

ORIGINALAN NAUČNI RAD – ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

UDK 619:546.47/48:636.3

INTERAKCIJE IZMEĐU KADMIJUMA I CINKA KOD MALIH
PREŽIVARA*INTERACTION BETWEEN CADMIUM AND ZINC IN SMALL
RUMINANTS

Sunčica Borozan, Gordana Gađanski-Omerović, J. Bojkovski**

Interakcije između teških metala i biogenih metala su kompleksne i od suštinskog značaja za toksične efekte u organizmu. Najčešće interakcije kadmijuma nastaju između cinka, bakra, gvožđa i kalcijuma. Kadmijum se smatra jednom od najtoksičnijih supstancija iz okoline i ubraja u prvu grupu karcinogena. Osnova toksičnosti ovog metala je dejstvo na enzimski sistem u ćeliji, na metaloenzime iz kojih istiskuje značajne biogene metalne jone kao što su Zn^{2+} , Cu^{2+} i Ca^{2+} . Pored toga ima visok afinitet prema slobodnim -SH grupama u biomolekulima. Ove interakcije se odvijaju kako u procesima apsorpcije, tako i pri distribuciji i ekskreciji kadmijuma i biogenih elemenata. Nakon apsorpcije kadmijum se albuminom transpotuje do svih organa i ekskretuje urinom preko bubrega ispoljavajući svoje nefrotoksično dejstvo.

Ključne reči: kadmijum, cink, bakar, interakcije, albumin, kreatinin

Skraćenice: Cd – kadmijum; Zn – cink; Cu – bakar; Fe – gvožđe;
Mt – metalotionein; reaktivne kiseonične vrste – ROS;
bakar, cink-zavisna superoksidna dizmutaza – Cu, Zn-SOD. /
*Abbreviations: Cd – cadmium, Zn – zinc, Cu – copper, Fe – iron,
Mt – metallothionein, ROS – reactive oxygen species,
Cu,Zn-SOD – copper, zinc-dependent superoxide dismutase*

Uvod / Introduction

Toksičnost teških metala *in vivo* nije samo posledica njihovog prisustva, već potiče i od interakcija sa drugim elementima i biomakromolekulima. Poslednjih godina od posebnog značaja su istraživanja interakcija teških metala i biogenih metala koje su osnova njihove toksičnosti. Kadmijum (Cd) je jedna od najtoksičnijih supstancija iz okoline i predstavlja veliku opasnost za žive sisteme.

* Rad primljen za štampu 9. 5. 2005. godine

** Dr Sunčica Borozan, docent, dr Gordana Gađanski-Omerović, red. profesor, dr Jovan Bojkovski, docent, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Apsorpcija i akumulacija Cd u tkivima zavisi od ishrane, vitaminskog statusa, uzrasta i pola [8], nedostatka gvožđa (Fe) [15], ali i od interakcija između kadmijuma i cinka u kojima favorizuju iste bioligande ili su antagonističke prirode. Posebno je značajno da se Cd i Zn kod sisara identično metabolišu stimulišući sintezu niskomolekulskog proteina metalotioneina (Mt). Sa Zn postoji kompeticija za isti protein u cirkulaciji vezujući se za eritrocite i albumin, a u tkivima za Mt. Intracelularni protein, Mt, niske molekulske mase (do 6-7 000 Da), sadrži oko 30 posto amino-kiselina sa sumporom, nalazi se u jetri, bubrezima, crevima i pankreasu. Regulator je metabolizma bakra (Cu) i Zn i učestvuje u detoksikaciji pri izloženosti Cd vezujući 7 atoma Zn ili Cd, a 12 atoma Cu. Sposobnost vezivanja teških metala ispoljava se preko dva domena, - i -domen, tako što -domen vezuje ukupno četiri atoma, a -domen tri atoma Zn ili Cd [1]. Metalotionein istovremeno može da gradi komplekse i sa Cd i Zn u molarnom odnosu 5:2, i takav kompleks povećava toksičnost kadmijuma indukujući oštećenje DNA *in vitro* [17].

Cink je esencijalni element neophodan za metabolizam proteina i održavanje integriteta membrana. On ima antioksidantnu ulogu u zaštiti sulfhidrilnih grupa od oksidacije i učestvuje u reakcijama sprečavanja stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS-a) izazvanim prelaznim metalima. U farmakološkim dozama ima zaštitno dejstvo od različitih hepatotoksičnih agenasa, menja biohemijske puteve kao što je metabolizam nekih metala i fosfolipida [19].

Kadmijum zamenjuje Fe i Cu u različitim proteinima kao što su transferin, feritin i ceruloplazmin povećavajući jonsku koncentraciju ovih elemenata što uzrokuje oksidativni stres preko Fentonove reakcije [11], oštećujući DNA, izazivajući kancer i apoptozu [23, 25]. Genotoksičnost Cd nije direktna, ali preko ROS-a, kao drugi glasnik učestvuje u kaskadnim reakcijama aktivacije enzima metilovanja citozina u molekulu DNA izaziva promene u genskoj ekspresiji [21]. Kadmijum istiskuje bakar iz bakra, cink-zavisne superoksidne dizmutaze (Cu, Zn-SOD) i zauzima 45 posto aktivnog centra ovog enzima. Ova reakcija menja strukturu disulfidnih mostova i konformaciju nativnog enzima smanjujući njegovu katalitičku efikasnost [12]. Narušena homeostaza bakra i prekidi homeostatskih mehanizama uzrokuje genetske i progresivne neurološke bolesti [16].

Bez obzira na put apsorpcije Cd se iz krvi brzo eliminiše i koncentruje u nekoliko organa, kod ljudi to su testisi [26], a kod životinja jetra i bubrezi [5]. U ovim organima se nalazi uglavnom ukupan telesni Cd. Ova akumulacija je posledica sposobnosti ovih tkiva da sintetišu velike količine Mt, čije prisustvo evidentno smanjuje toksičnost Cd [24]. Cd utiče i na homeostazu intracelularnog Ca^{2+} [9, 18, 2]. Pokazano je da kompleks Mt-Cd indukuje kalcijumuriju. Pored toga, Cd izaziva poremećaj u mineralizaciji tj. u formiranju koštanog mineralnog matriksa inhibirajući aktivnost alkalne fosfataze usled interakcije sa Zn, što povećava rizik od fraktura u kasnijim godinama [10]. Ovi poremećaji su dokazani kod dugotrajnog izlaganja niskim koncentracijama ili akutnom dozom Cd.

Nakon apsorpcije kadmijum se albuminom transpotuje do svih organa i ekskretuje urinom preko bubrega, ispoljavajući svoje nefrotoksično dej-

stvo. Ovaj transport uključuje i ulaz Cd u hepatocite i renalne ćelije istim mehanizmom transporta za biogene metale (Cu, Zn i Ca). Ulazak ovih metala u ćelije odvija se preko specifičnih proteina, čija genska deficitarnost uzrokuje određene bolesti. Akutna izloženost Cd izaziva karakteristična oštećenja proksimalnih renalnih tubula. A hepatotoksičnost pored akumulacije Cd deluje na sintezu albumina i druge proteine krvne plazme [20].

Cilj ovoga rada je bio da se ispituju interakcije kadmijuma i metala cinka i bakra, njihov uticaj na sintezu albumina i nefrotoksično dejstvo ovih metala, ispitivanjem nivoa albumina i kreatinina u krvnom serumu malih preživara.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Ispitivanja su izvedena na ovcama rase „Ile de France” (n=20), koje su jele hranu koja je sadržavala 20 g/kg suve supstancije Cd u toku tri meseca. Kontrolnu grupu sačinjavale su životinje koje su jele hranu bez prisustva teških metala (n=10). Serum ispitivanih životinja je zamrznut na temperaturi od -20°C i čuvan do analize. Analiza teških metala i metala u serumu ispitivanih životinja, kao i u uzorcima hrane obavljena je atomskom apsorpcionom spektrometrijom (Perkin Elmer Corp., USA) posle mineralizacije sa azotnom kiselinom uz dodatak vodonik-peroksida na TEKATOR DIGESTOR-u 100A. Koncentracija kreatinina određena je modifikovanom Jaffe metodom, a koncentracija albumina bromkrezol zelenim [3] spektrofotometrijski korišćenjem spektrofotometra CECIL CE 2021.

Rezultati i diskusija / Results and discussion

Rezultati analize koncentracije Cd, Zn i Cu u serumu životinja koje su jele hranu (ogledna grupa) u toku tri meseca sa niskim sadržajem ovog elementa prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Sadržaj kadmijuma, cinka i bakra u serumu ispitivanih životinja kontrolne i ogledne grupe /

Table 1. Cadmium, zinc and copper content in serum of control and exposed animal groups

Ispitivani element / <i>Investigated element</i>	Kontrolna grupa ¹ / <i>Control group</i> x ± sd	Ogledna grupa ² / <i>Exposed group</i> x ± sd	Značajnost razlike ^{1,2} / <i>Significance</i>
Kadmijum / <i>Cadmium</i> (g/L)	2.03 ± 0.35	6.33 ± 0.25	p<0.001
Zink / <i>Zinc</i> (g/L)	810 ± 115	1500 ± 150	p<0.001
Bakar / <i>Copper</i> (g/L)	1100 ± 300	843 ± 215	p<0.01

Prikazani rezultati ukazuju na statistički značajno povećanu koncentraciju Cd u krvnom serumu životinja ogledne grupe (6.33 ± 0.25 g/L) u poređenju sa kontrolnom grupom (2.03 ± 0.35 g/L, $p < 0,001$). Pored toga dokazan je i sadržaj Cd u kontrolnoj grupi životinja što može da bude posledica prethodne kontaminacije ovim teškim metalom, s obzirom na njegov period eliminacije koji iznosi od 10 do 30 godina [13].

Da bismo utvrdili da li nastaje interakcija između Cd i biogenih metala analiziran je sadržaj Zn i Cu u krvnom serumu ovih životinja. Rezultati analize prikazani su u tabeli 1.

Dejstvom Cd dokazan je signifikantan porast Zn ($p < 0,001$) kod ogledne grupe životinja koji je bio 1500 ± 150 g/L u odnosu na kontrolnu grupu, 810 ± 115 g/L. Ovi rezultati ukazuju da je nastala interakcija ova dva metalna jona, pri čemu Cd zamenjuje Zn u metaloenzimima kao što su karboanhidraza, alkalna fosfataza i Cu,Zn-SOD [22]. S obzirom da cink ima antioksidantnu ulogu ovo povećanje sprečava stvaranje ROS-a izazvanim prelaznim metalima [19]. Naša ispitivanja su pokazala signifikantan porast Zn u serumu životinja ogledne grupe, što je verovatno posledica vezivanja Cd za SH-grupe u proteinima koji su bitni za transportovanje Zn i Cu u hepatične i renalne ćelije. Utvrđeno je da se Cd najviše akumulira u bubrežima, a manje u jetri kao Mt-Cd kompleks, pri čemu je zamenjen Zn u ovom kompleksu [1]. Ove interakcije su značajne za metabolizam cinka koji se odvija ne samo u bubrežima i jetri, već i u cirkulaciji tokom transportovanja [24]. Neki autori su uočili da izlaganje Cd izaziva akumulaciju Zn u hepatocitima i bubrežima, tako da je sadržaj Zn u hepatocitima izrazito veći u životinja tretiranih ovim metalom. Povećana koncentracija Zn ima višestruko zaštitno dejstvo zaustavljajući čak i proliferaciju testikularnih lezija [14].

Kod životinja ogledne grupe uočava se pad sadržaja Cu (843 ± 215 g/L), u odnosu na životinje kontrolne grupe (1100 ± 300 g/L, $p < 0,01$). Homeostaza bakra je neznatno narušena rezultujući deponovanje bakra u ekstrahepatičnim tkivima [4, 16].

Da bi se utvrdilo da li Cd deluje na sintezu albumina u našim ispitivanjima odredili smo koncentraciju i albumina u serumu ispitivanih životinja. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Sadržaj albumina i kreatinina u serumu ispitivanih životinja kontrolne i ogledne grupe

Table 2. Albumin and creatinine content in serum of control and exposed animal groups

Ispitivani parametar <i>Investigated parameter</i>	Kontrolna grupa ¹ <i>Control group</i> x ± sd	Ogledna grupa ² <i>Exposed group</i> x ± sd	Značajnost razlike ^{1,2} <i>Significance</i>
Albumin / <i>Albumin</i> (g/L)	26,70 ± 2,70	17,98 ± 2,15	p<0,001
Kreatinin / <i>Creatinine</i> (mol/L)	140 ± 35	230 ± 40	p<0,001

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivana koncentracija Cd ukazuje na hepatotoksičnost i ogleda se u smanjenoj sintezi albumina $17,98 \pm 2,15$ g/L, u odnosu na kontrolnu grupu ispitivanih životinja, $26,70 \pm 2,70$ g/L; ($p < 0,001$). Ovi rezultati su u saglasnosti sa našim prethodnim ispitivanjima proteinskih adukata u krvnom serumu, dejstvom kadmijuma i olova [6, 7, 20]. Dokazan je i uticaj Cd na koncentraciju α_2 i α_1 serum-globulina [1].

Bubrezi su mesto delovanja Cd i istovremeno i ciljani organ Cd toksičnosti [5] kao i glavno mesto ispoljavanja antagonističkog dejstva Cd i Zn ukazuju rezultati analize sadržaja kreatinina prikazanih u tabeli 2.

Rezultati analize ukazuju na porast koncentracije kreatinina u serumu izloženih životinja (230 ± 40 mol/L) u odnosu na sadržaj kreatinina u serumu kontrolne grupe životinja (140 ± 35 mol/L). Povišeni sadržaj kreatinina ukazuje na smanjenu funkciju bubrega, što potvrđuje da su bubrezi ciljani organi za Cd^{2+} jone [5], vezujući se za Mt ili istiskujući Zn iz Zn-Mt kompleksa. Višak slobodnog jonskog Cd vezuje se za citosolske proteine i izlučuje se urinom delujući nefrotoksično. Jonski Cd indukuje povišenje kreatinina u serumu a Mt-Cd kompleks kalcijumuriju i pojavu proteinurije [1, 6].

Zaključak / Conclusion

Kadmijum je jedan od najtoksičnijih agenasa iz okoline i predstavlja veliku opasnost za žive sisteme. Apsorpcija i akumulacija Cd u tkivima zavisi od adekvatne ishrane i količine unetog cinka, ali i od interakcija između Cd i Zn u kojima se favorizuju isti bioligandi. Dokazana povećana koncentracija Zn u serumu ogleđnih životinja ($p < 0,001$), ukazuje da je došlo do interakcije ova dva metalna jona, pri čemu je Cd istisnuo Zn u metaloenzimima. Povišena koncentracija Zn udruženo deluje sa Cd izazivajući disfunkciju bubrega, na šta ukazuju i rezultati analize sadržaja kreatinina ($p < 0,001$), poremećaj u funkciji jetre, koja se ogleda u smanjenoj sintezi albumina ($p < 0,001$), lezije, teške dijareje i povećana smrtnost ispitivanih jedinki.

Homeostaza bakra je neznatno narušena rezultujući deponovanje bakra u ekstrahepatičnim tkivima i njegovo smanjenje u serumu.

Napomena: Ova istraživanja je finansiralo Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, u okviru projekta 1518 i 1740.

Literatura / References

1. Baldwin D. R., Marshall W. J.: Heavy metal poisoning and its laboratory investigation Ann Clin Biochem. 36, 267-300, 1999. - 2. Benders Jelko, Flo Ulrich, Thorsten Gelá, Scha Fer, Dieter Leibfritzá, Stefan Hechtenberg, Detmar Beyersmann: Study of the interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homeostasis using ^{19}F -NMR

spectroscopy Biochem. J. 322, 793-799, 1997. -3. Bishop L. M., Duben-Fon Laufen J.: Clinical Chemistry. Lippincott, Philadelphia, US, 1985. - 4. Blazka M. K., Shaikh Z. A.: Cadmium and mercury accumulation in rat hepatocytes interaction with other metal ions. Toxicol Appl Pharmacol 113, 118-125, 1992. - 5. Borozan Sunčica., Bojkovski J, Matić Valerija: Influence of heavy metals on health status weaned piglets 5th International Symposium of Metal Elements in Environment, Medicine and Biology, Timisoara, Romania, 7, 2002. - 6. Borozan Sunčica., Matić V., Bojkovski J., Vujanac I.: Heavy metals nephrotoxicity, Proceedings The 5 Middle-European Buiatrics Congress. XV. Magyar Buiatrikus Kongresszus, Jun, 2-5 Hajduszoboszlo, Hungary. 551-555, 2004. -7. Borozan Sunčica, Gađanski-Omerović Gordana, Bojkovski J, Stajković S.: Clinical aspects of the effects of ROS-caused impairments of hepatocytes, Proceedings The 5 Middle-European Buiatrics Congress. XV. Magyar Buiatrikus Kongresszus, Jun, 2-5 Hajduszoboszlo, Hungary, 556-561, 2004. - 8. Bremner I.: The toxicity of cadmium, zinc and molybdenum and their effects on copper metabolism. Proc Nutr Soc., 38, 235-242, 1979. - 9. Brzóska M. M., Moniuszko-Jakoniuk J.: The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism. Archives of Toxicology 72, 63-73, 1998. - 10. Brzóska M. M., Moniuszko-Jakoniuk J., Jurczuk M., Galazyn-Sidorczuk M., Rogalska J.: Effect of short-term ethanol administration on cadmium retention and bioelement metabolism in rats continuously exposed to cadmium. Alcohol. Alcohol. 35, 5, 439-445, 2000. - 11. Casalino E., Calzaretti G. Sblano., Landriscina C.: Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. Toxicology 179, 37-50, 2002. - 12. Frraroni M., Rypniewski W., Wilson K. S., Viezzoli M. S., Banci L., Bertini I., Mangani S.: The crystal structure of the monomeric human SOD mutant F50E/G51E/E133Q at atomic resolution. The enzyme mechanism revisited. J Mol Biol. 288, 3, 413-26, 1999. - 13. Jarup L., Berglund M., Elinder C. G., *et al.*: Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. Scand J Work Environ Health 24, 1-51, 1998. - 14. Krasowska A., Wlostowski T., Bonda E.: Zinc protection from fluoride-induced testicular injury in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). Toxicol Lett. 147, 229-35, 2004. - 15. Leazer T. M., Liu Y., Klaassen C. D.: Cadmium absorption and its relationship to divalent metal transporter-1 in the pregnant rat Toxicol Appl Pharmacol. 185, 18-24, 2002. - 16. Mercer J. F. B.: The molecular basis of copper-transport Trends Molecul Med 7, 64-69, 2001. - 17. Müller T., Schuckelt R., Jaenicke L.: Cadmium/zinc-metallothionein induces DNA strand breaks in vitro. Arch. Toxicol. 65, 20-26, 1991. - 18. Ohta H., Ichikawa M., Seki Y.: Effects of cadmium intake on bone metabolism of mothers during pregnancy and lactation J. Exp. Med, 196, 33-42, 2002. -19. Speich M., Pineau A., Ballereau F.: Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. Clin Chim Acta. 12, 1-11, 2001. - 20. Stajković Silvana, Borozan Sunčica, Gađanski-Omerović Gordana: Protein adduct and heavy metals, ICOSECS 4, Serbia and Montenegro, Book Abstract, I, 226, 2004. - 21. Tao L., Siming Yang., Mi Xie., Paula M. Kramer., Michael A.: Pereira Hypomethylation and overexpression of *c-jun* and *c-myc* protooncogenes and increased DNA methyltransferase activity in dichloroacetic and trichloroacetic acid-promoted mouse liver tumors. Cancer Letters 185-193, 2000. - 22. Uchida M., Teranishi H., Aoshima K., Katoh T., Kasuya M., Inadera H.: Reduction of erythrocyte catalase and superoxide dismutase activities in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Jinzu river basin, Japan Toxicol Lett. 151, 3, 451-457, 2004. -23. Valverde M. T., Rojas E.: Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interactions. Mutagenesis 16, 265-270, 2001. - 24. Waalkes M. P.: Cadmium carcinogenesis Mutat Res. 533, 107-20, 2003. - 25. Wätjen W., Beyersmann D.: Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. Biometals 17, 65-78, 2004. - 26. World Health Organization (WHO): Environmental Health Criteria 134 Cadmium. WHO, Geneva, 131-196, 1992.

ENGLISH

INTERACTION BETWEEN CADMIUM AND ZINC IN SMALL RUMINANTS

Sunčica Borozan, Gordana Gađanski-Omerović, J. Bojkovski

Interactions between heavy metals and biogenic metals are complex and of crucial importance for toxic effects in the organism. The most frequent interactions with cadmium take place between zinc, copper, iron, and calcium. Cadmium is considered one of the most toxic substances in the environment, and it belongs to the first group of carcinogens. The basic toxicity of this metal is in its effect on the enzyme system in the cell, on metalloenzymes from which it eliminates significant biogenic metal ions, such as Zn^{2+} , Cu^{2+} and Ca^{2+} . Moreover, cadmium has a high affinity for free –SH groups in biomolecules. These interactions take place both in the absorption processes, and in the distribution and excretion of cadmium and biogenic elements. Following its absorption, cadmium is transported by albumin to all organs and excreted through the kidneys in urine, this exhibiting its nephrotoxic effects.

Key words: Cadmium, zinc, copper, interactions, albumin, creatinine.

РУССКИЙ

ИНТЕРАКЦИИ МЕЖДУ КАДМИЕМ И ЦИНКОМ У МАЛЕНЬКИХ ЖВАЧНЫХ

Сунчица Борозан, Гордана Гађански-Омерович, Й. Бойковски

Интеракции между тяжёлыми металлами и биометаллами комплексные и существенного значения для токсических эффектов в организме. Наиболее частые интеракции кадмия наступают между цинком, медью, железом и кальцием. Кадмий считается одним из наиболее токсических веществ из окрестности и относится к первой группе карциногенов. Основа токсичности этого металла действие на ферментную систему в клетке, на металлоферменты из которых вытесняет значительные биометаллические ионы как Zn^{2+} , Cu^{2+} и Ca^{2+} . При этом имеет высокий аффинитет к свободным –SH группам и биомолекулам. Эти интеракции развиваются как в процессах абсорбции, так и при дистрибуции и экскреции кадмия и биоэлементов. После абсорбции кадмий альбумином транспортируется до всех органов и экскретируется мочей через почки, проявляя своё нефротоксическое действие.

Ключевые слова: кадмий, цинк, медь, интракции, альбумин, креатинин