УДК 591.11.1+639.215.2

ВПЛИВ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ЛІМФОЦИТИ *CYPRINUS CARPIO* L.

І.З. Дрогомирецька, М.А. Мазепа
Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника

В работе исследовано действие повышенных концентраций ионов кадмия и никеля на лимфоциты *Cyprinus carpio*. Установлено, что ионы кадмия в концентрациях 0,025 и 0,05 мг/л вызывают существенное угнетение реакции бластной трансформации лимфоцитов *C. carpio*; ионы никеля угнетают образование лимфобластов при концентрации 1,0 мг/л. Продукция оксида азота лимфоцитами *C. carpio* в реакции бласттрансформации снижается под действием концентраций ионов кадмия (0,025 и 0,05 мг/л) и никеля (0,5 и 1,0 мг/л). Кроме того, ионы кадмия и никеля подавляют процесс образования розеток лимфоцитами периферической крови *C. carpio*, при увеличении концентрации ионов исследуемых металлов этот процесс усиливается.

Кадмий, никель, Т-лимфоциты, периферическая кровь, реакция бласттрансформации лимфоцитов, оксид азота, розеткообразование, Cyprinus carpio

ВСТУП

У кісткових риб, зокрема, у *Cyprinus carpio* L., присутній тимус, що відповідає за формування популяції Т-лімфоцитів, яка аналогічно як і у ссавців, здійснює функцію адаптивного імунітету [16]. Утворення В-лімфоцитів відбувається у нирці (пронефросі), яка у риб є активним органом гемопоезу. У риб розрізняють субпопуляції Т-хелперів і Т-кіллерів/супресорів, що беруть участь в імунній відповіді [13]. Весь циркулючий пул лімфоцитів поділяють на 3 структурно-функціональні групи: малі (до 6,0 мкм), середні (7–9 мкм) і великі (10,0 і більше мкм) лімфоцити. На думку А.К. Фролова [6] малі лімфоцити циркулючого пулу є ранніми постпроліферативними зрілими активованими Т- і В-лімфоцитами з високою міграційною активністю. Основна кількість тривало циркулюючих лімфоцитів, які зберігають потенції до імуногенезу, мають середній діаметр 7–9 мкм. Лімфоцити розміром 10,0 мкм в діаметрі і більше – це імунобласти, в цитоплазмі яких активується білок-синтетична система. В процесі таких перетворень імунобласти продукують оксид азоту. Оксид азоту відіграє важливу роль у запальних реакціях, індукуючи вивільнення прозапальних факторів лейкоцитами, макрофагами, тромбоцитами, ендотеліальними клітинами [17].

Здатність важких металів утворювати хелати з різними сполуками, як розчинними, так і фіксованими на поверхні імунокомпетентних клітин, доведена в ґрунтовних експериментальних дослідженнях [7]. Виявлення незадовільного рівня функціонування клітин може свідчити про імунотоксичність металу і необхідність всебічного дослідження стану водойм. Імунна система риб визнана чутливим біомаркером імунотоксичності важких металів [19]. Разом з тим, більшість дослідників вивчають переважно реакції клітинних та гуморальних факторів неспецифічної резистентності риб [2, 4]. Дослідження, що стосуються реакції лімфоцитів на екотоксиканти, нечисленні, а стосовно впливу важких металів поодинокі [9]. Метод утворення розеток еритроцитами барана і лімфоцитами риб, який впродовж 30 років використовувався для ідентифікації Т-лімфоцитів у людини та інших ссавців, залишається актуальним для риб і сьогодні. Встановлено, що у форелі формувати розетки мають здатність лімфоцити, плазматичні клітини, макрофаги, ацидофільні гранулоцити в селезінці та пронефросі [11].

Враховуючи можливий вплив іонів важких металів на поверхневі рецептори та функціональну активність лімфоцитів, метою роботи було вивчити вплив іонів кадмію та нікелю на лімфоцити периферійної крові *C. carpio*.

УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В дослідженнях використовували дворічні особини *Cyprinus carpio*. Підвищений вміст іонів кадмію та нікелю у воді створювали внесенням в акваріум розчинних солей $3CdSO_4 \times 8H_2O$ у концентраціях 0,025 мг/л, що відповідала 5-ти гранично допустимим концентраціям (ГДК) Cd^{2+}, 0,05 мг/л (10 ГДК Cd^{2+}) та $NiCl_2 \times 6H_2O$ 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 у звичайних умовах акваріуму. Здійснювали контроль і підтримували постійний гідрохімічний режим води: величина pH – 7,5, вміст кисню – 6,0 мг/л, температура води – 18-20°С.

Із хвостової вени *C. carpio* кров забирали за допомогою шприца. Готували мазки периферійної крові загальноприйнятими методами [3]. Мікроскопіювання пофарбованих препаратів здійснювали під світловим мікроскопом Leitz із застосуванням імерсійного об'єктиву, збільшення × 1600. Форменні елементи крові риб диференціювали, використовуючи «Атлас клеток крови рыб» [3]. Після цього обчислювали відсотковий вміст клітин. Для підрахунку кількості лейкоцитів крові використовували камеру Горяєва. Кількість лейкоцитів виражали в тис. кл/мм^3.

Функціональну активність клітин визначали шляхом дослідження спонтанного синтезу активних форм NO в умовах *in vitro*. Із крові риб виділяли лімфоцити шляхом центрифугування в градієнті Ficoll-Paque, клітини двічі відмивали розчином Хенкса. Підраховували лімфоцити у камері Горяєва і доводили концентрацію до 2×10^7 кл/мл. Отриману суспензію лімфоцитів вносили у флакони із культуральним середовищем, яке містило стрептоміцин, пеніцилін, L-глутамін, середовище Хенкса та 10 %-ву сироватку коропа. Для отримання супернатантів, які мають NO активність, лімфоцити риб інкубували протягом 72 годин при 27°С: 1-а серія проб – контрольна; 2-а серія – з додаванням розчину сульфату кадмію до кінцевої концентрації Cd^{2+} – 0,025 мг/л (5 ГДК); 3-я серія – з додаванням розчину сульфату кадмію до кінцевої концентрації Cd^{2+} – 0,05 мг/л (10 ГДК); 4-а серія – з додаванням розчину хлориду нікелю до кінцевої концентрації Ni^{2+} – 0,5 мг/л (5 ГДК); 5-а серія – з додаванням розчину хлориду нікелю до кінцевої концентрації Ni^{2+} – 1,0 мг/л (10 ГДК). Після інкубації вміст флаконів центрифугували 15 хв при 1000 об./хв. Після центрифугування у супернатанті визначали продукцію NO, використовуючи реактив Грейса [1], з утвореного осаду готували мазки, фарбували за Папенгеймом. На мазках підраховували кількість лімфоцитів: малі, середні і великі (бласти) для оцінки бластної трансформації.

Визначення вмісту Т-лімфоцитів проводили методом Е-розеткоутворення [5]. Під мікроскопом на мазках знаходили не менше 200 лімфоцитів, і визначали серед них відсоток розеткоутворюючих клітин (РУК). Такою клітиною вважався лімфоцит, який приєднав не менше 3 еритроцити барана. Абсолютні цифри розеткоутворюючих клітин в 1 мкл виводили на основі кількості лімфоцитів в 1 мкл крові.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерної програми «MYNOVA». Дані представлені як середнє ± похибка середнього. Для знаходження вірогідної відмінності між досліджуваними групами використовували t-test Ст'юдента [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі роботи проведено визначення кількості лейкоцитів у крові риб у камері Горяєва та підрахунок відсоткового вмісту лімфоцитів у периферійній крові *Cyprinus carpio*, а також переведено отримані відсотки у абсолютні величини.

Наступним етапом роботи було вивчення впливу іонів важких металів на реакцію спонтанної бласттрансформації лімфоцитів у риб в умовах *in vitro*. У літературних даних [8] показано наявність мітогенетичних реакцій у риб, які свідчать про різноманітність їх лімфоцитів. Нами досліджено основні структурно-функціональні групи лімфоцитів риб під дією іонів важких металів. Як видно з рис. 1, іони кадмію, при обох досліджуваних концентраціях, викликали зменшення кількість бластних лімфоцитів у 2,2 і 3,2 рази.

Кількість малих та середніх лімфоцитів під дією іонів кадмію збільшувалась. Стосовно впливу іонів нікелю на процес бласттрансформації (рис. 1), виявлено достовірне зниження кількості лімфобластів при концентрації 1,0 мг/л Ni^{2+}. Під дією іонів нікелю спостерігалось підвищення кількості малих лімфоцитів, а також зниження середніх при

концентрації Ni^{2+} 1,0 мг/л. В літературних джерелах зустрічаються повідомлення про те, що проліферативна активність лімфоцитів є біоіндикатором забруднюючих речовин, які викликають стресові реакції у риб [15].

Одним із важливих факторів неспецифічного імунітету є оксид азоту, продукція якого клітинами активно досліджується у наш час [12, 14]. Оксид азоту продукується різними клітинами – мононуклеарними фагоцитами, нейтрофілами, лімфоцитами. У наших дослідженнях показано вплив іонів кадмію та нікелю на продукцію NO лімфоцитами периферійної крові риб. В контрольній серії проб спонтанна секреція NO складала 0,053 мкг/мл. Під дією іонів кадмію спостерігалось зниження концентрації NO в супернатантах (рис. 2).

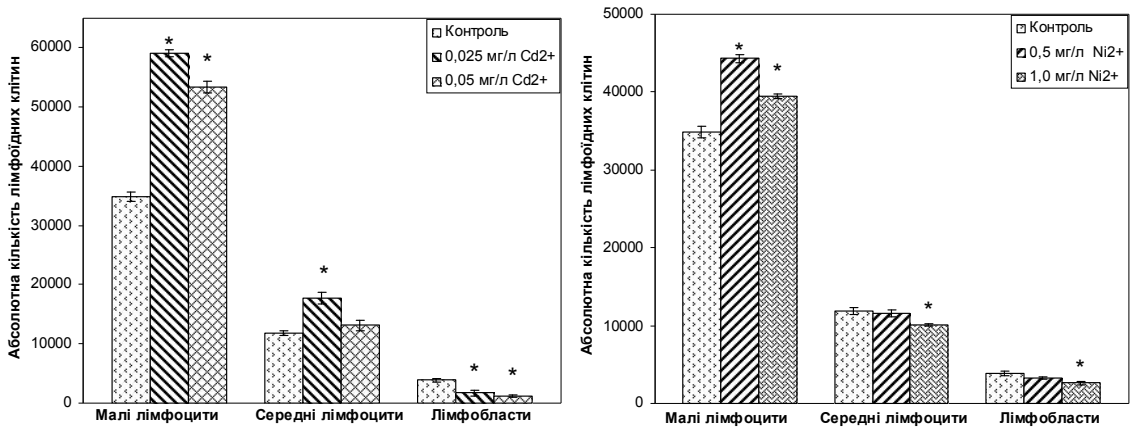


Рисунок 1 – Вплив іонів важких металів на кількість лімфоїдних клітин *Cyprinus carpio* (* – достовірна відмінність від контролю P<0,001)

При концентрації іонів кадмію 0,025 мг/л секреція NO знизилась в 1,4 рази, при збільшенні концентрації досліджуваного металу даний ефект посилювався. В роботі досліджено також дію підвищених концентрацій іонів нікелю на продукцію NO лімфоцитами периферійної крові риб (рис. 2). Вплив іонів даного металу на досліджуваний показник виявився аналогічним впливу іонів кадмію: секреція оксиду азоту знижувалась при збільшенні концентрації іонів металу.

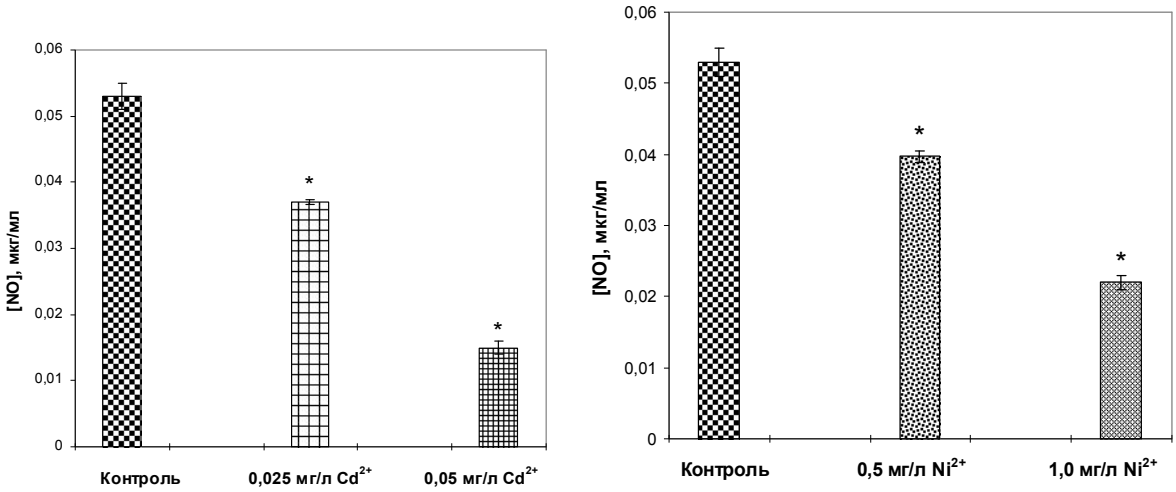


Рисунок 2 – Продукція NO лімфоцитами *Cyprinus carpio* під впливом іонів важких металів (* – достовірна відмінність від контролю P<0,001)

Наступним етапом роботи було вивчення впливу іонів важких металів на процес розеткоутворення у риб. В дослідженнях Йошида Т. [18] детально вивчені параметри, при

яких відбувається оптимальне розеткоутворення Т-лімфоцитами *C. carpio* з еритроцитами різних тварин (барана, коня, корови): pH, температура, тривалість інкубації, склад культурального середовища. Дослідниками встановлено, що за температури 15°С, при тривалості інкубації 24 години з еритроцитами барана найбільша кількість лімфоцитів бере участь у розеткоутворенні, яка склала у *C. carpio* $8{,}5\times10^4$ РУК / 10^7 лейкоцитів периферійної крові.

Нами досліджено дію іонів кадмію та нікелю на здатність Т-лімфоцитів до розеткоутворення (рис. 3, 4). Як видно з рис. 3, іони кадмію викликали достовірне зменшення кількості РУК в крові риб, а сааме, при концентрації іонів кадмію 0,025 мг/л кількість РУК знижувалась в 2 рази, при концентрації 0,05 мг/л – в 6 разів. Дія іонів нікелю на процес розеткоутворення у риб виявилась аналогічною до кадмію (рис. 4).

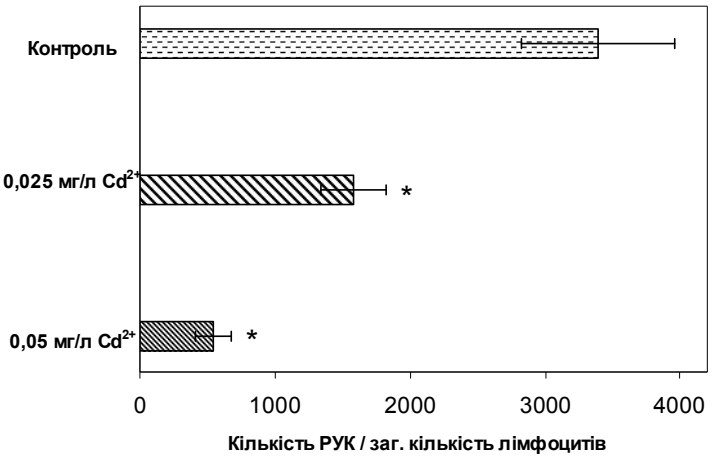


Рисунок 3 – Вплив іонів кадмію на здатність Т-лімфоцитів *Cyprinus carpio* до розеткоутворення (* – достовірна відмінність від контролю P<0,01)

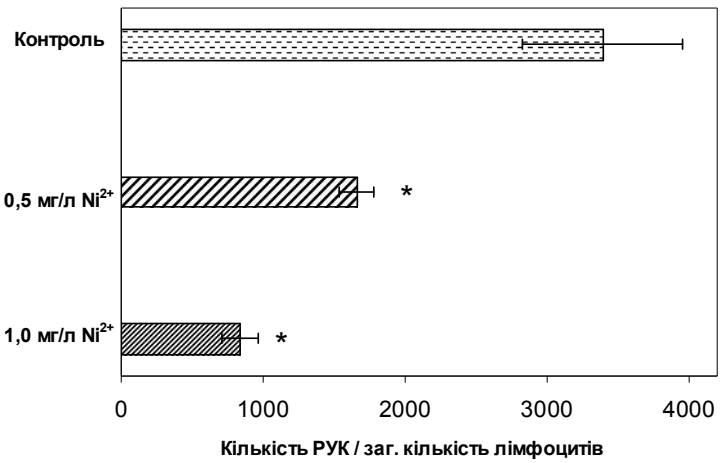


Рисунок 4 – Вплив іонів нікелю на здатність Т-лімфоцитів *Cyprinus carpio* до розеткоутворення (* – достовірна відмінність від контролю P<0,01)

При дослідженні впливу обох концентрацій іонів нікелю, здатність Т-лімфоцитів до утворення розеток з еритроцитами барана значно пригнічувалась: у 2 і 4 рази відповідно. Отримані результати дозволяють вважати, що іони кадмію та нікелю реагують з поверхневими молекулами саме на лімфоцитах, зокрема, з молекулою CD2 (молекулою адгезії).

Перспективними є дослідження порівняння дії важких металів на функціонування лімфоцитів *Cyprinus carpio*.

ВИСНОВКИ

1. Іони кадмію викликають істотне пригнічення реакції бластної трансформації лімфоцитів у *C. carpio*; іони нікелю пригнічують утворення лімфобластів при концентрації 1,0 мг/л.
2. Продукція оксиду азоту лімфоцитами *C. carpio* в реакції бласттрансформації знижується під дією концентрацій іонів кадмію 0,025 і 0,05 мг/л та нікелю 0,5 і 1,0 мг/л.
3. Іони кадмію та нікелю пригнічують процес утворення розеток лімфоцитами периферійної крові *C. carpio*, при збільшенні концентрації іонів досліджуваних металів цей процес посилюється.

ЛІТЕРАТУРА:

1. *Дріянська В.Є., Драннік Г.М., Горпінченко І.І., Фесенкова В.Й., Ващенко С.М. Продукція інтерлейкіну-1 і оксиду азоту у хворих на сечостатевий хламадіоз та вплив Ербісолу на ці показники в умовах in vitro // Імунологія та алергологія. – 2003. – №1. – С. 5–7.*
2. *Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б. Влияние тяжелых металлов на иммунофизиологический статус рыб // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123, № 4. – С. 401–408.*
3. *Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 179 с.*
4. *Лукьяненко В.И. Иммунобиология рыб. Врожденный иммунитет. – М.: «Агропромиздат», 1989. – 268 с.*
5. *Методичні вказівки до лабораторних занять великого практикуму «Методологія імунної системи ссавців» / Укл.: О.К. Фролов, А.Я. Толок. – Запоріжжя: ЗДУ, 1993. – 40 с.*
6. *Патогенетический анализ состояния иммунной системы по динамике новообразования и миграции активированных лимфоцитов во внутренней среде организма / Методические рекомендации / Фролов А.К. – Запорожье: ЗГУ, 1999. – 32 с.*
7. *Трахтенберг И.М., Колесников В.С., Луковенко В.П. Тяжелые мелаллы во внешней среде: Соврем. гигиен. и токсикол. аспекты. – Минск: Навука і тэхніка, 1994. – 285 с.*
8. *Agbede S.A., Adedeji O.B., Adeyemo O.K. Proliferative responses of tilapia T-like lymphocytes to stimulation by concanavanin A // African journal of biomedical research. – 2005. – Vol. 8, N 3. – P. 151–155.*
9. *Bols N.C., Brubacher J.L., Ganassin R.C., Lee L.E.J. Ecotoxicology and innante immunity in fish // Develompental and Comparative Immunology. – 2001. – Vol. 25. – P. 853–873.*
10. *Brooks S.P.J. A simple computer program with statistical test analysis of enzyme kinetics // Bio Techniques. – 1992. – Vol. 13. – P. 906–911.*
11. *Chiller J.M., Hodgins H.O., Chambers V.C., Weiser R.S. Antibody response in rainbow trout (Salmo gairdneri) I. Immunocompetent cells in the spleen and anterior kidney // The Journal of Immunology. – 1969. – Vol. 102. – P. 1193–1201.*
12. *Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization // Methods Enzymol. – 2008. – Vol. 440. – P. 361–380.*
13. *Nakanishi T., Aoyagi K., Xia C., Dijkstra J.M., Ototake M. Specific cell-mediated immunity in fish // Vet. Immunol. Immunopathol. – 1999. – Vol. 72. –P. 101–109.*
14. *Pietsch C., Vogt R., Neumann N., Kloas W. Production of nitric oxide by carp (Cyprinus carpio L.) kidney leukocytes is regulated by cyclic 3′,5′-adenosine monophosphate // Comparative Biochemistry and Physiology. – 2008. – Vol. 150. – P. 58–65.*
15. *Reynaud S., Deschaux P. The effects of 3-methylcholanthrene on lymphocyte proliferation in common carp (Cyprinus carpio L.) // Toxiciligy. – 2005. – Vol. 211. – P. 156–164.*

16. *Scapigliati G., Romano N., Abelli L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes // Aquaculture. – 1999a. – Vol. 172. – P. 3–28.*
17. *Wallace J.L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2005. – Vol. 100. – P. 5–9.*
18. *Yoshida T., Kitao T. Spontaneous rosette formation of carp peripheral leucocytes with mammalian red blood cells // Nippon Suisan Gakkaishi. – 1990. – Vol. 56, N 10. – P. 1579–1585.*
19. *Zelikoff J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals ? // Toxicology. – 1998. – Vol. 129, N 1. – P. 63–71.*

THE EFFECT OF HEAVY METALS IONS ON THE LYMPHOCYTES *CYPRINUS CARPIO* L.

Drogomyretska I.Z., Mazepa M.A.

Effects of the promoted concentrations of cadmium and nickel ions on lymphocytes of *Cyprinus carpio* was investigated. It is set that the cadmium ions (0,025 and 0,05 mg/l) cause substantial oppression of lymphocytes transformation reaction in *C. carpio*; the nickel ions repress formation of lymphoblast in 1,0 mg/l concentration. Production of nitric oxide lymphocytes of *C. carpio* in the reaction of transformation goes down under the action of concentrations of cadmium (0,025 and 0,05 mg/l) and nickel (0,5 and 1,0 mg/l) ions. In addition, the cadmium and nickel ions repress the process rosette forming lymphocytes of peripheral blood of *C. carpio*, at multiplying the ions concentration of the explored metals this process increases.