

УДК 591.111.7+639.215.2+546.48+546.74

Дрогомирецька І.З., Мазепа М.А.

ОСОБЛИВОСТІ ФАГОЦИТАРНОЇ АКТИВНОСТІ ЛЕЙКОЦИТІВ КРОВІ *CYPRINUS CARPIO* L. ПІД ВПЛИВОМ ІОНІВ КАДМІЮ ТА НІКЕЛЮ

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника,
м. Івано-Франківськ, Україна
E-mail: luchka@i.ua

Ключові слова: фагоцитоз, лейкоцити, периферійна кров, *Cyprinus carpio*, НСТ-тест, важкі метали, імунотоксичність

Імунологічні реакції є потужними гомеостатичними механізмами, які забезпечують сталість внутрішнього середовища організму при порушенні його речовинами антигенної природи. З огляду структурної організації імунної системи, риби займають важливе місце між безхребетними і вищими хребетними тваринами. Їм притаманні механізми неспецифічного захисту, як і безхребетним тваринам, зокрема, механізми фагоцитозу, що здійснюється за рахунок мелано-макрофагальних центрів, гранулоцитів та тромбоцитів [2]. Водночас, риби у філогенезі стали першими хребетними тваринами, в яких поряд із неспецифічними факторами захисту, починає розвиватись адаптивна імунна відповідь, опосередкована лімфоцитами [4].

На даний час все більшого значення в регуляції роботи імунної системи риб набувають техногенні впливи на середовище існування, які викликають пригнічення вроджених і набутих механізмів імунітету водних тварин [4]. Важкі метали та їх сполуки забруднюють природні водойми і створюють відчутний вплив на популяції водних тварин, в тому числі риб. Встановлено, що риби набагато чутливіші, ніж вищі хребетні, до важких металів, які здійснюють суттєвий вплив на імунологічні реакції організму, що дозволяє розглядати імунну систему риб як важливий біоіндикатор забруднення довкілля [12].

Для передбачення ризиків імунотоксичності використовують риб як модель досліджень в лабораторних умовах, так і дикі види риб [13]. При порівняльному аналізі імунологічних параметрів риб (окунів), виловлених із забруднених водойм сполуками хлору і вуглецю, та імунологічних параметрів риб із чистих водойм, дослідники виявили істотні зміни в клітинах крові риб та функціональній активності фагоцитів нирок [12].

Відомо, що екзогенні впливи важких металів, зокрема, кадмію та нікелю, спричиняють зниження імунної реактивності ссавців, а саме, іони нікелю призводять до зниження фагоцитарної активності альвеолярних макрофагів [8]; хлорид нікелю викликає істотні зміни у функції природних кіллерів [7]. Стосовно впливу нікелю і кадмію на імунну систему риб літературні дані нечисленні.

Метою нашої роботи було дослідити в експерименті вплив іонів кадмію та нікелю на показники фагоцитарної активності лейкоцитів периферійної крові *Cyprinus carpio* L., виловленого із штучних водойм Прикарпаття.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В дослідженнях використовували дворічні особини *Cyprinus carpio* в осінньо-зимовий період. Підвищений вміст іонів кадмію та нікелю у воді створювали внесенням в акваріум розчинних солей $3\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$ у концентраціях 0,025 мг/л, що відповідала 5 гранично допустимим концентраціям (ГДК) Cd^{2+} , 0,05 мг/л (10 ГДК Cd^{2+}) та $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ у концентраціях 0,5 мг/л (5 ГДК Ni^{2+}) та 1,0 мг/л (10 ГДК Ni^{2+}).

Риб витримували в токсичному середовищі 96 годин. Контрольну групу риб витримували аналогічний термін в звичайних умовах акваріуму. Здійснювали контроль і підтримували постійний гідрохімічний режим води: величина рН – 7,5, вміст кисню 5,6 мг/л, температура води – 18-20°C.

Із хвостової вени *C. carpio* кров забирали за допомогою шприца. Для підрахунку кількості лейкоцитів крові використовували камеру Горяєва. Кількість лейкоцитів виражали в тис. клітин/мм³.

В експерименті дослідили вплив іонів кадмію та нікелю на показники фагоцитозу у риб *in vivo* та *in vitro*. В експериментах *in vivo* розчини солей досліджуваних металів вносили у воду акваріуму. За умов *in vitro* розчини солей металів додавали до суміші клітини у перерахунку на іони металу у концентрації, яка відповідала 5 і 10 ГДК даного металу.

У лейкоцитах периферійної крові риб визначили показники НСТ-тесту, використовуючи 0,5% розчин нітросинього тетразолію (за Пінегіним Б.В.) [3]. Лейкоцити отримували центрифугуванням сироватки крові риб на градієнті густини Ficoll-Paque (1,077). Необхідна концентрація клітин – 2×10^6 кл/мл. Для визначення показника НСТ-індукованого (НСТінд) як об'єкт фагоцитозу використовували клітини *Saccharomyces cerevisiae* (у розрахунку 60 клітин на 1 фагоцит). На кінцевому етапі до суспензії клітин додавали диметилсульфоксид. Визначали наступні показники: НСТ-спонтанний

(НСТсп), НСТінд та коефіцієнт стимуляції (Кст) – відношення НСТінд до НСТсп. Результати виражали в умовних одиницях (у.о.) – одиницях оптичної густини $\times 1000$.

Використали другий метод для вивчення фагоцитарної активності лейкоцитів риб під дією іонів нікелю та кадмію, а саме, за зміною оптичної густини (O.D. 550 nm) досліджуваної реакції після додавання до суспензії лейкоцитів клітин *S. cerevisiae* у співвідношенні 40 клітин на 1 фагоцит. Суміш інкубували в розчині трипсин-ЕДТА 12 годин при температурі 37°C [11].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерної програми «MYNOVA». Дані представлені як середнє \pm похибка середнього. Для знаходження вірогідної відмінності між досліджуваними групами використовували t-test Student's [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі дослідження в експериментальних умовах дослідили вплив кадмію та нікелю на кількість лейкоцитів периферійної крові *S. carpio*. Результати наводимо в таблиці 1. Як видно з табл. 1, під дією обох концентрацій іонів нікелю відбувається незначне зниження кількості лейкоцитів риб (недостовірне порівняно з контролем). Іони кадмію при концентрації 0,025 мг/л, викликали збільшення кількості лейкоцитів, при концентрація 0,05 мг/л спостерігалось невелике зменшення цього показника, в обох випадках зміни кількості лейкоцитів були недостовірними. Отримані нами результати стосовно впливу іонів нікелю та кадмію на кількість лейкоцитів периферійної крові риб в експерименті співпадають з результатами інших авторів [6]. Логічно стверджувати, що цей показник не може бути біомаркером імунотоксичності нікелю та кадмію для риб, тим більше, що кількість лейкоцитів різко коливається в залежності від виду, віку риб, сезону, [1], виду і концентрації солей важких металів, часу експозиції тощо [9, 10].

Таблиця 1. Вплив іонів нікелю на кількість лейкоцитів *Cyprinus carpio* (M \pm m, тис. кл/мм³)

Досліджуваний показник	Контроль	Ni ²⁺ 0,5 мг/л	Ni ²⁺ 1,0 мг/л	Cd ²⁺ 0,025 мг/л	Cd ²⁺ 0,05 мг/л
Кількість лейкоцитів, тис. кл/мм ³	99,5 \pm 19,9	85,0 \pm 13,7	86,3 \pm 10,3	132,0 \pm 11,0	97,4 \pm 16,3

В той же час, результати досліджень показали суттєвий вплив іонів нікелю та кадмію на фагоцитарну активність лейкоцитів риб за зміною показника оптичної густини (O.D. 550 nm) досліджуваної

реакції *iv vivo* (табл. 2). Так якщо іони нікелю в концентрації 0,5 мг/л практично не впливали на показник фагоцитозу, то в концентрації 1,0 мг/л цей показник зростав в 2,5 рази (достовірно порівняно з контрольною групою ($p < 0,001$)). Ще чутливішим виявився показник фагоцитозу *iv vivo* до токсичних доз кадмію – обидві концентрації достовірно знижували його. Вважаємо, що тест на фагоцитарну активність лейкоцитів риб за зміною показника оптичної густини (O.D. 550 nm) досліджуваної реакції *iv vivo* може слугувати біомаркером імунотоксичності для іонів нікелю та кадмію.

Таблиця. 2. Фагоцитарна активність лейкоцитів *Suiprinus carpio* під впливом важких металів (* – достовірна відмінність від контролю $p < 0,001$)

Іони металу	Показник фагоцитозу, O.D. (550 nm)		
	Контроль	5 ГДК	10 ГДК
Cd ²⁺	1,250 ± 0,05	0,402 ± 0,01*	0,342 ± 0,02*
Ni ²⁺	1,250 ± 0,05	1,300 ± 0,01*	0,502 ± 0,03*

Стосовно дії іонів нікелю на активність фагоцитозу за показниками НСТ-тесту *in vivo* (експозиція риб у воді акваріуму з надлишковими концентраціями солей важких металів) отримано наступні результати (рис. 1). 5 ГДК нікелю викликають незначне підвищення показників НСТінд та достовірне підвищення НСТсп; вони становили 24,6 ± 3,5 у.о. проти 13,6 ± 4,1 у контролі та 45,5 ± 5,7 у.о. проти 36,5 ± 13,1 у контролі відповідно. При підвищенні концентрації нікелю до 1,0 мг/л (10 ГДК) спостерігається зниження фагоцитарної активності лейкоцитів, а саме, НСТінд знижується у 3,6 рази, НСТсп у 1,6 рази порівняно з контролем; зниження НСТсп та НСТінд достовірно порівняно з 5 ГДК нікелю. Кст лише при 10 ГДК нікелю достовірно знижувався порівняно з контролем.

Результати досліджень НСТ-тесту *in vivo* підтверджуються проведеними нами дослідженнями показників НСТ-тесту *in vitro* (додавання солей важких металів безпосередньо в пробірку до суспензії лейкоцитів). Так, при концентрації іонів нікелю 0,5 мг/л *in vitro* показник НСТсп становив 23,8 ± 2,4 у.о., НСТінд – 40,2 ± 2,3 у.о., Кст – 1,9 ± 0,2 у.о.; при концентрації Ni²⁺ – 1,0 мг/л НСТсп – 8,0 ± 1,2 у.о., НСТінд – 10,9 ± 1,2 у.о., Кст – 1,5 ± 0,2 у.о. Тобто, і в дослідах *in vitro* 5 ГДК нікелю стимулюють НСТсп, а 10 ГДК – пригнічують фагоцитоз за результатами НСТсп, НСТінд та Кст.

Отримані результати дозволяють вважати НСТ-тест чутливим показником імунотоксичності нікелю для *S. carpio*.

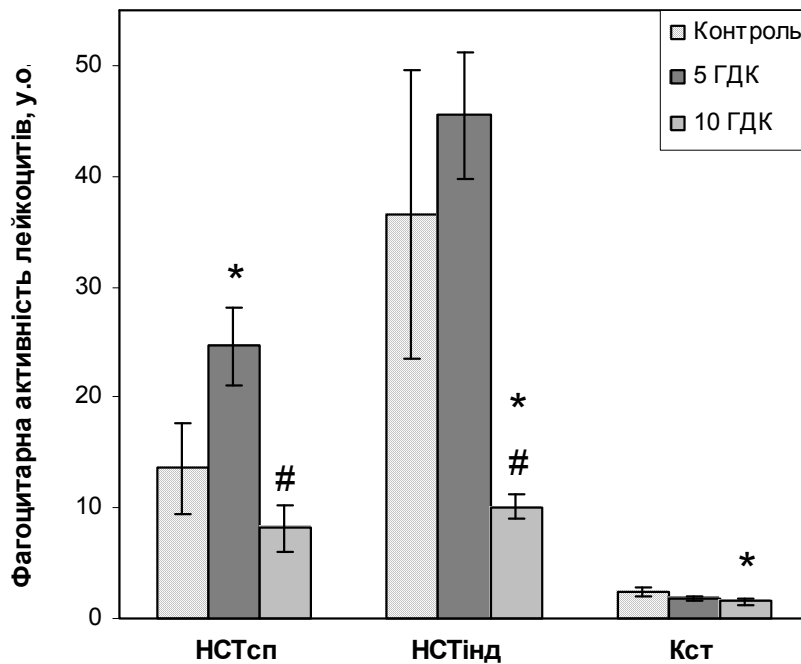


Рисунок 1. Показники НСТ-тесту лейкоцитів *Syrpinus carpio* під впливом іонів нікелю

Примітка: * – достовірна відмінність від контролю $p < 0,05$; # – достовірна відмінність від 5 ГДК Ni^{2+} $p < 0,005$)

В результаті досліджень впливу різних концентрацій кадмію на показники НСТ-тесту *in vivo* (рис. 2) встановлено зниження фагоцитарної активності клітин: при 5 ГДК кадмію НСТсп знижувався в 2,5 рази, НСТінд – в 3,4 рази, порівняно з контролем; при 10 ГДК кадмію НСТсп знижувався в 1,6 рази, НСТінд – в 3,2 рази. Спостерігалася тенденція до зниження Кст при 5 і 10 ГДК кадмію. Аналогічну закономірність отримали під впливом іонів кадмію *in vitro*: НСТсп становив $5,4 \pm 0,9$ у.о. та $7,3 \pm 1,5$ у.о. при 5 і 10 ГДК кадмію відповідно; НСТінд – $11,1 \pm 2,6$ у.о. та $10,2 \pm 1,6$ у.о. при 5 і 10 ГДК кадмію відповідно.

Отже, результати роботи дозволяють стверджувати, що НСТ-тест в усіх досліджених варіантах є чутливим показником імунотоксичності нікелю і кадмію для *S. carpio*.

Таким чином, результати досліджень показують інгібуючий вплив досліджуваних металів на функціональну активність фагоцитів. При збільшенні дози металу фагоцитарна активність пригнічується. Нікель спричиняє незначну активацію фагоцитів при концентрації 0,5 мг/л (5 ГДК).

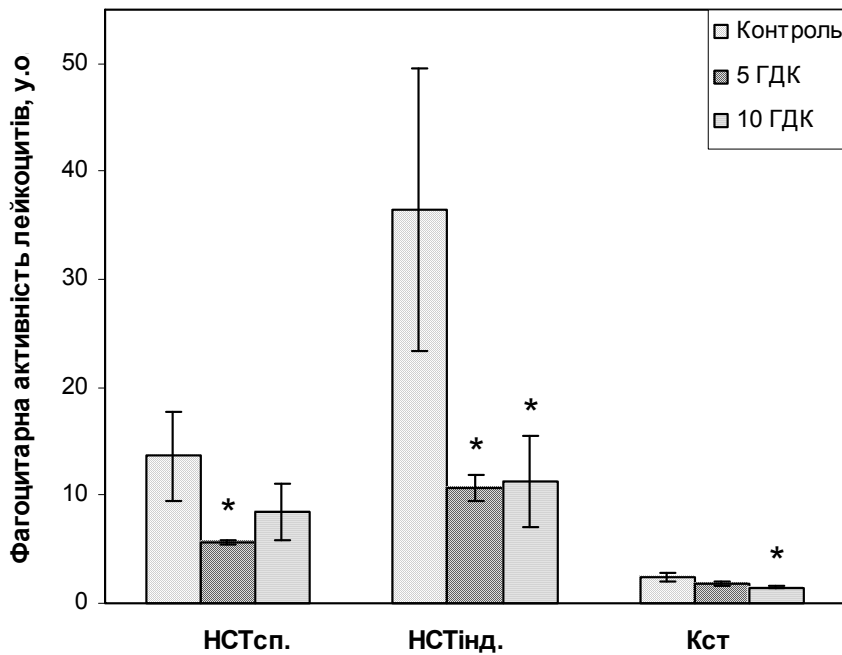


Рисунок 2. Показники НСТ-тесту лейкоцитів *Cyprinus carpio* під впливом іонів кадмію

Примітки: * – достовірна відмінність від контролю $p < 0,05$)

Значення отриманих результатів вбачається у встановленні імунних параметрів для розуміння цілісного впливу екотоксиканту на природний імунітет, накопиченні знань про регуляцію індивідуальних функцій природного імунітету на всіх його рівнях за нормальних умов. Ці базові знання необхідні також для встановлення уніфікованих механізмів дії класів токсикантів та специфічних механізмів дії окремих токсикантів.

ВИСНОВКИ

1. Під впливом токсичних концентрацій нікелю та кадмію встановлено зниження фагоцитарної активності лейкоцитів периферійної крові *C. carpio*, тільки невисокі концентрації нікелю (0,5 мг/л) незначно активують фагоцитоз.

2. Тест на фагоцитарну активність лейкоцитів риб за зміною показника оптичної густини (O.D. 550 nm) досліджуваної реакції *in vivo* може слугувати біомаркером імунотоксичності для іонів нікелю та кадмію.

3. НСТ-тест в умовах *in vivo* та *in vitro* є чутливим показником імунотоксичності нікелю та кадмію для *C. carpio*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аминова В.А., Яржомбек А.А. Физиология рыб. – М.: «Легкая и пищевая промышленность», 1984. – 200 с.

2. Кондратьева И.А., Киташова А.А. Функционирование и регуляция иммунной системы рыб // Иммунология. – 2002, №2. – С. 97-101.
3. Сизякина Л.П., Андреева И.И. Справочник по клинической иммунологии / Серия «Большой вопрос». – Ростов н/Д: Феникс, 2005. – 448 с.
4. Agbede S.A., Adeyemo O.K., Adedeji O.B., Junaid A.U. Ultrastructural study of the phagocytic activities of splenic macrophages in tilapia (*Oreochromis niloticus*) // African Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol. 5(22). – P. 2350-2353.
5. Brooks S.P.J. A simple computer program with statistical test analysis of enzyme kinetics // Bio Techniques. – 1992. – P. 906-911.
6. Brucka-Jastrzębska E., Protasowicki M. Effects of cadmium and nickel exposure on haematological parameters of common carp, *Cyprinus carpio* L. // Acta Ichthyol. Piscat. – 2005. – Vol. 35(1). – P. 29-38.
7. Condevaux F, Guichard J, Forichon A, Aujoulat M, Descotes J. Compared effects of morphine and nickel chloride on NK cell activity in vitro in rats and monkeys // J. Appl. Toxicol. – 2001. – Vol. 21(5). – P. 431-434.
8. Haley P.J., Shopp G.M., Benson J.M., Cheng Y.S., Bice D.E., Luster M.I., Dunnick J.K., Hobbs C.H. The immunotoxicity of three nickel compounds following 13-week inhalation exposure in the mouse // Fundam. Appl. Toxicol. – 1990. – Vol. 15(3). – P. 476-487.
9. Vosylienė M.Z. The effect of heavy metals on hematological indices of fish // Acta Zoologica Lituanica. Hydrobiologia. – 1999. – Vol. 9(2). – P. 76-82.
10. Witeska M. Changes in the common carp blood cell picture after acute exposure to cadmium // Acta Zoologica Lituanica. – 2001. – Vol.11(4). – P. 366-371.
11. Yin G., Jeney G., Racz T., Xu P., Jun X., Jeney Z. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus* // Aquaculture. – 2006. – Vol. 253. – P. 39-47.
12. Zelikoff J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? // Toxicology. – 1998. – Vol. 129(1). – P. 63-71.
13. Zelikoff J. T., Carlson E., Li Y., Raymond A., Duffy J., Beaman J. R., Anderson M. Immunotoxicity biomarkers in fish: development, validation and application for field studies and risk assessment // Human and ecological risk assessment. – 2002. – Vol. 8(2). – P. 253-263.

И.З. Дрогомирецкая, М.А. Мазепа
ОСОБЕННОСТИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ
ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ *CYPRINUS CARPIO* L. ПОД
ВОЗДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ КАДМИЯ И НИКЕЛЯ

Ключевые слова: фагоцитоз, лейкоциты, периферическая кровь, *Cyprinus carpio*, НСТ-тест, тяжелые металлы, иммунотоксичность

Иммунная система рыб рассматривается как важный биоиндикатор загрязнения водоемов, поскольку она чувствительнее от иммунной системы высших позвоночных к действию экотоксикантов, особенно тяжелым металлам. Среди последних высокую токсичность имеют никель и кадмий, потому быстрая и точная оценка влияния данных токсикантов на рыб является достаточно полезной. В работе исследовано влияние ионов никеля и кадмия на фагоцитарную активность лейкоцитов *Cyprinus carpio*. Использовали растворы солей $3\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$ у концентрациях 0,025 мг/л и 0,05 мг/л, которые соответствовали 5

и 10 предельно допустимым концентрациям (ПДК) ионов кадмия; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ у концентрациях 0,5 мг/л и 1,0 мг/л, что соответствовало 5 и 10 ПДК ионов никеля.

Установлено, что 96-часовая экспозиция с солями кадмия и никеля вызывает снижение фагоцитарной активности лейкоцитов *C. carpio*, только невысокие концентрации ионов никеля (0,5 мг/л) незначительно активируют фагоцитоз.

Тест на фагоцитарную активность лейкоцитов рыб за изменением показателя оптической плотности (O.D. 550 nm) исследуемой реакции *in vivo* может служить биомаркером иммунотоксичности для ионов никеля и кадмия.

НСТ-тест в условиях *in vivo* и *in vitro* является чувствительным показателем иммунотоксичности никеля и кадмия для *C. carpio*.

I.Z. Drogomyretska, M.A. Mazepa

**PECULIARITIES OF PHAGOCYtic ACTIVITY OF BLOOD
LEUCOCYTES OF *CYPRINUS CARPIO* UNDER INFLUENCE
CADMIUM AND NICKEL IONS**

Key words: *phagocytosis, leucocytes, peripheral blood, Cyprinus carpio, NBT-test, heavy metals, immunotoxicity*

The immune system of fishes is an important bioindicator of the contamination of reservoirs, as it is more sensitive to ecotoxicants, especially heavy metals, than the immune system of higher vertebrates. Among heavy metals nickel and cadmium are very toxic, therefore a rapid and an exact estimation of influence of toxicants on fishes is important. In this work it was studied the influence of nickel and cadmium ions on phagocytic activity of leucocytes *Cyprinus carpio*. Solutions of $3\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$ in concentrations 0,025 mg/l and 0,05 mg/l, which correspond 5 and 10 maximum permissible concentration (MPC) of ions cadmium; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in concentrations 0,5 mg/l and 1,0 mg/l, which correspond 5 and 10 MPC ions nickel were used. It was shown, that exposure with salts cadmium and nickel ions during 96 h, causes decrease in phagocytic activity of leucocytes *C. carpio*. Low concentrations of nickel ions (0,5 mg/l) slight activate phagocytosis. Test on phagocytic activity of fishes leucocytes by measuring a change of optical density (O.D. 550 nm) of the explored reaction *in vivo* can serve as biomarkers of immunotoxicity of nickel and cadmium ions. NBT-test *in vivo* and *in vitro* is the sensitive index of immunotoxicity of nickel and cadmium ions for *C. carpio*.