

Elżbieta Kondera*

WPŁYW KADMU I MIEDZI NA AKTYWNOŚĆ KRWIOTWÓRCZĄ NERKI GŁOWOWEJ KARPIA

THE EFFECT OF CADMIUM AND COPPER ON HEMATOPOIETIC ACTIVITY OF CARP HEAD KIDNEY

Słowa kluczowe: ryby, metale ciężkie, toksyczność, proliferacja, apoptoza, hematopoeza.

Key words: fish, heavy metals, toxicity, proliferation, apoptosis, hematopoiesis.

Common carp ($21,6 \pm 8,3$ g) were exposed for 4 weeks to waterborne cadmium at 0.65 mg/dm³ or copper at 0.075 mg/dm³ (10 % of 96hLC50). Every week, main hematopoietic organ – head kidneys were sampled from 5 fish of each group. Frequency of proliferating and apoptotic hematopoietic precursor cells was counted in microscopic preparations. The cells were detected with immunocytochemical methods using monoclonal antibodies binding to PCNA protein (proliferating cell nuclear marker) or caspase 3 (an enzyme participating in DNA degradation during apoptosis) and stained with appropriate chromogen.

Both metals: copper and cadmium caused a significant increase in apoptotic rate with only minor increase in the rate of cell proliferation which resulted in a significant reduction of hematopoietic activity. The obtained results indicate that fish hematopoietic system is sensitive to intoxication with heavy metals.

1. WPROWADZENIE

Kadm i miedź, zaraz po rtęci, należą do najbardziej toksycznych metali ciężkich [Hella-well 1989]. Kadm jest zaliczany do ksenobiotyków i nie pełni żadnych znanych funkcji w procesach życiowych zwierząt. Miedź jest mikroelementem niezbędnym, w śladowych ilościach wspomaga np. wchłanianie oraz transport żelaza z jelita, bierze udział w procesie syntezy hemoglobiny, jest też składnikiem wielu enzymów [Hoser 1998]. W wodach metale te stanowią

* *Mgr Elżbieta Kondera – Katedra Fizjologii Zwierząt, Akademia Podlaska, ul. B. Prusa 12, 08-110 Siedlce; tel.: 25 6431228, e-mail: konderae@ap.siedlce.pl.*

szeroko rozpowszechnione zanieczyszczenia. Ich pochodzenie może być naturalne, choć w znacznej mierze jest antropogeniczne [Dojlido 1995, Wittmana i Hu 2002, Bonda i in. 2007]. Źródłem zanieczyszczenia wód miedzią są m.in. ścieki przemysłowe i komunalne oraz środki stosowane w rolnictwie oraz hodowli i terapii ryb. Antropogenicznym źródłem kadmu są ścieki z kopalń i hut kadmu, jak również odcieki ze składowisk odpadów oraz sztuczne nawożenie gleb [Dojlido 1995]. Problem związany z tymi metalami polega nie tylko na ich właściwościach toksycznych, ale także na zdolności do kumulowania się w organizmie.

Metale ciężkie mogą wnikać do organizmu ryb przez układ oddechowy, pokarmowy oraz przez skórę. Subletalne działanie kadmu i miedzi powoduje u ryb zaburzenia różnych procesów fizjologicznych: wymiany gazowej i jonowej, aktywności wielu enzymów, mechanizmów odpornościowych, regulacji hormonalnej – wywołując w konsekwencji zaburzenia zachowania, wzrostu, rozrodu i rozwoju, a także zwiększając podatność ryb na choroby [Jeziarska i Witeska 2001].

Wiadomo, że parametry krwi obwodowej i morfologia komórek krwi są dobrymi wskaźnikami wpływu środowiska (np. substancji toksycznych) na organizm ryb [Vosyliene 1999, Mazon i in. 2002, Drastichova i in. 2004, Kori-Siakpere i in. 2006], jednak mało jest danych na temat wpływu czynników środowiskowych na tkankę krwiotwórczą tych zwierząt [Peters i Schwarzer 1985, Własow i Dąbrowska 1989, Gosh i in. 2006, Som i in. 2009]. Wiadomo, że jest to tkanka bardzo aktywna – stale zachodzą w niej procesy namnażania, różnicowania i dojrzewania komórek, a procesy proliferacji i apoptozy (programowana śmierć komórki) są ważnymi mechanizmami regulacji homeostazy w tkankach. Można zatem przypuszczać, że ze względu na duże tempo wymiany komórek w tkance hematopoetycznej nerki główowej ryb jej wrażliwość na działanie różnych czynników zaburzających homeostazę organizmu jest duża.

Celem badań było porównanie wpływu subletalnych stężeń miedzi i kadmu na aktywność tkanki krwiotwórczej karpia (potencjał proliferacyjny i apoptotyczny) w warunkach ekspozycji chronicznej.

2. MATERIAŁ I METODY

Karpie (*Cyprinus carpio* L.) o masie $21,6 \pm 8,3$ g sprowadzono ze stawów hodowlanych Zakładu Doświadczalnego Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Żabieńcu w październiku 2008 roku. Przed eksperymentem ryby aklimowano przez 4 tygodnie do warunków laboratoryjnych w zbiorniku przepływowym, w temperaturze 17–18°C. Następnie ryby przeniesiono do trzech 100 dm³ akwariów (20 ryb w każdym).

Pierwsza grupa ryb przebywała cały czas w czystej wodzie (kontrola). Kolejne 2 grupy ryb, Cu (n=20) i Cd (n=20), były poddane działaniu metali przez cały czas trwania doświadczenia (4 tygodnie), w wodzie zawierającej odpowiednio 0,075 mg/dm³ miedzi lub 0,65 mg/dm³ kadmu, co stanowiło 10% 96hLC50 [Witeska i in. 2009, 2010]. Wodę stale napo-

wietrzano i codziennie wymieniano $\frac{3}{4}$ jej objętości. Temperatura wody wynosiła 17–17,5°C, wysycenie tlenem – w granicach 86–88%, a pH 6,6–7,0. Stężenie NO_2^- wynosiło 0,03–0,06 mg/dm³, a zawartość NH_4^+ – 3,9–6,1 mg/dm³. W tym okresie ryby karmiono codziennie karmą Aller Aqua Classic dla karpia, o średnicy granul 4 mm, w dawce dziennej równej 2% masy ciała. W czasie ekspozycji co tydzień (przez miesiąc) od 5 ryb z każdej grupy doświadczalnej pobierano główny organ krwiotwórczy karpia – nerki główowe, które zostały wielokrotnie pocięte skalpelem. Na odtłuszczonych szkiełkach z każdej nerki główowej delikatnie wykonano rozmazy tkanki krwiotwórczej. Preparaty suszono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, a następnie barwiono metodami immunocytochemicznymi.

Do identyfikacji komórek w stadium mitozy i apoptozy użyto metod immunocytochemicznych (standaryzowane metody firmy Dako Cytomation). Komórki w fazie apoptozy wykazują obecność kaspazy 3 (enzym rozszczepiający białka jądrowe i cytoplazmatyczne podczas apoptozy komórek), podczas gdy u proliferujących komórek obserwuje się aktywne białko PCNA (antygen jądrowy komórek w stadium proliferacji). W prezentowanych badaniach PCNA wykrywano stosując mysie przeciwciała monoklonalne anti-PCNA (Dako), a następnie wywoływano reakcję barwną za pomocą Dako mouse anti-caspase Envision system. Do kaspazy 3 wykorzystywano królicze przeciwciała monoklonalne anti-aspaza 3 (Sigma), a do wizualizacji stosowano Dako mouse anti-caspase Envision system. Wybarwione preparaty utrwalono balsamem kanadyjskim i oglądano pod powiększeniem 1000 x za pomocą mikroskopu Nikon – Eclipse E600.

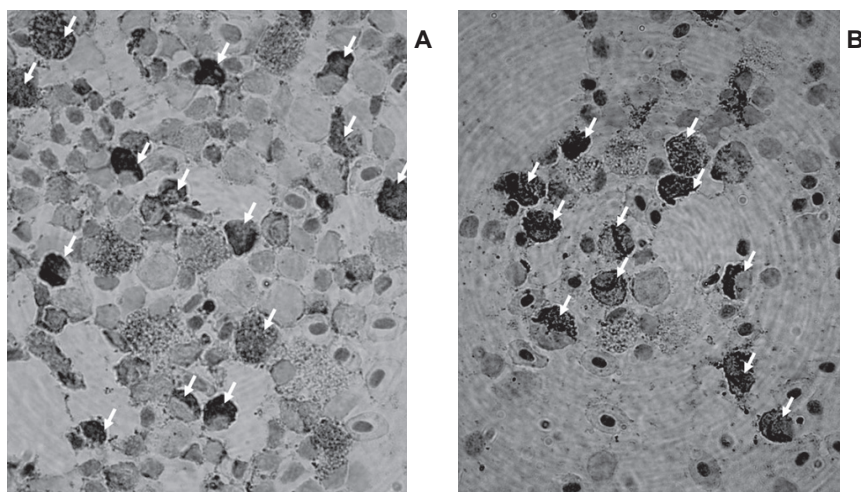
Na wybarwionych preparatach komórki PCNA-pozytywne lub kaspazo-pozytywne (barwiły się na brązowo, podczas gdy pozostałe komórki były niebieskie – fot.1.) liczono w co najmniej 6 polach widzenia i obliczano ich odsetek we wszystkich komórkach tkanki (na 500 wybranych losowo komórek). W celu oceny wpływu kadmu i miedzi na aktywność tkanki krwiotwórczej obliczono wskaźnik wymiany komórek (*turnover rate*), jako stosunek odsetka komórek proliferujących (PCNA-pozytywnych) do apoptotycznych (kaspazo-pozytywnych).

Istotność różnic między grupami analizowano nieparametrycznym testem U Manna-Whitneya, przyjmując poziom istotności $p \leq 0,05$. Wartości istotnie statystycznie różne od występujących w grupie kontrolnej oznaczono w tabeli symbolem \uparrow (wartość istotnie wyższa) i \downarrow (wartość istotnie niższa).

3. WYNIKI

W grupie kontrolnej w fazie proliferacji było ponad 3 razy więcej komórek (12,8%) niż w stadium apoptozy (4,3%) (tab. 1). Kadm i miedź w niewielkim stopniu zmieniły aktywność proliferacyjną komórek krwiotwórczych nerki główowej. Istotny wzrost odnotowano tylko w 2. i 3. tygodniu ekspozycji w wodzie z kadmem (18,1–19,1%) oraz w 4. tygodniu w wodzie z miedzią – do 19,5% (choć w wszystkich grupach doświadczalnych zanotowano tendencję wzrostową).

Udział komórek w fazie apoptozy, w stosunku do grupy kontrolnej, znacząco zwiększył się we wszystkich grupach badawczych (nawet do 15,8% komórek kaspazo-pozytywnych w grupie Cd2), a tym samym zmniejszyło się tempo wymiany komórek układu krwiotwórczego nerki główowej, na co wskazuje znacząco mniejszy (we wszystkich grupach doświadczalnych z wyjątkiem Cu3) stosunek udziału komórek w fazie namnażania do komórek apoptotycznych, najmniejszy w grupie Cd1 (1,17).



Fot. 1. Komórki PCNA-pozytywne (A) i kaspazo-pozytywne (B), barwienie immunocytochemiczne (A – Cd1, B – Cu1)

Fot. 1. PCNA-positive (A) and caspase 3-positive cells (B), immunocytochemical staining (A – Cd1, B – Cu1)

Tabela 1. Zmiany aktywności proliferacyjnej i apoptotycznej nerki główowej karpki poddanych przez 4 tygodnie działaniu $0,65 \text{ mg/dm}^3$ kadmu (Cd1, Cd2, Cd3, Cd4) lub $0,075 \text{ mg/dm}^3$ miedzi (Cu1, Cu2, Cu3, Cu4); wartość istotnie wyższa \uparrow , niższa \downarrow niż w grupie kontrolnej (K), test U Manna-Whitneya, $p \leq 0,05$, $n=5$.

Table 1. Changes of proliferation and apoptosis of hematopoietic cells in head kidney of common carp after 4 week exposure to 0.65 mg/dm^3 of cadmium (Cd1, Cd2, Cd3, Cd4), or $0,075 \text{ mg/dm}^3$ copper (Cu1, Cu2, Cu3, Cu4), values significantly higher \uparrow , lower \downarrow from K, U test, $p \leq 0.05$, $n=5$.

PARAMETR	K	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4	Cu1	Cu2	Cu3	Cu4
Proliferacja, %	12,8 \pm 3,4	15,5 \pm 2,6	19,1 \pm 4,0 \uparrow	18,1 \pm 4,0 \uparrow	18,7 \pm 4,5	13,5 \pm 3,4	13,1 \pm 4,5	14,9 \pm 5,9	19,5 \pm 5,1 \uparrow
Apoptoza, %	4,3 \pm 1,6	14,1 \pm 4,0 \uparrow	15,8 \pm 6,8 \uparrow	11,4 \pm 3,3 \uparrow	10,7 \pm 3,0 \uparrow	8,9 \pm 2,3 \uparrow	8,9 \pm 4,1 \uparrow	8,0 \pm 1,0 \uparrow	10,3 \pm 1,7 \uparrow
Proliferacja / apoptoza	3,12 \pm 0,71	1,17 \pm 0,38 \downarrow	1,41 \pm 0,64 \downarrow	1,68 \pm 0,55 \downarrow	1,88 \pm 0,68 \downarrow	1,58 \pm 0,61 \downarrow	1,58 \pm 0,50 \downarrow	1,95 \pm 0,99 \downarrow	1,87 \pm 0,28 \downarrow

4. DYSKUSJA

Proliferacja i apoptoza to podstawowe procesy, które wraz z różnicowaniem i dojrzewaniem komórek stanowią o efektywności krwiotworzenia. W prezentowanych badaniach kadm i miedź znacząco zmniejszyły całkowity potencjał tkanki krwiotwórczej nerki głowowej karpia: aktywność apoptotyczna zwiększyła się u ryb poddanych działaniu metali, a tempo namnażania komórek nie zmieniło się lub wzrosło w niewielkim stopniu. W literaturze niemal brak jest prac na temat toksycznego działania metali ciężkich na aktywność krwiotwórczą u ryb.

Saxena i in. [1992] wspominają o uszkodzeniu tkanki krwiotwórczej *Heteropneustis fossilis* przez kadm. Garofano i Hirschfield [1982] zaobserwowali eliminację wszystkich komórek (z wyjątkiem dojrzałych erytrocytów) u *Ictalurus nebulosus* poddanych krótkotrwałemu działaniu wysokiego stężenia tego metalu. Baker [1969] zaś stwierdził, że również miedź może powodować całkowitą martwicę tkanki krwiotwórczej nerek u *Pseudopleuronectes americanus*. Nieliczne są też dane na temat wpływu metali na układ krwiotwórczy innych kręgowców. Celik i in. [2005, 2009] donoszą o genotoksycznym i cytotoksycznym działaniu kadmu na komórki szpiku kostnego szczura. Mitsumori i in. [1998] badając szczury, którym podawano pokarm z dodatkiem tego metalu, obserwowali zmniejszenie tempa hematopoezy w ich szpiku. Van Den Heuvel i in. [1999, 2001] zauważyli, że mysie i ludzkie komórki prekursorowe poszczególnych linii komórkowych wykazują różną wrażliwość na związki toksyczne.

W literaturze nie ma prawie żadnych danych na temat wpływu metali ciężkich na aktywność proliferacyjną i apoptotyczną tkanki krwiotwórczej ryb, są jedynie doniesienia dotyczące innych tkanek. Lundebye i in. [1999] zaobserwowali wzrost poziomu proliferacji i apoptozy w jelitach ryb poddanych działaniu kadmu i miedzi drogą pokarmową, co oznacza, że oba metale mogą modyfikować intensywność tych procesów. Według Berntssen i in. [2001], u *Salmo salar* karmionych pokarmem zawierającym kadm, w porównaniu do ryb z grupy kontrolnej, znaczący wzrost komórek o regulowanej śmierci równoważony tymi w fazie namnażania się wydaje się skutecznie zapobiegać uszkodzeniu tkanek. Garcia-Santos i in. [2011] badając skrzela i nerki *Sparus aurata* zauważyli wzrost liczebności komórek proliferujących, co przyczynia się do osłabienia szkodliwego wpływu kadmu. Tsangaris i Tzortzou-Stathoupoulou [1998] odnotowali apoptyczną działalność kadmu wśród ludzkich komórek odpornościowych (limfocyty B były bardziej wrażliwe niż limfoblasty i limfocyty T). O wywoływaniu apoptozy u mysich trombocytów przez kadm donoszą także Fujimaki i in. [2000]. Natomiast wyniki otrzymane przez Habeebu i in. [1998] dowodzą, że ze wzrostem dawki i czasu działania kadmu rośnie tempo apoptozy i mitozy komórek wątroby myszy.

Jedyna praca, w której badano skutki działania metali ciężkich na namnażanie i apoptozę komórek krwiotwórczych u ryby (*Labeo rohita*) dotyczy miedzi [Som i in. 2009]. Autorzy

donoszą, że metal ten aktywował procesy apoptozy zarówno w stężeniu subletalnym, jak i letalnym, podczas gdy tempo rozmnażania komórek rosło jedynie w warunkach subletalnych, a malało w czasie ekspozycji letalnej.

5. WNIOSKI

1. Otrzymane wyniki wskazują, że badania tkanki krwiotwórczej warto włączyć do metod oceny wpływu różnych czynników środowiska na organizm ryb.
2. Oba badane metale istotnie zmniejszyły tempo wymiany komórek układu krwiotwórczego nerki główowej karpia – kadm w nieco większym stopniu niż miedź.

PIŚMIENNICTWO

- BAKER J. T. P. 1969. Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). J. Fish Res. Bd. Can. 26: 2785–2793.
- BERNTSEN M. H. G., ASPHOLM O. O., HYLLAND K., WENDELAAR BONGA S. E., LUNDEBYE A. K. 2001. Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed elevated dietary cadmium. Comp. Biochem. Physiol C 128: 299–310.
- BONDA E., WŁOSTOWSKI T., KRASOWSKA A. 2007. Metabolizm i toksyczność kadmu u człowieka i zwierząt. Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych 56: 87–97.
- CELIK A., COMELEKOGLU U., YALIN S. 2005. A study on the investigation of cadmium chloride genotoxicity in rat bone marrow using micronucleus test and chromosome aberration analysis. Toxicol. Ind. Health 21: 243–248.
- CELIK A., BUYUKAKILLI B., CIMEN B., TASDELEN B., OZTURK M. I., EKE D. 2009. Assessment of cadmium genotoxicity in peripheral blood and bone marrow tissues of male Wistar rats. Toxicol. Mech. Meth. 19: 135–140.
- DRASTICHOVA J., SVOBODOVA Z., LUSKOVA V., MACHOVA J. 2004. Effects of cadmium on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72: 725–732.
- DOJLIDO J., R. 1995. Chemia wód powierzchniowych. Wyd. Ekonomia i Środowisko, Białystok.
- FUJIMAKI H., ISHIDO M., NOHARA K. 2000. Induction of apoptosis in mouse thymocytes by cadmium. Toxicol. Lett. 115: 99–105.
- GARCIA-SANTOS S., VARGAS-CHACOFF L., RUIZ-JARABO I., VARELA J. L., MANCERA J. M., FANTAINHAS-FERNANDES A., WILSON J. M. 2011. Metabolic and osmoregulatory changes and cell proliferation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to cadmium. Ecotoxicol. and Environ. Safety 74: 270–278.

- GAROFANO J. S., HIRSHFELD H. I. 1982. Peripheral effects of cadmium on the blood and head kidney in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 28: 552–556.
- GHOSH D., DATTA S., BHATTACHARYA S., MAZUMDER S. 2007. Long-term exposure to arsenic affects head kidney and impairs humoral immune responses of *Clarias batrachus*. Aquatic Toxicology 81: 79–89.
- HABEEBU S. S. M., LIU J., KLAASSEN C. D. 1998. Cadmium-Induced Apoptosis in mouse liver. Toxicology and applied pharmacology 149: 203–209.
- HELLAWELL J. M. 1989. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. Elsevier, London and New York.
- HOSER P. 1998. Fizjologia organizmów z elementami anatomii człowieka. Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne, Warszawa.
- JEZIERSKA B., WITESKA M. 2001. Metal toxicity to fish. University of Podlasie, Siedlce.
- KORI-SIAKPERE O., AKE J. E. G., AVWORO U. M. 2006. Sublethal effects of cadmium on some selected haematological parameters of *Heteroclaris* (a hybrid of *Heterobranchus bidorsalis* and *Clarias gariepinus*). Int. J. Zool. Res. 2: 77–83.
- LUNDEBYE A.K., BERNTSEN M.H.G., WENDELAAR BONGA S.E., MAAGE A. 1999. Biochemical and Physiological Responses in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Following Dietary Exposure to Copper and Cadmium. Marine Pollution Bulletin Vol. 39, Nos. 1–12: 137–144.
- MAZON A. F., MONTEIRO E. A. S., PINHEIRO G. H. D., FERNANDES M. N. 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. Brazilian Journal of Biology 62: 621–631.
- MITSUMORI K., SHIBUTANI M., SATO S., ONODERA H., NAKAGAWA J., HAYASHI Y., ANDO M. 1998. Relationship between the development of hepato-renal toxicity and cadmium accumulation in rats given minimum to large amounts of cadmium chloride in the long-term: preliminary study. Arch. Toxicol. 72: 545–552.
- PETERS G., SCHWARZER R. 1985. Changes in hemopoietic tissue of rainbow trout under influence of stress. Dis. Aquat. Org. 1: 1–10.
- SAXENA M. P., GOPAL K., JONES W., RAY P. K. 1992. Immune responses to *Aeromonas hydrophila* in cat fish (*Heteropneustis fossilis*) exposed to cadmium and hexachlorocyclohexane. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48: 194–201.
- SOM M., KUNDU N., BHATTACHARYA S., HOMECHAUDHURI S. 2009. Evaluation of hemopoietic responses in Labeo rohita Hamilton following acute copper toxicity. Toxicol. Environ. Chem. 91: 87–98.
- TSANGARIS G. T., TZORTZATOY-STATHOPOULOU F. 1998. Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. Toxicology 128: 143–150.
- VAN DEN HEUVEL R. L., LEPPENS H., SCHOETERS G. E. R. 1999. Lead and catechol hematotoxicity in vitro using human and murine hematopoietic progenitor cells. Cell Biol. Toxicol. 15: 101–110.

- VAN DEN HEUVEL R. L., LEPPENS H., SCHOETERS G. E. R. 2001. Use of in vitro assays to assess hematotoxic effects of environmental compounds. *Cell Biol. Toxicol.* 17: 107–116.
- VOSYLIENE M. Z. 1999. The effect of heavy metals on haematological indices of fish (survey). *Acta. Zool. Lituanica* 9: 76–82.
- WLASOW T., DĄBROWSKA H. 1989. Cellular changes in the blood and haemopoietic tissues of common carp exposed to sublethal concentration of ammonia. *Aquatic Living Resources* 2: 169–174.
- WITESKA M., KONDERA E., LIPIONOGA J., JASTRZĘBSKA A. 2010. Dynamics of oxygen consumption rate, and red blood parameters in common carp *Cyprinus carpio* L. after acute copper and cadmium exposures. *Fresenius Environmental Bulletin* 19: 115–122.
- WITESKA M., KONDERA E., LIPIONOGA J., NIENAŁTOWSKA R. 2009. The changes in blood leukocyte profile of common carp induced by acute exposures to copper and cadmium. *Fresenius Environmental Bulletin* 18(8): 1534–1540.
- WITTMAN R., HU H. 2002. Cadmium exposure and nephropathy in a 28-year-old female metals worker. *Environ. Health. Perspect* 110: 1261–1266.