

Tab. 3. Kształtowanie się parametrów biochemicznych u piskląt ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)

Grupa	Białko całkowite (g/dl)	AIAT (IU/l)	AspAT (IU/l)	BUN (mg/dl)	Kwas moczowy (mg/dl)	Fosfataza alkaliczna (IU/l)
I	1.42 $\pm$ 0.40	13,4 $\pm$ 2,5	154,2 $\pm$ 16,8*	8,11 $\pm$ 1,61*	4,04 $\pm$ 1,86**	1188 $\pm$ 378,2
II	1.78 $\pm$ 0,41	21,4 $\pm$ 5,1*	195,4 $\pm$ 42,9	10,55 $\pm$ 3,81	7,66 $\pm$ 4,87	1561 $\pm$ 735,9
III	1.61 $\pm$ 0,46	15,3 $\pm$ 4,8	176,4 $\pm$ 28,9	10,22 $\pm$ 2,43	7,72 $\pm$ 4,79	1358 $\pm$ 462,5
V Kontrola	1,53 $\pm$ 0,38	14,9 $\pm$ 5,2	182,7 $\pm$ 31,8	12,0 $\pm$ 3,26	7,88 $\pm$ 1,93	1338 $\pm$ 529,2

Objaśnienia: jak w tab. 1.

W żadnej grupie nie obserwowano działania teratogenne. Verrett i wsp. (18) oraz Vesely i wsp. (19) uważają odkształcenia morfologiczne za ważny element próby biologicznej na zarodkach. Nie ma możliwości sprawdzenia powyższą metodą działania onkogenne. Tokosova (15) obserwowała po wirginiamycynie wzrost zachorowań na chorobę Mareka u kurcząt co wymaga osobnych badań.

Badanie histopatologiczne wątroby i nerek wylężonych piskląt nie ujawniło uszkodzeń patomorfologicznych.

Na podstawie przeprowadzonej próby biologicznej na zarodkach toksyczność badanych stymulatorów wzrostu można przedstawić w następującej kolejności: awoparcina, flawomycyna i wirginiamycyna.

Piśmiennictwo

1. Allen P. C.: Avian Dis. 36, 852, 1992.
2. Atef H., Shalaby A. A., Khafagy A., Abo-Noraga A.: Dt. tierarztl. Wschr. 96, 285, 1989.
3. Borzemska W., Kosowska G., Malec H., Piusiński W., Niezgoda J., Malec L.: Medycyna Wet. 47, 366, 1991.
4. Dodatki paszowe w żywieniu drobiu. Praca zbiorowa, PAN Jabłonna, 20, 1994.
5. Harvey R. B., Kubena L. F., Nagi S. A., Gyimah J., Corrier D. E., Panigrahy B., Philips T. D.: Avian Dis. 31, 787, 1987.
6. ISCC Espert Panel of Enzymes – Part 3: J. clinical chemistry Clin. Biochem. 24, 481, 1986.
7. Kadłubowski R., Błaszowska J.: Wiad. parazyt. 38, 31, 1992.
8. Kirchgesner M., Roth F. X.: Arch. Geflugelk. 46, 36, 1982.
9. Lesson S., Summers J. D., Ferguson A. E.: Can. J. Anim. Sci. 60, 275, 1980.
10. Malec H.: Diagram czasu wylęgu piskląt kurzych przy zakłóceniu naturalnej synchronizacji klucia. Etologia Drobiu wyd. IZ Kraków, 1988.
11. Malec H., Borzemska W., Malec L.: Roczn. Nauk roln. B, 106, 93, 1990.
12. Mazurczak J., Harenza T.: Medycyna Wet. 32, 577, 1977.
13. Tokosova M.: Vet. Med. Praga 34, 51, 1989.
14. Tokosova M.: Vet. Med. Praga 34, 107, 1989.
15. Tokosova M.: Vet. Med. Praga 35, 105, 1990.
16. Tuller R.: Arch. Geflugelk. 33, 351, 1969.
17. Turek F.: Wien. tierarztl. Machr. 60, 95, 1973.
18. Verrett M. J., Scott W. F., Reynaldo E. F., Alterman E. K., Thomas C. A.: Toxic. appl. Pharmac. 56, 265, 1980.
19. Vesely D., Vesela D.: Vet. Med. Praga 36, 175, 1991.

Adres autora: prof. dr hab. Wanda Borzemska, ul. Perzyńskiego 8 m. 18, 01-872 Warszawa

ANTONINA Sopińska, HANNA Lutnicka, LESZEK Guz

Wpływ permetryny na układ odpornościowy karpi

Katedra Chorób Ryb i Biologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

S u m m a r y

The influence of permethrin on the immune system of the carp

The studies were done on 90 carps K₁ of a 60-80 g weight exposed to permethrin at a concentration of 0.3 µg/L of water for 28 days (group 1) or 11 µg/L for 14 days (group 2). Immunological examinations were done with the blood of fish in group 1 after 4, 7, 14, 21, and 28 days, and in group 2 after 4, 7 and 14 days after the use of permethrin. Immunological examinations were performed after 7 and 14 days from the end of permethrin action. Group 3, untreated, served as a control.

It was found that permethrin at a concentration of 0.3 µg/L significantly decreased metabolic activity of neutrocytes and the level of blood lysozyme after 28 days of exposure. Permethrin at a concentration of 11 µg/L caused death of about 50% of the examined individuals after 14 days exposure. Granulocytosis, monocytosis and unphysiological nuclear division in neutrocytes and lymphocytes were noted. During the whole period a significantly de-

creased metabolic activity of neutrocytes and blood plasma lysozyme level were observed. After transport of the fish into clean water, the examined parameters returned to physiological value in group 1 after 14 days, while in group 2 all the parameters had lower values than those in the control group.

Syntetyczne pyretroidy odznaczają się dużą siłą toksycznego oddziaływania na większość organizmów żywych. Spośród wielu należących do tej grup pestycydów na szczególną uwagę zasługuje permetryna, szeroko stosowana jako środek owadobójczy, która podczas opryskiwania pól dostaje się do wód powierzchniowych. Jej toksyczne działanie na ryby, a także inne organizmy zamieszkujące środowisko wodne wynika zarówno z bezpośredniego oddziaływania substancji macierzystej, jak również produktów jej degradacji, które okazały się bardziej toksyczne dla ryb niż sama permetryna (6, 16). Dlatego też, pomimo prac wskazujących na niewielką trwałość permetryny jako insektycydu (16) należy się spodziewać, że w środowisku wodnym wystąpi jej przedłużone działanie poprzez

toksyczne produkty degradacji, a także poprzez synergistyczne oddziaływanie permetryny ze swymi produktami biotransformacji (16). Szczegółowo poznano przemiany tego insektycydu u niektórych ptaków i ssaków (3, 5) oraz określono jego toksyczność dla tych zwierząt. Poznano również efekt supresyjnego działania permetryny na układ odpornościowy zwierząt i ludzi (4, 11, 12, 20, 22, 23).

Badania nad wpływem permetryny na organizm ryb należą do bardzo nielicznych (14). Dotyczą one głównie wpływu tego związku na podstawowe parametry hematologiczne (1). Dlatego też celem pracy było poznanie wpływu permetryny na obraz białokrwińkowy karpia oraz na aktywność obronną tych krwinek.

Materiał i metody

Badania wykonano na 80 karpach K_J o masie 60-80 g. Ryby poddano działaniu insektycydu Ambusz 25 EC produkcji Zakładów Chemicznych „Organika-Azot” w Jaworznie, który zawiera 25% permetryny. Dawki czystej permetryny w zastosowanym insektycydzie wynosiły: 0,3 µg/l i 11 µg/l wody. Obliczono je na podstawie danych piśmiennictwa według których podczas jednorazowego opryskiwania pół permetryną w ilości 17,5 g/ha, do wód powierzchniowych leżących w odległości 1-1,4 km od miejsca oprysku przenika do wody od 0,07 do 2,5 µg/l wody tego związku (9). Po zastosowaniu powszechnie używanej w Polsce dawki permetryny wynoszącej 75 g/ha należy przypuszczać, że zawartość tego preparatu w wodach powierzchniowych wynosić powinna odpowiednio 0,3 µg/l i 11 µg/l wody. Przyjęty w doświadczeniu czas działania preparatu na ryby, 14 i 28 dni, wynikał z braku dokładnych danych utrzymywania się preparatu w wodzie. Na podstawie danych uzyskanych z „Monitoringu pestycydów” wiadomo, że czas rozpadu permetryny w glebie do produktów nieszkodliwych trwa do 1 miesiąca (24). Ryby podzielono na 3 grupy doświadczalne: grupę 1, stanowiło 30 ryb, które poddano działaniu permetryny w dawce 0,3 µg/l wody przez okres 28 dni; grupę 2, stanowiło 30 ryb, które poddano działaniu permetryny w dawce 11,0 µg/l wody przez okres 14 dni; grupę 3, stanowiło 20 ryb kontrolnych, które nie zostały poddane działaniu permetryny. Zarówno w grupie 1 jak i 2 co drugi dzień woda była zmieniana i każdorazowo był dodawany świeży roztwór permetryny w poszczególnych stosowanych w pracy dawkach. Po zakończeniu działania permetryny na organizm ryb karpie przeniesiono do wody czystej. Ryby podczas całego okresu doświadczenia były poddane ciągłej obserwacji klinicznej. U ryb śniętych wykonano badanie sekcyjne. Krew do badań immunologicznych od ryb w grupie 1 pobierano po 4, 7, 14, 21, 28 dniach a w grupie 2 po 4, 7 i 14 dniach od zadania permetryny. Po zakończeniu działania permetryny, u ryb obu grup doświad-

czalnych kontynuowano badania immunologiczne pobierając krew po 7 i 14 dniach. Od ryb grupy kontrolnej pobierano krew 3-krotnie, w 4, 14 i 28 dniu od rozpoczęcia badań. W pobranej krwi od ryb doświadczalnych i kontrolnych wykonywano oznaczenia liczby leukocytów i neutrocytów w 1 µl krwi wg ogólnie przyjętych metod. Rozmazy krwi barwione metodą May-Grunwalda, służyły zarówno do obliczania liczby neutrocytów, jak również do obserwacji zmian zachodzących w obrazie krwi. Wykonywano także oznaczanie aktywności metabolicznej neutrocytów testem NBT (19), poziomu lizozymu w surowicy krwi metodą spektrofotometryczną (17) oraz rozdział elektroforezyczny białek surowicy krwi. Zastosowano elektroforezę dyskową w żelu poliakrylamidowym wg metody opisanej przez Laemliego (10). Użyto 10% żelu o pH = 8,9 oraz buforu elektrodowego Tris-glicyna 0,192 M o pH = 8,3. Rozdział prowadzono w układzie z SDS stosując natężenie prądu równe 30 mA. Do oznaczenia mas cząsteczkowych uzyskanych białek użyto standardów f-my Sigma (MW-SDS-200). Żele barwiono roztworem Coomassie Brilliant Blue R-250 po czym odbarwiono mieszaniną kwas octowy : metanol : woda w stosunku 1 : 4 : 5. Analizę profilów białkowych przeprowadzono na densytometrze GS 300 f-my Hoefer.

Uzyskane wyniki liczbowe poddano analizie statystycznej testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

W 1 grupie doświadczalnej (0,3 µg permetryny/l) wszystkie ryby przeżyły okres doświadczenia podczas którego nie wykazywały objawów nieprawidłowego zachowania. W 2 grupie doświadczalnej (11 µg permetryny/l) bezpośrednio po podaniu permetryny ryby zachowywały się nieprawidłowo, wykazywały wyraźne zaburzenia równowagi a następnie opadły na dno gdzie leżały na boku (20 ryb). Obserwowano również zwolnione ruchy wieczek skrzelowych. W 14 dniu działania permetryny usnęło 8 karp spośród 30. W związku z tym zakończono dalsze podawanie środka toksycznego. Po przeniesieniu karp do wody czystej usnęły dalsze 4 sztuki. Pozostałe ryby nadal leżały na dnie akwarium. Do końca obserwacji (14 dni po zakończeniu działania permetryny) liczba ryb nie uległa zmniejszeniu, wystąpił u nich powolny powrót do prawidłowej pozycji. Do końca doświadczenia obserwowano jednak zwolnione ruchy wieczek skrzelowych i osłabioną reakcję na bodźce zewnętrzne.

U ryb śniętych podczas badania sekcyjnego stwierdzono przekrwione skrzela koloru ciemnoczerwonego, natomiast w narządach wewnętrznych powiększoną wątrobę o kruchej konsystencji koloru gliniasto-zielonkawego z nadmiernie wypeł-

Tab. 1. Wartości badanych wskaźników odporności nieswoistej karpia podczas i po działaniu permetryny ($\bar{x} \pm s$) w dawce 0,3 µg/l wody (grupa 1) i 11 µg/l wody (grupa 2)

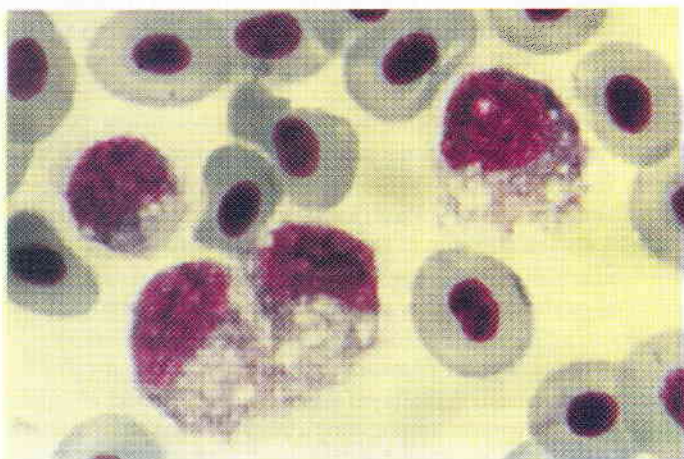
Czas (dni)		Leukocyty $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$				Neutrocyty $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$				NBT (μg)				Lizozym ($\mu\text{g/ml}$)			
		grupa 1		grupa 2		grupa 1		grupa 2		grupa 1		grupa 2		grupa 1		grupa 2	
działania permetryny	4	44,60	3,6	32,50*	3,6	4,62	0,8	8,78*	1,4	18,50*	1,4	14,56*	1,8	0,57	0,04	1,11*	0,10
	7	47,80	3,2	22,50*	1,8	4,46	0,6	6,47*	0,8	35,90	2,5	15,90*	1,6	0,72*	0,03	0,33*	0,06
	14	42,50	3,5	15,25*	2,6	5,01	1,1	5,83	0,3	41,00*	1,8	17,90*	2,3	0,70*	0,05	0,50*	0,05
	21	35,75	6,7			4,20	0,5			55,15*	2,4			0,45	0,07		
	28	42,50	4,2			1,01*	0,4			17,80*	2,6			0,35	0,06		
po działaniu permetryny	7	46,75	3,8	17,50*	2,4	2,33*	0,4	1,80*	1,1	42,50*	3,6	7,60*	1,2	0,36*	0,04	0,20*	0,04
	14	37,50	2,2	18,50*	2,6	1,82*	0,3	1,70*	0,2	48,40*	4,4	8,03*	1,5	0,23*	0,02	0,33*	0,02
Kontrola		44,90 4,6				4,50 0,8				32,60 2,8				0,52 0,05			

Objaśnienie: * – różnica istotna przy $p < 0,05$

nionym woreczkiem żółciowym oraz znacznie powiększoną śledzionę i nerki.

Wyniki badań immunologicznych podczas i po działaniu permetyryny przedstawia tab. 1.

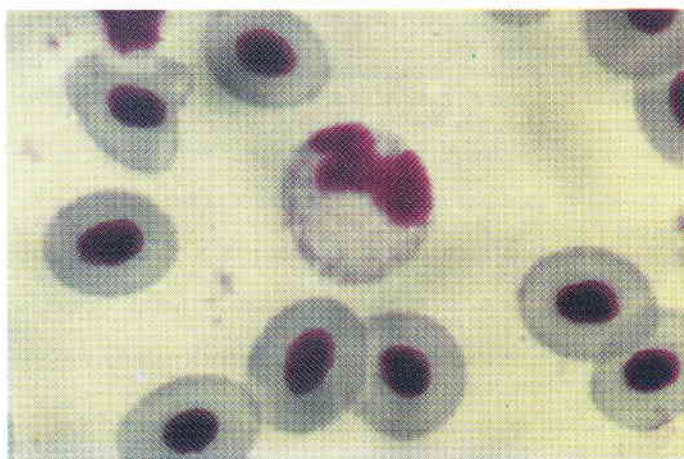
W 1 grupie doświadczalnej po podaniu permetyryny w dawce 0,3 $\mu\text{g/l}$ wody nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w liczbie leukocytów w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 1). Natomiast u ryb w 2 grupie doświadczalnej obserwowano począwszy od 4 dnia badania statystycznie istotnie niższe wartości liczby leukocytów w porównaniu z rybami grupy kontrolnej. Podobne zmniejszenie liczby leukocytów obserwowano po długotrwałym działaniu permetyryny u ssaków (13, 18).



Ryc. 1. Monocyty z cytoplazmą silnie zwakuolizowaną, jądrami powiększonymi o zatartych granicach z rozrzedzoną chromatyną



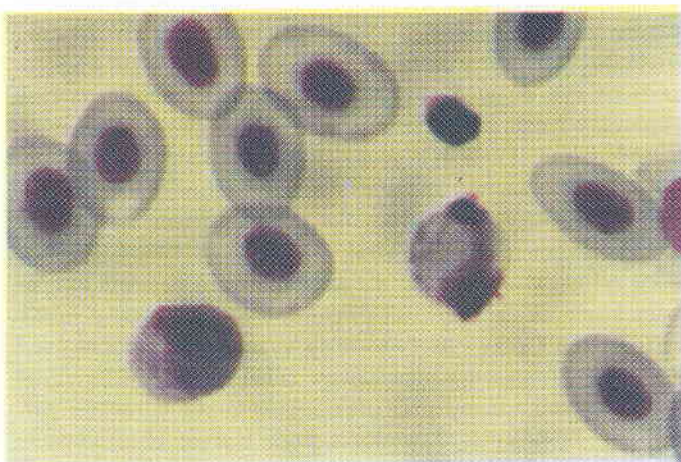
Ryc. 2. Monocyty ze zwyrodnieniem wodniczkowym jądra



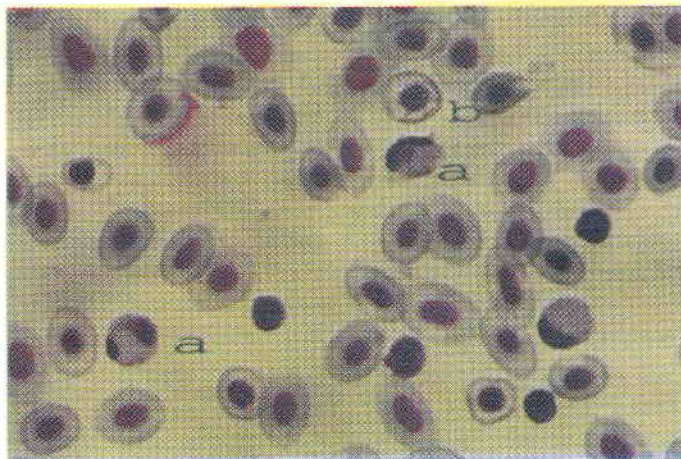
Ryc. 3. Neutrocyty z nietypowym jądrem wielopłatowym

Liczba neutrocytów u ryb grupy 1 uległa statystycznie istotnemu obniżeniu w 28 dniu działania permetyryny na organizm ryb i utrzymywała się po przeniesieniu ryb do wody czystej. Zarówno w 7 jak i 14 dniu po ekspozycji ryb na permetyrynę nie obserwowano powrotu do normy. U ryb grupy 2 we wszystkich okresach badania wystąpił statystycznie istotny wzrost liczby neutrocytów w 1 μl krwi.

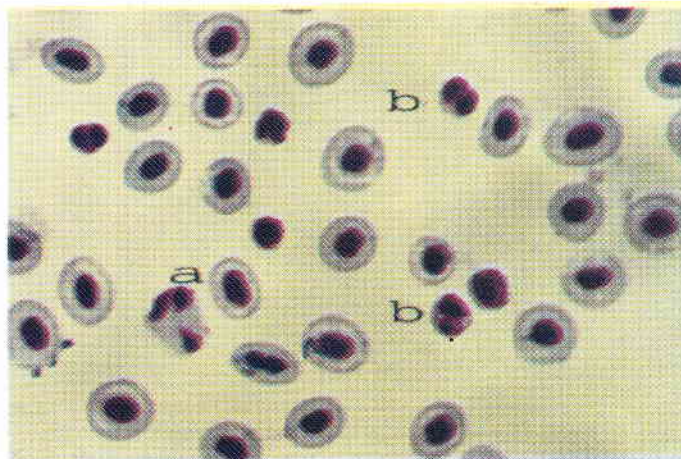
W obrazie krwi u ryb grupy 2 obserwowanym na wybarwionych rozmazach stwierdzano dużą liczbę granulocytów i monocytów. Liczne monocyty były znacznie powiększone z cytoplazmą silnie zwakuolizowaną i jądrami o zatartych granicach z rozrzedzoną chromatyną, niekiedy ze zwyrodnieniem



Ryc. 4. Neutrocyty ze zmianami degeneracyjnymi jądra



Ryc. 5. a – promielocyty ze zmianami degeneracyjnymi jądra, b – erytrocyt z cytoplazmą niedobarwliwą i obecnością wakuoli



Ryc. 6. a – neutrocyt z nietypowym jądrem wielopłatowym, b – limfocyty z jądrami podzielonymi

wodniczkowym (ryc. 1, 2). Wśród granulocytów (promiocyto-
cytów i neutrocytów) obserwowano krwinki z nietypowymi,
wielopłatowymi jądrami lub z jądrami w znacznym stopniu
ulegającymi rozpadowi (ryc. 3-6). Obserwowano również duży
procent limfocytów z jądrem podzielonym (ryc. 6). Niektórzy
autorzy obserwowali wzmożone podziały komórkowe w ho-
dowli limfocytów ludzkich poddanych działaniu pyretroidów
(2, 21). Także u niektórych roślin (groch, cebula) poddanych
działaniu tych związków obserwowano również zwiększoną
liczbę komórek dzielących się w tkance twórczej stożków
wzrostu (7, 8).

U ryb 1 grupy doświadczalnej w 14 i 21 dniu działania
permetryny aktywność metaboliczna neutrocytów była statys-
tycznie istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej. W 28 dniu
działania permetryny nastąpił spadek tej wartości, zaś po prze-
niesieniu ryb do wody czystej aktywność metaboliczna tych
komórek wzrosła statystycznie istotnie w porównaniu z grupą
kontrolną (tab. 1). U ryb grupy 2 podczas całego okresu do-
świadczenia obserwowano statystycznie istotny spadek aktyw-
ności metabolicznej neutrocytów. Ilość formazanu NBT w
komórkach zmniejszała się wraz z czasem obserwacji. Przenie-
szenie ryb do wody czystej nie spowodowało powrotu aktyw-
ności komórek do wartości prawidłowych. Uzyskane niskie
wartości NBT przy obserwowanej wysokiej granulocytozie i
monocytozie sugerują niesprawny układ enzymatyczny tych
komórek, uszkodzony prawdopodobnie przez działanie per-
metryny. Obniżenie aktywności fagocytarnej obserwowano
również u owiec po 5 tygodniowym stosowaniu pyretroi-
dów (13).

Poziom lizozymu w surowicy krwi był u ryb grupy 1, w
7 i 14 dniu działania permetryny statystycznie istotnie wyższy
niż w grupie kontrolnej. Po przeniesieniu ryb do wody czystej
obserwowano jego spadek (tab. 1). U ryb grupy 2 z wyjątkiem
pierwszego terminu badań (4 dni) w którym wystąpił statys-
tycznie istotny wzrost poziomu lizozymu, w następnych okre-
sach badań każdorazowo stwierdzano statystycznie istotnie
niższą wartość lizozymu niż w grupie kontrolnej.

Analiza profilów białkowych surowicy krwi wykazała, że
w 2 grupie ryb stwierdzono w 7 dniu doświadczenia obecność
dodatkowego białka (ryc. 7) o masie cząsteczkowej 40 431
Da, które utrzymywało się do końca doświadczenia. Uzyskany

wynik jest trudny do interpretacji, wymagałby bowiem dal-
szych dokładnych badań biochemicznych.

Wnioski

1. Obecność permetryny w wodach powierzchniowych wy-
nikająca ze stosowania jej podczas opryskiwania pól, w jej
najniższym stężeniu (0,3 µg/l) wykazuje działanie immunosu-
presyjne dopiero po 28 dniowym okresie oddziaływania, zaś
w stężeniu najwyższym (11 µg/l) już po 4 dniu działania.

2. Reakcja układu krwiotwórczego ryb poddanych działaniu
permetryny objawia się nasiloną neutrofilią i monocytozą oraz
wzmocnionymi podziałami jąder tych komórek. Jednakże niska
aktywność metaboliczna komórek fagocytykujących stwierdzana
testem NBT oraz obniżony poziom lizozymu świadczą przy-
puszczalnie o uszkadzającym działaniu permetryny na układ
enzymatyczny tych krwinek.

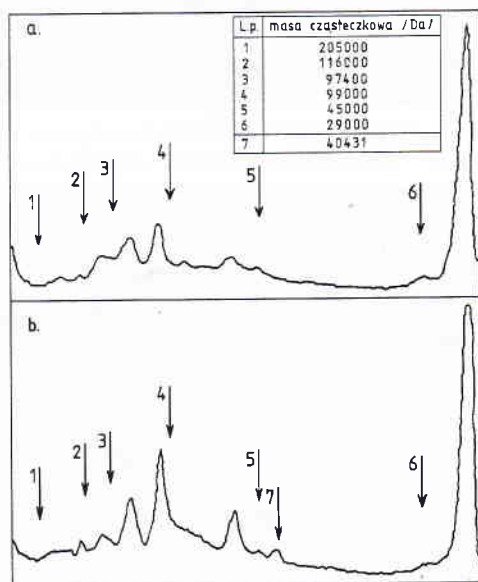
3. Po ustąpieniu skażenia wywołanego obecnością perme-
tryny, czas powrotu ryb do stanu normalnej aktywności ob-
ronnej jest uzależniony od stężenia tego preparatu w wodzie.
Przy niskim stężeniu (0,3 µg/l) występuje on już po 7 dniach,
zaś przy dużym stężeniu (11 µg/l) nie obserwuje się go nawet
po 14 dniach. Należy przypuszczać, że podobna reakcja układu
obronnego ryb występuje w szkodnym środowisku naturalnym,
w którym występują zbliżone zakresy stężeń permetryny.

4. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że u ryb ży-
jących w środowisku naturalnym skażonym permetryną wskutek
osłabienia aktywności immunologicznej wzrasta stan zagro-
żenia i podatność na choroby.

Piśmiennictwo

1. Amer S. M., Farah O. R., Mohamed F. J.: Ann. Agricult. Sci. 32, 479, 1987.
2. Carbonell E., Puig M., Xamena N., Creus A., Marcos R.: Toxicol Lett. 48, 45, 1989.
3. Casida J. E., Gammon D. W., Glickman A. H., Lawrence L.: A. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 431, 1983.
4. Desi J., Dobronyl, Varga L.: Ecotoxicol. Environ. Safety 12, 220, 1986.
5. Gwiazda M.: Pesticidy, Sympozjum, Pyretroidy, 130, 1989.
6. Hill J. R.: Pesticide Sci. 27, 429, 1989.
7. Klein M.: Wpływ insektycydu Ambus 25EC (permetryna) na procesy mitozy i mikrosporogenezy u *Pisum sativum* L. Praca hab. AR Kraków, Zesz. Nauk. AR w Krakowie, 1990.
8. Klein M.: Genetica-Polonica, 31, 107, 1990.
9. Kreutzweiser D. P., Wood G. A.: Pesticide Sci. 33, 35, 1991.
10. Laemli V. K.: Nature 227, 680, 1970.
11. Lukowicz-Ratajczak J., Krechniak J.: Bromat. 24, 57, 1991.
12. Lukowicz-Ratajczak J., Krechniak J.: Acta Pol. Toxicol. 1, 104, 1993.
13. Mikula J., Pistl J., Kacmar: Acta Vet Brno 61, 57, 1992.
14. Reddy P. M., Bashamohideen M.: Acta Hydrochim. Hydrobiol. 17, 101, 1989.
15. Różański L.: Wiad. Chem. 39, 427, 1983.
16. Różański L.: Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku. PWRiL, Warszawa 1992.
17. Sankaran K., Shanto G.: Indian Biochem. Biophys. 9, 162, 1972.
18. Shakoori A. R., Aziz F., Alam J., Ali S. S.: Pakistan J Zool. 22, 289, 1990.
19. Sopińska A.: Medycyna Wet. 41, 738, 1985.
20. Stalzer K. J., Gormon M. A.: Res. Com. Chem. Pathol. Pharm. 46, 137, 1984.
21. Surrales J., Carbonell E., Puig M., Xamena N., Creus A., Marcos R.: Toxicol Lett. 54, 151, 1990.
22. Tamang R., Iha G. J., Gupta M. K., Chauhan H. V. S., Tiwary B. K.: Vet. Immunol. Immunopath. 3-4, 299, 1988.
23. Qadri S. S. H., Jabeen K., Mahboob M., Mustafa M.: J. Appl. Toxicol. 7, 36, 1987.
24. Zelechowska A., Makowski Z.: Monitoring pestycydów w wodach powierzchniowych. Państw. Insp. Ochrony Środ., Warszawa 1993.

Adres autora: dr Antonina Sopińska, ul. Królowej Jadwigi 6 m. 15
20-282 Lublin



Ryc. 7. Profile białkowe surowicy krwi karpi po działaniu permetryny w dawce 11 µg/l wody uzyskane w 4 dniu (a) i 7 dniu (b) doświadczenia