

ANTONINA Sopińska, LESZEK GUZ

Wpływ permetryny na aktywność fagocytów karpia

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

Sopińska A., Guz L.

Influence of permethrin on phagocytic activity of carp

Summary

Synthetic pyrethroids commonly used for plant protection often contaminate superficial water sources and therefore they become a health threat for fish. The objective of the studies was to evaluate the influence of permethrin present in water on phagocytic activity of neutrocytes macrophage/monocytes of the main kidneys and circulatory blood of the carp. The fish of about 90 ± 10 g were exposed for 96 h to permethrin at a concentration of 0.03 and 1.1 $\mu\text{g/L}$ in the insecticide Ambusz 25EC. The percentage of phagocytic cells (KF) among neutrocytes and macrophages, the value of phagocytic index (IF) and metabolic activity of phagocytes (NBT) were determined in the kidneys and in blood of 6 individuals from each experimental group at 1, 3, 4, 7 and 14 days after the end of the experiment. The same parameters have been evaluated three times for controls at day 1, 7 and 14 of the experiment.

The 96-hour exposure of the carp to permethrin during the experiment induced leukopenia and neutrocytosis and lowered the percentage of the kidney cells (KF) active in phagocytosis. Compared to control, at day 7 the value of phagocytic index in the fish under experimentation also decreased.

U ryb występują różnego rodzaju komórki chroniące organizm przed ciałami obcymi. Komórki te są obecne w krwi, jamie otrzewnowej i tkankach krwiotwórczych. Ich liczba, rodzaj i funkcje są przedmiotem badań przy zastosowaniu metod tradycyjnych – mikroskopowych (1, 3, 8) jak i nowoczesnych z zastosowaniem chemiluminescencji (9, 22) i cytometrii przepływowej (24, 26, 27).

Nerki głowowe są podstawowym narządem krwiotwórczym, który zawiera w porównaniu z innymi narządami największą liczbę komórek fagocytujących (3, 13). Do komórek tych należą neutrocyty (promielocyty, metamielocyty, neutrocyty pałeczkowate i segmentowane) oraz makrofagi. Neutrocyty dominują ilościowo wśród komórek żernych zarówno we krwi obwodowej jak i nerce głowowej. Należą do komórek szybkiego reagowania, tworząc jeden z kluczowych punktów w mechanizmie obrony przeciwko czynnikom patogennym. Posiadają zdolność wykrywania czynnika sygnału chemotaktycznego, adhezji do śródbłonna a następnie przenikania przez ściany naczyń do miejsca toczącego się procesu zapalnego. Tam rozpoznają, fagocytują i następnie niszczą pochłonięte cząsteczki (10, 11, 15, 21). Sam proces fagocytozy nie pozwala jednak wnioskować o efektywności zabijania wewnątrzkomórkowego. Neutrocyt dysponuje zasobem enzymów proteolitycznych i syntetyzowanych produktów metabolizmu tlenowego. Badania metabolizmu tlenowego neutrocytów znajdują zastosowanie w ocenie wpływu różnych czynników endo- i egzogennych na produkcję wewnątrzkomórkowych metabolitów tlenowych (2, 4, 5, 6, 14, 17,

23, 27). Dlatego też, badania oceniające zdolność neutrocytów do fagocytozy jak też pomiar aktywności metabolicznej neutrocytów i makrofagów, są najczęściej wykonywane do określenia wpływu związków toksycznych na organizm ryb. Wielu autorów uważa, że neutrocyty są wskaźnikami zdrowotności ryb, ich reakcji na stres środowiskowy czy zanieczyszczenia chemiczne środowiska wodnego (7, 12, 20, 23, 27, 28). Spośród wielu pestycydów powszechnie stosowanych w ochronie roślin na szczególną uwagę zasługują syntetyczne pyretroidy charakteryzujące się dużą toksycznością dla bezkręgowców i kręgowców niższych. Permetryna jako jedna z nich, jest stosowana jako środek owadobójczy, która podczas opryskiwania pól dostaje się do wód powierzchniowych. Badania nad wpływem tego preparatu na układ odpornościowy ryb należą do nielicznych (20).

Celem badań było określenie wpływu permetryny obecnej w środowisku wodnym na aktywność fagocytarną neutrocytów krwi obwodowej i nerek głowowych karpia.

Materiał i metody

Badania wykonano na 90 karpach K_1 o masie 90 ± 10 g. Ryby podzielono na dwie grupy doświadczalne po 30 ryb każda i jedną grupę kontrolną (30 ryb). Ryby przetrzymywano w 100 l akwariach, dobrze napowietrzanych. Karpie poddano działaniu insektycydu Ambusz 25 EC produkcji Zakładów Chemicznych „Organika – Azot” w Jaworznie, który zawiera w swym składzie 2,5% permetryny. Ryby grupy I, zostały poddane 96-godzinne- mu działaniu permetryny w stężeniu 0,03 $\mu\text{g/l}$ (0,12 μl

Tab.1. Wyniki badań hematologicznych testu NBT u karpki doświadczalnych poddanych 96 godzinnemu działaniu permetryny w stężeniu 0,03 µg/l (Grupa I) i 1,1 µg/l (Grupa II) (n=30; $\bar{x} \pm s$)

Czas (dni)	Grupy ryb	Leukocyty $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$	Granulocyty obojętnochł. $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$	Test NBT	Wskaźnik red. NBT (%)
1	I	28,6* \pm 4,10	6,8* \pm 0,8	1,77* \pm 0,80	52,36
	II	18,50* \pm 3,20	8,6* \pm 0,6	0,37* \pm 0,42	10,94
3	I	42,30 \pm 6,10	4,6 \pm 0,4	1,58* \pm 0,27	46,74
	II	22,40* \pm 3,30	7,4* \pm 0,4	0,67* \pm 0,36	19,82
4	I	39,50 \pm 6,20	5,01* \pm 0,5	1,61* \pm 0,52	47,63
	II	24,50* \pm 4,20	8,8* \pm 0,3	1,10* \pm 0,44	32,54
7	I	42,30 \pm 3,8	4,40 \pm 0,4	2,06* \pm 0,62	60,94
	II	28,60* \pm 2,2	6,40* \pm 0,2	1,87* \pm 0,44	55,32
14	I	45,40 \pm 3,6	3,80 \pm 0,2	2,87 \pm 0,68	84,90
	II	24,50* \pm 4,2	3,60 \pm 0,4	3,44 \pm 0,52	101,77
Kontrola		56,20 \pm 4,6	3,30 \pm 0,5	3,38 \pm 0,72	100,0 \pm 0,0

Objaśnienie: * - różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$.

Ambuszu 25 EC na 100 l wody). Ryby grupy II zostały poddane 96-godzinnemu działaniu permetryny w stężeniu 1,1 µg/l (4,40 µl Ambuszu 25 EC na 100 l wody). Dawki ustalono na podstawie wcześniejszych badań własnych (20). Po zakończeniu działania permetryny na organizm ryb, karpie przeniesiono do wody czystej, nie zawierającej permetryny.

Materiał do badań, krew i nerki główowe, pobierano w obu grupach doświadczalnych po 1, 3, 4, 7 i 14 dniach od zakończenia działania permetryny każdorazowo od 6 ryb. Od ryb grupy kontrolnej pobierano materiał 3 krotnie w 1, 7 i 14 dniu doświadczenia. W badaniach hematologicznych określano liczbę leukocytów i neutrocytów w 1 µl krwi wg ogólnie przyjętych metod. Aktywność metaboliczną fagocytów badano metodą mikroilościową testem redukcji błękitu nitrotetrazoliowego NBT przez komórki żerne do formazanu (17). Wyniki przedstawiono dla poszczególnych prób w formie testu NBT, który obliczono w oparciu o pomiar gęstości optycznej na spektrofotometrze przy długości fali 546 nm. Następnie wyliczono wartość wskaźnika redukcji NBT spowodowanego działaniem permetryny korzystając ze wzoru:

$$\text{Wskaźnik redukcji NBT (\%)} = \frac{\text{NBT dośw.}}{\text{NBT kont.}} \times 100$$

Wskaźnik aktywności fagocytarnej komórek nerek główowych karpki oceniano na podstawie zdolności tych komórek do pochłaniania standardowego szczepu *Staphylococcus aureus* 209 P (19). Komórki z nerek główowych izolowano wg metody stosowanej w badaniach własnych (18). Nerki pobierano każdorazowo od 6 ryb do płynu odżywczego Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej oraz 100 j penicyliny ml^{-1} i 100 µg streptomycyny ml^{-1} , następnie przecierano przez sitko metalowe i nanoszono na gradient Lymphoprep™ (Nyegaard & Co. A/S, Oslo, Norway). Uzyskaną zawiesinę leukocytów

przeplukiwano 2-krotnie płynem odżywczym. Do badania odczynu fagocytarnej użyto zawiesiny neutrocytów i makrofagów zawierającej $6 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$, komórek bakteryjnych w zagęszczeniu 10-krotnie wyższym oraz surowicy karpki. Po 1-godzinnej inkubacji bakterii i komórek fagocytarnych wykonywano rozmazy, w których pod imersją, określono udział komórek fagocytujących (KF) wśród granulocytów i makrofagów oraz wartości indeksu fagocytarnej (IF) przedstawiającego średnią liczbę bakterii wchłoniętych przez 1 komórkę. Wyniki obu wskaźników uzyskano oglądając 200 granulocytów obojętnochłonnych w każdym rozmazie. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta przy $p \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań hematologicznych przedstawiono w tab. 1. Po 96-godzinnym działaniu permetryny na organizm karpki obserwowano zmiany wskazujące na wystąpienie u tych ryb leukopenii i neutrocytozy. Obniżenie liczby leukocytów w krwi obwodowej karpki doświadczalnych było statystycznie istotne u ryb grupy I w 1 dniu badania zaś u ryb grupy II we wszystkich okresach badania (tab. 1). Statystycznie istotny wzrost liczby granulocytów obojętnochłonnych stwierdzono u ryb grupy I w 1, 3 i 4 dniu badania zaś u ryb grupy II utrzymywał się on do 7 dnia badania (tab. 1).

Dla oceny aktywności metabolicznej neutrocytów przeprowadzono test NBT. Test ten jest pośrednią miarą aktywności tlenowych oksydaz, które prowadzą do wytworzenia nadtlenu wodoru w komórkach granulocytów. Redukcja błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) do badanego formazanu świadczy o aktywności energetycznej komórki, która to jest warunkiem prawidłowego zniszczenia bakterii w procesie fagocytozy. Wyniki przeprowadzonego te-

stu NBT dowodzą, że u ryb poddanych działaniu permetryny neutrocyty mają znacznie obniżoną zdolność redukcji NBT do formazanu NBT niż neutrocyty ryb kontrolnych (tab. 1). Statystycznie istotnie niższą wartość testu NBT uzyskano u ryb grupy I i II do 7 dnia badania. Obliczany wskaźnik redukcji NBT wykazał wyraźną supresję aktywności fagocytów utrzymującą się na ogół przez cały czas doświadczenia, jedynie u ryb grupy II po 14 dniach nie stwierdzono supresji (tab. 1).

Wyniki badań aktywności fagocytarnej przedstawiono w tab. 2. Po działaniu permetryny stwierdzono zmniejszenie procentowego udziału komórek (KF) nerek głowowych w procesie fagocytozy we wszystkich okresach badania. Wartości te różniły się statystycznie istotnie u ryb doświadczalnych w porównaniu z grupą kontrolną. Przy czym w 1 i 3 dni uzyskano najniższe wartości u ryb grupy I i II w porównaniu z grupą kontrolną. Również indeks fagocytarnej do 7 dnia doświadczenia był statystycznie istotnie niższy u ryb grupy I i II niż u ryb grupy kontrolnej. Także w 14 dni stwierdzono niższe wartości indeksu, ale nie były one statystycznie istotne. Przeprowadzone badania dowodzą, że permetryna obniża aktywność fagocytarną granulocytów obojętnochłonnych i makrofagów znajdujących się zarówno we krwi jak i w nerkach głowowych. Wiadomo również, że neutrocyty jak i makrofagi odgrywają ważną rolę w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej ustroju (26). W związku z tym szczegółowe badania nad stanem czynnościowym tych komórek pozwalają wnioskować o obniżonej aktywności immunologicznej organizmu ryb i zwiększonej ich podatności na działania czynników patogennych.

Piśmiennictwo

- Ainsworth A. J.: Ann. Rev. Fish Dis. 2, 123, 1992.
- Anderson D. P., Moritoma T., Grooth R.: Vet. Immunol. 30, 419, 1992.
- Bayne C. J.: Vet. Immunol. 12, 141, 1986.
- Bennani N., Schmid-Alliona A., Lafaulie M.: Fish Shellfish Immunol. 5, 237, 1995.
- Chung S., Secombes C. J.: J. Fish Biol. 31, 51, 1987.
- Chung S., Secombes C. J.: Comp. Biochem. Physiol. 89B, 539, 1988.
- Cossarini-Dunier M.: J. Fish Biol., (Suppl. A) 67, 1987.
- Hine P. M.: Fish Shellfish Immunol. 2, 79, 1992.
- Kubala L., Lojek A., Vondracek J., Duskova M., Slavikova H.: Vet. Med.-Czech., 41, 323, 1996.
- Mac Arthur J. I., Fletcher T. C.: Phagocytosis in fish. W: Fish Immunology (wyd. M. J. Manning, M. F. Tatner), Academic Press, London 1985, s. 29.
- Olivier G., Eaton C. A., Campbell N.: Vet. Immunol. 12, 223, 1986.
- Prost M., Sopińska A., Guz L.: Medycyna Wet. 51, 275, 1995.
- Rowley A.: Techn. Fish Immunol. I, SOS Publications, USA 1990, s. 112.
- Scott A. I., Klesius P. H.: Develop. Biolog. Standard. 49, 243, 1981.
- Secombes C. J., Chung S., Jeffries A. H.: Dev. comp. Immunol. 12, 201, 1988.
- Secombes C. J.: Fish Shellfish Immunol. 4, 421, 1994.

Tab. 2. Średnie wartości aktywności fagocytarnej komórek nerki głowowej u karpia doświadczalnych poddanych 96 godzinnemu działaniu permetryny w stężeniu 0,03 µg/l (Grupa I) i 1,1 µg/l (Grupa II) (n=30; $\bar{x} \pm s$)

Czas (dni)	Grupy ryb	Udział komórek fagocytujących - KF (%)	Indeks fagocyt. - IF
1	I	30,0* ± 5,20	1,34* ± 0,29
	II	21,5* ± 2,30	1,20* ± 0,39
3	I	35,0* ± 4,56	2,70* ± 0,66
	II	30,0* ± 3,03	1,40* ± 0,42
4	I	40,0* ± 2,28	3,33* ± 0,52
	II	45,0* ± 2,97	3,40* ± 0,39
7	I	44,0* ± 12,68	5,80* ± 0,57
	II	45,0* ± 3,40	4,87* ± 0,34
14	I	58,0* ± 6,97	10,40 ± 0,60
	II	50,0* ± 3,20	9,20 ± 0,48
Kontrola		65,0 ± 5,20	12,65 ± 0,83

Objaśnienie: * – różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$.

- Sopińska A.: Medycyna Wet. 41, 738, 1985.
- Sopińska A.: Medycyna Wet. 42, 146, 1986.
- Sopińska A.: Medycyna Wet. 42, 268, 1986.
- Sopińska A., Lutnicka H., Guz L.: Medycyna Wet. 51, 747, 1995.
- Stasiak S. A., Baumann P. C.: Fish Shellfish Immunol. 6, 537, 1996.
- Steinhagen D., Jendrysek S.: Fish Shellfish Immunol. 4, 521, 1994.
- Stosik M.: Medycyna Wet. 52, 529, 1996.
- Thuvander A., Norrgreen L., Fossum C.: J. Fish Biol., 31, 197, 1987.
- Verburg – Van Kemenade B. M. L., Groeneveld A., Van Rans B. T. T. M., Rombout J. H. W. M.: J. exp. Biol. 187, 143, 1994.
- Verburg – Van Kemenade B. M. L., Kuy L. C., Smith R., Groeneveld A., Rombout J. H. W. M.: Dev. comp. Immunol. 15, 583, 1991.
- Verburg – Van Kemenade B. M. L.: Techn. Fish Immunol. III, SOS Publications, USA 1994, s. 79.
- Weeks B. A., Warriner J. E., Mason P. L., McGinnis D. S.: J. Fish Biol. 28, 653, 1986.

Adres autora: prof. AR, dr hab. Antonina Sopińska, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

BAYNES R. E., CRAIGMILL D. L., RIVIERE J. E.: Okres karencji po miejscowym stosowaniu leków weterynaryjnych i pestycydów. (Residue avoidance after topical application of veterinary drugs and pesticides). J. Amer. Vet. Med. Ass. 210, 1288-1289, 1997(9)

Dane odnośnie okresu karencji leków weterynaryjnych i preparatów przeciw pasożytniczych stosowanych miejscowo u zwierząt są bardzo skąpe. W ustalaniu okresu karencji należy uwzględnić oprócz rodzaju preparatu także sposób jego stosowania, obecność włosów lub wełny w miejscu podania leku, gatunek zwierzęcia i warunki środowiskowe. Okres karencji dla fenotionu wynosi w tkankach 35-45 dni, w mleku 10 dni, dla famphur 35 i 45 dni, dla phosmet 1 i 0 dni, dla chlorpyrifos 0 i 0 dni, dla trichlorfonu 21 i 7-10 dni, dla kumafosu 10 i 10 dni, dla metoksychloru 0 i 0 dni, dla permetryny u bydła 0 i 0 dni, u świń 5 dni. Nie jest wymagany okres karencji dla stosowanych miejscowo następujących preparatów: nitrofurazon, tetracyklina, siarczan miedzi, naftenian miedzi, formaldehyd i metoksychlor.