

19. Pejsak Z., Hogg A., Wasińska B., Foreman K.: J. Vet. Med. B 37, 593, 1990.
20. Rutter J. M.: Recl Méd. vét. 163, 439, 1987.
21. Rutter J. M., Luther P. D.: Vet. Rec. 114, 393, 1984.
22. Scheidt A. B., Mayrose V. B., Hill M. A., Clark L. K., Einstein M. E., Frantz S. F., Runnels L. J., Knox K. E.: J. Am. vet. med. Ass. 200, 1492, 1992.
23. Vena M. M., Blanchard B., Thomas D., Kobisch M.: Ann. Rech. vét. 22, 211, 1991.
24. Wołoszyn S., Krauss S., Ziolo T.: Anns Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sect. DD, 20, 243, 1965.

Adres autora: dr Zbigniew Grądzki, ul. Tatarakowa 2/52, 20-541 Lublin

ANTONINA Sopińska, HANNA Lutnicka, LESZEK Guz

Badania nad działaniem lewamizolu po przewlekłej intoksykacji karpia związkami azotowymi

Katedra Chorób Ryb, Wydział Weterynaryjny AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Summary

Studies on the influence of levamisole in carps after the chronic intoxication with nitro-compounds

The influence of poisoning with nitro-compounds on the immunological system of carp has been assessed under natural conditions using water diversion of the Nitrogen Plant at Puławy. The examinations were carried out on 80 carps weighing 250-300 g each which were maintained for six weeks in the water diversion and in which an increased level of nitro-compounds was found. Twenty fishes transported from a healthy environment served as control animals. After the period of poisoning the fish were placed in aquaria with water free from contaminants and remained under the influence of levamisole (5 mg per 1 l of water) in order to stimulate immune mechanisms after nitro-compounds immunosuppression. The reaction of the immunological system was assessed on the following basis: the number of leukocytes and neutrocytes in 1 μ l of blood, metabolic activity of granulocytes, the level of lysozyme in the serum and in the mucus of the carp. It was found that a chronic poisoning of carp caused irreversible changes in their immune system; the fish could not respond to the immunostimulating action of levamisole. The findings give the reasons to believe that fish kept for a longer time in water with an elevated concentration of nitro-compounds may be more susceptible to various disease-causing factors.

Poważnym problemem ekologicznym w dzisiejszych czasach są zanieczyszczenia wód związkami chemicznymi, których źródłem są najczęściej wycieki z oczyszczalni ścieków oraz zakładów przemysłowych. Oddziaływanie substancji chemicznych zanieczyszczających środowisko na organizm ryb jest najczęściej wielokierunkowe (3). Uszkadzają one bezpośrednio lub pośrednio strukturę i funkcje wielu narządów i układów. Badaniem zmian immunologicznych zachodzących pod wpływem związków chemicznych zanieczyszczających środowisko wodne zajmuje się immunotoksykologia ryb.

Nieliczne badania przeprowadzone na karpach dotyczą wpływu preparatów fosforoorganicznych (6, 8), lindanu (7), związków azotynowych (13) na ich mechanizmy obronne. Większość badań nad wpływem azotanów i azotynów na organizm ludzi i zwierząt zwraca uwagę na wystąpienie pod

wpływem tych związków oksydacji hemoglobiny do met-hemoglobiny (2, 4, 9, 10, 11, 21). Uniemożliwia to transport tlenu do tkanek i przyczynia się do wystąpienia anemii hemolitycznej. Brak jednak danych dotyczących reakcji układu immunologicznego na przewlekłe działanie związków azotowych na organizm karpia.

Niektóre prace zalecają stosowanie preparatów chemicznych, które wykazują działanie stymulujące odporność nieswoistą ryb i przeciwdziałają immunosupresji wywołanej intoksykacją związkami chemicznymi. Takim preparatem okazał się lewamizol stosowany przy intoksykacji związkami fosforoorganicznymi u karpia (18) oraz nitrogranulogen podawany rybom przed krótkotrwałym (24-godzinnym) oddziaływaniem azotynów na ich organizm (13). Dotychczasowe badania nad wpływem związków chemicznych na układ immunologiczny ryb były wykonywane w warunkach eksperymentalnych, natomiast badania własne wykonano w warunkach naturalnych, wykorzystując jako środowisko życia ryb kanał zrzutowy Zakładów Azotowych w Puławach, który wpada do rzeki Wisły i jest miejscem występowania wielu gatunków ryb.

Celem pracy było określenie wpływu długotrwałego oddziaływania (6-tygodniowego) środowiska wodnego o zwiększonym stężeniu związków azotowych na układ immunologiczny ryb oraz na reakcję tego układu po podaniu rybom immunostymulatora – lewamizolu.

Materiał i metody

Badania wykonano u karpia K1, o masie 250-300 g, przywiezionych ze środowiska nie zanieczyszczonego (gospodarstwo rybackie w Zagrodzie), które umieszczono w sadzach w kanale zrzutowym Zakładów Azotowych w Puławach.

W oparciu o analizę chemiczną wody obejmującą: azot amonowy, azot azotanowy, azot azotynowy, azot ogólny, odczyn wody, wybrano dwa stanowiska (1 i 2) różniące się poziomem zanieczyszczeń związkami azotowymi, odległe od siebie o około 1 km. W każdym sadzu, każdego stanowiska, umieszczono po 40 sztuk karpia. Ryby przetrzymywano w kanale zrzutowym przez okres 6 tygodni. Po tym okresie karpie przeniesiono do akwariów 100 l. z wodą nie zawierającą zanieczyszczeń chemicznych. Każdą z grup podzielono na dwie podgrupy, uzyskując w ten sposób następujące grupy doświadczalne: grupę I i II – obejmującą ryby pochodzące ze stanowiska 1, grupę

III i IV – obejmującą ryby pochodzące ze stanowiska 2 oraz grupę V – kontrolną – obejmującą ryby nie poddane działaniu zanieczyszczeń chemicznych.

Ryby grupy I i III poddano działaniu lewamizolu podczas 1-godzinnej kąpieli w stężeniu 5 mg/l wody (16). Po zakończeniu kąpieli karpie przeniesiono do akwariów z wodą czystą, napowietrzaną, o temperaturze 16 – 18°C. W tych samych warunkach przebywały ryby pozostałych grup doświadczalnych, które nie zostały poddane działaniu immunostymulatora. Obserwacje prowadzono przez okres 28 dni od dnia, w którym odłowiono ryby z kanału zrzutowego. Krew oraz śluz do badań immunologicznych pobierano od ryb grupy I i III po 3, 7, 14 i 28 dniach od zakończenia kąpieli, a także w tym samym okresie od pozostałych grup (II, IV i V). W dniach tych pobierano materiał do badań od 10 ryb z każdej grupy doświadczalnej.

Badanie hematologiczne: liczbę krwinek białych w 1 µl krwi oraz liczbę neutrocytów określano według metod rutynowych dla ryb (5), aktywność metaboliczną neutrocytów oceniano testem NBT (19, 20), poziom lizozymu w surowicy krwi oznaczano metodą spektrofotometryczną (15), poziom lizozymu w śluzie według metody Al-Harbi (1) również przy użyciu spektrofotometru.

Uzyskane liczbowe wyniki badań poddano analizie statystycznej testem t – Studenta.

Wyniki i omówienie

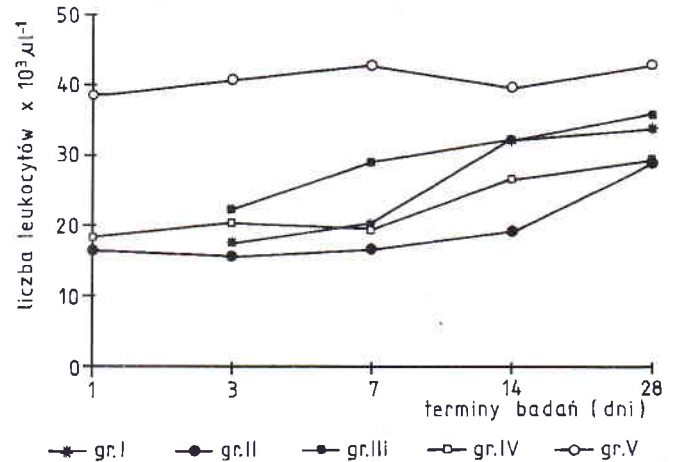
Wyniki badań chemicznych wody kanału zrzutowego Zakładów Azotowych w Puławach przedstawiono w tab. 1.

Analizując uzyskane wyniki należy stwierdzić, że zawartość związków chemicznych w wodzie kanału znacznie przekraczała wartości najwyższych dopuszczalnych zanieczyszczeń w ściekach wprowadzanych do wód i do ziemi (14). Wartości te dotyczą azotu amonowego i azotu azotanowego.

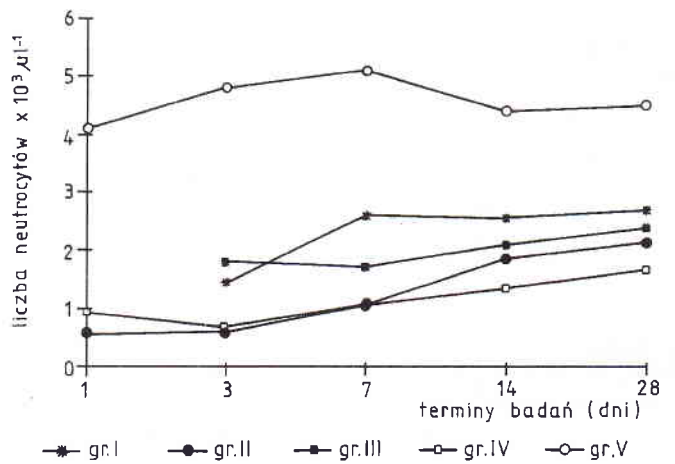
Wyniki badań immunologicznych karpie po 6-tygodniowej intoksykacji związkami chemicznymi obecnymi w wodzie kanału zrzutowego Zakładów Azotowych w Puławach przedstawiono na ryc. 1–5. Wszystkie badane parametry: liczba leukocytów i neutrocytów w 1 µl krwi, aktywność metaboliczna granulocytów, a także poziom lizozymu w surowicy i śluzie ryb uległy statystycznie istotnemu obniżeniu w porównaniu z grupą kontrolną. Również ilość śluzu obecna na powierzchni ryb była znacznie mniejsza w porównaniu z rybami nie przebywającymi w wodzie kanału zrzutowego. Analizując wyniki badań uzyskanych od ryb w poszczególnych stanowiskach (1 i 2) nie stwierdza się wyraźnej zależności od miejsca lokalizacji sadzy w kanale zrzutowym, gdyż u ryb w obu stanowiskach wystąpiło wyraźne działanie immunosupresyjne pod wpływem zanieczyszczeń obecnych w wodzie.

Po przeniesieniu ryb z sadzy, z kanału zrzutowego do akwariów z wodą nie zanieczyszczoną obserwowano u ryb grupy II i IV nie stymulowanych lewamizolem, w każdym okresie ba-

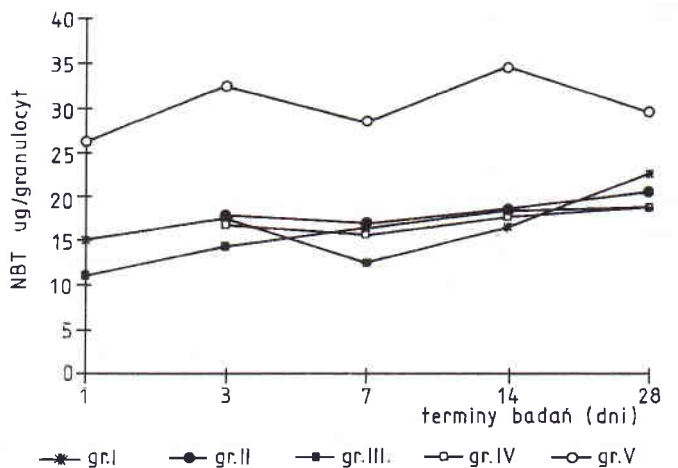
dania, powolny wzrost liczby leukocytów i neutrocytów (ryc. 1, 2). Jednak jeszcze w 28 dniu był on statystycznie istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. U ryb stymulowanych lewamizolem, grupy I i III, liczba leukocytów i neutrocytów uległa wzrostowi począwszy od 3 dnia obserwacji i w każdym okresie badań była wyższa niż u ryb nie stymulowanych. Nie obserwowano jednak u żadnej grupy powrotu do wartości prawidłowych występujących u ryb kontrolnych.



Ryc. 1. Średnie wartości liczby leukocytów w 1 µl krwi karpie



Ryc. 2. Średnie wartości liczby neutrocytów w 1 µl krwi karpie



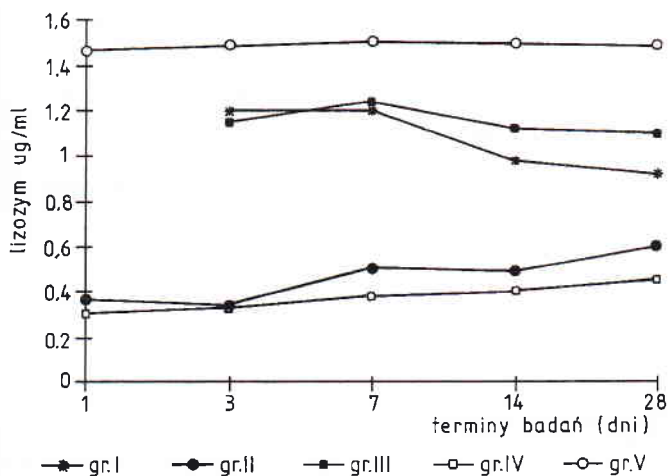
Ryc. 3. Średnie wartości formazanu NBT w granulocytach krwi karpie

Tab. 1. Parametry chemiczne wody w kanale zrzutowym Zakładów Azotowych w Puławach w okresie przeprowadzanych badań

Badane parametry	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Dopuszczalne wartości związków azotowych w ściekach (wg. 14)
Odczyn pH	7,74	7,3–7,5	6,5–9,0
Azot amonowy (mg/l)	25,0–26,0	15,0–16,0	6,0
Azot azotanowy (mg/l)	8,2–8,4	2,8–6,6	30,0
Azot azotynowy (mg/l)	1,5–6,0	0,6–0,8	–
Azot ogólny (mg/l)	26,6–48,8	20,1–27,8	30,0



Ryc. 4. Średni poziom lizozymu w surowicy krwi karpia



Ryc. 5. Średni poziom lizozymu w śluzie karpia

Aktywność metaboliczna granulocytów, oceniana testem NBT, nie wzrosła u ryb nie stymulowanych, jak i u ryb po stymulacji lewamizolem w żadnym okresie obserwacji. Wartości uzyskiwane w grupach doświadczalnych były statystycznie istotnie niższe w porównaniu z grupą kontrolną w każdym terminie badań.

Poziom lizozymu w surowicy krwi i śluzie ryb po 6-tygodniowej intoksykacji związkami azotowymi był statystycznie istotnie niższy od uzyskanego u ryb kontrolnych (ryc. 4, 5). Wraz z czasem obserwacji nie stwierdzono wzrostu wartości tego parametru i przez 28 dni utrzymywał się on na zbliżonym poziomie. Stymulacja ryb lewamizolem spowodowała wzrost tego parametru u obu grup doświadczalnych (I i III). Uzyskane wartości w porównaniu z wartościami uzyskanymi od ryb nie stymulowanych (II i IV) były statystycznie istotnie niższe w porównaniu z grupą kontrolną (V).

Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że przemiany metaboliczne związków azotowych obecnych w wodzie kanału zrzutowego z Zakładów Azotowych w Puławach powodują trwałe uszkodzenie układu immunologicznego ryb. Po przewlekłej intoksykacji trwającej 6 tygodni pomimo przeniesienia ryb do wody nie zanieczyszczonej nie obserwowano przez okres 28 dni powrotu do normy badanych parametrów. Nie obserwowano również uaktywnienia układu immunologicznego po stymulacji lewamizolem.

Na ogół stosowanie preparatów stymulujących u ryb zdrowych daje pozytywne reakcje pobudzające nieswoiste mechanizmy odpornościowe (16, 17); również zastosowanie ich przed okresem intoksykacji ma korzystne działanie przeciwsupresyjne (13). Wyniki badań własnych wskazują, że zastosowanie lewamizolu po długotrwałym okresie intoksykacji (6 tygodni) nie dało pozytywnych wyników. Przepuszczalnie toksyczne działanie związków azotowych spowodowało długotrwałe uszkodzenie układu immunologicznego niezdołnego do wyraźnej reakcji na związek immunostymulujący. W literaturze spotyka się nieliczne doniesienia wskazujące na znaczną podatność ryb na infekcje bakteryjne po intoksykacji związkami azotowymi (12). Należy sądzić, że ryby przebywające dłuższy czas w wodzie o podwyższonym stężeniu związków azotowych, po dostaniu się do środowiska nie zanieczyszczonego (np. z kanału zrzutowego Zakładów Azotowych w Puławach do Wisły) będą bardziej podatne na różne czynniki chorobotwórcze.

Wnioski

1. Długotrwałe przebywanie ryb w wodzie zanieczyszczonej ściekami przemysłowymi Zakładów Azotowych w Puławach wpływa supresyjnie na komórkowe mechanizmy obronne karpia.

2. Przewlekła intoksykacja karpia związkami azotowymi powoduje nieodwracalne zmiany w układzie immunologicznym ryb. W wyniku tego układ obronny nie jest zdolny do reakcji na immunostymulujące działanie lewamizolu.

Piśmiennictwo

- Al-Harbi A. H., Austin B.: Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 12, 14, 1992.
- Arillo A., Gaino E., Margiocco C., Mensi P., Shenone G.: Environ. Res. 34, 135, 1984.
- Aviation R. R.: Crit. Rev. Environ. Control. 11, 163, 1981.
- Barlett G. R., Schwantes A. R., Val A. L.: Comp. Biochem. Physiol. 86C, 449, 1987.
- Blaxhall P. C., Daisley K. W.: J. Fish Biol. 5, 771, 1973.
- Cossarini-Dunier M., Demael A., Siwicki A. K.: Ecotoxicol. Environ. Saf. 19, 93, 1990.
- Cossarini-Dunier M., Monod L., Demael A., Lepot D.: Ecotoxicol. Environ. Saf. 13, 339, 1987.
- Cossarini-Dunier M., Siwicki A. K., Demael A.: Ecotoxicol. Environ. Saf. 22, 79, 1991.
- Duthu G. S., Shertzer M. G.: Drug Metabolic Disposition 7, 263, 1979.
- Eddy F. B., Kunzlick P., Bath R. N.: J. Fish Biol. 23, 105, 1983.
- Fremman L., Beitinger T. L., Huey D. W.: Comp. Biochem. Physiol. 75B, 27, 1983.
- Hanson L. A., Grizzle J. M.: Prog. fish Cult. 47, 98, 1985.
- Myszkowski L., Kazuń K., Głabski E., Siwicki A. K.: Fish Diseases Diagnosis and Preventions Methods. Materiały Sympozjum I.R.Ś. Olsztyn, 1993.
- Rozporządzenie Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa z dn. 5 listopada 1991 r., w sprawie klasyfikacji wód oraz warunków jakim powinny odpowiadać ścieki wprowadzane do wód lub do ziemi.
- Sankaran K., Shanto G.: Indian. Biochem. Biophys. 9, 162, 1972.
- Siwicki A. K.: Stymulowanie odporności nieswoistej w chowie i hodowli ryb. Materiały Sympozjum I.R.Ś. Olsztyn, 1991.
- Siwicki A. K.: Dev. Comp. Immunol. 13, 87, 1989.
- Siwicki A. K., Studnicka M.: Materiały Sympozjum, Lugano 1992.
- Sopińska A.: Medycyna Wet. 41, 738, 1985.
- Sychtłowy A., Lukas A.: Pol. Tyg. Lek. 33, 45, 1987.
- Tucker C. S., Francis-Floyd R., Bealeau M. H.: Bul Environ. Contam. Toxicol. 43, 295, 1989.

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