poisoned with 200 mg/kg, IV — poisoned with 300 mg/kg, and V — poisoned with 300 mg/kg and cured with atropine and tobobidin. After 1 hour since poisoning the rats were given  $^{59}\text{Fe}$  intragastrically in the amount of 0.5 ml, radioactivity = 8.33 kBq. The radiometric examinations of the stomach, small and large intestines, the liver,

kidneys, lungs, heart, muscles, blood, brain, testes and prostate were made after 3 and 6 hours, and 1, 2, 4 and 8 days since poisoning.

The findings indicated that the distribution of iron in the internal organs of normal rats went in two phases in which the maximal concentration of Fe took place after 3 hours in the stomach, after 6 hours in the small and large intestines, in the heart and testes, and after two days in the lungs, muscles, blood and brain. In the prostate, liver, kidneys, and spleen four phases could be noted: a maximal increase after 3 hours (prostate) or 6 hours (liver, kidneys and spleen), then a diminished level of Fe up to one day, and a reincrease after 2 days and a drop of the level of Fe in 8 days. In the rats poisoned with trichlorophon some disturbances appeared in the regulatory homeopatic mechanism of Fe metabolism. They were characterized in the group II by quicker iron accumulation with diminished concentrations after 8 days, and in the other groups by retarded cumulation with the increased levels in the organs. In the group of animals cured the changes were less pronounced than those in other groups.

ANTONINA Sopińska

## Odpowiedź immunologiczna limfocytów karpi na podanie antygeny glikopeptydowego erytrocytów owcy\*

Zakład Chorób Ryb Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Poznanie i praktyczne zastosowanie metod badania odpowiedzi obronnej limfocytów, stanowi jeden z najważniejszych problemów współczesnej immunologii ryb. Od rozwoju tego kierunku badań zależy w dużym stopniu możliwość ingerencji w procesy immunologiczne i skuteczna kontrola zjawisk patologicznych u tych zwierząt. W wykształconym układzie immunologicznym jedną z głównych funkcji pełnią limfocyty — komórki dające początek komórkom efektorowym odpowiedzi humoralnej (limfocyty B) i odpowiedzi komórkowej (limfocyty T). Określenie testem rozetkowym E poziomu limfocytów T we krwi lub tkankach limfatycznych ludzi i zwierząt jest jedną z podstawowych metod oceny stanu odporności badanego organizmu. Test ten pozwala na wykrycie w błonie cytoplazmatycznej limfocytów T receptorów dla antygeny glikopeptydowego erytrocytów owcy. Limfocyty T mają zdolność wiązania krwinek czerwonych owcy i tworzenia figur określanych jako rozety. Technika ta znalazła szerokie zastosowanie w medycynie ludzkiej, natomiast w badaniach stanu odpornościowego u ryb wymaga jeszcze odpowiednich przystosowań. Dotychczasowe nieliczne badania wykonane u ryb łososiowatych i karpowatych poruszają jedynie częściowo zagadnienia z tego zakresu (2, 3, 7).

Celem pracy było określenie poziomu lim-

focytów T metodą rozetową we krwi karpi nieimmunizowanych i immunizowanych erytrocytami owcy w zależności od uzyskanego w surowicy miana przeciwciał oraz czasu upływającego od immunizacji.

### Materiał i metody

Badania wykonano u karpi 2-letnich ( $K_2$ ) o masie 250—300 g. Ryby przetrzymywano w akwariach z wodą o temperaturze 18°C—20°C. Karpie karmiono granulatem dla ryb 2 razy w tygodniu. Ryby podzielono na dwie grupy 1 — kontrolną, 2 — doświadczalną, po 10 karpi w każdej.

Do immunizacji ryb użyto antygeny, który stanowiły czerwone krwinki barana, konserwowane w płynie Alsevera. Przed użyciem krwinki płukano 3-krotnie w PBS. Do iniekcji użyto stężenia  $10^8$  krwinek w 1 ml. Antygen podawano karpom domięśniowo w ilości 1 ml. W celu uzyskania wysokiego miana przeciwciał w surowicy karpi immunizowanych po okresie 7 dni iniekcję tę powtórzono. Rybom kontrolnym każdorazowo podano 1 ml PBS.

Test rozetkowy wykonywano u karpi po upływie 2 i 4 tygodni oraz 2 i 4 miesięcy od wykonania powtórnej iniekcji antygeny. Limfocyty izolowano z krwi obwodowej karpi w gradiencie Ficoll-uropolina. Zawiesinę komórek przygotowywano według Rijckersa i Van Muiswinkela (5). Test rozetkowy wykonywano według metody Zaalberga (8) i Biozzi i in. (1). Do testu użyto równych objętości limfocytów karpia o stężeniu  $4 \times 10^6$ /ml oraz krwinek baranich o stężeniu  $24 \times 10^6$ /ml w podłożu Hanksa z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i antybiotyków (100 j.m. penicyliny i 0,1 mg streptomycyny/ml). Mieszaninę tę inkubowano przez okres 24 godzin w temperaturze 4°C. Następnie po dokładnym wymieszaniu wirowano przy 500 obr./min w ciągu 10 minut w temperaturze pokojowej. Po odlaniu płynu znad osadu w

\* Praca finansowana przez Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie