

**Barbara Poniedziałek*, Katarzyna Piwecka*, Jacek Karczewski*,
Jakub Żurawski*, Krzysztof Wiktorowicz***

**WPŁYW KADMU NA PROLIFERACJĘ LIMFOCYTÓW KRWI
OBWODOWEJ CZŁOWIEKA *IN VITRO***

**INFLUENCE OF CADMIUM ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES
PROLIFERATION *IN VITRO***

Słowa kluczowe: limfocyty, hodowle komórkowe, kadm.

Key words: lymphocytes, cell culture, cadmium.

The influence of cadmium salts at three different concentrations on proliferation of human peripheral lymphocytes in vitro was investigated. The lymphocytes were isolated from whole blood collected from health donors. The lymphocyte cell suspension (1 mln cells/mL) in growth medium containing fetal calf serum was prepared. PHA-L (Phytohemagglutinin - L) was used for stimulation of lymphocyte proliferation. The cell culture was conducted on microplates in 37°C at 5% CO₂. Cadmium chloride (CdCl₂) at three different concentrations (1 μM, 10 μM, 100 μM) and [3H]-thymidine were added after 48 hours of incubation. The cell culture was continued for next 24 hours. A rate of lymphocyte proliferation was analyzed by means of scintillation counter. The results indicate that cadmium chloride downregulates the proliferation of human peripheral lymphocytes.

1. WPROWADZENIE

Organizm człowieka jest stale narażony na działanie czynników środowiskowych, do których zaliczamy m.in. metale ciężkie. Mogą one prowadzić do powstawania rozmaitych zmian w podstawowych procesach metabolicznych komórki, m.in. zakłócać biosyntezę bia-

* *Dr n. med. Barbara Poniedziałek, mgr Katarzyna Piwecka, dr n. med. Jacek Karczewski, dr n. biol. Jakub Żurawski, prof. dr hab. n. med. Krzysztof Wiktorowicz – Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań; tel.: 61 853 05 71; e-mail: kasia_piwecka@tlen.pl*

łek oraz prowadzić do uszkodzenia organelli komórkowych [Wójcik 2006; Marth 2000, 2001; Krocova 2000; Tsangaris 1998].

Jednym z wielu zagrażających zdrowiu człowieka metali ciężkich jest kadm, który naturalnie występuje w niektórych glebach. Ponadto jest on wprowadzany do środowiska przez spalanie paliw kopalnych, stosowanie nawozów fosforowych oraz osady ściekowe.

Znajdujący się w środowisku kadm może być przyswojony przez rośliny uprawne i zakumulowany w organizmach morskich skorupiaków, a następnie przedostaje się drogą pokarmową do organizmu człowieka [Tellez-Plaza 2008; McKelvey 2007]. Pierwiastek ten może trafić do organizmu człowieka także przez układ oddechowy [Changcheng 2008; McKelvey 2007; El Azzouzi 1994].

Metal ten działa genotoksycznie, mutagennie, kancerogenne oraz wpływa na układ endokryny. Prowadzi także do uszkodzenia wątroby, nerek, mózgu, płuc, serca i układu nerwowego, a także modyfikuje odpowiedź immunologiczną [Skoczyńska 2002; Daum 1993; Marth 2000, 2001; Lafuente 2004; Krocova 2000; Tsangaris 1998; De La Fuente 2002; Wójcik 2006].

Komórkami docelowymi, na które działa kadm, są m.in.: limfocyty, makrofagi [Aiba 1997; Daum 1993; Marth 2000; 2001; Krocova 2000; Tsangaris 1998].

Mechanizm odpowiedzialny za reakcję na immunotoksyczne działanie kadmu nie został dokładnie poznany [Tsangaris 1998; Carey 2006]. Wiadomo, że metal ten wywiera szkodliwy wpływ na funkcjonowanie błon komórkowych ludzkich limfocytów i monocytów [De La Fuente 2002; Marth 2000, 2001], ponadto hamuje syntezę kwasów nukleinowych w różnicujących się komórkach układu immunologicznego, co może mieć wpływ na proliferację tych komórek [Daum 1993].

2. CEL I METODYKA BADAŃ

Celem pracy było zbadanie wpływu chlorku kadmu (II) na proliferację limfocytów krwi obwodowej człowieka *in vitro*.

W badaniach wykorzystano próbki krwi, pobranej na heparynę litową (próbówki Vacuette) pozyskanej od zdrowych, anonimowych dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu (8 ml od dawcy).

W celu przygotowania krwi do izolacji, mieszano ją z podłożem hodowlanym (podłoże Eagle'a „Biomed” Wytwórnia Surowic i Szczepionek) w stosunku 1:1, a następnie podwarstwiono 5 ml Gradisolu – L (AQUA – MED) i wirowano przez 30 min, przy 2000 obrotach, w temperaturze pokojowej (19°C). Po wirowaniu zebrano komórki jednojądrzaste, znajdujące się w interfazie. Następnie dwukrotnie płukano komórki. W tym celu do zebranych komórek dodano 10 ml podłoża Eagle'a i wirowano przez 15 min, przy 1500 obrotach, w temperaturze pokojowej (19°C).

Zawiesinę limfocytów umieszczono (1mln komórek/ml) w podłożu hodowlanym, z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (Fetal Bovine Serum; SIGMA). Stymulowano proliferację limfocytów mitogenem PHA-L w ilości 2,5 mg/ml hodowli (Phytohemoagglutinin – L; Roche Diagnostics). Tak przygotowana hodowla była prowadzona na 96-dółkowych mikro-płytkach U-kształtnych (NUNC), w inkubatorze CO₂ (KEBOASSAB AB) w 5% CO₂, w temperaturze 37°C.

Po upływie 48 godzin do hodowli dodano chlorek kadmu (II) – CdCl₂, uzyskując trzy stężenia (1 μM, 10 μM, 100 μM CdCl₂). Do każdego stężenia wykonano trzy powtórzenia. Dodano równocześnie tymidynę znakowaną radioaktywnie trytem (methyl-³H) Thymidine (Amersham; 1 μCi/dółek) i inkubowano przez kolejne 24 godziny.

Następnie hodowlę przeniesiono przy użyciu harvestera (SKATRON Instruments) na filtry z włókna szklanego (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences), które po wysuszeniu umieszczono w foliach Waste Bag (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences) i zatopiono w płynie scyntylicyjnym Betaplate Scint (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences). Tak przygotowane filtry umieszczono w kasetkach i dokonano pomiaru stopnia proliferacji limfocytów w liczniku scyntylicyjnym (WALLAC).

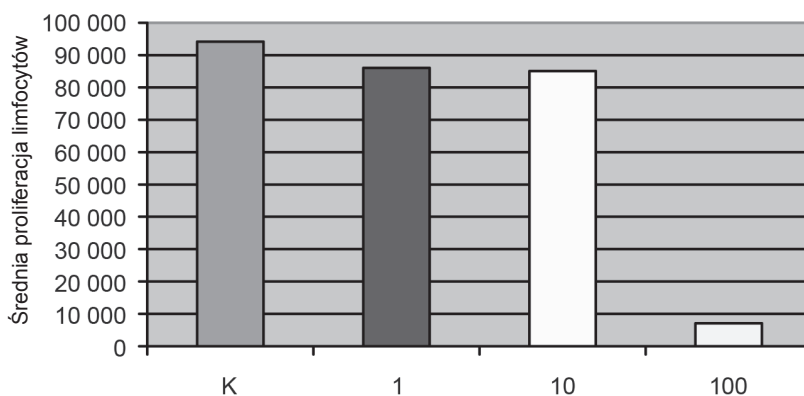
W badaniach zastosowano następujące oznaczenia:

- K – próba kontrolna,
- 1 – próba badana o stężeniu 1 μM CdCl₂,
- 10 – próba badana o stężeniu 10 μM CdCl₂,
- 100 – próba badana o stężeniu 100 μM CdCl₂.

Otrzymane wyniki poddano obróbce statystycznej za pomocą programu Statistica 6.0 (StatSoft, USA). W celu sprawdzenia rozkładu zmiennych zastosowano test Lilieforsa. Do porównania zmiennych, których rozkład był normalny, zastosowano test t-Studenta dla prób powiązanych (zmiennie K&1, K&10), dla prób zmiennych natomiast, których rozkład nie wykazywał cech normalności, zastosowano test kolejności par Wilcozona (zmiennie K&100). W obu testach wartość p <0,05 była uważana za statystycznie istotną.

3. WYNIKI

Średnia proliferacja limfocytów w hodowlach poddanych działaniu chlorku kadmu (II) była niższa od średniej proliferacji limfocytów w hodowlach kontrolnych, niepoddanych działaniu chlorku kadmu (II); rys. 1.



Rys. 1. Wpływ chlorku kadmu (II) na proliferację limfocytów krwi obwodowej *in vitro* (oznaczenia prób zgodne z podanymi w metodyce)

Fig. 1. Comparison of lymphocyte proliferation rate in control and investigated samples (statistically significant results are marked in red; samples are labeled according to the methodology)

Poddanie hodowli limfocytów działaniu soli kadmu wywołało istotne statystycznie zmiany w proliferacji tych komórek, przy stężeniu 1 μM i 100 μM CdCl_2 (tab. 1).

Tabela 1. Porównanie proliferacji limfocytów w próbach kontrolnych i badanych (kursywą zaznaczono wyniki świadczące o istotności statystycznej, oznaczenia prób zgodne z podanymi w metodyce)

Table 1. Influence of cadmium chloride on proliferation of human peripheral lymphocytes *in vitro* (statistically significant results are marked italic; samples are labeled according to the methodology)

Porównywane próby	Wartość p
K & 1	<i>0,011517</i>
K & 10	0,072189
K & 100	<i>0,000438</i>

4. DYSKUSJA WYNIKÓW

Chlorek kadmu (II) ma znaczący wpływ na proliferację limfocytów krwi obwodowej człowieka. Wpływ ten może się różnie kształtować w zależności od stężenia metalu.

Z analizy średniej proliferacji limfocytów wynika, że najwyższe stężenia soli kadmu najmocniej hamuje proliferację komórek. Dla stężenia 100 μM średnia proliferacja wyniosła zaledwie 7,6%. W przypadku pozostałych stężeń wartości te kształtowały się następująco:

1 μM – 91,4%; 10 μM – 90,3%;

Na podstawie przeprowadzonych analiz statystycznych można wnioskować o cytotoksycznym wpływie wysokich stężeń kadmu. Wpływ kadmu na proliferację limfocytów jest obecnie badany na różnych modelach doświadczalnych.

W niniejszym opracowaniu wykazano spadek średniej proliferacji limfocytów poddanych działaniu chlorku kadmu (II), w stosunku do prób kontrolnych, niepoddanych działaniu soli metalu. Stężenia 1 μM i 100 μM CdCl_2 wywołały istotne statystycznie zmiany proliferacji limfocytów krwi obwodowej człowieka.

Jak wykazały badania prowadzone przez Marth'a [2001], metale ciężkie i ich sole mogą wpływać na komórki układu odpornościowego w dwojaki sposób:

- wnikając do wnętrza komórek układu odpornościowego poprzez kanały wapniowe typu L oraz
- reagując ze strukturami na powierzchni komórek.

Nieliczne publikacje opisują wpływ kadmu na proliferację limfocytów człowieka. Obserwacje poczynione przez Marth'a wykazały hamujący wpływ wysokich stężeń kadmu na proliferację limfocytów krwi obwodowej człowieka. W badaniu tym użyto soli kadmu CdCl_2 w następujących stężeniach: 5, 25, 50, 75, 100 μM . Toksyczny wpływ kadmu obserwowano w stężeniach wyższych od 75 μM . W niższych stężeniach efekt ten był niezauważalny [Marth 2001]. Wyniki uzyskane przez Marth'a potwierdzają obserwacje poczynione w niniejszej pracy. Przy stężeniu 100 μM zaobserwowano znaczny spadek średniej proliferacji, która wyniosła zaledwie 7,6% w stosunku do kontroli.

Badania dotyczące wpływu soli kadmu na układ odpornościowy są prowadzone również na zwierzętach, tj.: szczurach, owcach i rybach. Lafuente przeprowadził badania dotyczące oddziaływania kadmu (Cd) na limfocyty krwi obwodowej szczurów. Liczba limfocytów B i T zmniejszyła się przy dawkach 5–10 ppm, w wyższych stężeniach natomiast 25–100 ppm obserwowano wzrost ich liczby [Lafuente 2004]. Dawka 10 ppm jest dawką zbliżoną do 1 μM CdCl_2 , czyli do najniższego stężenia kadmu zastosowanego w badaniach omawianych w niniejszym opracowaniu.

Hamujący wpływ niskich stężeń kadmu na proliferację limfocytów wykazały również badania na sumie europejskim (*Silurus glanis*), prowadzone przez Albergoni – CdCl_2 podawany był w stężeniach 5–40 μM i powodował hamowanie proliferacji limfocytów *in vitro* jedynie wówczas, gdy był podawany jednocześnie z mitogenem (PHA) [Albergoni 1995].

W doświadczeniach prowadzonych przez Steca na owcach użyto stężeń: 0,01; 0,1; 1; 10 oraz 100 μM CdCl_2 . Wykazano nieznaczny wzrost proliferacji limfocytów dla stężenia 1 μM CdCl_2 . Przy wyższej koncentracji (powyżej 10 μM) zaobserwowano silne hamowanie wzrostu limfocytów. W badaniach tych wykazano również, że spadek proliferacji limfocytów może być spowodowany zakłóceniami na wczesnym etapie transformacji limfocytów [Stec 2003].

PIŚMIENNICTWO

- AIBA S., TERUNUMA A., MANOME H. 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immun.* 27: 1–14.
- ALBERGONI V., VIOLA A. 1995. Effects of cadmium on lymphocyte proliferation and macrophage activation in catfish. *Fish Shellfish Immun.* 5: 301–311.
- CAREY J.B., ASHLEY A., FRANK N. et al. 2006. Immune modulation by cadmium and lead in the acute reporter antigen – popliteal lymph node assay. *Toxicol. Sci.* 91: 113–122.
- CHANGCHENG S., ZHEN X., NAGASHIMA K. et al. 2008. The heavy metal cadmium induced valosin-containing protein (VCP)-mediated aggresome formation. *Toxicol. Appl. Pharm.* 228: 351–363.
- DAUM J.R., SHEPHERD D.M., NOELLE R.J. 1993. Immunotoxicology of cadmium and mercury on B-lymphocytes. Effects on lymphocyte function. *Int. J. Immunopharmacol.* 15: 383–394.
- DE LA FUENTE H., PORTALES-PÉREZ D., BARANDA L. et al. 2002. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclears. *Clin. Exp. Immun.* 129: 69–77.
- EL AZZOZI B., TSANGARIS G.T., PELLEGRINI O. et al. 1994. Cadmium induced apoptosis in human T cell line. *Toxicology* 11: 127–139.
- KROCOCOVA Z., MACELA A., KROCA M., HERNYCHOVA L. 2000. The immunomodulatory efekt(s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. *Toxicol in Vitro* 14: 33–40.
- LAFUENTE A., GONZALES-CARRACEDO A., ESQUIFINO A. 2004. Differential effects of cadmium on blood subsets. *BioMetals* 17: 451–456.
- MARTH E., BARTH S., JELOVCAN S. 2000. Influence of cadmium on the immune system. Description of stimulating reactions. *Cent Eur J. Public Health* 8: 4–40.
- MARTH E., JELOVCAN S., KLEINHAPPL B., GUTSCHI A., BATRH S. 2001. The effect of heavy metals on the immune system at low concentrations. *IJOMEH* 14: 375–386.
- MCKELVEY W., CHARON G., NANCY J. et al. 2007. A biomonitoring study of lead, cadmium, and Merkury in the blond of New York City adults. *Environ. Health Persp.* 115: 1435–1445.
- SKOCZYŃSKA A., PORĘBAR., SIERADZKIA. i in. 2002. Wpływ kadmu i ołowiu na funkcje układu immunologicznego. *Med. Pr.* 53: 259–264.
- STEC J. 2003. Effect of cadmium and lead on [³H] - thymidine uptake in sheep lymphocytes infected with bovine leukemia virus. *Bull. Vet. Inst.* 47: 77–87.
- TELLEZ-PLAZA M., NAVAS-ACIEN A., CRAINICEANU C.M. et al. 2008. Cadmium exposure and hypertension in the 1999–2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Environ. Health. Persp.* 116: 51–56.

- TSANGARIS G., TZORTZATOOU-STATHOPOULOU F. 1998. Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. *Toxicology* 128: 143–150.
- WÓJCIK R. i in. 2006. Wpływ preparatu Immunostim – Plus na aktywność fagocytarną i metabolizm tlenowy leukocytów krwi szczurów indukowaną kadmem. *Medycyna Wet.* 62: 1179–1182.